



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**İNSAN RETİNAL PİGMENT EPİTELYAL HÜCRE
HATTINDA RESVERATROL VE NİKOTİNAMİD'İN
HÜCRE ÇOĞALMASI VE APOPTOZİSE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Tuğba KESKİN

Danışman
Doç. Dr.Şengül TURAL

SAMSUN
2023

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**İNSAN RETİNAL PİGMENT EPİTELYAL HÜCRE
HATTINDA RESVERATROL VE NİKOTİNAMİD'İN
HÜCRE ÇOĞALMASI VE APOPTOZİSE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Tuğba KESKİN

Danışman

Doç. Dr. Şengül TURAL

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 221S328 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Tuğba KESKİN tarafından, **Doç. Dr. Şengül TURAL** danışmanlığında hazırlanan “**İNSAN RETİNAL PİGMENT EPİTELYAL HÜCRE HATTINDA RESVERATROL VE NİKOTİNAMİD’İN HÜCRE ÇOĞALMASI VE APOPTOZİSE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 22.3.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Ebru ALP Giresun Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Özlem EŞKİ YÜCEL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Serbülent YİĞİT Ondokuz Mayıs Üniversitesi L.üstü Eğt.Enst.,Tıbbi Biyo. ABD Veterinerlik Genetiği ABD	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Ayşe Feyda NURSAL Hitit Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Şengül TURAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

05 /01/ 2023
Tuğba KESKİN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : İNSAN RETİNAL PİGMENT EPİTELYAL HÜCRE HATTINDA RESVERATROL VE NİKOTİNAMİD'İN HÜCRE ÇOĞALMASI VE APOPTOZİSE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 06.01.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

06 /01/2023
Doç. Dr. Şengül TURAL

ÖZET

İNSAN RETİNAL PİGMENT EPİTELYAL HÜCRE HATTINDA RESVERATROL VE NİKOTİNAMİD'İN HÜCRE ÇOĞALMASI VE APOPTOZİSE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuğba KESKİN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Mart/2023

Danışman: Doç. Dr. Şengül TURAL

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) metabolik, fonksiyonel, genetik ve çevresel faktörlerin etkilediği, patogeneğinde oksidatif stres kaynaklı retinal pigment epitelyum (RPE) hasarın sorumlu olduğu ve özellikle kuru tipinde kesin bir tedavi yöntemi olmayan bir hastalıktır. Muhtemel tedavi seçeneği olarak, antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikleri aracılığıyla mitokondriyal disfonksiyonu azaltarak aditif yada sinerjik etkisi olabileceği düşünülen resveratrol ve nikotinamid'in kuru tip YBMD modelindeki potansiyel etkinliğinin gösterilmesi amaçlandı.

Bu çalışmada YBMD modeli oluşturmak için, sağlıklı RPE hücreler standart seviyede oksidatif strese maruz bırakıldı. Etken maddelerin belirlenen konsantrasyonlarda ve sürelerde ayrı ayrı ve kombinasyon halinde sağlıklı ve oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanmasının hücre çoğalmasına olan etkisi CCK-8 analizi ile ölçüldü ve aynı parametrelerin apoptoz analizi ise flow sitometri yöntemi ile belirlendi. Bu analizlerde, her iki etken madde için en iyi sonucu veren etkili dozlar ve kombine dozun, *SIRT1* gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi Kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile belirlendi. Veriler istatistiksel açıdan değerlendirildi.

Etken maddeler ve kombine doz seçenekleri arasında, YBMD modelindeki progresyonun azalması yönünde, en etkili hücre viabilite ($p<0,001$), hücre proliferasyon indeksi ($p<0,001$) ve hücre apoptoz+nekroz değerlerinin ($p<0,001$) 72.saat inkübasyon süresinde 100µmol/L resveratrol+1mM/L nikotinamid kombine doz uygulamasında gerçekleştiği tespit edildi. İlgili kombine dozun sağlıklı RPE hücre grubunda sitotoksik etki göstermediği ($p>0,05$) ve yara onarımını sağlayacak düzeyde proliferatif etki sağladığı ($p=0,01$) görüldü ve ayrıca hasarlı RPE hücre grubunda *SIRT1* gen ekspresyon seviyesini arttırdığı belirlendi ($p<0,001$).

Araştırmamızda etken maddelerin ayrı ayrı uygulamalarına kıyasla kombine doz uygulamalarının, hücre proliferasyonunu, hücre viabilitesini ve *SIRT1* gen ifade düzeyini etkili bir şekilde arttırdığı ve hücre apoptoz+nekroz oranını ise etkili bir şekilde azalttığı görüldü ve iki etken maddenin sinerjik etki gösterdiği belirlendi. Proje araştırmamız, ilgili kombine dozun kuru tip YBMD modelindeki etkisini araştıran ilk çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: Resveratrol, Nikotinamid, Kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF RESVERATROL AND NICOTINAMIDE ON CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELL LINE

Tuğba KESKİN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Ph.D., March/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şengül TURAL

Age-related macular degeneration (AMD) is a disease that is affected by metabolic, functional, genetic and environmental factors, oxidative stress-induced retinal pigment epithelium (RPE) damage is responsible in its pathogenesis, and there is no definitive treatment method, especially in the dry type. As a possible treatment option, it was aimed to demonstrate the potential efficacy of resveratrol and nicotinamide which are thought to have additive or synergistic effect by reducing mitochondrial dysfunction through their antioxidant, antiapoptotic and antiinflammatory properties in the dry type AMD model.

In this study, healthy RPE cells were exposed to standard levels of oxidative stress to form the AMD model. The effect of the application of the active substances separately and in combination at the determined concentrations and times on cell proliferation of healthy and oxidative stress damaged RPE cells was measured by CCK-8 assay and apoptosis analysis of the same parameters was determined by flow cytometry method. In these analyzes, the effective doses that gave the best results for both active substances and the combined dose on *SIRT1* gene expression level were determined by Quantitative Real-Time PCR method. Data were evaluated statistically.

Among the active substances and combined dose options, the most effective cell viability ($p<0.001$) cell proliferation index ($p<0.001$) and cell apoptosis+necrosis values ($p<0.001$) in the direction of decreasing progression in the AMD model were determined to be occurred in the combined dose application of 100 μ mol/L resveratrol+1mM/L nicotinamide at the 72nd hour incubation period. It was observed that the relevant combined dose did not show cytotoxic effect in the healthy RPE cell group ($p>0.05$) and provided a proliferative effect at a level that would provide wound repair ($p=0.01$) and it was also determined that it increased *SIRT1* gene expression level in the damaged RPE cell group ($p<0.001$).

In our study, it was observed that the combined dose application of the active substances effectively increased cell proliferation, cell viability and *SIRT1* gene expression level and effectively decreased cell apoptosis+necrosis rate compared to their separate applications and it was determined that the two active ingredients showed a synergistic effect. Our project research is the first study to investigate the effect of the relevant combined dose in a dry type AMD model.

Keywords: Resveratrol, Nicotinamide, Dry type age related macula degeneration

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde her türlü imkân ve desteği sağlayan ve akademik çalışmalarımda büyük emeği geçen, her daim desteğini hissettiren kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Şengül TURAL'a,

Bu tezin hazırlanması sırasında desteğini esirgemeyen, engin tecrübelerinden faydalandığım ve çalışma azmini örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Nurten KARA'ya,

Doktora tez projemize fikir ve destek veren, önerileriyle projemizin oluşmasında büyük katkısı olan değerli hocam Doç. Dr. Özlem EŞKİ YÜCEL'e,

Doktora eğitimimde ders aldığım, tecrübelerinden ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Sezgin ÖZGÜR GÜNEŞ'e ve tıbbi biyoloji anabilim dalımızın değerli öğretim üyelerine,

Hizmet alımı kapsamında deneysel araştırmalarımızda bizlere yardımcı olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne ve Öğr. Gör. Dr. Eda UĞURTAY'a, Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü Öğr. Gör. Dr. Melek YÜCE'ye ve Öğr. Gör. Dr. Esra ALBAYRAK'a,

Hücre hattının temini konusunda bizlere yardımcı olan Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM) Müdürü Sayın Prof. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a ve değerli ekibine,

Aldığım eğitim boyunca ilgi, destek ve sevgilerini esirgemeyen, bu aşamaya gelene kadar her daim maddi manevi yanımda olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 221S328 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Tuğba KESKİN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu	5
2.1.1. Retinal Pigment Epitelyal Hücrelerin Disfonksiyonu ve Kuru Tip YBMD.....	8
2.1.2. Kuru Tip YBMD Patogenezisinde Oksidatif Stres	10
2.1.3. Kuru Tip YBMD Patogenezisinde Mitokondriyal Disfonksiyonun Rolü.....	14
2.1.4. Resveratrol, Nikotinamid ve <i>SIRT1</i> Geninin YBMD Tedavisindeki Rolü	16
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1. Hücre Hattı	22
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	22
3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler	23
3.4. Medyum, Çözeltiler ve Etken Maddelerin Hazırlanması	23
3.4.1. Serumlu DMEM/F-12, HEPES (Tam Büyüme Ortamı) Hazırlanışı.....	23
3.4.1.1. Fetal Bovine Serum (FBS) Çözülmesi	23
3.4.1.2. Penicilin-Streptomisin Antibiyotiklerinin Çözülmesi	24
3.4.2. Serumsuz DMEM/F-12, HEPES Hazırlanışı.....	24
3.4.3. %0.25 Trypsin-EDTA (TE) Hazırlanışı	24
3.4.4. Etken Maddelerin Hazırlanışı.....	24
3.4.4.1. Resveratrol'ün Hazırlanışı.....	25
3.4.4.2. Nikotinamid'in Hazırlanışı	25
3.4.4.3. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Çözeltisi'nin Hazırlanışı.....	25
3.5. Hücre Kültürü	26
3.5.1. Hücrelerin Çözülmesi.....	26
3.5.2. Adherent (Yapışkan) Hücrelerin Pasajlanması	27
3.5.3. Hücrelerin Dondurulması	28
3.6. Hücre Viabilite Analizleri	29
3.6.1. Tripan Mavis Deneyi	29

3.6.2.	Bio-Rad Automated Cell Counter Cihazında Hücre Sayımı	29
3.6.3.	Thoma Lamı ile Hücre Sayımı	30
3.6.4.	Thoma Lamında Hücre Sayım Hesaplamaları	30
3.7.	CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Viabilite Analiz Yöntemi	31
3.7.1.	Sağlıklı RPE Hücrelerinde Standart Seviyede Oksidatif Stres Oluşumu	32
3.7.1.1.	Kuru Tip Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyon Modeli	32
3.7.1.2.	Oksidatif Stres Medyumunun Belirlenmesi	33
3.7.1.3.	Oksidatif Stres Protokolü	34
3.8.	CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi ile Hücre Viabilite ve Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	35
3.9.	CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Hasarlı RPE Hücre Analizi	36
3.10.	CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Kombine	38
	Dozların Değerlendirilmesi.....	38
3.11.	CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Sağlıklı RPE.....	40
	Hücre Analizi	40
3.12.	Apoptoz Analizleri	41
3.12.1.	Flow Sitometrik Analiz.....	42
3.12.2.	Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Hasarlı RPE Hücrelerde Apoptoz Analizi.	43
3.12.3.	Sağlıklı RPE Hücrelerde Apoptoz Analizi.....	44
3.12.4.	Apoptoz Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	46
3.13.	<i>SIRT1</i> Gen ifade Düzeyinin Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile Belirlenmesi	46
3.13.1.	Tedavi Deney Hücre Kültür Grupları ve Kontrol Hücre Kültür	47
	Grubundan Total RNA'nın Elde Edilmesi.....	47
3.13.2.	RNA miktarı ve RNA Saflık Ölçümü	49
3.13.3.	Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	49
3.13.4.	Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı.....	50
3.13.5.	Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile Belirlenmesi	51
3.13.6.	Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi	51
3.14.	İstatistiksel Analiz Yöntemleri ve Sonuçların Değerlendirilmesi	53
4.	BULGULAR.....	54
4.1.	Hücre Kültürü Çalışmaları	54
4.1.1.	Sağlıklı Hücre Kültürünün Pasajlanması	54
4.1.2.	Oksidatif Stres Protokolü Sonrası Hasarlı RPE Hücre Kültürü	56
4.2.	Hücre Viabilite Analizleri	59
4.2.1.	Tripan Mavisi Deneyi	59
4.2.1.1.	Bio-Rad Automated Cell Counter Cihazında Hücre Sayımı	59
4.2.1.2.	Thoma Lamı ile Hücre Sayımı	59

4.4.	CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Hasarlı RPE Hücrelerinde Hücre Viabilite ve Hücre Proliferasyon Analiz Sonuçları	66
4.4.1.	Etken Maddelerin Ayrı Ayrı Analiz Sonuçları.....	66
4.4.2.	Etken Maddelerin Kombine Uygulama Analiz Sonuçları.....	72
4.4.2.1.	Kombine Dozların Yara Onarımına Etkisi	78
4.5.	CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Sağlıklı RPE Hücrelerinde Hücre Viabilite ve Hücre Proliferasyon Analizi	80
4.5.1.	IC50 Değerinin Hesaplanması	86
4.6.	Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Hasarlı RPE Hücrelerde Apoptoz Analiz Sonuçları	89
4.6.1.	24. saat inkübasyon süresi için apoptoz analiz sonuçları.....	91
4.6.2.	48. saat inkübasyon süresi için apoptoz analiz sonuçları.....	96
4.6.3.	72. saat inkübasyon süresinin apoptoz analiz sonuçları.....	101
4.1.	Sağlıklı RPE Hücrelerde Apoptoz Analiz Sonuçları	106
4.7.1.	24. saat inkübasyon süresinin apoptoz analiz sonuçları.....	108
4.7.2.	48. saat inkübasyon süresinin apoptoz sonuçları	111
4.7.3.	72. saat inkübasyon süresinin apoptoz analiz sonuçları.....	114
4.8.	Kitlerden Alınan Sonuçların Değerlendirilmesi	117
4.9.	SIRT1 Gen ifade Düzeyinin Kantitatif Değerlendirilmesi.....	117
5.	TARTIŞMA.....	120
6.	SONUÇ.....	128
	KAYNAKLAR	134
	ÖZ GEÇMİŞ	140

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
CCK-8	: Cell Counting Kit-8
cDNA	: Komplementer DNA
DMEM/F12	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FBS	: Fetal Bovine Serum
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
mtDNA	: mitokondriyal DNA
NAD ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
RPE	: Retinal Pigment Epitelyum
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SIRT1	: Sirtuin 1
TE	: Tripsin-EDTA
YBMD	: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kuru tip YBMD modeli.....	7
Şekil 2.2. <i>SIRT1</i> 'in YBMD gelişimindeki rolü.....	21
Şekil 4.1a. Sağlıklı RPE hücrelerinin pasaj sonrası invert mikroskop görüntüsü (10X).....	55
Şekil 4.1b. Tripsin-EDTA solüsyon uygulaması sonrası sağlıklı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10X).....	55
Şekil 4.1c. Tripsin-EDTA solüsyon uygulaması sonrası sağlıklı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (20X).....	56
Şekil 4.2a. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinin 10X invert mikroskop görüntüsü.....	57
Şekil 4.2b. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında 24 saat oksidatif stres medyumuna maruz bırakılan hasarlı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10X).....	57
Şekil 4.2c. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında 48 saat oksidatif stres medyumuna maruz bırakılan hasarlı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10X).....	58
Şekil 4.2d. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında 72 saat oksidatif stres medyumuna maruz bırakılan hasarlı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10X).....	58
Şekil 4.3. CCK-8 Analiz yöntemi ile oksidatif stres protokolünün uygulanması sonucu 96 kuyucuklu mikrolaka görüntüsü.....	61
Şekil 4.4. Oksidatif stres medyumunun üç ayrı protokol sonucunda gözlemlenen hücre viabilite kaybı.....	65
Şekil 4.5. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 24 saat inkübasyon sonrası hücre proliferasyon indekslerinin (%) karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.6. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 48 saat inkübasyon sonrası hücre proliferasyon indekslerinin (%) karşılaştırılması	71
Şekil 4.7. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 72 saat inkübasyon sonrası hücre proliferasyon indekslerinin (%) karşılaştırılması.....	72
Şekil.4.8. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası uygulanan kombine dozların hücre proliferasyon indeks karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.9. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için 72 saat inkübasyon sonrası uygulanan kombine dozların proliferasyon indeks karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.10. 24,48,72 saat inkübasyon sonrası oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücrelere uygulanan ilgili kombine dozların kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücreleri ile proliferasyon indeks karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.11. 24 saat inkübasyon süresi sonrası kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine kıyasla etken maddelerin ve kombine dozun hücre proliferasyon indeks (%) karşılaştırılması.....	83

Şekil 4.12. 48 saat inkübasyon süresi sonrası kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine kıyasla etken maddelerin ve kombine dozun hücre proliferasyon indeks (%) karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.13. 72 saat inkübasyon süresi sonrası kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine kıyasla etken maddelerin ve kombine dozun hücre proliferasyon indeks (%) karşılaştırılması.....	86
Şekil 4.14. 72 saat inkübasyon süresi sonunda, resveratrol etken maddesi için IC50 değeri.....	87
Şekil 4.15. 72 saat inkübasyon süresi sonunda, nikotinamid etken maddesi için IC50 değeri.....	87
Şekil 4.16. 24.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri.....	91
Şekil 4.17. 24 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranların karşılaştırılması.....	93
Şekil 4.18a. 24 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi.....	94
Şekil 4.18b. Apoptoz analizi için 24 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü.....	95
Şekil 4.19. 48.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri.....	96
Şekil 4.20. 48 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranların karşılaştırılması.....	98
Şekil 4.21a. 48 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi.....	99
Şekil 4.21b. Apoptoz analizi için 48 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü.....	100
Şekil 4.22. 72.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri.....	101
Şekil 4.23. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranların karşılaştırılması.....	103
Şekil 4.24a. 72 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi.....	104
Şekil 4.24b. Apoptoz analizi için 72 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü.....	105
Şekil 4.25. 24.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri.....	108
Şekil 4.26a. 24 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi.....	109
Şekil 4.26b. Apoptoz analizi için 24 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü.....	110
Şekil 4.27. 48.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri.....	111
Şekil 4.28a. 48 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi.....	112

Şekil 4.28b. Apoptoz analizi için 48 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü.....	113
Şekil 4.29. 72.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri.....	114
Şekil 4.30a. 72 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki hücre medyum değişimi.	115
Şekil 4.30b. Apoptoz analizi için 72 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü.....	116
Şekil 4.31. <i>SIRT1</i> geni için 72 saat inkübasyon sonrası rölatif kat değişimi.....	118
Şekil 4.32. <i>SIRT1</i> geni için 72 saat inkübasyon sonrası oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücrelere kıyasla gen ekspresyon kat artışı.....	118



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo. 3.1. Revers transkripsiyon PCR reaksiyon karışımı.....	50
Tablo.3.2. Reverse transkripsiyon PCR programı.....	50
Tablo. 3.3. qRT PCR için kullanılan hedef gen primer dizileri ve uzunlukları.....	51
Tablo 3.4. qRT-PCR reaksiyon karışımı.....	52
Tablo 3.5. qRT-PCR programı.....	52
Tablo 4.1. Oksidatif stres medyumunun 1. oksidatif stres protokolü.....	62
Tablo 4.2. Oksidatif stres medyumunun 2. oksidatif stres protokolü.....	63
Tablo 4.3. Oksidatif stres medyumunun 3. oksidatif stres protokolü.....	64
Tablo 4.4. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 24. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon analiz sonuçları	68
Tablo 4.5. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 48. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon analiz sonuçları.....	69
Tablo 4.6. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 72. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon analiz sonuçları.....	70
Tablo 4.7. Farklı dozlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde en yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değeri veren etken madde seçenekleri.....	72
Tablo 4.8. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 24. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks analiz sonuçları.....	74
Tablo 4.9. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 48. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks analiz sonuçları.....	75
Tablo 4.10. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 72. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks analiz sonuçları.....	76
Tablo 4.11. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 24. saat, 48. saat ve 72. saat inkübasyon sonrası bu hücrelerdeki yara onarımına etkisi.....	79
Tablo 4.12. Sağlıklı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin ve ilgili kombine dozun 24. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerleri.....	81
Tablo 4.13. Sağlıklı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin ve ilgili kombine dozun 48. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerleri.....	83
Tablo 4.14. Sağlıklı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin ve ilgili kombine dozun 72. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerleri.....	85

Tablo 4.15. Apoptoz analizlerinde uygulanmak üzere her bir inkübasyon süresi için seçilen etken madde seçenekleri ve kombine dozlar.....	88
Tablo 4.16. 24 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları.....	92
Tablo 4.17. 24 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranlarının Post Hoc/Tukey HSD testine göre elde edilen p değerleri.....	94
Tablo 4.18. 48 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları.....	97
Tablo 4.19. 48 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranlarının Post Hoc/Tukey HSD testine göre elde edilen p değerleri.....	99
Tablo 4.20. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları.....	102
Tablo 4.21. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranlarının Post Hoc/Tukey HSD testine göre elde edilen p değerleri.....	104
Tablo 4.22. 24 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları.....	109
Tablo 4.23. 48 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları.....	112
Tablo 4.24. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları.....	115
Tablo 4.25. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için Δ CT değerlerinin Post Hoc/Tukey HSD testine göre elde edilen p değerleri.....	119

1. GİRİŞ

Yaşa bağı makula dejenenasyonu (YBMD) 65 yaş üstü popülasyonda görme kaybının başlıca nedenlerindendir. Bu retinal hastalığın yaklaşık %85'ni kuru tip YBMD oluşturur. Hastalığın patogenezi metabolik, fonksiyonel, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşimini içerir. Bu yüzden YBMD'nin patogenezi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Özellikle kuru tip YBMD için kesin bir tedavi yöntemi yoktur. Bu retinal hastalıkla ilgili önemli tıbbi, bireysel, sosyal ve ekonomik maliyetler dikkate alındığında yeni önleyici ve tedavi edici stratejilere acil ihtiyaç olduğu açıktır (Chiras vd., 2015; Munia vd., 2020). Sadece birkaç çalışma kuru tip YBMD gelişiminde önemli olan faktörlere odaklanmıştır. Adından da anlaşılacağı gibi en güçlü risk faktörü ileri yaştır. Yapılan araştırmalar sonucunda patogenezin anlaşılmasındaki önemli gelişmeler, retinadaki oksidatif hasarın rolüne odaklanmıştır. Oksidatif stres, patogenezin primer tetikleyicilerinden biri olarak karşımıza çıkar ve bu retinal hastalığın gelişimine katkıda bulunarak yaşlı retinada kronik inflamasyonu indüklediği açıkça görülmektedir. Dolayısıyla, oksidatif stresi artıran faktörlerin hastalığı şiddetlendirdiğini, oksidatif stresi azaltan faktörlerin hastalığın ilerlemesini yavaşlattığını gösteren çalışmalarla bu durum desteklenmektedir (Chiras vd., 2015; Hernández-Zimbrón vd., 2018).

Glokom ve yaşa bağı makula dejenerasyonu (YBMD) önemli sağlık ve toplumsal yüklerle dünya çapında geri dönüşü olmayan körlüğün önde gelen nedenleridir. Bugüne kadar hiçbir klinik tedavi mevcut değildir. Tedaviler sadece yönetilebilir semptomları ve risk faktörlerini hedeflemektedir ancak hastalığın altında yatan patolojiyi düzeltememektedir. Her iki hastalık da retina patolojisinde nörodejeneratiftir ve hücre disfonksiyonunu, hücre dejenerasyonunu ve nihai hücre kaybını tetikleyen olayların çoğu; mitokondriyal disfonksiyon, inflamasyon ve oksidatif strese bağlıdır. Yaşlanma ise artmış oksidatif stresle güçlü bir şekilde ilişkilidir. Oksidatif stresin ve *PARP* aktivasyonunun yaş ile birlikte artması, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) hemostazı üzerinde önemli bir baskı oluşturmaktadır. İnflamasyon gibi yaşla ilişkili hastalıklar, *PARP-1*'in aşırı ekspresyonuyla artmaktadır. Bunun sonucunda NAD^+ seviyeleri ile birlikte Sirtuin1 (*SIRT1*) aktivitesi de yaşla birlikte düşmektedir. *SIRT1* aktivitesindeki azalma, yaşlanmanın karakteristik bir özelliğini temsil eder ve muhtemelen çeşitli yaşa bağı kronik inflamasyon ve metabolik hastalıkların önde gelen nedenlerinden biri olan

mitokondriyal disfonksiyona neden olur. Mitokondriyal disfonksiyon, YBMD'nin dejeneratif süreçlerinde piramidin en altında görülmektedir. Sonuç olarak bu mekanizmaların hepsi NAD^+ biyoyararlanımı ile bağlantılıdır (NAD^+ 'nın yetersiz üretimi ya da NAD^+ tüketen enzimlerin aşırı tüketimi). Bu durum göz önüne alındığında, YBMD için varsayılan terapötik bir strateji olarak NAD^+ seviyesinin artırılması önerilmektedir. NAD^+ seviyesindeki artış ekzojen kaynaklardan elde edilebilmektedir. NAD^+ öncüllerinin nöroprotektif ve yaşlanma üzerine pozitif etkilerine dair artan kanıtlar, güvenlik seviyeleri ile ilgili araştırmaları yoğunlaştırmıştır (Chung ve Joe, 2014; Cimaglia vd., 2020).

Hücrel yaşlanma artan oksidatif stres ve DNA hasarına maruz kalma ile ilişkilidir. Bu tür streslere karşı hücrel savunma mekanizmaları olarak *PARP*'lar, sirtuinler ve mevcut NAD^+ (Nikotinamid adenin dinükleotit) 'dır. Retinal NAD^+ seviyeleri yaşla birlikte azalır ve yaşlanan nöronları hastalık ile ilgili saldırılara karşı savunmasız hale getirir. NAD^+ kullanımının artması, mevcut NAD^+ kullanılabilirliğini azaltır, bu durumda yaşa bağlı disfonksiyonları arttırarak hücrel yaşlanmayı uyarır. NAD^+ 'nın öncül moleküllerden biri olan nikotinamid, yaşa bağlı NAD^+ kaybının giderilmesi için seçilmiştir. Mitokondride *SIRT*s aktivitesinin modölatörleri olan nikotinamid ve resveratrol potansiyel nöroprotektif faktörler olarak bilinmektedir. Resveratrol, *SIRT1* ve *PGC-1 α* aktivitesini indükler ve mitokondriyal aktivitenin indüksiyonunu sağlar. Nikotinamid ise *PARP* ve *SIRT2* aktivitesinin inhibisyonunu ve NAD^+ metabolizmasının indüksiyonunu sağlar. Resveratrol'ün serbest radikalleri uzaklaştırdığı ve giderdiği, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi endojen antioksidanların gen ekspresyonlarını arttırdığı bilinmektedir. Nikotinamid'in ise hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarında güçlü antioksidan özellik gösterdiği görülmüştür (Arduíno vd., 2010; Ilkhani vd., 2016; Williams vd., 2017; Kirkland ve Meyer-Ficca; 2018; Nashine vd., 2020).

Toplumda yaşlı popülasyonda yaygın olarak görülen, tedavi seçenekleri yetersiz ve araştırma aşamasında olan kuru tip YBMD ve bu hastalığın progresyonu sonucu gelişebilen yaş tip YBMD ile ilgili sosyoekonomik sorunlar, bu hastalıkların takip ve tedavisinin sosyal güvenlik kurumlarına getirdiği büyük maliyet yükü ve hastanelere getirdiği iş yükü göz önüne alındığında, yeni önleyici ve tedavi edici stratejilere acil ihtiyaç duyulduğu aşikardır.

Görme kaybının birincil nedenlerinden biri olmasına rağmen YBMD, AREDS (yaşa bağlı göz hastalıkları çalışmaları) formülasyonları ve anti-VEGF ilaçlarının sık intravitreal enjeksiyonlarını içeren sınırlı tedavi seçeneklerine sahiptir. Bu hastalığın patogenezinde oksidatif stresin rolü göz önüne alınarak, kuru tip YBMD için antioksidan terapi yöntemleri klinik olarak desteklenmektedir. AREDS çalışmaları oküler hastalıkların progresyonunda besin takviyelerinin koruyucu etkisine ışık tutar. AREDS1 ve AREDS2 araştırmalarında kuru tip YBMD için diyet antioksidan etken maddelerin hastalığın progresyonunu azaltabileceği görülmüştür. AREDS1 (2001) araştırması, antioksidanlar (β -karoten), vitaminler (C ve E) ve mineraller (bakır) ile günlük oral takviyenin, YBMD gelişme riskini 5 yılda %25 azalttığını ve aynı zamanda yüksek dozlarda çinko ve vitaminlerin kuru tip YBMD progresyonunu ve görme kaybı riskini azalttığını göstermiştir. Bu etken maddelerin bir gözde orta ve geç progresyonlu YBMD hastaları için kullanılması önerilmiştir. AREDS2 (2013) çalışmasında ise ilk çalışmada kullanılan beta karoten yerine lutein ve zeaksantin olarak değiştirilmesi gerektiği bildirilmiştir. Çünkü beta karotenin sigara içenler arasında akciğer kanseri görülme sıklığını arttırdığı görülmüştür (Chiras vd., 2015; Munia vd., 2020; Nashine vd., 2020).

Kuru tip YBMD dejenerasyonu için yapılan kapsamlı literatür taraması sonucunda muhtemel tedavi seçeneği olarak, RPE (Retinal Pigment Epitelyum) mitokondrisini potansiyel terapötik hedef seçebilecek, antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikte olan ve sonuç olarak mitokondriyal disfonksiyonu azaltabilecek etken maddeler araştırılmıştır. Özellikle doktora tez araştırmamızda, AREDS1 ve AREDS2 çalışmaları göz önünde bulundurularak, kuru tip YBMD gelişimi ve progresyonunu azaltmayı hedef alan ve antioksidan özelliği güçlü olan etken maddelerin araştırılması planlanmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında ve literatür taraması sonucunda, antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikte olan; oksidatif stresle zarar gören RPE mitokondrisini hedef alarak mitokondrinin işlevini iyileştirebilecek etken maddeler olarak resveratrol ve nikotinamid'in kuru tip YBMD tedavisindeki potansiyel etkinliğini göstermeyi amaçladık.

Doktora tez araştırmamızda, resveratrol ve nikotinamid'in birlikte kullanımı ile antioksidan ve antiapoptotik etkinin artmasına bağlı olarak, bu iki etken maddenin kombinasyonunun aditif veya sinerjik etkisi araştırılarak tedavide daha etkili sonuçlar almak adına literatüre katkı sağlaması amaçlanmıştır. Böylelikle, bulunan en etkili kombine dozun oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı ARPE-19 hücrelerine kıyasla, hasarlı RPE hücreleri için onarım düzeyinde hücre proliferasyonunu sağlayacak, apoptoz oranını azaltacak ve *SIRT1* geninin ekspresyon düzeyini arttıracak bir tedavi stratejisi, bu hücrelerde rejeneratif etki sağlayarak, kuru tip YBMD'de progresyonu azaltabilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

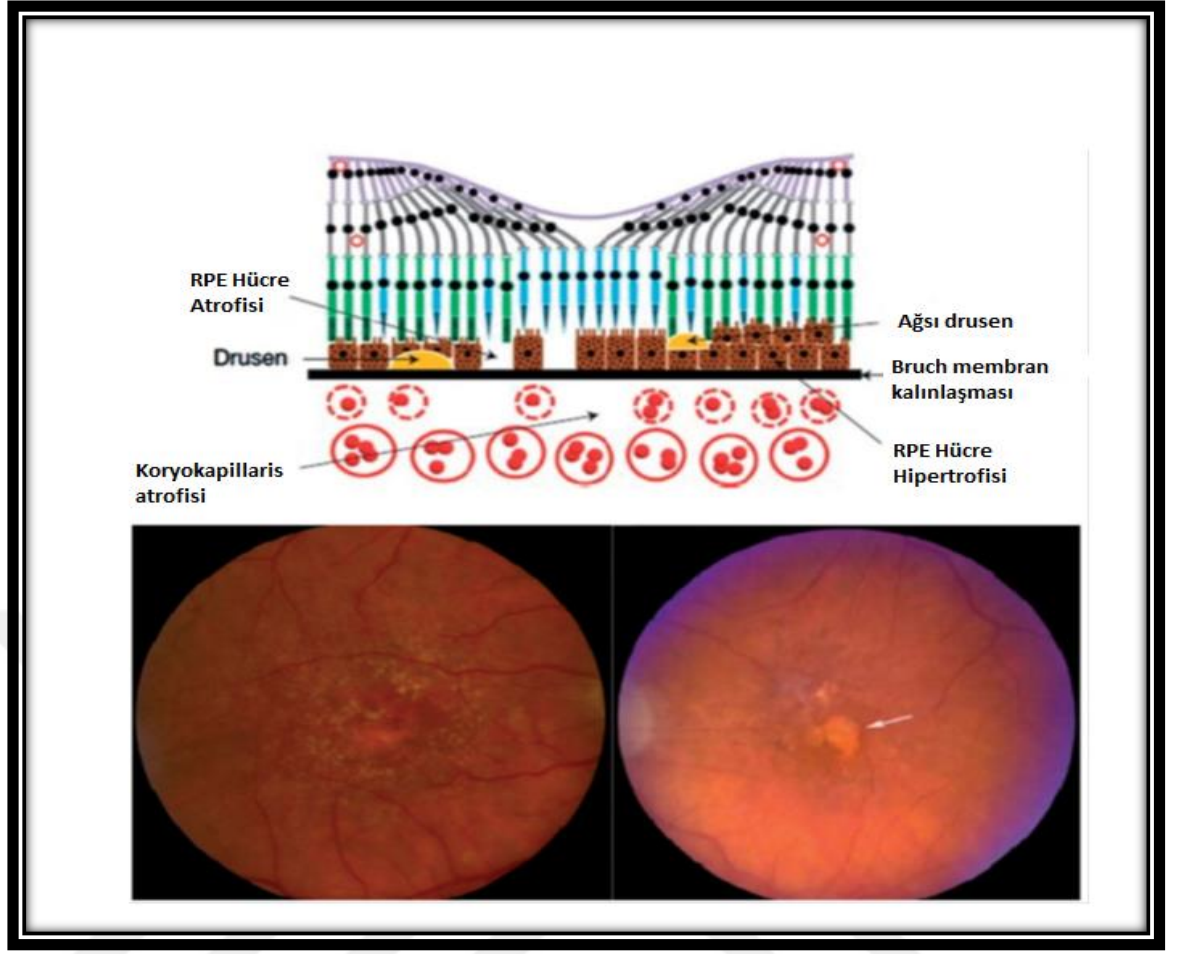
2.1. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) retinanın merkezi kısmı olan makulanın ilerleyici dejeneratif bir hastalığıdır ve retinanın en yoğun fotoreseptör popülasyonuna sahip bölgesi olan makuladan fotoreseptör ve retina pigment epitel (RPE) hücrelerinin kronik, geri dönüşümsüz ve ilerleyici kaybını ifade eder. Görme kaybının önde gelen nedeni olarak gösterilen YBMD; 65 yaş üstü kişilerde ciddi ve geri dönüşümü olmayan kompleks, kronik, nörodejeneratif bir hastalıktır. İnsan popülasyonlarında ve YBMD hastalarından alınan donör gözlerde yapılan çalışmalar YBMD'nin patogenezinin anlaşılmasına ilişkin önemli bilgiler sağlamıştır. Kanıtlar, YBMD'nin hem genetik hem de çevresel risk faktörlerine sahip multifaktöriyel bir hastalık olduğunu göstermektedir. (Chiras vd., 2015; Cillà vd., 2020; Ung vd., 2017; Abokyi vd., 2020). Yaşlı popülasyonda %2-%20 arasında değişen bir prevalansa sahiptir. Wong ve diğerleri, YBMD'nin küresel prevalansını incelemiş ve 2020 yılına kadar 196 milyon insanın YBMD'dan etkileneceğini tahmin etmişlerdir. Ayrıca 2040 yılına kadar bu sayının 288 milyona yükseleceğini bildirdiler. Dünyada önde gelen körlük nedeni olmasına rağmen patogenezi hakkında nispeten az şey bilinmektedir. YBMD; multifaktöriyel etiyolojisi olan kompleks kronik nörodejeneratif ve progresif bir hastalıktır. İleri yaş ve buna bağlı fizyolojik hücre apoptozu, doku involüsyonu, genetik yatkınlık ve epigenetik modifikasyonlarla birlikte en güçlü risk faktörleridir (Nita ve Grzybowski 2016; Maugeri vd., 2018; Ung vd., 2017; Wong vd 2014). Oksidatif stres ve inflamasyon; glokom, katarakt, diyabetik retinopati ve makula dejenerasyonunu içeren yaşa bağlı oküler hastalıkların başlamasında ve ilerlemesinde kritik rol oynamaktadırlar (Abu-Amro vd., 2016). YBMD ile ilgili mekanizmalar; oksidasyon, inflamasyon, hipoksida, ve retinal dokuların neovaskülarizasyonundan oluşmaktadır. Anormallikler; RPE, Bruch membranı ve karyokapillaris gibi birbirleriyle ilişkili fonksiyonel dokuları etkilemektedir (Cimaglia vd., 2020).

YBMD'nin kesin etyopatogenezi hala bilinmemekle birlikte, azalmış koroidal kan akımının RPE fonksiyonunda lipoprotein birikimiyle birlikte değişiklikler gösterdiği, bu durumun RPE dejenerasyonuna ve Bruch membran geçirgenliğinin değişmesine neden olduğu varsayılmaktadır. Bu retinal hastalıkta değişen hücreler ve yapılar arasında; RPE, fotoreseptör hücreleri, karyokapillaris ve Bruch membranı bulunur. YBMD'de retina histopatolojisi bu oküler hastalığın makula bölgesindeki

retinal tabakalarının lokalize destriksiyonu ile karakterize olduğunu ortaya koymaktadır. YBMD'li gözlerde gözlemlenen retinal değişiklikler çeşitlidir. Bu değişiklikler; RPE ve fotoreseptör tabakanın kaybı, RPE'nin altında veya Bruch membranında lipidlerin ve protein depozitlerinin birikmesi, koryokapillaris ayrılması, koroidal neovaskülarizasyon (CNV), diskiform skar şeklinde tanımlayabiliriz. Bunlara ek olarak makrofajların ve mikrogliaların oluşması ve kompleman aktivasyonu yoluyla inflamasyon yanıtı da bulunmaktadır (Chiras vd., 2015; Abokyi vd., 2020; Cillà vd., 2020).

Klinik olarak genellikle iki forma ayrılır; kuru tip YBMD ve yaş tip YBMD Eksüdatif olmayan atrofik form kuru tip olarak değerlendirilir ve makula dejenerasyonu vakalarının yaklaşık% 85'ini oluşturur. Kuru tip (atrofik form) en yaygın görülen formudur. RPE'nin yavaş ilerleyen disfonksiyonu, fotoreseptör kaybı ve retinal dejenerasyonu ile karakterizedir. Kuru tip YBMD yavaş ilerler ve makulada drusen (RPE'nin altındaki hücre dışı birikintiler), RPE'nin depigmentasyonu veya dış retinal hiperpigmentasyon ile karakterizedir. Büyük drusen birleştiğinde, RPE'nin Bruch membranından ayrılmasına neden olabilir, bu durum RPE apoptozuna ve coğrafik atrofiye yol açar (Şekil 2.1). RPE hücrelerinin kaybı, üstteki fotoreseptörlerin dejenerasyonu ve altta yatan koroid kapiller damarlarının atrofisi ile sonuçlanır, dolayısıyla tüm bu durumlar makula dejenerasyonunun ilerlemiş ve ciddi formu olan kuru tipin oluşmasına neden olur. Kuru tip YBMD'nin ilk belirtileri; RPE ile Bruch membranı arasında yer alan drusen adı verilen küçük, beyaz-sarı birikintilerdir. Drusen; ubikuitin, integrin, kompleman, kolajen, fibronektinler ve beta-amiloidlerin birikiminden oluşur. Drusen oluşumu ve birikmesi koryokapiller damarlardan RPE'ye oksijen akışını azaltarak RPE'de hipoksiye neden olur, bu durum dejenerasyonuna yol açar. Yaş tip veya neovasküler form daha az sıklıkta görülür. Vakaların yaklaşık %15'ni oluşturmaktadır. İntraretinal veya subretinal sızıntı, kanama ve RPE dekolmanları ile birlikte koroidal neovaskülarizasyon ile karakterizedir (Chiras vd., 2015;Hernández-Zimbrón vd., 2018).



Şekil 2.1. Kuru tip YBMD modeli. Üst fotoğrafta kuru YBMD'de retinadaki patolojik değişiklikler gösterilmektedir. Alt fotoğraflarda, kuru YBMD 'li bir olgunun fundusu gösterilmektedir. Soldaki fotoğrafta sarı drusen birikintileri, sağdaki fotoğrafta ok ile gösterilen ilerlemiş kuru YBMD'de coğrafi atrofi görünümüdür (Chiras vd.,2015)

Kapiller damarlar, koryokapiller damarlardan bruch membranına geçerek retinaya doğru büyür. Yaş tip YBMD'de oluşan koroidal neovaskülarizasyon, retinada ödem ve vasküler sızıntı nedeniyle fotoreseptör hücre hasarına yol açar. Neovaskülarizasyon, RPE dekolmalarına, yırtılmalara, ve kanamalara neden olur. Görmede kalıcı hasara neden olan atrofik maküler yaralanmaya yol açar. Bazı ciddi vakalarda retinal pigmentinin ayrılmasına ve seröz sıvılarının birikmesine ve RPE tabakasının altında kanamaya neden olmaktadır (Rastoin vd., 2020).

En sık görülen kuru tip YBMD; yavaş progresif RPE disfonksiyonu, fotoreseptör kaybı ve retinal dejenerasyonu gösterirken, daha agresif ve daha hızlı progresyon gösteren yaş tip YBMD intraretinal veya subretinal sızıntı, kanama RPE dekolman ile koroidal neovaskülarizasyonu olarak ortaya çıkar. Ayrıca kuru tip

YBMD, hastalığın yaş tipine dönüşebilir ve bu durum hastayı daha ciddi görme kaybı riski altına sokmaktadır (Chiras vd., 2015; Cimaglia vd., 2020).

2.1.1. Retinal Pigment Epitelyal Hücrelerin Disfonksiyonu ve Kuru Tip YBMD

Retinal pigment epitelyumu (RPE), omurgalı canlıların (insan) gözünde Bruch membranı ile nöral retinanın fotoreseptör tabakası arasında bulunan bir doku tabakasıdır. Optik çanağın dış tabakasından köken alır. Doğuştan gelen bir bağışıklık sistemine sahiptir ve sıkı bir matriste birbirleriyle bağlı pigmentli hücrelerin tek tabakasından oluşmuştur (Fronk ve Vargis, 2016). Nöral retinanın altında yer alan ve hücrel bir tabaka olan RPE katmanının temel fonksiyonları, üstteki fotoreseptör hücrelerini desteklemek ve kan-retina bariyeri boyunca transportu düzenlemektir (Stern ve Temple, 2015). Basit bir doku tabakası olmasına rağmen RPE, omurgalı gözünde retina gelişiminin düzenlenmesi, foto-oksidatif stresi azaltmak için göze giren aşırı ışığın emilmesi, vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin salgılanması, gözün bağışıklık tepkisine aracılık, metabolitlerin ve sıvıların taşınması gibi birçok karmaşık rol oynar. RPE, fotoreseptörler için sağlıklı bir ortam sağlamak, retinaya glikoz ve diğer hayati besinleri temin etmek ve ayrıca büyük moleküllerin kan dolaşımından göze girmesini önlemek amacıyla bir ara madde olarak işlev görür (Fronk ve Vargis, 2016). RPE retinal hemostazı sürdürmek için birkaç işlevi yerine getirir. Bunlardan bazıları; besinler ve metabolitlerin transportunu düzenlemek, ışığın emilmesi, fototransdüksiyonun devamlılığı için retinal görsel pigmentinin geri dönüşümü, dökülen fotoreseptör dış bölümlerinin fagositozudur (Abokyi vd., 2020). RPE, ayrıca dolaşımdaki ksenobiyotiklerin göze erişimini sınırlayan dış kan retinal bariyeri olarak da önemli rol oynar. RPE, intravitreal yöntemle enjekte edilen ilaçların dolaşımdaki posterior eliminasyonunu sınırlar. Bu nedenle, RPE'deki permeasyonun oküler farmakokinetik üzerinde önemli bir etkisi vardır (Hellinen vd., 2019).

YBMD, RPE hücre disfonksiyonu ile yakından ilişkilidir. YBMD'nin kesin patogenezi büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, oksidatif stres kaynaklı RPE hasarının YBMD'nin birincil nedenlerinden biri olduğuna inanılmaktadır. YBMD dahil olmak üzere birçok retinal dejeneratif hastalık RPE disfonksiyonu ile yakından ilişkilidir. Odak ışıktan yoğun ışınlama sebebiyle, makula bölgesindeki yüksek oksijen gerilimi ve fotoreseptör dış segmentlerin fagositozundan dolayı RPE hücreler

oksidatif strese özellikle duyarlıdır. Sonuç olarak, RPE oksidatif stres tarafından sürekli zarar görür. Bu nedenle hücresel oksidatif stres, yaşlanma sırasında ve yaşlı kişilerde körlüğün birincil nedeni olan YBMD'nin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle oksidatif stres koşulları altında RPE hücre disfonksiyonunun mekanizmasını anlamak, YBMD için yeni tedaviler geliştirmek adına kritik öneme sahiptir (Hwang vd., 2019).

Retinal Pigment Epitelyum (RPE), YBMD'de potansiyel olarak önemli bir ilaç hedefidir. YBMD'da birincil yaralanma bölgesi olarak RPE'yi önerilmiştir. Bu nedenle, RPE'nin hücre modelleri oküler ilaç geliştirmede önemli araçlardır. Sonuç olarak bu retinal hastalık için olası bir tedaviyi arayan bir araştırmacı, kültürlenmiş hücreler üzerindeki etkilerini gözlemlemek için çeşitli kimyasallar veya takviyeler eklemekten önce RPE tek tabakasında atrofiye neden olabilecek uygulamalar yapabilmektedir (Fronk ve Vargis, 2016; Hellinen vd., 2019; Abokyi vd., 2020). Çok sayıda çalışma, retinal hasarın neden olduğu görme bozukluğunun körlüğün en önemli nedenlerinden biri olduğunu, özellikle YBMD ve diğer retinal hastalıklarda patolojik RPE hasarı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle RPE hücrelerinin yaralanmadan korumak veya RPE hücre hasarını geciktirmek YBMD tedavisinde önemlidir (Yuan vd.,2020).

YBMD, yaşlı bireylerde retinanın makula (merkezi) bölgesini etkileyen bir hastalıktır. Öncelikle RPE hücrelerinin dejenerasyonundan kaynaklanır. Kan-göz bariyerinin bu bölgesi, retina ve koroid arasındaki besinleri ve oksijeni taşır ve büyüme faktörleri ve sitokinleri üretir. RPE tabakası ayrıca kullanılmış fotoreseptörlerin fagositozunda çok önemli bir rol oynar. Bruch membranının üstünde tek bir tabaka oluşturur. Tabakanın altında koryokapiller damarlar bulunur. RPE ve Bruch membranı, koroid ve retina arasında bir bariyer görevi görür (Rastoin vd., 2020).

Fotoreseptör ve koroid arasında tek bir tabaka olartak yer alan RPE, üstte bulunan fotoreseptörleri koruma, iyonların, besinlerin ve suyun akımına aracılık etme görevleri ile retinanın hayatta kalması için gereklidir. YBMD dahil olmak üzere birçok retinal dejeneratif hastalık RPE disfonksiyonu ile yakından ilişkilidir (Hwang vd.,2019). Yaşlı retinada, nöronların kaybı ve ayrıca fotoreseptör hücrelerinin kısalması nedeniyle genel bir incelme görülmektedir. RPE'nin özellikle yaşla birlikte, melanin granüllerinin kaybı, lipofusinin birikmesi, Bruch membranı üzerinde veya içinde bazal depositlerin birikmesi, drusen oluşumu, Bruch membranının kalınlaşması, RPE mikrovilli atrofisi ve bazal katlanmaların düzensizliği olmak üzere çeşitli yapısal değişikliklere maruz kaldığı bilinmektedir (Bonilha, 2008).

YBMD'li gözlerdeki RPE patolojik değişikliklerin yanı sıra, basal lamina depositi, bazal lineer depoziti ve drusen içeren ekstraselüller depozitler mevcuttur. Bruch membranındaki drusen ve diğer bazal birikintiler, YBMD'nin gelişiminde önemli risk faktörleridir. Genel olarak; subretinal lipid/protein depozitlerinin oluşumunda; verimsiz RPE metabolizması, substratın etkisiz degradasyonu veya hasarlı RPE hücrelerinin debrisye neden olması, aktive edilmiş mikrogliaların debris bölgesine alınmasıyla kompleman aktivasyonuna bağlı lokal kronik inflamasyon süreçlerinin katkıda bulunduğu düşünülmektedir. İmmünolojik özelliklerin yanı sıra, bu lipid depozitler kolayca oksitlenir ve oksidatif strese katkıda bulunur. Ek olarak Bruch membranı, besinlerin ve metabolitlerin dış retina ve koryokapillaris arasında difüzyonunu kolaylaştıran yarı geçirgen bir zar görevi görür. Bu nedenle Bruch membranında depozitlerin birikmesi moleküllerin taşınmasına zarar verir ve bu durum RPE hasarına ve fotoreseptör katmanlarının zarar görmesine neden olur (Abokyi vd., 2020).

Coğrafi atrofi terimi makulada RPE ve fotoreseptör hücre kaybı gözlemlendiğinde kullanılır. Atrofik alan yıllar içerisinde yavaş yavaş ilerleyerek görme işlevini azaltır (Rastoin vd.,2020). Hipo/hiper pigmentasyon veya pigmentasyonun genel olarak yer değiştirmesi de RPE'lerde gözlenir. Kuru tip YBMD'de kademeli görme kaybı ve drusen oluşumu tanısal özelliklerdir. Lipofuscin drusenin ana bileşenidir ve lipid peroksidasyonu gibi hücre metabolitlerinin reaksiyonu sırasında üretilir. Lipofuscin, RPE'deki fotoreseptör pigmentinin bu ürünü uzaklaştırma kapasitesini aştığında birikmeye başlar. RPE, yüksek oksijen tüketimi, yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri ve sürekli ışığa maruz kalması

nedeniyle oksidatif stres tarafından indüklenen reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna özellikle duyarlıdır. Drusen RPE dejenerasyonuna neden olur ve coğrafi atrofi göz fundusunda gözlemlenir. Atrofi foveaya ulaştığında, hızlı ve şiddetli görme kaybı oluşur (Nita ve Grzybowski 2016; Yuan vd.,2020).

2.1.2. Kuru Tip YBMD Patogenezinde Oksidatif Stres

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD), demografik, çevresel ve genetik risk faktörleri ile oldukça karmaşık bir hastalıktır ve patogenezi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Dahası, sadece birkaç çalışma kuru tip YBMD gelişiminde önemli olan faktörlere odaklanmıştır ve ayrıca bu retinal hastalık için kesin bir tedavi yöntemi yoktur. Adından da anlaşılacağı gibi en güçlü risk faktörü ileri yaştır. Yapılan araştırmalar sonucunda patogenezin anlaşılmasındaki önemli gelişmeler, retinadaki oksidatif hasarın rolüne odaklanmıştır. Oksidatif stres, patogenezin primer tetikleyicilerinden biri olarak karşımıza çıkar ve bu retinal hastalığın gelişimine katkıda bulunarak yaşlı retinada kronik inflamasyonu indüklediği açıkça görülmektedir. Dolayısıyla, oksidatif stresi artıran faktörlerin hastalığı şiddetlendirdiğini, oksidatif stresi azaltan faktörlerin hastalığın ilerlemesini yavaşlattığını gösteren çalışmalarla bu durum desteklenmektedir (Chiras vd., 2015; Hernández-Zimbrón vd., 2018).

Oksidatif stres, drusen oluşumu, RPE disfonksiyonu, apoptozis, bağışıklık sistemini aktive etme, yaşlanan hemostatik kontrol kaybı ve Bruch membran anormallikleri gibi YBMD'nin gelişimim sırasında meydana gelen çeşitli durumlar bulunmaktadır. Bu durumlar oldukça komplekstir ve birbirleriyle etkileşimin yanı sıra çapraz ilişki de içerirler. Adından da anlaşılacağı gibi YBMD yaşlı bireylerde önemli bir oküler hastalıktır. Yaşlanma ile birlikte antioksidan seviyesi düşer. Serbest radikaller, hidrojen peroksit ve oksijen metabolizmasının yan ürünlerinden oksijen iyonu içeren, farklı hücre tiplerinde hücre hasarı ve apoptozu indükleyen temel hücrel reaktif oksijen ara ürünleri olan ROS seviyesi artar ve sonuçta bu durum oksidatif stresi oluşturur. Önemli antioksidan ve sitoprotektif sistemlere rağmen yaşlanma RPE'yi oksidatif strese karşı savunmasız hale getirir. Literatür YBMD'de RPE hasarının bir itici gücü olarak yetersiz şekilde nötralize edilmiş oksidatif stresin rolünü destekler. Sonuçta YBMD'yi önlemek veya tedavi etmek için antioksidan tedavi önerilmiştir (Nita ve Grzybowski 2016; Jabbehdari ve Handa, 2021; Yuan vd.,2020).

Oksidatif stres, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, glokom, diyabetik retinopati ve retinal ven tıkanıklığı dahil retinal hastalıklarının gelişmesinde ve hızlanmasında çok önemli bir rol oynar. Oksidatif stres tarafından indüklenen reaktif oksijen türleri (ROS), serbest radikaller, hidrojen peroksit ve oksijen metabolizmasının yan ürünlerinden oksijen iyonu içeren, farklı hücre tiplerinde hücre hasarı ve apoptozu indükleyen temel hücresel reaktif oksijen ara ürünleridir. Fazla miktarda ROS üretimi, RPE’de, endotel hücrelerinde, retinal ganglion hücrelerinde fonksiyonel ve morfolojik bozukluklara yol açabilir (Masuda vd., 2017; Yuan vd., 2020).

Oksidatif stres, antioksidan savunma sistemi ile, süperoksit anyon, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve tekli oksijen dahil olmak üzere ROS üretimi arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. ROS çeşitli enzimatik ve oksidasyon süreçleri sırasında üretilen, moleküler oksijenin kısmen indirgenmesi nedeniyle normal fizyolojik koşullar altında ürün olarak oluşmaktadır. Mitokondriyal solunum zinciri, ROS üretiminin ana kaynağıdır. Oksidatif stres genellikle; aşırı ROS üretimi, mitokondriyal disfonksiyon, bozulmuş antioksidan sistem veya bu faktörlerin bir kombinasyonundan kaynaklanır. ROS üretimi ile biyolojik sistemlerin savunma mekanizmalarının hücresel stres bozukluklarını ortadan kaldırma yeteneği arasındaki prooksidatif/antioksidatif hücresel dengesizlik, oksidatif stresin karşılıklı olarak ROS üretimini şiddetlendirdiğinden kısır bir döngüye yol açar (Nita ve Grzybowski 2016).

YBMD patogenezinin anlaşılmasındaki önemli gelişmeler, retinadaki oksidatif hasarın rolüne odaklanmıştır. ROS ve oksitlenmiş lipoproteinlerin hücre ve doku stresinin temel kaynakları olduğu ve yaşlanan retinada YBMD gelişimine katkıda bulunan inflamasyon için alt yapı oluşturduğu açıkça belirlenmiştir. (Chiras vd.,2015).

Retina insan vücudunda en yüksek oksijen tüketen ve ROS üretiminin birincil olduğu dokulardan biridir. RPE hücre tabakası benzersiz konumu sayesinde fotooksidasyona karşı fundus dokusunun koruyabilmesinin yanı sıra görsel döngüyü yönetmesine izin veren işlevleri nedeniyle önemli bir rol oynamaktadır. RPE hücreleri yaşam boyu ışığa maruz kalma, yüksek enerji ihtiyacı ve koryokapillarisden gelen yüksek oksijen kısmi basınç nedeniyle kronik oksidatif stres altında yaşar. Normal hücrelerde ROS üretimi ve antioksidan sistemler arasındaki denge hücresel redoks hemostazını korur. Ne yazık ki, yaşlandıkça oksidatif stres artar ve antioksidan kapasite azalır ve onarım sistemlerinin etkinliği bozulur. Retina ve RPE

hücreleri hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar açısından zengin olmasına rağmen, ya lanan retinada ROS seviyeleri artar. Artan ROS seviyesi ve zayıflayan antioksidan hücre savunma sistemleri oksidatif strese yol açar ve apoptoz sürecinde RPE hücrelerinin, fotoreseptörlerin, koryokapillerin hasarına neden olur. RPE hücre disfonksiyonu YBMD’de ya lanma, genetik ve çevresel stres etkenlerinin bir kombinasyonundan kaynaklanan temel bir de i ikliktir (Chiras vd., 2015; Nita ve Grzybowski 2016; Yuan vd.,2020; Jabbehdari ve Handa, 2021).

Retina tüm insan dokuları arasında en yüksek oksijen tüketimi olan dokudur. Makulanın RPE ve fotoreseptörleri yüksek enerjili ı ı a maruz kalır. Fotoreseptörler kan damarlarından iletilen oksijen ve besin maddeleri sebebiyle yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerdir. Yüksek kısmi oksijen basıncı retinada ROS üretimini teşvik etmektedir. Makula koni ağırlıklı merkezi fovea ve onu çevreleyen basil ağırlıklı perifoveadan oluşur. Ya lanmayla birlikte perifoveal RPE hücreleri normal altıgen şeklinden şekilsiz hale dönüşür. RPE lizozomlarında biriken sindirilmemi  lipid-protein kümeleri olan lipofuskin biriktirir. Ya lanmayla birlikte maküler karotenoid seviyesi, glutatyon S-transferaz-1 ekspresyon düzeyi, E vitamini düzeyi, azalır ve lipid peroksidasyonu artar. Buna karşılık retinada lipofuskin kaynaklı mitokondriyal DNA hasarı, ileri lipid peroksidasyonu ve glikasyon artar. Ya lanma bu faktörlerin hemostazını de i tirir. Bu durum da ya lı bireylerde YBMD gelişme oranının yüksek olduğu anlamına gelir. Drusen veya sarı depositler, RPE’de hiper/hipopigmenter anormallikler erken evre YBMD’nin ayırt edici klinik belirtileridir. İleri kuru YBMD’de, RPE atrofik hale gelir ve RPE hücreleri coğrafik atrofi görünümün karakteristiği olan apoptoza uğrar. RPE kaybıyla birlikte üst tarafta bulunan fotoreseptörler dış pleksiform ve i  nükleer tabakaların nihai atrofisi ile dejenere olur (Nita ve Grzybowski 2016; Jabbehdari ve Handa, 2021).

Ya landık a, makulada oksidatif stres birikir. Makula onarımını desteklemek için mikrogliyal aktivasyon, subretinal birikim ve kompleman aktivasyonu ile karakterize bir parainflamatuar yanıt başlatılır. Sağlıklı bir ba ı ıklılık sistemi, parainflamasyon yoluyla makula hemostazisini sürdürebilmelidir. Ya lanma sırasında retina, onlarca yıl devam eden ve ilerleyen yaşla birlikte artan kronik oksidatif stresten muzdariptir. Çoğu durumda bu parainflamatuar yanıt, sağlıklı ya lanan gözde hemostazı koruyabilir. Ancak YBMD bireylerde bu parainflamatuar yanıt düzensiz hale gelir ve makula dejenerasyonuna katkıda bulunur. YBMD’de

parainflamatuar yanıt; genetik yatkınlık, epigenetik modifikasyon veya çevresel faktörler nedeniyle düzensizdir. Düzensiz parainflamasyon yani kronik inflamasyon, RPE ve fotoreseptörlere zarar veren ve YBMD'nin gelişmesine yol açan çeşitli pro-inflamasyon sitokin üretimi veya inflamasyon aktivasyonu ile sonuçlanır. YBMD'de düzensiz parainflamasyon kan retina bariyerine zarar vererek retinal immün ayrıcalığının ihlaline neden olarak retinal lezyonlarının gelişmesine yol açar ve ayrıca makulada devam eden sürekli kronik inflamasyon, görme kaybına neden olan yara oluşumuna yol açabilir (Chen ve Xu, 2015).

Gelişimin erken dönemlerinde oluşan ve yaşam boyunca minimum proliferasyonla uykuda kalan RPE hücrelerinde yara onarımı sınırlı olduğu için, dejenerasyonun ardından bu hücreler kendilerini yenileyemez. RPE hücrelerinde rejeneratif kapasite eksikliği ve RPE hücrelerinin kademeli olarak kaybedilmesi özellikle kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi atrofik hastalıklar için önemli bir sorundur. Bu retinal hastalıklar için RPE'nin yara onarımını sağlayacak olan proliferatif cevap, onarıcı ve rejeneratif etki gösterebilmektedir. İnsan RPE'sinin yaralanmaya karşı sınırlı bir proliferatif tepkisi olmasına rağmen, amfibiler gibi bazı düşük seviyeli hayvanların olağanüstü rejeneratif kapasiteye sahip olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bazı hayvanlarda, RPE tabakası hasarı, RPE tabakasını tamamen onaran ve hatta bazı durumlarda nörosensoriyel retinayı yenileme kapasitesine sahip olan proliferatif bir tepki ortaya çıkarır. İnsanlarda ise tersine, güçlü RPE proliferasyonu nadirdir ve meydana geldiğinde genellikle patolojik epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT) görülür. Bu durum, RPE tabakasının veya nörosensoriyel retinanın rejenerasyonundan ziyade, cerrahi olarak eksize edilmiş insan proliferatif vitreoretinopati (PVR)'sinde tespit edilenler gibi fibroblastik mezenkimal progeniye neden olur. Normalde yaşam boyunca uykuda olan RPE, sakin bir durumu koruyan nişten salıverildiğinde çoğalmak üzere etkinleştirilebilir. RPE hücrelerinin nişten kaçarak yüksek proliferasyon artışına neden olması ve EMT'nin PVR'ye veya diskiform skar oluşumuna yol açması gibi, RPE proliferasyonu yıkıcı olabilir. Retina hastalarının yararına RPE proliferasyonu aracılı yara onarımını geliştirmeye yönelik stratejileri keşfetmek önem arz etmektedir (King vd., 2005; Stern ve Temple, 2015).

2.1.3. Kuru Tip YBMD Patogenezisinde Mitokondriyal Disfonksiyonun Rolü

RPE, yüksek metabolik ihtiyaçları karşılamak için yüksek oksijen akışını içeren yüksek bir oksidatif stres mikroçevresinde yaşar ve görmenin foto-oksidatif stresine benzersiz bir şekilde maruz kalır. Fotoreseptörleri sağlıklı tutmak için RPE'nin yüksek metabolik aktiviteyi sürdürmesi gerekir. Yüksek metabolik aktivitesi nedeniyle RPE'de çok fazla sayıda mitokondri bulunur. Mitokondri, RPE'de ana endojen ROS kaynağını temsil eder ve kuru tip YBMD patogenezisinde merkezi bir rol oynar. Mitokondri hem ROS üretiminin hem de ROS ile indüklenen radikal hasarın birincil bölgesi olarak gösterilir. Mitokondri hücrel ROS'un %90'nını üretir ve bu miktar mitokondriyal hasarı 10 kat arttırabilir. ROS esas olarak mitokondri tarafından üretilir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri oksidatif fosforilasyon yolunun solunum kompleksleri I ve III'teki tek elektron çıkışı yoluyla süperoksit radikalleri üretir. Ayrıca mitokondriyal matriksteki flavin bağımlı enzimler reaktif oksijen türlerini kompleks I'den daha fazla oranda üretebilir. RPE yaşlandıkça, mitokondriyal kaynaklı ROS'u kullanma veya nötralize etme kapasitesi muhtemelen azalır. Mitokondri zengin bir ROS kaynağı olduğundan, özellikle oksidatif hasarın hedefidir. RPE'deki mitokondriyal DNA (mtDNA) onarımı nükleer DNA onarımına kıyasla nispeten yavaş ve yetersiz görünmektedir. mtDNA, iç mitokondriyal membrana yakın bir yerde bulunduğu için, nükleer DNA'ya göre oksidatif hasara karşı daha hassastır. mtDNA kodlama bölgesindeki oksidatif modifikasyonlara karşı daha yüksek bir duyarlılığa sahiptir. Ayrıca RPE hücreleri post mitotik olduğundan hasarlı mitokondri hücre bölünmesinin bir fonksiyonu olarak kolayca elimine edilemez. Böylece mitokondriyal hasar, mitokondriye ve diğer önemli hücrel elementlere daha fazla zarar verebilecek ROS üretiminde artışa ve oksidatif fosforilasyonda bozulmaya neden olur (Chiras vd., 2015; Nita ve Grzybowski 2016; Nashine vd., 2020; Jabbehdari ve Handa, 2021).

Fizyolojik koşullar altında ökaryotik hücreler, enzimler ve antioksidanlar dahil olmak üzere çeşitli antioksidatif savunma mekanizmalarına sahip olduğundan, ROS üretimi ve temizlenmesi arasında hücrel bir denge vardır. Yaşlanma ve aşırı ROS üretimi ile azalan antioksidan seviyeleri redoks dengesizliğine bağlı olarak yani ROS hücrel aşırı üretimi içsel antioksidan kapasitesini aştığında oksidatif stresin oluşumuna neden olur. Yaşla birlikte DNA onarım sistemindeki bozulmalar ve

yoğunlaşan oksidatif stres nedeniyle ve ayrıca antioksidan sisteminin etkisinin azalmasıyla birlikte biriken hasarın miktarı artar. Antioksidan kapasite yetersiz olduğunda, oksidatif stres apoptoza neden olur. Oksidatif stres, mtDNA'ya zarar vererek, mitokondriyal solunum zinciri geçişini engelleyerek ve mitokondriyal membran geçirgenliğini artırarak apoptozu indükleyebilir. Aşırı ROS üretimi ve oksidatif stres tarafından indüklenen hücre ölümü bir çok nörodejeneratif patolojinin patomekanizmasında rol oynar. Sonuç olarak YBMD dahil olmak üzere yaşla ilgili birçok hastalığın patogeneziyle oksidatif stresin ilişkili olduğu bilinmektedir (Nita ve Grzybowski 2016; Nashine vd., 2020)

Mitokondriyal hasarın ve ROS üretiminin artması YBMD ile ilişkilidir. Bu durum hasarlı mitokondriyanın ve oksidatif olarak değişen diğer bileşenlerin yaşlı RPE hücreleri tarafından etkili bir şekilde uzaklaştırılmadığını gösterir. Retina özellikle yaşlanmaya karşı hassas ve oksidatif strese karşı savunmasızdır. Bölünmeyen fotoreseptörler ve RPE hücreleri mitoz sırasında kusurlu mitokondriyi azaltamadıklarından dolayı biriken mtDNA hasarına yatkındırlar. Mitokondri bozukluğu yaşanan RPE hücrelerinin oksidatif strese karşı duyarlılığının artmasıyla ilişkilidir. Yaşla birlikte mitokondriyal işlev bozuklukları, düşük ATP seviyesi, zayıflamış mitokondriyal membran potansiyeli, azalmış sitoplazmik Ca^{+2} ve artan mitokondriyal Ca^{+2} sekestrasyonu ile ilişkilidir. Mitokondri oksidatif stres tarafından uzun süre uyarılması sonucunda, mitokondriyal süperoksit dismutaz seviyesinin azalmasına, süperoksit anyonunun artmasına, fotoreseptörlerin dış ve iç segmentlerinin kısılmasına ve düzensizleşmesine, RPE hücrelerinin degradasyonuna, brunch mebranın kalınlaşmasına son olarak ta YBMD progresinde apoptotik hücre ölümüne neden olur (Nita ve Grzybowski 2016; Cillà vd.,2020).

YBMD'da mitokondriyal disfonksiyonun varlığını direk olarak kanıtlayan birkaç çalışma mevcuttur. YBMD'den etkilenen gözlerde maküler RPE hücrelerinden elde edilen mtDNA, yaşla uyumlu kontrol gruplarına kıyasla daha fazla hasara sahiptir ve mtDNA hasarı, periferel retinaya kıyasla maküler bölgenin RPE hücrelerinde daha fazladır. Ayrıca ROS ile ilişkili mtDNA hasarı, hastalığın şiddetine paraleldir ve YBMD'nin progresyonu ile pozitif korelasyon gösterirken, onarım kapasitesi ile negatif olarak ilişkilidir. Son yıllarda oftalmik hastalıklar ve oksidatif stres arasındaki ilişkiler hakkında giderek artan araştırmalar mevcuttur. Oksidatif stresin bazı oftalmik hastalıklarda (kuru göz, YBMD, diyabetik retinopati

dahil) patolojik progresyonu indüklediği ve hızlandırdığı bulunmuştur. Çalışmalar diyet veya serumda antioksidan seviyelerinin artmasının, YBMD progresyonuna karşı koruyucu olabileceğini göstermiştir Şu anda kuru tip YBMD için herhangi bir kesin tedavi mevcut olmadığından, mevcut terapötik stratejiler, büyük ölçüde oksidatif hasarı dengelemek için antioksidan seviyelerini arttırmaya odaklanmıştır. Bu stratejilerin başarısı sınırlı olmasına rağmen, antioksidanların optimal kombinasyonunun henüz formüle edilmediği ve antioksidan tedavinin YBMD tedavisinde çok yönlü bir yaklaşımın parçası olacağı açıktır (Chiras vd.,2015; Nita ve Grzybowski 2016; Abokyi vd., 2020; Yuan vd.,2020).

2.1.4. Resveratrol, Nikotinamid ve *SIRT1* Geninin YBMD Tedavisindeki Rolü

Mitokondride SIRTs aktivitesinin modülatörleri olan nikotinamid ve resveratrol potansiyel nöroprotektif faktörler olarak bilinmektedir. Resveratrol, *SIRT1* ve *PGC-1 α* aktivitesini indükler ve mitokondriyal aktivitenin indüksiyonunu , nikotinamid ise *PARP* ve *SIRT2* aktivitesinin inhibisyonunu ve NAD^+ metabolizmasının indüksiyonunu sağlar. Resveratrol, antioksidan enzimleri kontrol ederek ve DNA'daki serbest radikal hasarını bloke ederek bir antioksidan görevi görür. Oksidatif DNA hasarının bilinen bir belirteci olan 8-okso-7,8-dihidroksi-29-deoksiguanozin seviyesi in vivo olarak resveratrol eklenmesiyle azalır. Resveratrol ayrıca MAPK aktivasyonunu inhibe eder ve *SIRT1/AMPK* ve *Nrf2* antioksidan savunma yollarını aktive ederek inflamatuvar mediatörlerin üretimini azaltır. NAD^+ sentezinde rol oynayan ana öncüllerden biri olan ve ayrıca antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olan nikotinamid'in, drusen proteinleri de dahil olmak üzere YBMD ile ilişkili proteinlerin üretimini önemli ölçüde inhibe edebildiği ve inflamasyon yolağındaki anahtar genleri önemli ölçüde susturarak RPE'nin hayatta kalmasını geliştirdiğine dair önemli çalışmalar mevcuttur. Nikotinamid mitokondriyal membran potansiyelini korur. Nikotinamid mitokondride potansiyel nöroprotektif etkisini bu bağlamda poli (ADP-riboz) polimeraz geninin inhibisyonunu hedef alarak NAD^+ metabolizmasının indüksiyonu üzerinden sağlamaktadır. Nikotinamid, NAD^+ öncülleri arasında benzersizdir çünkü NAD^+ katabolik enzimlerin fizyolojik bir inhibitörüdür. Nikotinamid'in oksidatif strese karşı koruyucu ve inflamasyona karşı önleyici etki dahil olmak üzere YBMD tedavisinde yararlı olabilecek birden fazla rolü vardır. Dolayısıyla nikotinamid

tarafından düzenlenen yolakları hedeflemek YBMD ile mücadelede terapötik yollar geliştirmek adına umut vermektedir (Arduíno vd.,2010; Saini vd., 2017; Williams vd, 2017; Johnson ve Imai, 2018; Bryl ve ark., 2022).

Resveratrol (3,5,41-trihidroksi-trans-stilben), bir tür doğal fenol olan bir stilbenoiddir ve birkaç bitkinin, bakteri ve mantar gibi patojenlerin saldırısına uğradığında yanıt olarak ürettiği doğal bir fitoaleksindir. Antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle fitokimyasalların yaşı bağlı oküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde potansiyel rolü olabileceğini destekleyen birikmiş kanıtlar mevcuttur. Birkaç fitokimyasal arasında özellikle hastalığın önlenmesi açısından, resveratrol'ün göz üzerindeki terapötik etkilerine artan bir ilgi vardır (Abu-Amero vd., 2016).

Oksidatif stres ve inflamasyon, glokom, katarakt, diyabetik retinopati ve makula dejenerasyonunu içeren yaşı bağlı oküler hastalıkların başlamasında ve ilerlemesinde kritik rol oynamaktadır. Literatürde yapılan in vitro ve in vivo deneysel çalışmalar göz önüne alındığında yaşı bağlı oküler hastalıkların patogeneğinde rol oynayan; oksidatif stres, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, apoptoz ve anjiyogenez dahil olmak üzere çok sayıda yolak üzerinde, bir stilbenoid ve bir tür doğal fenol olan resveratrol'ün (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben) biyolojik etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Klinik çalışmalar güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özelliğinden dolayı, resveratrol'ün yaşı bağlı oküler hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel bir rolü olabileceğini gösteren birikimli kanıtlar sunmaktadır. Kuru tip YBMD için, deney hayvanı ve hücre kültürü çalışmalarında resveratrol kullanımının retinada normal işlevi sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Sonuç olarak günümüzde birçok araştırma, resveratrol'ün nöroprotektif ve anti-aging etkiler gösterebileceği biyolojik yolaklar üzerine odaklanmıştır (Abu-Amero vd., 2016 ; Subramani vd., 2017). Resveratrol, *SIRT1* (sirtuin 1) geninin aktivatörü olarak tanımlanmıştır (Bola vd., 2014). *SIRT1*, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı bir deasetilazdır ve birçok histon ve histon olmayan proteinlerden asetil gruplarını çıkarır. *SIRT1* çeşitli substratları deasetile edebilir ve bu sayede gen ekspresyonunun kontrolü, metabolizma ve yaşlanmayı içeren çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda yer alabilmektedir. Örneğin oksidatif stres kaynaklı apoptoz, *SIRT1* geni tarafından inhibe edilen *p53* transkripsiyon faktörünün aktivasyonundan kaynaklanır (Rahman ve Islam, 2011; Karbasforooshana ve Karimia, 2018). Eğer

SIRT1 geni terapötik bir hedef olarak belirlenirse, bu geni aktive edebilen terapötik ilaçlar yaşa bağlı hastalıklarda etkili olabileceği fikri son yıllarda artmaktadır. Resveratrol'un antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı ve böylece *SIRT1* genine etki ederek intristik apoptotik hücre ölümüne aracılık etmenin önemli bir adımı olan proapoptotik BAX translokasyonunu baskıladığı bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda *SIRT1* aktivatörlerinin oksidatif stresi azalttığı ve nöronal hücrelerde mitokondriyal fonksiyonu desteklediği bildirilmiştir. *SIRT1* aktivatörleri bu mekanizmalar aracılığıyla optik nörit sırasında hücre kaybını önleyebilir ve nöroprotektif etkilere aracılık edebilir (Bola vd., 2014; Stacchiotti vd., 2019). Resveratrol ise p53 ve DNA onarım enzimlerinin asetilasyon durumunu etkileyen *SIRT1* aktivitesini modüle edebilir. Resveratrol'un *SIRT1*'in N-terminal alanına bağlanması, *SIRT* ile p53 peptidi arasındaki bağları güçlendirir, böylece *SIRT1*'in aktivitesini artırır (Bryl ve ark., 2022).

Resveratrol, insan RPE hücrelerinde sitotoksiteyi indükleyen hidrojen peroksit karşı doza bağlı koruyucu bir etki gösterdiği, süperoksit dizmutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz aktivitelerini artırarak hücre içi ROS seviyelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Resveratrol takviyesinin anti-oksidatif etki sağlayarak bu hastalarda oksidatif stresin neden olduğu RPE dejenerasyonunu önlemede faydalı olabileceğini öne süren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Resveratrol, mitokondriyal biyogenezi olumlu yönde etkilediği ve mitokondriyal biyoenrjiyi arttırarak RPE hücrelerini akrolein kaynaklı oksidatif sitotoksitiye karşı koruduğu gösterilmiştir (Pintea vd., 2011; Sheu vd., 2013; Abu-Amero vd., 2016).

Kubota ve ark. (2010), tarafından yapılan bir başka araştırmada, resveratrol'un görsel hücre apoptozunu araştırmak için kullanılan bir model olan ışığa bağlı retinal dejenerasyonuna karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bunun YBMD ve retinis pigmentosa dahil olmak üzere nörodejeneartif nitelikteki hastalıkların patogenezeine önemli katkıda bulunan bir faktör olduğu düşünülmektedir. Sonuçlara göre retinal aktive edici protein (AP-1) ve *SIRT1* aktivasyonunun inhibisyonuna neden olan ışığa maruz kalmanın etkisini resveratrol'un tersine çevirerek ışık kaynaklı retina dejenerasyonuna karşı koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Resveratrol'un anti-apoptotik aktivitesi, YBMD gibi nörodejeneartif hastalıkların önlenmesinde önemli bir katkı faktörü olabileceği görülmektedir (Bola vd., 2014; Abu-Amero vd., 2016).

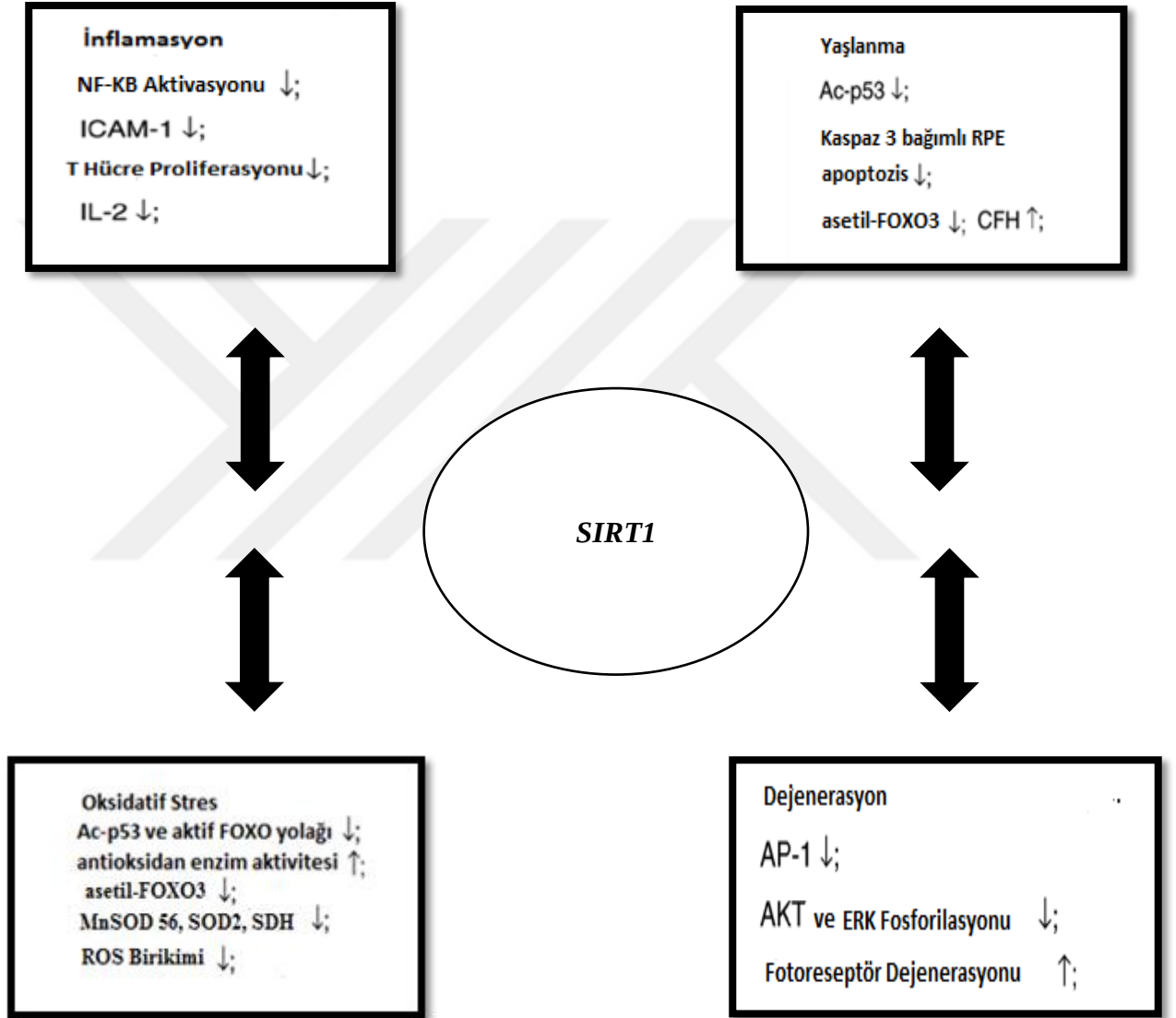
B3 vitamininin suda çözünür amid formu olan nikotinamid, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) üretiminde rol alan metabolik yolun önemli bir bileşenidir (Fricker vd., 2018). NAD^+ ise oksidatif fosforilasyon ve ATP üretimi, DNA onarımı, epigenetik olarak modüle edilmiş gen ekspresyonu, hücre içi kalsiyum sinyali ve immünolojik fonksiyonlarda yer alan bir dizi kritik hücresel işlem için temel bir kofaktör ve substrat olarak görev yapan temel bir piridin nükleotittir. NAD^+ ayrıca nükleer tamir enzimi olan poli (ADP-riboz) polimeraz ve *SIRT1* geni için tek substratı temsil eder. Yaşlanma, çoklu dokularda NAD^+ seviyesinde sistemik bir azalma ile dikkat çeker. NAD^+ biyosentezinin işlev bozukluğu, yaşa bağlı metabolik bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığın patofizyolojisinde kritik bir rol oynar. Ayrıca retinal NAD^+ 'daki düşüşler, yaşa bağlı disfonksiyon ve ışığa bağlı dejenerasyon dahil olmak üzere birçok retinal dejeneratif bozuklukta tespit edilmiştir. NAD^+ öncüllerinin kullanılmasıyla, NAD^+ anabolizmasının teşviki, hücresel enerjideki yaşa bağlı düşüşü hafifletmek için klinik olarak uygun bir terapötik stratejiyi temsil edebilir. Bu nedenle, hücre içi NAD^+ anabolizmasının teşviki bize genel olarak yaşa bağlı dejeneratif hastalıklar için umut verici bir terapötik strateji sunmaktadır (Massudi vd., 2012; Johnson ve Imai, 2018; Braidy vd., 2019). YBMD, RPE hücrelerinin yüksek seviyelerde ROS ürettiği ve dağılmış mitokondriye, düşük seviyelerde *PGC-1 α* ve *SIRT1* aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada *PARP* aktivitesinin nikotinamid aracılı inhibisyonu veya NAD^+ seviyesinin NAM aracılı yükselmesi, YBMD RPE hücrelerinin apoptozise karşı koruyucu etki gösterdiği görülmüştür. Muhtemelen düşük *PGC-1 α* ve *SIRT1* aktivitesi nedeniyle ortaya çıkan mitokondriyal disintegrasyon, NAD^+ seviyesinin artırılması yoluyla *SIRT1* aktivasyonuna, hücrelerin ROS seviyelerini düşürmesine ve oksidatif stresle daha iyi başa çıkmasına yardımcı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca nikotinamid'in proinflamatuvar sitokin ve immün hücrelerin migrasyon faktörlerinden sorumlu genlerin ekspresyonunu azaltarak, RPE hücrelerin YBMD'ye karşı korunmasında anti-inflamatuvar etki göstererek katkıda bulunduğu aynı çalışmada gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2016; Song vd., 2019). Nikotinamid'in NAD^+ 'ya dönüşümü YBMD tedavisindeki etkinliği açısından önemli bir faktör olabilmektedir. Hücresel NAD^+ seviyesinin artması, sadece mitokondriyal ATP ve süperoksit üretimini modüle etmekle kalmaz aynı zamanda birçok enzimi de aktive etmektedir. NAD^+ bağımlı deasetilazların bir ailesi olan aktive edilmiş sirtuin proteinleri nöronal ve metabolik

hastalıklara karşı hücre viabilitesini ve mitokondriyal kaliteyi arttırmak gibi nikotinamid'in etkili olduğu birçok olayda rol oynar (Zhou vd., 2018).

SIRT ailesinin bir üyesi olan Sirtuin (*SIRT*)1, çeşitli proteinlerden asetil gruplarını çıkararak çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçte düzenleyici bir role sahip olan, yüksek oranda korunmuş NAD⁺ bağımlı bir histon deasetilazdır. *SIRT1* oksidatif stresi ve buna bağlı hasarı hafifleten çok sayıda transkripsiyon faktörünün ve kofaktörün aktivitesini kontrol eder. Çok sayıda çalışma, *SIRT1* işlev bozukluğunun katarakt, YBMD, diyabetik retinopati ve glokom gibi oküler hastalıklarla bağlantılı olduğu, *SIRT1*'in ektopik yukarı regülasyonu ise çeşitli oküler hastalıklara karşı koruduğunu ortaya koymuştur (Zhou vd.,2018).

SIRT1 geni inflamasyon, anjiyogenez, yaşlanma, oksidatif stres, nöroproteksiyon gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri etkileyerek oküler hastalıklarda önemli bir rol oynar (Şekil 2.2). Deasetilasyon yoluyla *SIRT1*, çeşitli hedef proteinlerin aktivitelerini değiştirir ve hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, hücre yaşlanması gibi kritik süreçlere aracılık ederek, hücrelerin çeşitli stres koşulları altında hayatta kalmasına yardımcı olur. Ayrıca *SIRT1* uzun ömürlülüğü teşvik edebilir. *SIRT1*'in potansiyel koruyucu rolü, oküler hastalıkların birçok in vitro ve in vivo modelinde gösterilmiş olmasına rağmen, bu hastalıklarda *SIRT1* aktivatörlerinin ve inhibitörlerinin tam mekanizmasını ve en etkili uygulamasını doğrulamak için daha ileri çalışmalar gereklidir. Ek olarak, hayvan modelleri kullanılarak elde edilen verilerin insan göz hastalıklarına uygulanabilir olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir. *SIRT1* oküler hastalıklarda değerli bir terapötik hedef olarak düşünülebilir (Hwang ve Song 2017; Zhou vd., 2018). *SIRT1*, hücre viabiliteyi, proliferasyonu, gelişimi, hormon ve stres tepkilerini olumlu yönde etkileyen ve metabolizmayı modüle eden bir gendir. Aynı zamanda apoptoz ve inflamasyonu azaltır ve yaşlanmayla ilgili birçok hastalığı önler. *SIRT1*, retina hücrelerini oksidatif strese bağlı retinal hasardan, apoptotik retinal ölümden korur (Chen vd., 2015; Song vd., 2019). Özetle, *SIRT1* oküler yaşlanma veya yaşa bağlı retina hastalığının gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili süreçlerle bağlantılıdır (Jadeja vd., 2018). Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada NAD⁺ bağımlı bir histon deasetilaz olan *SIRT1* geninin RPE hücrelerini apoptoza karşı koruduğunu ve oksidatif stresin ve kronik inflamasyonun neden olduğu RPE fonksiyonlarındaki değişiklikleri ortadan kaldırdığını göstermektedir. Ayrıca önceki çalışmalarda, *SIRT1* ekspresyonunun

retinal kök hücrelerinde artan yaşla birlikte önemli ölçüde azaldığını ve insan YMBD retinalarında YBMD olmayan donörlere kıyasla daha az ekspre edildiği görülmüştür (Maugeri vd., 2018). Tüm bu gözlemler, *SIRT1*'in YBMD'na duyarlı olduğu konusunda aday gen olma olasılığını düşündürmektedir (Chen vd., 2015).



Şekil 2.2. *SIRT1*'in YBMD gelişimindeki rolü. ↓, bastırılma; ↑, artırılma. NF; nükleer faktör; SOD; süperoksit dismutaz; SDH; süksinat dehidrojenaz; ICAM, hücreler arası adezyon molekülü; ROS; reaktif oksijen türleri; IL; interlökin; ICAM; hücreler arası adezyon molekülü; AP; etkinleştirici protein; ERK; hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz, Ac-p53; asetillenmiş p53; CFH; tamamlayıcı faktör H, FOXO; forkhead box O, RPE; retina pigment epiteli. Şekil ilgili hastalığa göre modifiye edilmiştir (Zhou vd.,2018)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücre Hattı

Tez çalışmamızda Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)’nden temin edilen Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)’na ait olan İnsan Retinal Pigment Epitelyal Hücre Hattı (ARPE-19 ATCC® CRL-2302™) kullanıldı.

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- CO₂’li inkübatör, HERACELL 240i, Thermo Scientific
- CO₂’li inkübatör, HERACELL, Heraeus
- Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)
- Laminar akışlı steril kabin (Nuair Biological Safety Cabinets, Class II Type A/B3)
- Hassas Teraziler (Adam equipment, Sartorius)
- Derin Dondurucu (Beko, Türkiye)
- Bidistile Su Cihazı (Aguatron, Siemed, Türkiye)
- Isı bloğu (VWR, ABD)
- Vorteks (Clifton Cyclone, İngiltere)
- İnvert mikroskop (Zeiss Axiovert 100, Germany)
- Masa üstü santrifüj (Heraeus, Labofuge Ae)
- DNA sayacı: Nano-drop (Jenway Genova Nano, İngiltere)
- PCR Cihazı: GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems (AB)
- Kantitatif eş zamanlı PCR cihazı: Bio-Rad CFX96™ Touch Real-Time System
- Mikroplaka spektrofotometre cihazı (BioTek, Synergy 4)
- Hücre sayım cihazı (BIO-RAD TC20™ Automated Cell Counter)
- Soğutmalı Santrifüj (Jouan, BR 4)
- Flow sitometri cihazı (Bd FascCalibur)

3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

- Trypan Blue Solution %0.4 (Gibco)
- Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Abbkine)
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™)
- TRIzol Reagent (ABP Biosciences)
- cDNA sentez kiti (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)
- qRT-PCR super mix : SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad)

3.4. Medyum, Çözelti ve Etkin Maddelerin Hazırlanması

3.4.1. Serumlu DMEM/F-12, HEPES (Tam Büyüme Ortamı) Hazırlanışı

Toplam medyum hacminin %10 oranında fetal bovine serumu (FBS) ve % 1 oranında 100 units/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ilaveli Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12, HEPES (DMEM/F12, HEPES) (Thermo) besiyeri hazırlandı. 50 mL FBS, 5 mL Penisilin-Streptomisin antibiyotiği ve 445 mL DMEM-F12,HEPES besiyerinden olmak üzere toplamda 500 mL tam büyüme ortamı hazırlandı. Hazırlanan medyumlar olası bir kontaminasyonu önlemek için 50 mL hacimli falkon tüplere bölündü ve +4°C sıcaklıktaki buz dolabında saklandı.

3.4.1.1. Fetal Bovine Serum (FBS) Çözülmesi

- Fetal Bovine Serum (Thermo), -20 °C'deki dondurucudan çıkarıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Daha sonra 37 °C'deki inkübatöre yerleştirildi.
- Şişe dibinde tortu kalmaması ve serumun eşit dağılması için her 15 dakikada bir serum tamamen eriyinceye kadar hafifçe sallandı.
- Serumun defalarca eritilmesi verimliliğini düşürdüğünden eritilen serum 50 mL hacimli falkon tüplere bölündü ve -20 °C'deki dondurucuda saklandı.

3.4.1.2. Penicilin-Streptomisin Antibiyotığının Çözülmesi

Penicilin-Streptomisin Antibiyotığı (Thermo), -20 °C'deki dondurucudan çıkarıldı ve bir gece boyunca +4 °C'deki buzdolabında tutularak çözülmesi sağlandı. Antibiyotığın sık sık çözülmesi verimliliğini düşürmesine neden olacağından, 12 mL hacimli hücre kültür tüplerine bölünerek -20 °C'deki dondurucuda saklandı.

3.4.2. Serumsuz DMEM/F-12, HEPES Hazırlanışı

Toplam medyum hacminin % 1 oranında 100 units/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ilaveli Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12, HEPES (DMEM/F12, HEPES) besiyeri hazırlandı. 5 mL Penisilin-Streptomisin antibiyotığı ve 495 mL DMEM-F12, HEPES besiyerinden olmak üzere toplamda 500 mL serumsuz büyüme ortamı hazırlandı. Hazırlanan medyumlar olası bir kontaminasyonu önlemek için 50 mL hacimli falkon tüplere bölündü ve +4°C sıcaklıktaki buz dolabında saklandı.

3.4.3. %0.25 Trypsin-EDTA (TE) Hazırlanışı

Trypsin-EDTA (Thermo), -20 °C'deki dondurucudan çıkarıldı. Bir gece boyunca +4 °C'deki buzdolabında tutuldu. Sürekli dondurma ve çözülme enzimatik aktiviteyi düşüreceğinden TE, 12 mL hacimli hücre kültür tüplerine bölünerek, tekrar -20 °C'deki dondurucuda saklandı. Hücre kültür tüplerine bölünen TE hücre kültür uygulamalarında kullanılacağı zaman -20 °C'deki dondurucudan çıkarılarak 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Daha sonra 37 °C'deki inkübatöre yerleştirilerek 20 dakika ısınması sağlandı.

3.4.4. Etken Maddelerin Hazırlanışı

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreler için hazırlanan her bir deney protokolü için serum faktörü göz önünde tutularak, serum etkisiyle iyileşmeyi ortadan kaldırmak ve stres protokolünde belirtilen serumsuz kültür medyumunda muamele edilen hücreleri eşit şartlarda tutabilmek amacıyla ve sadece etken maddenin kontrole kıyasla etkisini araştırmak adına oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreler için kullanılacak olan etken maddeler serumsuz hücre kültür medyumunda içerisinde seyreltilti. Sağlıklı RPE hücreler için kullanılacak olan etken maddeler ise serumlu hücre kültür medyumunda içerisinde seyreltilti.

Aşağıda belirtilen tüm etken madde stokları, kit analizleri ve moleküler analiz için taze olarak hazırlandı.

3.4.4.1. Resveratrol'ün Hazırlanışı

Resveratrol (Sigma, R5010) çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 1 mM stok çözelti hazırlandı ve hazırlanan etken madde solüsyonu +4 °C'deki buzdolabında saklandı. 1 mM stok etken madde çözeltisini hazırlamak için 250 µl %100 DMSO içerisinde 11,4 mgr resveratrol çözüldü ve iyice çözülmesi için 2 gün boyunca +4 °C'deki buzdolabında bekletildi. Serumlu ve serumsuz hücre kültürü medyumları için iki ayrı ana stok hazırlandı. 250 µl %100 DMSO içerisinde çözülen etken madde çözeltisi ikiye bölünerek, 125 µl etken madde çözeltisi serumlu ve serumsuz olmak üzere DMEM-F12, HEPES besiyerinden 25 ml'ye tamamlanarak iki ayrı ana stok elde edildi. Böylelikle ana stok % 0.5 DMSO çözeltisi içerisinde hazırlanmış oldu. Stok resveratrol solüsyonu ayrı ayrı serumlu ve serumsuz hücre kültür medyumları içerisinde son konsantrasyonu 50 µmol/L, 100 µmol/L, 150 µmol/L olacak şekilde seyreltildi ve deneylerde kullanılıncaya kadar +4 °C'deki buzdolabında saklandı. DMSO'nun son konsantrasyonu ise % 0.1'i geçmeyecek şekilde hazırlandı.

3.4.4.2. Nikotinamid'in Hazırlanışı

Nikotinamid (Sigma, N3606) çözücü olarak steril distile su içerisinde çözülerek 0,1 molar stok çözelti hazırlandı ve hazırlanan etken madde solüsyonu +4 °C'deki buzdolabında saklandı. 0.1 molar nikotinamid etken madde çözeltisini hazırlamak için 0.610 gr nikotinamid 50 ml steril distile suda çözüldü. Stok nikotinamid solüsyonu ayrı ayrı serumlu ve serumsuz DMEM-F12, HEPES hücre kültür medyumları içerisinde son konsantrasyonu 1 mM/L, 5mM/L, 10 mM/L olacak şekilde seyreltildi ve deneylerde kullanılıncaya kadar +4 °C'deki buzdolabında saklandı.

3.4.4.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Çözeltisi'nin Hazırlanışı

%30'luk 9,8 molar hidrojen peroksit (Merk) çözeltisinden 0,1 molar 50 ml olacak şekilde ana stok hazırlandı. Hidrojen peroksit çözeltisinden 0,1 molar 50 ml hazırlamak için 510 µl %30'luk 9,8 molar hidrojen peroksit çözeltisinden alındı ve toplam hacim 50 ml olacak şekilde steril distile su ile tamamlandı. Hidrojen peroksit çözeltisi son konsantrasyonu 300 µmol/L olacak şekilde serumsuz DMEM-F12,

HEPES besiyerinde seyreltilerek hazırlandı ve deneylerde kullanılıncaya kadar +4 °C'deki buzdolabında saklandı.

3.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları için, İnsan Retinal Pigment Epitelyal Hücre Hattı (ARPE-19 ATCC® CRL-2302™) kullanıldı. ARPE-19 hücreleri, tam büyüme ortamı içeren serumlu DMEM/F12, HEPES besiyerinde, %95 nem , %5 CO₂ içeren 37 °C'deki steril inkübatörde kültüre edilerek çoğaltıldı.

3.5.1. Hücrelerin Çözülmesi

- 1.) Donmuş hücreleri içeren cryo tüp oda sıcaklığında çözündürüldü.
- 2.) Cryo tüpü %70'lik ethanolle silindi ve bu aşamadan sonra işlemler katı aseptik koşullar altında yapıldı.
- 3.) Tam büyüme ortamı içeren falkon tüpleri, medyum ortamının normal pH'ına (7.0 ila 7.6) ulaşmasını sağlamak için 20 dakika 37 °C'lik inkübatöre yerleştirildi. Cryo tüp içerisindeki hücre süspansiyonu, önceden ısınması sağlanan 7 mL tam büyüme ortamı içeren hücre kültürü santrifüj tüpüne aktarıldı ve 7 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüj edildi.
- 4.) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Tam büyüme medyumunu 20 dakika 37 °C'lik inkübatörde bekletildi ve daha sonra T25 hücre kültür flasklarına her bir flaskta 4 ml olacak şekilde konuldu.
- 5.) Santrifüj tüp içerisindeki hücre kültür pelleti 2 mL tam büyüme ortamıyla süspanse edildi ve nazıkçe pipetaj yapılarak hücre kültür pelletinin homojen bir şekilde dağılması sağlandı.
- 6.) Hücre sayımı için Bio-Rad Automated Cell Counter cihazında ölçüm yapılmak üzere hücre süspansiyonundan 10 µl alındı.
- 7.) Santrifüj sonrası homojen haline getirilen 2 ml hücre kültür süspansiyonu 4 ml tam büyüme ortamı içeren 2 adet T25 flaskı yüzeyine 1'er ml eklenerek eşit şekilde dağılması sağlandı ve her bir flaskta toplam 5'er ml olacak şekilde yeni hücre süspansiyonu hazırlandı.

8.) 2 adet T25 flaskı, 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde inkübe edilmeye bırakıldı. Medyum yenileme gün aşırı olmak üzere haftada 3 kez, alt kültür oranı ise 1:3 olacak şekilde ayarlandı.

3.5.2. Adherent (Yapışkan) Hücrelerin Pasajlanması

Hücre flaskları her gün invert mikroskop altında konfluent durumları kontrol edildi. Hücrelerin konfluent durumu en az %90 yoğunluğa ulaşmış flaskın tüm yüzeyini kapladığı zaman hücre flaskları için yeni pasajlanmaya aşağıda belirtildiği şekilde geçilmiştir.

- 1.) Kullanılmış hücre kültürü ortamı kültür kabından çıkarıldı.
- 2.) Ayrıştırma reaktifinin (TE) etkisini engelleyecek herhangi bir serum, kalsiyum ve magnezyum kalıntısını ortadan kaldırmak için 3 ml 1X fosfat tamponlu salin (PBS, Thermo) eklenerek, hücreler nazikçe yıkandı.
- 3.) Yıkama solüsyonu (1X PBS) flasktan uzaklaştırıldı.
- 4.) Hücrelerin kültür plaklarından ayrılması için önceden ısıtılmış (37 °C) 2 ml Tripsin-EDTA (ayırma reaktifi) flaska eklendi. Daha sonra Tripsin-EDTA eklenen flask 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde 5 dakika bekletildi.
- 5.) Ayrışmayı görmek için hücreler invert mikroskop altında gözlemlendi. Hücrelerin %90'dan fazla oranda ayrılması gözlemlendi.
- 6.) Önceden ısıtılmış (37°C) tam büyüme ortamı, ayırma reaktifi için kullanılan hacmin iki katı kadar olacak şekilde 4 ml flaska eklendi.
- 7.) Tripsin EDTA solüsyonunu ortamdan çıkarmak için hücre süspansiyonu hücre kültür tüplerine aktarıldı ve 7 dakika boyunca yaklaşık 2000 rpm'de santrifüj edildi.
- 8.) Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve hücre kültür pelleti önceden 37 °C'de ısıtılmış 1 ml taze tam büyüme ortamında nazikçe pipetaj yapılarak besiyerine homojen bir şekilde dağılması sağlandı.
- 9.) Hücre sayımı için Bio-Rad Automated Cell Counter cihazında veya Thoma Lamı'nda ölçüm yapılmak üzere hücre süspansiyonundan 10 µl alındı.

10.) T25 flasklarına 4 ml tam büyüme medyumunu eklendi. Daha sonra 12 ml'lik kültür tüplerinde homojen halde bulunan 1 ml hücre süspansiyonunu 4 ml tam büyüme medyumunu içeren flaska eklenerek toplam hacmin 5 ml olması sağlandı.

11. T25 flaskları 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde inkübe edildi.

3.5.3. Hücrelerin Dondurulması

Hücreleri dondurmak için 950µl FBS ve 50 µl DMSO (Sigma) olmak üzere toplamda 1mL dondurma medyumundaki hücreler, cryo tüp saklama kutusunda öncelikle -20 °C'deki buzdolabında 2 saat bekletildi. Daha sonra -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Dondurma medyumundaki 50 µl DMSO, hücrelere zararını en aza indirmek için hücre pelletiyle homojenizasyondan hemen önce 950 µl FBS solüsyonuna eklendi. Daha sonra 1 mL dondurma medyumunu ile hücre pelleti homojenizasyonu aşağıda belirtilen prosedür doğrultusunda yapıldı.

1.) Kullanılmış hücre kültürü ortamını kültür kabından çıkarıldı.

2.) Ayırıştırma reaktifinin etkisini engelleyecek herhangi bir serum, kalsiyum ve magnezyum kalıntısını ortadan kaldırmak için 3 ml 1X PBS eklenerek, hücreler nazikçe yıkandı.

3.) Yıkama solüsyonunu (1X PBS) flasktan uzaklaştırıldı.

4.) Hücrelerin kültür plaklarından ayrılması için önceden ısıtılmış (37 °C) 2 ml Tripsin-EDTA (ayırışma reaktifi) flaska eklendi. Daha sonra Tripsin-EDTA eklenen flask 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde 5 dakika bekletildi.

5.) Ayırışmayı görmek için hücreler invert mikroskop altında gözlemlendi. Hücrelerin %90'dan fazla oranda ayrılması gözlemlendi.

6.) Önceden ısıtılmış (37 °C) tam büyüme ortamı, ayırışma reaktifi için kullanılan hacmin iki katı kadar olacak şekilde 4 ml flaska eklendi.

7.) Tripsin EDTA solüsyonunu ortamdan çıkarmak için hücre süspansiyonu hücre kültür tüplerine aktarıldı ve 7 dakika boyunca yaklaşık 2000 rpm'de santrifüj edildi.

8.) Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve hücre kültür pelleti nazikçe pipetaj yapılarak cryotüp içerisindeki dondurma medyumunda süspanse edilerek, hücre kültür pelletinin dondurma medyumunda homojen bir şekilde dağılması sağlandı.

9.) Cryotüp içerisindeki dondurma medyumunda süspanse edilen hücreler 2 saat -20 °C’de buz dolabında bekletildi. Daha sonra -80 °C’de derin dondurucuda saklandı.

3.6. Hücre Viabilite Analizleri

3.6.1. Tripan Mavisi Deneyi

Tripan mavisi boyama çözeltisi ölü dokuları veya ölü hücreleri mavi olarak renklendiren önemli bir boyadır. Tripan mavisi boyası hücre ortamına eklendiği zaman, canlı hücrelerde boya hücre içine geçemezken, ölü hücrelerde boya hücre membranından geçerek hücreleri maviye boyar. Bu esnada boyayı içine alan hücreler ölü, almayan hücreler ise canlı kabul edilir. Böylece ölü ve canlı hücrelerin süspansiyondaki toplam yüzdesi belirlenebilir. Boyanmamış hücreler, tripan mavisi boyasına geçirgen olmayan canlı hücreleri temsil eder. Hücreler çok seçici olduğundan, canlı bir hücrede tripan mavisi zardan geçemez. Fakat ölü bir hücrede zardan geçer. Bu nedenle, ölü hücreler mikroskop altında ayırıcı bir mavi renk olarak görülürler. Hücreler tripan mavisi solüsyonu ile inkübe edildikten sonra karartılmış bir ortamda optik bir mikroskop altında gözlemlenebilir (Alp E., 2011; Gedikli S., 2013; Iloki-Assanga vd., 2015; Li vd., 2018).

Bu deney iki ayrı amaç için uygulandı. Birinci uygulama, hücre kültürünün laboratuvara ilk geldiğinde donmuş hücrelerin çözülme işleminden sonra ve pasaj kontrolleri sonrası yapılan son pasaj için, ml’de hücre sayımını değerlendirmek amacıyla hücre kültüründeki toplam hücre yoğunlukları ve yüzde canlı-ölü hücre oranları Bio-Rad Automated Cell Counter cihazında ölçüldü. İkinci uygulamada ise deney setlerinde kullanılmak üzere 96 veya 12 kuyucuklu hücre kültür plaklarına ilgili deneye özgü her bir kuyucuğa ml’deki hücre yoğunluklarının ve yüzde canlı-ölü hücre oranlarının hesaplanması Thoma Lamı’nda gerçekleştirildi.

3.6.2. Bio-Rad Automated Cell Counter Cihazında Hücre Sayımı

Yeni pasaj öncesi 1 ml serumlu tam hücre kültür medyumunu ile pipetaj yapılarak homojen haline getirilen hücre süspansiyonundan 10 µl ve 0.4’lük tripan mavisi çözeltisinden 10 µl alınarak 1.5 ml steril bir ependorf tüpte nazikçe karıştırıldı ve sonrasında 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra karışımdan 10 µl alınarak Bio-Rad sayım slaytına eklendi. Sayım slaytı Bio-Rad Automated Cell Counter

cihazına yerleştirilerek hücre süspansiyonunun ml'sinde toplam hücre yoğunluğu, canlı ve ölü hücre oranlarının ölçümü yapıldı.

3.6.3. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Deney setleri için hazırlanan ve invert mikroskop altında konfluent durumları kontrol edilen hücre kültür flasklarının konfluent durumu en az %90 yoğunluğa ulaşmış flaskın tüm yüzeyini kapladığında deney setlerine alınmadan önce Thoma Lamı ile hücre sayımı aşağıda belirtilen protokol ile gerçekleştirilmiştir.

1.) İnkübasyondan sonra çoğalan hücre süspansiyonu, 2000 rpm'de 7 dk santrifüj edildi ve 1 ml tam büyüme ortamı eklenerek pipetaj yapıldı.

2.) Hücre süspansiyonundan 10 µl, 0.4'lük tripan mavisi çözeltisinden 40 µl alınarak 1.5 ml steril bir ependorf tüpte nazikçe karıştırıldı ve sonrasında 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

3.) Karışımından 10 µl alınarak Thoma Lamına yerleştirildi. İnvrt mikroskop altında 10X objektifte canlı hücreler saydam, ölü hücreler mavi renkte gözlemlendi. Canlı hücre sayısı en az %90'a ulaşan flasklar deney gruplarına alındı.

3.6.4. Thoma Lamında Hücre Sayım Hesaplamaları

Thoma Lamı'nda orta merkezi büyük kare sayılır. Büyük kare 16 orta kareden, her bir orta kare ise 25 küçük kareden oluşur. Büyük karenin sınırlarındaki hücreler sayılırken, sağ üst köşeler sayılır, sol alt köşeler sayılmaz. Hücre sayımı invert mikroskopta 10X objektifte gerçekleştirildi. Hücre sayım hesaplamaları aşağıda belirtilen formüllere göre yapıldı.

1.) **% Canlı Hücre Sayısı**= Toplam Canlı Hücre/ Toplam Hücre (Total Canlı Hücre+ Toplam Ölü Hücre) X100

2.) **Dilüsyon Faktörü**: Final Hacim/ Hücrelerin Hacmi: 50 µl / 10 µl= 5

3.) **mL'deki canlı hücre sayısı (konsantrasyonu)**:

Orta merkez büyük karedeki canlı hücre sayısı X Dilüsyon Faktörü X 10⁴

3.7. CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Viabilite Analiz Yöntemi

Radyoaktif olmayan hücre sayım kiti CCK-8, hücre proliferasyonunda ve sitotoksikite deneylerinde canlı hücrelerin sayısının belirlenmesi için hassas kolorimetrik testlerde kullanılır. Üretici firmanın protokolüne göre CCK-8 analizi; suda çözünürlüğü yüksek tetrazolyum tuzunu (WST-8) kullanarak, bir elektron taşıyıcısının varlığında indirgeme sonucu, suda çözünür bir formazan boyası üretmesini esas alır. Bu analiz yöntemine göre; WST-8, kültür ortamında çözünebilen sarı renkli bir ürün olan formazanı verecek şekilde hücrelerdeki dehidrojenazlar aracılığıyla indirgenir. Hücrelerdeki dehidrojenazların aktivitesiyle üretilen formazan boyasının miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır.

Bu analiz yöntemiyle ilk etapta standart seviyede oksidatif stres oluşumunu sağlamak amacıyla 300µM/L hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisinin sağlıklı RPE hücrelerine belirli sürelerde muamelesi sonucu kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşturabilmek amacıyla, sağlıklı RPE hücrelerinin %35-%40 oranında beklenen viabilite kaybının hangi koşullarda sağlandığının gözlemlenmesiyle oksidatif stres medyumunu belirlenmiştir. Yine bu analiz yöntemi ile standart seviyede RPE hücrelerine uygulanan oksidatif strese bağlı olarak bu oranlarda azalan hücre viabilitesinin, resveratrol ve nikotinamid'in belirlenen konsantrasyonlarda ve sürelerde, ayrı ayrı olarak ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine uygulanmasıyla ne yönde ve nasıl değiştiği değerlendirilerek, iki etken madde için etkili dozları belirlenmiştir. Ayrıca oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde viabiliteyi arttıran en iyi etken madde seçeneğinin ve etkili kombine dozun, sağlıklı RPE hücreler için sitotoksik etki göstererek hücre viabilitesini etkileyip etkilemediği de bu analiz yöntemi ile gözlemlenmiştir.

Sağlıklı RPE hücrelerinin ve standart seviyede oksidatif stres uygulanan RPE hücrelerinin ortalama absorbansı ortalama absorbansı %100 canlılığa karşılık gelen değer olarak kabul edildi ve etken maddeler uygulandıktan sonra elde edilen absorbans değerleri ise kontrol grubu hücrelerine göre oranlanarak hücre canlılığı için yüzde değer olarak belirlendi (Iloki-Assanga vd., 2015; Shi vd., 2015; Cui vd., 2019).

3.7.1. Sağlıklı RPE Hücrelerinde Standart Seviyede Oksidatif Stres Oluşumu

İnsan retinal pigment epitelyal hücre hattında oksidatif stres hasarı ile ilgili yapılan bir çalışmada (Iloki-Assanga vd., 2015) araştırmacılar, bu hücre hattında oluşturmak istedikleri en iyi ve en kısa sürede oksidatif stresin yani sitotoksik etkinin % 50'sini ortaya çıkarmak için gerekli minimum konsantrasyonun (IC50), serumsuz kültür ortamında serumlu kültür ortamına kıyasla yaklaşık iki kat arttırdığını ortaya koymuşlardır. Bu sebeple oksidatif stres protokolünde, sağlıklı RPE hücreler serum içermeyen hücre kültürü medyumuna ile muamele edilmiştir.

RPE hücrelerinde antioksidan savunma sistemlerini devre dışı bırakıp, kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon progresyonunu başlatabilen ve progresyonun ilerlemesine neden olabilecek hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını literatür araştırması sonucunda belirleyerek (Kim vd., 2015; Zhu vd., 2016; Huang vd., 2019; Bai vd., 2021; Kim vd., 2021), oksidatif stres protokolü oluşturuldu. Sağlıklı RPE hücrelerinde oluşturulmak istenen oksidatif stres, $300\mu M/L$ H_2O_2 konsantrasyonu kullanılarak standart seviyede gerçekleştirildi.

Sağlıklı RPE hücrelerinde oluşturulmak istenen oksidatif stresin standart seviyede elde edilebilmesi kuru tip YBMD progresyonunu temsil etmektedir (standart oksidatif stres; orta progresyonlu). Literatür taraması sonucunda kuru tip YBMD için RPE hücre yoğunluğunun kontrole kıyasla %35-%40 arasında hücre viabilite oranının azalması orta (standart) progresyonlu, %50 ve daha fazla hücre viabilite oranının azalması ise yüksek (ileri) progresyonlu olarak değerlendirildi (Shi vd., 2015; Zhu vd., 2016; Cui vd., 2019).

3.7.1.1. Kuru Tip Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyon Modeli

Her bir deney protokolünde sağlıklı RPE hücrelerin oksidatif strese maruz bırakılarak kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşumu için; öncelikle serumlu hücre kültür medyumunda inkübe edilen sağlıklı hücreler, deney hücre plakalarında ilgili deneydeki hücre kültür kuyucuklarına dilüsyon faktörüne göre ekim yapıldı ve 24 saat boyunca plaka yüzeylerine hücrelerin yapışmasını sağlamak için hiç bir madde eklenmeden % 5'lik CO_2 'li inkübatöre bırakıldı.

Daha sonra serumlu hücre kültür medyumunu ortadan uzaklaştırıldı ve hücreler pH 7.4 1X PBS ile yıkandı ve serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat inkübe edildi (Kim vd., 2015). Daha sonra 300µM/L H₂O₂ çözeltisi ile muamele edildi ve oksidatif stresin indüklenmesi için oluşturulan oksidatif stres medyumunda 20 saat inkübe edildi.

3.7.1.2. Oksidatif Stres Medyumunun Belirlenmesi

Tez çalışmamızda sağlıklı RPE hücrelerine 300µM H₂O₂ çözeltisi ile muamele sonucu kontrole kıyasla %35-%40 arasında viabilite kaybı araştırılmış olup, belirlenen konsantrasyon orta seviye (standart) oksidatif stres kaynağı olarak değerlendirmeye alındı.

Standart seviyede oksidatif stres oluşumu CCK-8 analiz yöntemi ile belirlendi. Oksidatif stres medyum konsantrasyon içeriğinin belirlenebilmesi için kontrole kıyasla istenilen düzeyde viabilite kaybının oluşması gözlemlendi. Planlanan doğrultuda kontrol grubu olarak sağlıklı RPE hücreleri, deney grubu olarak ise oksidatif stres medyumunu içeren hasarlı RPE hücrelerine CCK-8 analizi yapıldı. Hücre viabilite oranı 450 nm dalga boyundaki mikropilaka okuyucuda absorbans değeri ölçülerek belirlendi. Bu dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenen absorbans değeri canlı hücre sayısı ile orantılı olarak hesaplandı. Kontrol grubuna kıyasla deney grubundaki absorbans değerleri karşılaştırılarak doğru orantı sonucunda % kaç oranında hücre viabilitesinin azaldığı hesaplandı. Öncelikle oksidatif stres medyumunun %10'unun 300 µM/L H₂O₂ çözeltisi olacak şekilde hazırlanıp, deney seti başlatıldı. İstenilen düzeyde hücre viabilite kaybını elde etmek için oksidatif stres medyumunun %20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 oranında 300 µM/L H₂O₂ çözeltisi olacak şekilde deney setleri hazırlandı. Kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşturmak için istenilen hücre viabilite kaybı oksidatif stres medyumunun %50'sinin 300 µM/L H₂O₂ çözeltisi ve diğer %50'sinin serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri olacak şekilde hazırlanması belirlendi. Bundan sonraki tüm deney setlerinde oksidatif stres medyumunu olarak belirlenen bu konsantrasyon kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşturmak için oksidatif stres protokolünde kullanıldı.

3.7.1.3. Oksidatif Stres Protokolü

Oksidatif stres protokolü aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1.) Serum içeren hücre kültürü medyumunu ile süspanse edilen sağlıklı RPE hücrelerinden, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her bir kuyucukta 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve adherent hücrelerin hücre plak yüzeyine iyice yapışması için 24 saat boyunca hiç bir madde eklenmeden inkübatöre bırakıldı. Kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine, bu aşamadan oksidatif stres oluşumu sonrası hücrelerin yıkanması aşamasına kadar işlem yapılmadı, deney grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine ise oksidatif stres protokolü uygulandı.

2.) İnkübasyon sonrası deney gruplarında medyum aspire edildi ve hücreler 60 µl 1X PBS ile yıkandı.

3.) Hücreler serum içermeyen 50 µl DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat inkübe edildi.

4.) Oksidatif stresin oluşabilmesi için 50 µl 300 µM/L H₂O₂ ile 20 saat inkübe edildi.

5.) İnkübasyondan sonra kontrol ve deney gruplarındaki medyum aspire edildi ve hücreler 60 µl 1X PBS ile yıkandı.

6.) Deney gruplarına serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinden 100 µl, kontrol grubuna ise serumlu DMEM/F12, HEPES besiyerinden 100 µl eklendi.

7.) Sağlıklı Blank grubuna serum içeren DMEM/F12, HEPES besiyerinden 100 µl, oksidatif stres uygulanan blank grubuna ise serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinden 100 µl eklendi.

8.) Kontrol, deney ve blank gruplarına 10 µl CCK-8 solüsyonundan eklendi.

9.) 2 saat 37 °C'de inkübasyondan sonra 450 nm'de mikropłaka okuyucuda absorbans değeri ölçüldü. Daha sonra örneklere ait 3 farklı absorbans değerin ortalaması alındı.

Tüm gruplar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

Ao= Kontrol Grubu: 100µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde hücre kültürü + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Ao blank= Blank Kontrol Grubu: 100µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Ad = Deney grubu: 100µL serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisindeki hücre kültürü + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Ad blank= Deney Blank Kontrol Grubu: 100µL serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Sağlıklı hücrelerin ortalama absorbans değeri %100 canlılığa karşılık gelen değer olarak kabul edildi. Oksidatif strese maruz bırakıldıktan sonra ölçülen absorbans değeri ile oranlanarak hücre canlılığı için yüzde değer olarak aşağıdaki formüle göre belirlendi (Iloki-Assanga vd., 2015; Shi vd., 2015; Cui vd., 2019).

$$\% \text{ Hücre viabilite oranı: } 100X (\text{Ad} - \text{Ad blank}) / (\text{Ao} - \text{Ao blank})$$

3.8. CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi ile Hücre Viabilite ve Hücre Proliferasyonun Belirlenmesi

Hücre viabilite ve hücre proliferasyon oranı, CCK-8 analiz yöntemiyle üretici firmanın kullanım talimatına göre ölçüldü (Tsujinaka vd., 2015; Zhang vd., 2019). Sağlıklı ve standart düzeyde oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin hücre proliferasyon indeksi deney sonucuna göre hesaplandı. Deneysel verilere göre bu iki etken madde için, kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modelinde progresyonu azaltacak yönde hücre proliferasyon indeksinin arttığı gözlemlenen en etkili doz miktarları, kombine doz olarak belirlendi ve kombine doz aynı analiz yöntemi için de uygulandı.

% Proliferasyon indeksi aşağıda belirtilen formüle ve CCK-8 analizine göre hesaplandı. Kontrol grubu ile kıyaslanarak anlamlı farklılık esas alındı (Hao vd., 2016).

At: Tedavi Deney Grubu

At blank: Blank Tedavi Deney Grubu

Ak: Kontrol Grubu

Ak blank: Blank Kontrol Grubu

% Proliferasyon İndeksi: $100X (At - At \text{ blank} / Ak - Ak \text{ blank})$.

3.9. CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Hasarlı RPE Hücre Analizi

Farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine dozunun oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla hücre viabilite ve hücre proliferasyonuna etkisi aşağıda belirtilen protokole göre ölçülmüştür. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücrelerin ortalama absorbans değeri %100 canlılığa karşılık gelen değer olarak kabul edildi. Hasarlı hücreler farklı inkübasyon sürelerinde etken maddeler ile muamale edildikten sonra ölçülen absorbans değeri ile oranlanarak hücre canlılığı için yüzde değer olarak belirlendi (Liang vd.,2021).

1.) Serum içeren hücre kültürü medyumunu ile süspanse edilen sağlıklı RPE hücrelerinden, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına yaklaşık 20.000 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa 100 µl ekim yapıldı ve adherent hücrelerin hücre plak yüzeyine iyice yapışmasını sağlamak için 24 saat boyunca hiç bir madde eklenmeden inkübatöre bırakıldı.

2.) İnkübasyon sonrası tedavi deney gruplarında medyum aspire edildi ve hücreler 60 µl 1X PBS ile yıkandı.

3.) Hücreler serum içermeyen 50 µl DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat inkübe edildi.

4.) Oksidatif stresin indüklenmesi için 50 µl 300 µM/L H₂O₂ ile 20 saat inkübe edildi.

5.) İnkübasyondan sonra kontrol ve deney gruplarındaki medyum aspire edildi ve hücreler 60 µl 1X PBS ile yıkandı.

6.) Kontrol grubuna serum içermeyen DMEM F12, HEPES besiyerinden 100 µl, tedavi deney gruplarına ise serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinden 90 µl eklendi.

7.) Farklı konsantrasyonlarda serumsuz DMEM F12, HEPES besiyeri ile seyreltilmiş etken madde solüsyonlarından 10 µL eklendi.

8.) Her bir grup için blank gruplar belirlendi.

9.) 96'lı hücre kültürü plakaları, 24,48,72 saat ayrı ayrı inkübasyona bırakıldı.

10.) İnkübasyon sonrası tüm gruplara en az 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş 10 µL CCK-8 çözeltisi eklendi.

11.) 2 saat 37 °C'de inkübasyondan sonra 450 nm'de mikropilaka okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü. Daha sonra örneklerle ait 3 farklı absorbans değerinin ortalaması alındı.

12.) % Hücre viabilite oranı ve hücre proliferasyon indeksi; resveratrol için; 100X (Aort- Aort blank) / (Aok-Aok blank), nikotinamid için ise; 100X (Aont- Aont blank) / (Aok-Aok blank) formülleri ile hesaplandı.

Tüm gruplar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

Aort/Aont= Tedavi Deney Grubu: 90µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde hücre kültürü + 10 µL Etken Madde + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Aort blank = Resveratrol için Blank Tedavi Deney Grubu: 90µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi+ serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde seyreltilmiş % 0,1'lik DMSO çözeltisinden 10 µL.

Aont blank = Nikotinamid için Blank Tedavi Deney Grubu: 100µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Aok = Kontrol Grubu: 100µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde hücre kültürü + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Aok blank= Blank Kontrol Grubu: 100µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

3.10. CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Kombine Dozların Değerlendirilmesi

Farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin, deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine uygulamasının, hem oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için hemde sağlıklı RPE hücreler için iki farklı kontrol grubuna kıyasla hücre viabilite ve hücre proliferasyonuna etkisi aşağıdaki protokole göre ölçüldü.

1.) Serum içeren hücre kültürü medyumunu ile süspanse edilen sağlıklı RPE hücrelerinden, 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yaklaşık 20.000 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa 100 µl ekim yapıldı ve adherent hücrelerin hücre plak yüzeyine iyice yapışmasını sağlamak için 24 saat boyunca hiç bir madde eklenmeden inkübatöre bırakıldı.

2.) İnkübasyon sonrası tedavi deney gruplarında medyum aspire edildi ve hücreler 60 µl 1X PBS ile yıkandı.

3.) Hücreler serum içermeyen 50 µl DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat inkübe edildi.

4.) Oksidatif stresin indüklenmesi için 50 µl 300 µM/L H₂O₂ ile 20 saat inkübe edildi.

5.) İnkübasyondan sonra kontrol ve deney gruplarındaki medyum aspire edildi ve hücreler 60 µl 1X PBS ile yıkandı.

6.) Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücreler için serum içermeyen DMEM F12, HEPES besiyerinden 100 µl, sağlıklı RPE hücreler için serumlu DMEM F12, HEPES besiyerinden 100 µl, tedavi deney gruplarına ise serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinden 90 µl eklendi.

7.) Farklı konsantrasyonlarda serumsuz DMEM F12, HEPES besiyeri ile seyreltilmiş etken madde solüsyonlarından 5'er µL olmak üzere toplam 10 µL eklenmiştir.

8.) Kontrol gruplarının ve kombine doz gruplarının blank gruplar ayrı ayrı belirlendi.

9.) 96'lı hücre kültür plakaları, 24,48,72 saat ayrı ayrı inkübasyona bırakıldı.

10.) İnkübasyon sonrası tüm gruplara en az 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş 10 µL CCK-8 çözeltisi eklendi.

11.) 2 saat 37 °C'de inkübasyondan sonra 450 nm'de mikropilaka okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü. Daha sonra örneklerle ait 3 farklı absorbans değerinin ortalaması alındı.

12.) Kombine dozlar için % hücre viabilite oranı; $100X (A_{otc} - A_{otc\ blank}) / (A_{ok} - A_{ok\ blank})$ formülü ile, yara onarımı değerlendirilmesinde ise $100X (A_{otc} - A_{otc\ blank}) / (A_{sk} - A_{sk\ blank})$ formülü ile hesaplanmıştır.

Tüm gruplar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Aotc = Kombine doz için Tedavi Deney Grubu: 90µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde hücre kültürü + 5 µL Resveratrol, + 5 µL Nikotinamid+ 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Aotc blank = Kombine doz için Blank Tedavi Deney Grubu: 95µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri+ 10 µL CCK-8 çözeltisi+ serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde seyreltilmiş %0,1'lik DMSO çözeltisinden 5µL.

Aok = Hasarlı RPE Hücreler İçin Kontrol Grubu: 100µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde hücre kültürü + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Aok blank = Hasarlı RPE Hücreler İçin Blank Kontrol Grubu: 100µL serumsuz DMEM/F12, HEPES besiyeri+ 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Ask= Sağlıklı RPE Hücreler İçin Kontrol Grubu: 100µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde hücre kültürü + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Ask blank= Sağlıklı RPE Hücreler İçin Blank Kontrol Grubu: 100µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

3.11. CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Sağlıklı RPE Hücre Analizi

Farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine uygulamasının, sağlıklı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla hücre viabilite ve hücre proliferasyonuna etkisi aşağıda belirtilen protokole göre ölçüldü.

1.) Serum içeren hücre kültürü medyumunu ile süspanse edilen sağlıklı RPE hücrelerinden, 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her bir kuyucukta yaklaşık 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve adherent hücrelerin hücre plak yüzeyine iyice yapışmasını sağlamak için 24 saat boyunca hiç bir madde eklenmeden inkübatöre bırakıldı.

2.) İnkübasyon sonrası tedavi deney gruplarında medyum aspire edildi.

3.) Kontrol grubuna serumlu DMEM F12, HEPES besiyerinden 100 µl, tedavi deney gruplarına ise serumlu DMEM/F12, HEPES besiyerinden 90 µl eklendi.

4.) Farklı konsantrasyonlarda serumlu DMEM F12, HEPES besiyeri ile seyreltilmiş etken madde solüsyonlarından 10 µL, kombine doz için ise etken madde solüsyonlarından 5'er µL eklendi.

5.) Resveratrol, nikotinamid ve kombine dozların blank grupları ayrı ayrı belirlendi.

6.) 96'lı hücre kültür plakaları 24,48,72 saat ayrı ayrı inkübasyona bırakıldı.

7.) İnkübasyon sonrası tüm gruplara en az 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş 10 µL CCK-8 çözeltisi eklendi.

8.) 2 saat 37 °C'de inkübasyondan sonra 450 nm'de mikropılaka okuyucuda absorbans değerleri ölçüldü. Daha sonra örneklere ait 3 farklı absorbans değerinin ortalaması alındı.

Tüm gruplar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

Asrt blank = Resveratrol için Blank Tedavi Deney Grubu: 90µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri+ 10 µL CCK-8 çözeltisi+ serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde seyreltilmiş % 0,1'lik DMSO çözeltisinden 10 µL.

Asnt blank = Nikotinamid için Blank Tedavi Deney Grubu: 100µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Astc = Kombine doz için Tedavi Deney Grubu: 90µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde hücre kültürü + 5 µL Resveratrol, + 5 µL Nikotinamid + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Astc blank = Kombine doz için Blank Tedavi Deney Grubu: 95µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi+ serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde seyreltilmiş % 0,1'lik DMSO çözeltisinden 5µL.

Ask = Kontrol Grubu: 100µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri içerisinde hücre kültürü + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

Ask blank = Blank Kontrol Grubu: 100µL serumlu DMEM/F12, HEPES besiyeri + 10 µL CCK-8 çözeltisi.

3.12. Apoptoz Analizleri

CCK-8 (cell counting kit- 8) analiz yöntemi ile sağlıklı ve oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücre analizleri sonucu her bir inkübasyon süresi için belirlenen en etkili etken madde seçenekleri ve buna bağlı kombine doz uygulamaları apoptoz analizleri için seçildi. Resveratrol ve nikotinamid'in belirlenen konsantrasyonlarda ve sürelerde ayrı ayrı olarak ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine uygulaması, sağlıklı ve oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelere uygulanmasının hücre apoptozuna olan etkisi FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I kullanılarak gözlemlendi. Üretici firmanın protokolü hücre yoğunluğuna göre modifiye edildi.

3.12.1. Flow Sitometrik Analiz

Bu analiz yöntemi üretici firmanın apoptotik programı esas alarak oluşturduğu protokole göre gerçekleştirilen bir yöntemdir. Apoptotik programa göre analiz yöntemi aşağıda belirtilen esaslara göre gerçekleştirilir.

Plazma zarı kaybı apoptozun en erken süreçlerinden biridir. Apoptotik hücrelerde, membran fosfolipid fosfatidilserin (PS) plazma zarının iç kısmından dış kısmına taşınır. Böylece PS dış hücresel ortama maruz bırakılır. Annexin V, PS'ye yüksek afinitesi olan, 35-36 kDa Ca^{+2} bağımlı fosfolipit bağlayıcı bir proteindir. Açıkta olan PS ile hücrelere bağlanır. Annexin V, PS'ye yüksek afinitesini korur, böylece apoptoz geçiren hücrelerde flow sitometri analizi için hassas bir prob olarak işlev görür. FITC Annexin V boyaması, apoptozu DNA fragmentasyonu gibi geç aşamalardan daha erken bir aşamada tanımlayabilir. Yani FITC Annexin V boyaması, apoptotik süreçlerden kaynaklanan hücre ölümünün son aşamalarına eşlik eden membran bütünlüğü kaybından önce gelmektedir. Bu nedenle, FITC Annexin V ile boyama tipik olarak, araştırmacının erken apoptotik hücreleri tanımlanmasına yardım etmek için Propidyum İyodür (PI) boyamayla birlikte kullanılır. Sağlam membranlı canlı hücreler PI'yi dışarıda tutarken, ölü ve hasarlı hücrelerin membranları PI'ye geçirgendir. Üretici firmanın protokolüne göre değerlendirme üç şekilde olur. Birincisi; Annexin V negatif/ PI negatif hücreler canlı kabul edilir. Yani apoptoz yoktur. İkincisi; Annexin V pozitif/ PI negatif hücreler erken apoptotik ve membran bütünlüğü mevcut kabul edilir. Üçüncü olarak; annexin V pozitif/ PI Pozitif hücreler geç apoptotik veya ölü hücreler olarak kabul edilir. Bu boyama yöntemi, aktif olarak apoptoz geçiren bir populasyon içerisindeki hücrelerin yüzdesini nicel olarak belirlemek için kullanılır.

Annexin ve PI boyaları kit içerisinde kullanılmaya hazır halde ve her bir test için 5 µl kullanıldı. Boyalar kullanmadan önce vortekslendi. Kit içerisinde bulunan 10X Annexin V Binding Buffer, 1X olacak şekilde hazırlandı. 10X Annexin V Binding Buffer solüsyonunu 1X haline getirebilmek için; 1 ml 10X Binding Buffer solüsyonuna 9 ml distile su eklenerek toplam hacim 10 ml'ye tamamlandı.

Her bir deney grubu; 24, 48, 72 saat'lik inkübasyon süreleri için ayrı ayrı belirlenen konsantrasyondaki etken maddeler ve buna bağlı kombine dozun sağlıklı ve oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı olan boyanmış RPE hücreleri, kontrol

grubu; her bir deney setindeki etken maddelerin yokluğunda boyanmış hücre kültür grubunu, boyasız kontrol grubu ise her bir deney setindeki etken maddelerin yokluğunda boyanmamış hücre kültür grubunu temsil edecek şekilde hazırlandı. Tüm gruplar iki tekrarlı olacak şekilde hazırlandı.

3.12.2. Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Hasarlı RPE Hücrelerde Apoptoz Analizi

Farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine uygulamasının, oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla apoptoz oranına etkisi üretici firmanın protokolüne göre, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I yardımıyla aşağıda belirtilen protokol çerçevesinde yapıldı (Song vd., 2012; Zha vd., 2015).

1.) Serum içeren hücre kültürü medyumunu ile süspanse edilen sağlıklı RPE hücrelerinden, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her bir plakta yaklaşık olarak 3×10^5 /ml hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ekim yapıldı ve 24 saat boyunca hiç bir madde eklenmeden inkübatöre bırakıldı.

2.) 24 saat inkübasyon süresi sonrasında deney gruplarında medyum aspire edildi ve hücreler 600 µl 1X PBS ile yıkandı.

3.) Hücreler serum içermeyen 500 µl DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat inkübe edildi.

4.) Oksidatif stresin indüklenmesi için 500 µl 300 µM/L H₂O₂ ile 20 saat inkübe edildi.

5.) İnkübasyondan sonra deney gruplarındaki medyum aspire edildi ve 600 µl 1X PBS ile yıkandı.

6.) Serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinden 900 µl eklendi. 100 µl resveratrol ve 100 µl nikotinamidden ayrı ayrı belirlenen konsantrasyonlarda eklenerek, son hacim 1000 µl olacak şekilde ayarlandı. Kombine dozlar 50'şer µl olacak şekilde toplamda 100 µl olarak ayarlandı. Kontrol grubuna ise serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinden 1000 µl eklendi.

7.) 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda tüm gruplarda medyum aspire edildi.

8.) 12'li hücre kültür plakalarındaki tüm kuyucuklara 500 µl %0.25 Tripsin-EDTA (1XTE) eklendi ve daha sonra 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde 5 dakika inkübe edildi.

9.) 1000 µl tam büyüme medyumunu eklendi.

10.) Tüm solüsyon (1500 µl) santrifüj tüpüne aktarıldı ve 7 dk boyunca yaklaşık 2000 rpm'de santrifüj edildi.

11.) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.

12.) Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve 300 µl 1X Bağlanma Tamponu içinde pipetaj ile süspansiyon edilerek homojen haline getirildi.

13.) 100 µl süspansiyondan alındı ve 1,5 ml ependorf tüplere konuldu.

14.) 5 µl Annexin V ve 5 µl PI eklendi.

15.) Yavaşça hücreler vortekslendi ve karanlıkta oda sıcaklığında (25°C) 15 dk inkübe edildi.

16.) 100µl 1X Bağlanma Tamponu her bir tüpe eklendi.

17.) 1 saat içerisinde flow sitometri ile analiz edildi.

3.12.3. Sağlıklı RPE Hücrelerde Apoptoz Analizi

Farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine uygulamasının, sağlıklı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla apoptoz oranına etkisi üretici firmanın protokolüne göre, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I yardımıyla aşağıda belirtilen protokol çerçevesinde yapıldı (Song vd., 2012; Zha vd., 2015).

1.) Serum içeren hücre kültürü medyumunu ile süspanse edilen sağlıklı RPE hücrelerinden, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her bir plakta yaklaşık olarak 3×10^5 /ml hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ekim yapıldı ve 24 saat boyunca hiç bir madde eklenmeden inkübatöre bırakıldı.

2.) 24 saat inkübasyon süresi sonrasında deney gruplarında medyum aspire edildi ve hücreler 600 µl 1X PBS ile yıkandı.

3.) Serumlu DMEM/F12, HEPES besiyerinden 900 µl eklendi. 100 µl resveratrol ve 100 µl nikotinamidden ayrı ayrı belirlenen konsantrasyonlarda eklenerek, son hacim 1000 µl olacak şekilde ayarlandı. Kombine dozlar 50'şer µl olacak şekilde toplamda 100 µl olarak ayarlandı. Kontrol grubuna ise serumlu DMEM/F12, HEPES besiyerinden 1000 µl eklendi.

4.) 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda tüm gruplarda medyum aspire edildi.

5.) 12'li hücre kültür plakalarındaki tüm kuyucuklara 500 µl %0.25 Tripsin-EDTA (1XTE) eklendi ve daha sonra 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde 5 dakika inkübe edildi.

6.) 1000 µl tam büyüme medyumunu eklendi.

7.) Tüm solüsyon (1500 µl) santrifüj tüpüne aktarıldı ve 7 dk boyunca yaklaşık 2000 rpm'de santrifüj edildi.

8.) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.

9.) Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve 300 µl 1X Bağlanma Tamponu içinde pipetaj ile süspansiyon edilerek homojen haline getirildi.

10.) 100 µl süspansiyondan alındı ve 1,5 ml ependorf tüplere konuldu.

11.) 5 µl Annexin V ve 5 µl PI eklendi.

12.) Yavaşça hücreler vortekslendi ve karanlıkta oda sıcaklığında (25°C) 15 dk inkübe edildi.

13.) 100µl 1X Bağlanma Tamponu her bir tüpe eklendi.

14.) 1 saat içerisinde flow sitometri ile analiz edildi.

3.12.4. Apoptoz Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Apoptoz analizlerinin sonuçları aşağıda belirtildiği gibi 3 farklı şekilde değerlendirildi (Liu vd., 2021; Zi vd., 2021).

Birinci değerlendirme; Annexin V negatif/ PI negatif hücreler canlı kabul edilir. Yani apoptoz yoktur. (Hücreler boyanmamış; Annexin-, P-).

İkinci değerlendirme; Annexin V pozitif/ PI negatif hücreler erken apoptotik ve membran bütünlüğü mevcut kabul edilir. (Annexin+, PI-).

Üçüncü değerlendirme; Annexin V pozitif/ PI pozitif hücreler geç apoptotik veya ölü hücreler olarak kabul edilir. (Annexin+, PI+).

Apoptotik oran= Erken evre apoptotik hücrelerin yüzdesi + Geç evre apoptotik hücrelerin yüzdesi.

3.13. *SIRT1* Gen ifade Düzeyinin Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile Belirlenmesi

Sağlıklı ARPE-19 hücrelerine uygulanan standart seviye oksidatif stres protokolü sonrasında, farklı dozda ve farklı inkübasyon sürelerinde uygulanan resveratrol ve nikotinamid'in kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modelinde progresyonu azaltacak yönde belirlenen hücre viabilite, hücre proliferasyonu ve hücre apoptoz analizlerinden alınan en etkili doz miktarları ve birlikte uygulanarak oluşan kombine dozun, birçok oküler hastalığın patogenezinde rol oynayan *SIRT1* genindeki mRNA ifade düzeylerine olan etkisi kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile belirlendi. Bu analizin belirlenebilmesi için tedavi deney hücre kültür grupları ve kontrol hücre kültür grubundan; total RNA izolasyonu, komplementer DNA (cDNA) sentezi ve bunun sonucunda ise RT-qPCR yöntemi gerçekleştirildi.

3.13.1. Tedavi Deney Hücre Kültür Grupları ve Kontrol Hücre Kültür Grubundan Total RNA'nın Elde Edilmesi

Hücrelerden total RNA izolasyonu, TRIzol reaktifi kullanılarak aşağıda belirtilen protokole göre izole edildi. (Hwang vd.,2019). Bu yöntem tek bir örnekten, RNA, DNA ve proteinlerin sıralı olarak çökeltilmesi esasına dayanmaktadır. Üretici firmanın protokolü hücrenin karakteristik özelliğine göre, yüksek verimlilikte total RNA izolasyonunun sağlanması için modifiye edilmiştir. TRIzol reaktifi ile total RNA eldesi; örnek homojenizasyonu, faz ayrımı, RNA çökeltilmesi, RNA yıkama ve RNA'nın çözülmesi aşamalarından oluşmaktadır.

1.) Örnek Homojenizasyonu (Örneklerin Liziz Edilmesi)

a.) Serum içeren hücre kültürü medyumunu ile süspanse edilen sağlıklı RPE hücrelerinden, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her bir plakta yaklaşık olarak 3×10^5 /ml hücre olacak şekilde her bir grup için iki kuyucuğa ekim yapıldı ve 24 saat boyunca hiç bir madde eklenmeden inkübatöre bırakıldı.

b.) 24 saat inkübasyon süresi sonrasında deney gruplarında medyum aspire edildi.

c.) Hücreler serum içermeyen 500 µl DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat inkübe edildi. Sağlıklı ARPE hücre grubu için herhangi bir işlem yapılmadı.

d.) Oksidatif stresin indüklenmesi için 500 µl 300 µM/L H₂O₂ ile 20 saat inkübe edildi.

e.) İnkübasyondan sonra deney gruplarındaki medyum aspire edildi ve 600 µl 1X PBS ile yıkandı.

f.) Serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinden 900 µl eklendi. 100 µl resveratrol ve 100 µl nikotinamidden ayrı ayrı belirlenen konsantrasyonlarda eklenerek, son hacim 1000 µl olacak şekilde ayarlandı. Kombine dozlar 50'şer µl olacak şekilde toplamda 100 µl olarak ayarlandı. Kontrol grubuna ise serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinden 1000 µl eklendi.

g.) 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda tüm gruplarda medyum aspire edildi.

h.) 12'li hücre kültür plakalarındaki tüm kuyucuklara 500 µl %0.25 Tripsin-EDTA (1X TE) eklendi ve daha sonra 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde 5 dakika inkübe edildi.

i.) 1000 µl tam büyüme medyumunu eklendi.

j.) Tüm solüsyon (1500 µl) santrifüj tüpüne aktarıldı ve 7 dk boyunca yaklaşık 2000 rpm'de santrifüj edildi.

k.) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.

l.) 2 adet 12 kuyucuklu mikrolakadan elde edilen hücre pelletinin her birine, 350 µl Trizol Reagent eklendi.

m.) Hücrelerin homejenize edilebilmesi için elde edilen lizat birkaç kez yukarı aşağı pipetlendi.

n.) Her iki örnek RNaz içermeyen 1.5 ml ependorf tüpüne transfer edilerek tek bir ependorf tüpte toplandı.

o.) 5 dk oda sıcaklığında nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrışmasına izin vermek için inkübe edildi.

2.) Faz Ayrımı

a.) 1.5 ml ependorf tüpüne 140 µl kloroform (Fluka) eklendi, ardından tüp sıkıca kapatıldı ve 15 saniye boyunca kuvvetlice karıştırıldı.

b.) 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

c.) 1.5 ml ependorf tüpü, 12.000 x g'de 4°C soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası karışım, bir alt mavi fenol-kloroforma, ara bir faza ve renksiz bir üst sulu faza ayrıldı.

d.) Faz transfer aşamasında fazlar arasındaki beyaz katman olan ara faza pipet ucunu değdirmemeye dikkat ederek, üst sulu faz yeni bir RNaz içermeyen 1.5 ml ependorf tüpüne aktarıldı.

3.) RNA Çöktürülmesi

a.) Üst sulu faza 350 µl izopropanol (Fluka) eklendi.

b.) Ependorf tüp birkaç kez ters çevirerek karıştırıldı.

c.) Örnek karışım, oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

d.) RNA pelleti oluşturmak için ependorf tüpü 12000 x g'de 10 dakika 4°C'de soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi.

e.) Toplam RNA çökeltisi, tüpün altında beyaz jel benzeri bir pellet oluşumu ile gözlemlendi.

f.) Süpernatant pipet ucu pellete değdirilmeden dikkatlice çıkarıldı.

4.) RNA Yıkama

a.) RNA pelletini yıkamak için 700 µl %75'lik ethanol (Fluka) eklendi ve ardından kısa bir süre vortekslendi.

b.) Ependorf tüp, 4°C'de 5 dakika boyunca 7500 x g'de soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi.

c.) RNA pelletiyle temas etmemeye dikkat edilerek, süpernatant dikkatlice çıkarıldı.

d.) RNA pelleti, 5-10 dakika havayla oda sıcaklığında kurutuldu.

5.) RNA'nın Çözülmesi (Resüspansiyonu)

a.) RNA pelletini yeniden süspanse etmek için 50 µl RNaz içermeyen su eklenerek pipetaj yapıldı.

b.) RNA pelletini çözmek için 55°C'de 10-15 dakika inkübe edildi.

c.) Total RNA eldesi -20°C'deki buzdolabında saklandı.

3.13.2. RNA miktarı ve RNA Saflık Ölçümü

Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop Spektrofotometre" cihazında ölçülerek Reverse Transkriptaz (RT)-PCR'da kullanılabilecek kadar -20 °C'de buzdolabında saklandı. RNA konsantrasyonu µg/ml değeri olarak belirlendi. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'deki dalga boyunda ölçülerek A260/A280 oranı hesaplandı ve yaklaşık 2 oranı saf kabul edildi.

3.13.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi, RevertAid First Strand cDNA sentez kiti yardımıyla aşağıda belirtilen protokole göre gerçekleştirildi.

a.) Kit bileşenleri buz üzerinde çözüldü. Daha sonra tüm bileşenler vorteksle karıştırıldı.

b.) Tablo 3.1.’de gösterilen bileşenler steril, nükleaz içermeyen ependorf tüp içerisinde buz üzerinde belirtilen sırayla eklendi.

Tablo 3.1. Revers transkripsiyon PCR reaksiyon karışımı

BİLEŞENLER (Reaksiyon Başına)	HACİM (Reaksiyon Başına)
Total RNA (0.5 µg/ µL)	2 µL
Oligo (dT)18 Primer	1 µL
5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid RT (200 U/µL)	1 µL

Tablo 3.1. (devam)

Nükleaz içermeyen su	9 µL
TOTAL HACİM	20µL

c.) Yavaşça karıştırıp, kısa bir süre santrifüjlendi.

3.13.4. Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 3.2’de belirtilen programa ayarlanarak cDNA sentezi yapıldı. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri qRT-PCR’da kullanılabilecek kadar -20 °C’deki buzdolabında saklandı.

Tablo 3.2. Reverse transkripsiyon PCR programı

Sıcaklık	Süre
42 °C	60 DK
70 °C	5 DK

3.13.5. Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile Belirlenmesi

SIRT1 geninin mRNA miktarları, Kantitatif Real-Time PCR (RT-qPCR) yöntemi ile aşağıdaki protokole göre Kantitatif eş zamanlı PCR cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, ilgili gene özgü forward ve reverse primerler, SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix ve Nuclease-free water kullanılarak Tablo 3.4’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. GAPDH primerleri iç kontrol olarak kullanıldı. *SIRT1* geninin reverse ve forward primer sekansları Tablo 3.3’de belirtildiği gibidir (Song vd., 2017; Kim vd., 2021).

Tablo 3.3. qRT PCR için kullanılan hedef gen primer dizileri ve uzunlukları

GEN	Primer Sekansı (5’-3’)	Primer Uzunluğu (Baz Çifti)
<i>SIRT1</i>	Forward 5'- CCATGGCGCTGAGGTATATT -3’	20
	Reverse 5'- TCTCCATCAGTCCCAAATCC -3’	20

3.13.6. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi

Sybr Green Supermix ve diğer bileşenler oda sıcaklığında çözüldü. Bileşenler kısa bir süre santrifüj edildi ve buz üzerine alındı. Aşağıdaki tabloda belirtilen bileşenler steril, nükleaz içermeyen PCR tüp içerisinde buz üzerinde belirtilen sırayla eklendi (Tablo 3.4). Örnek sayısına göre cDNA hariç olmak üzere qPCR master mix hazırlandı. Master mix iyice karıştırıldı. Kantitatif Real Time PCR (RT-qPCR) analizi için Real Time PCR cihaz kullanımı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (KİTAM) hizmet alımı kapsamında yararlanıldı.

Tablo 3.4. qRT-PCR reaksiyon karışımı

BİLEŞEN	Reaksiyon Başına (µl)
Sybr Green Supermix	5 µL
Forward Primer	0.5 µL
Reverse Primer	0.5 µL
Nükleaz içermeyen su	2 µL
cDNA (100 ng)	2 µL
TOTAL REAKSİYON HACMİ	10 µL

Protokol aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

a.) İyice karışan master mix eşit miktarda qPCR platine eklendi. Reaksiyon karışımı örnek sayısına göre her bir qPCR platine eşit miktarda dağıtıldı.

b.) Son olarak kuyucuklara 2 µl cDNA eklendi. Kalıp içermeyen kontrol (no template control: NTC) negatif kontrol grubu olarak kullanıldı. No template kontrol için cDNA yerine nükleaz içermeyen su eklendi.

c.) Seal filmi yerleştirdikten sonra reaksiyon karışımını 30 saniye vortekslendi.

qRT-PCR programı Tablo 3.5.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. qRT-PCR programı

AŞAMA	SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
Polimeraz Aktivasyonu ve DNA Denatürasyonu	95 °C -98 °C	30 saniye	
Denatürasyon	95 °C -98 °C	5-15 saniye	40 döngü
Annealing/Extension ve Plate Okuma	60 °C	15-30 saniye	40 döngü

3.14. İstatistiksel Analiz Yöntemleri ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Deneyisel uygulama verileri IBM SPSS Statistics 22 programı kullanılarak değerlendirildi. Örnek gruplar arasındaki farkları analiz etmek ve karşılaştırmak için ise Student t-testi veya tek yönlü Anova varyans analizi kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



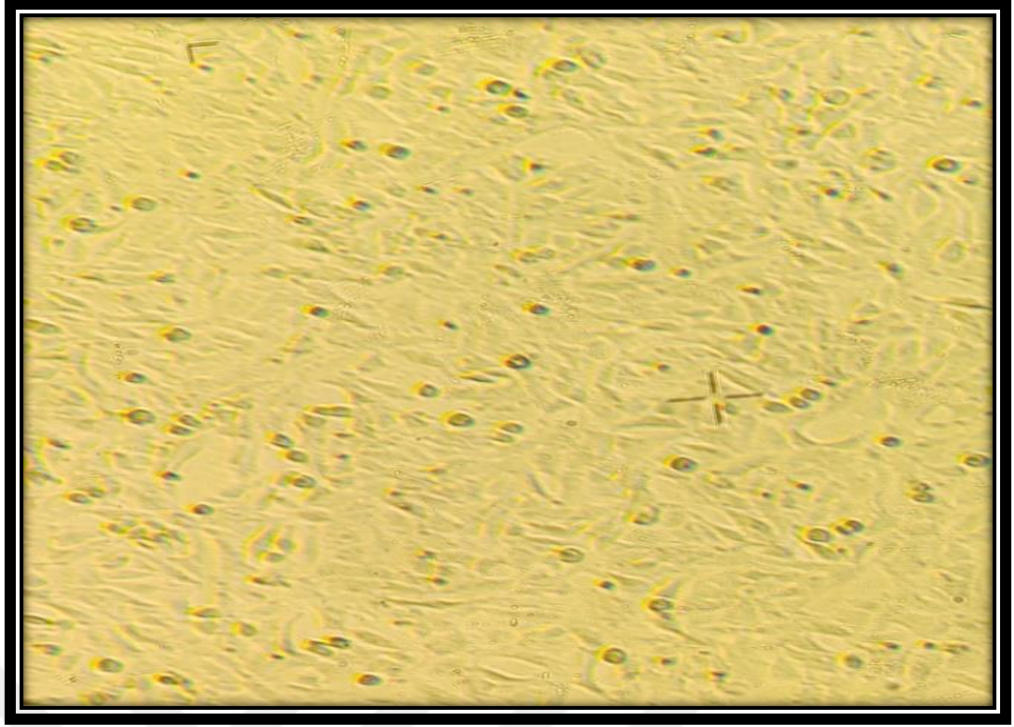
4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

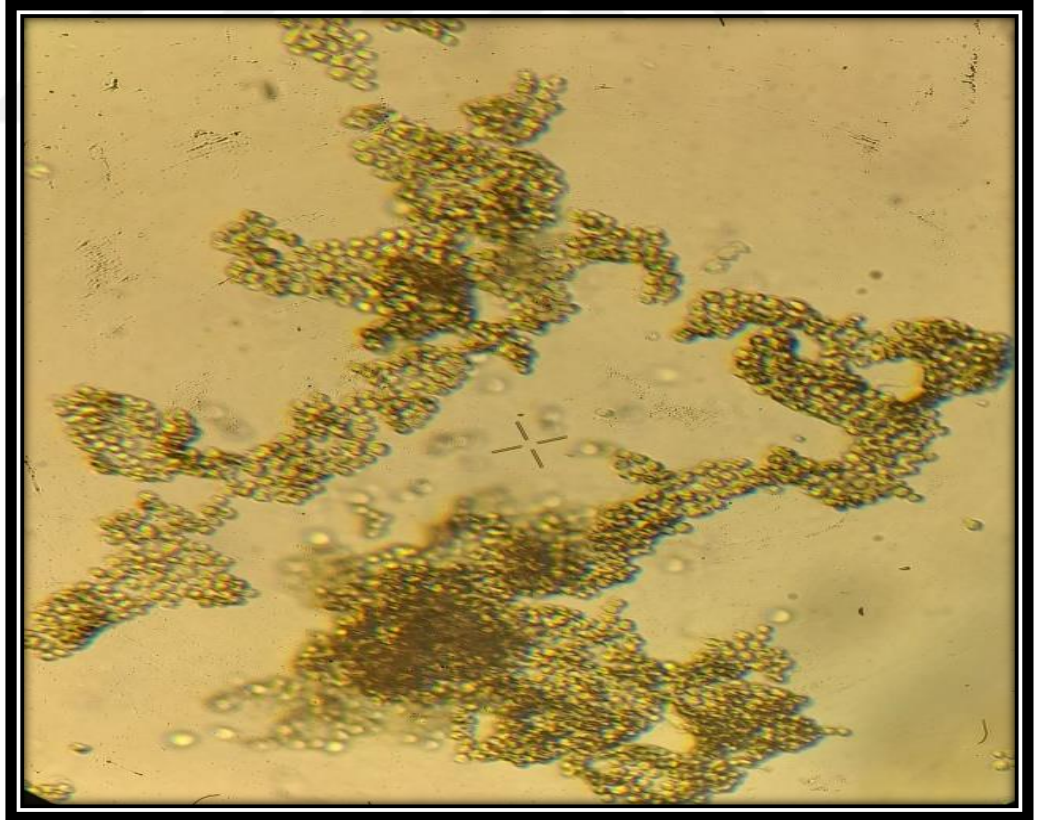
Tez çalışmamızda Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)’nden temin edilen Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)’na ait olan İnsan Retinal Pigment Epitelyal Hücre Hattı (ARPE-19 ATCC® CRL-2302™), hızlı uçak kargo vasıtasıyla Edirne Trakya Üniversitesi’nden Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi tıbbi biyoloji hücre kültürü laboratuvarımıza 12.saatte kuru buzda getirildi. Hücre kültürü çalışmaları hemen başlatıldı ve hücre hattına özgü tam büyüme ortamı olan serumlu DMEM/F-12, HEPES besiyeri içerisinde toplamda 4 kez pasajlandıktan sonra deney analizlerine geçildi.

4.1.1. Sağlıklı Hücre Kültürünün Pasajlanması

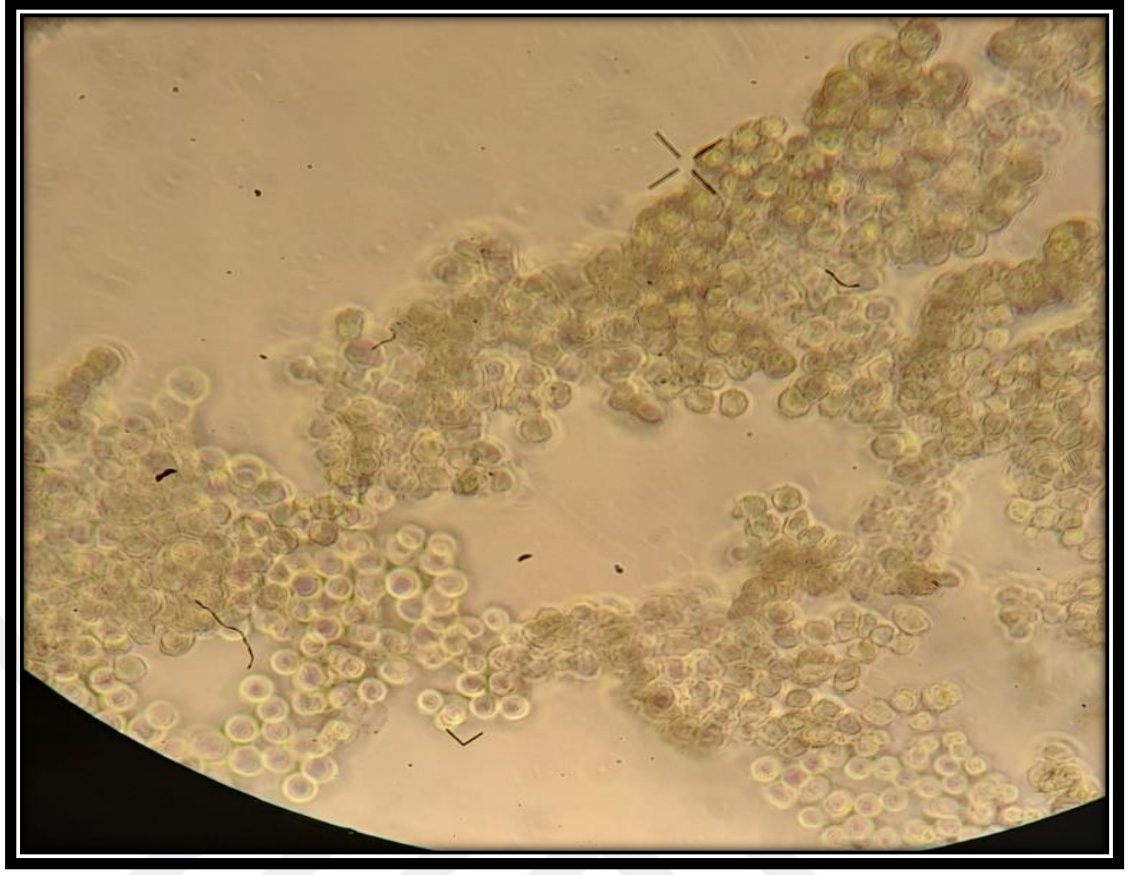
Sağlıklı hücre kültürünün pasajlanması aşamalarında, analiz sonuçlarının pasaj farkından doğabilecek herhangi bir etkiyi ortadan kaldırmak ve eşit şartlarda hücre kültür ortamını sağlamak amacıyla, tüm analizler hücre hattının 4. pasajından yapılarak, analiz sonuçlarının aynı pasajdan değerlendirilmesi sağlanmıştır. Sağlıklı RPE hücre kültürünün pasaj sonrası 10X objektifte invert mikroskop görüntüsü Şekil 4.1a’da ve tripsin-EDTA (TE) solüsyon uygulaması sonrası 10X objektifte invert mikroskop görüntüsü Şekil 4.1b’de, 20X objektifteki görüntüsü Şekil 4.1c’de verilmektedir.



Şekil 4.1a. Sağlıklı RPE hücrelerinin pasaj sonrası invert mikroskop görüntüsü (10X)



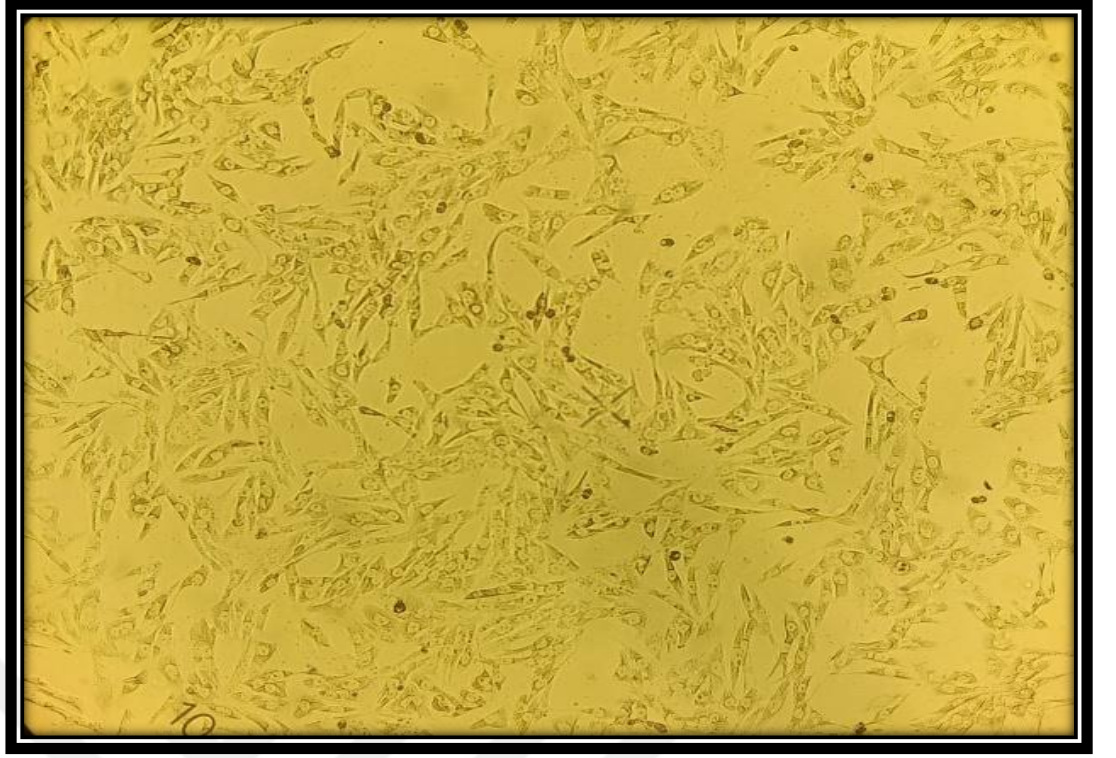
Şekil 4.1b. Trypsin-EDTA solüsyon uygulaması sonrası sağlıklı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10X)



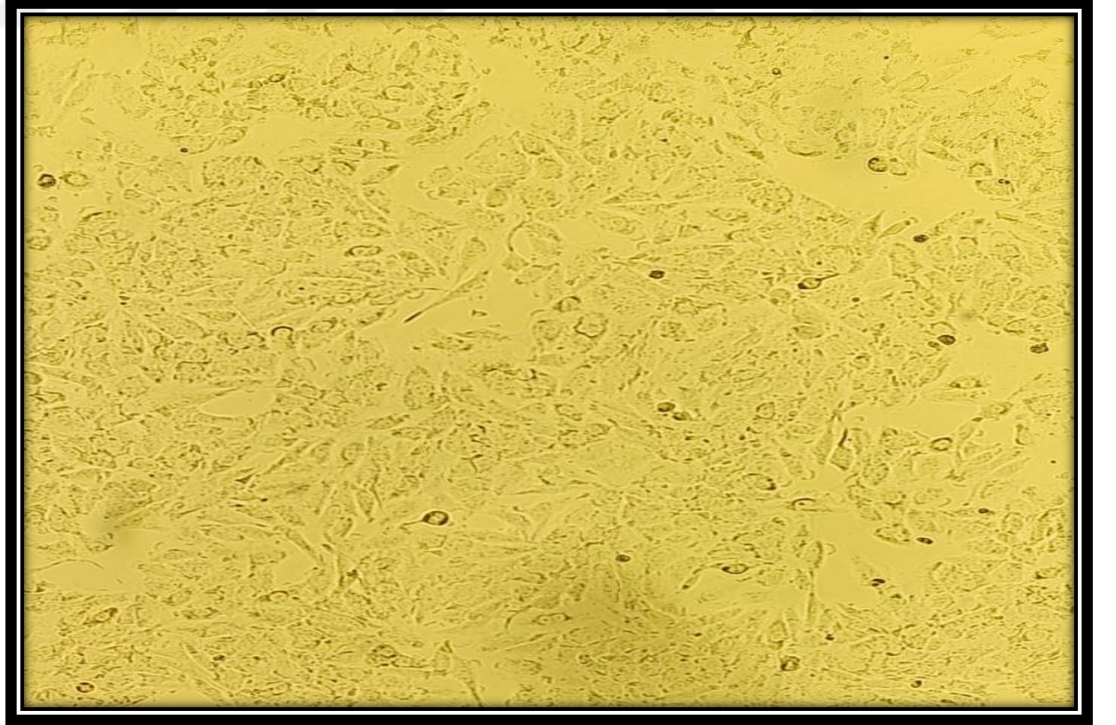
Şekil 4.1c. Tripsin-EDTA solüsyon uygulaması sonrası sağlıklı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (20X)

4.1.2. Oksidatif Stres Protokolü Sonrası Hasarlı RPE Hücre Kültürü

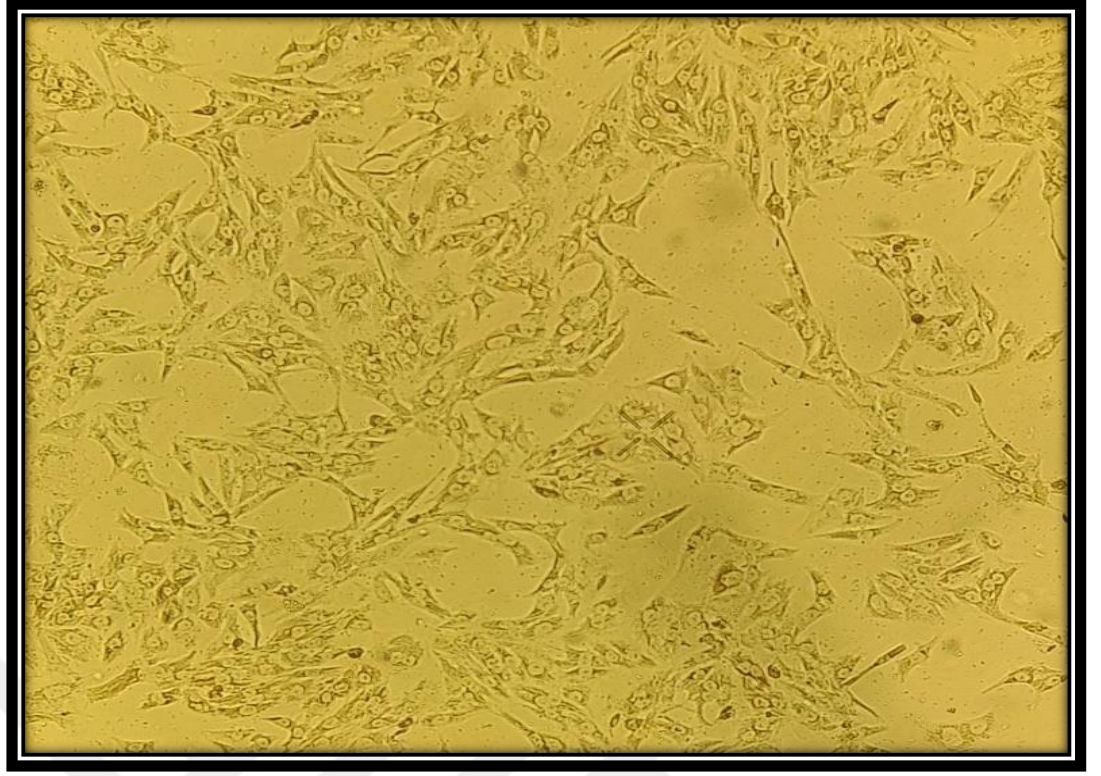
Sağlıklı ARPE-19 hücre kültürünün oksidatif stres protokolüne göre serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat, daha sonra 300 $\mu\text{M/L}$ H_2O_2 çözeltisinde 20 saat %95 nem , %5 CO_2 içeren 37 °C'deki steril inkübatörde inkübe edildikten sonra kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşumu sağlanmış olup, oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinin 10X objektifte invert mikroskop görüntüsü Şekil 4.2a.'da verilmektedir. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında 24, 48 ve 72 saat oksidatif stres medyumuna maruz bırakılan hasarlı RPE hücrelerinin inkübasyon sonrası 10X objektifteki invert mikroskop görüntüleri ise sırasıyla; Şekil 4.2b., Şekil 4.2c., ve Şekil 4.2d.'de verilmektedir.



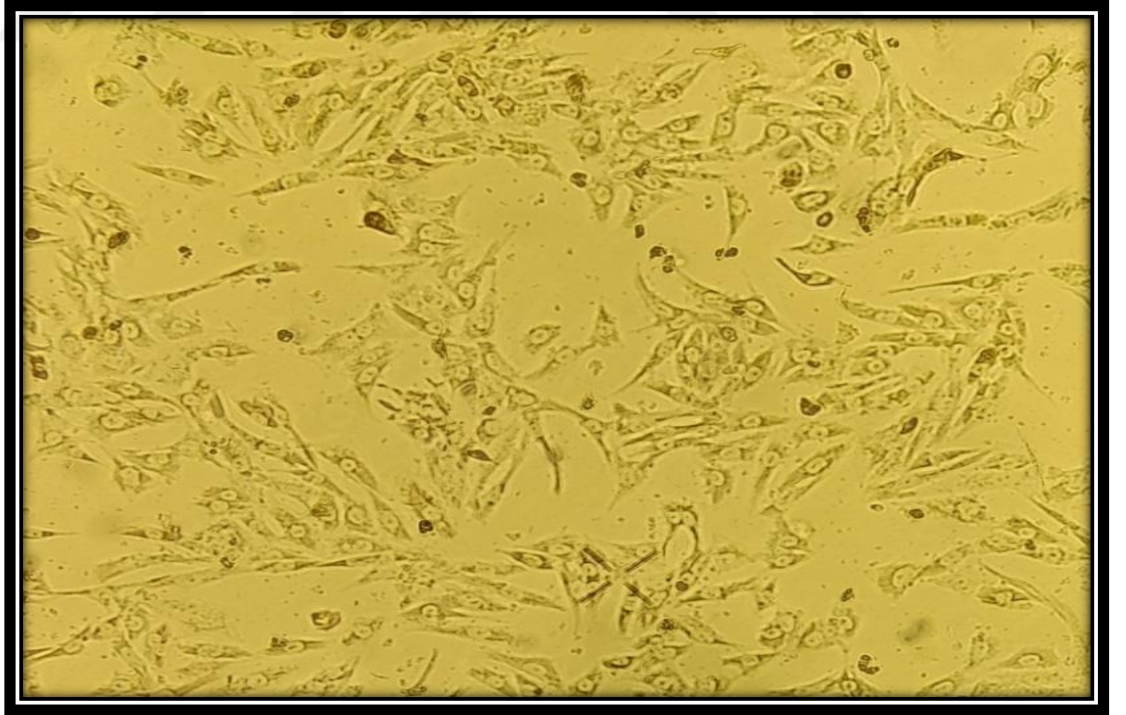
Şekil 4.2a. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinin 10X invert mikroskop görüntüsü



Şekil 4.2b. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında 24 saat oksidatif stres medyumuna maruz bırakılan hasarlı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10X)



Şekil 4.2c. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında 48 saat oksidatif stres medyumuna maruz bırakılan hasarlı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10X)



Şekil 4.2d. Standart oksidatif stres protokolü sonrasında 72 saat oksidatif stres medyumuna maruz bırakılan hasarlı RPE hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10X)

4.2. Hücre Viabilite Analizleri

4.2.1. Tripan Mavisi Deneyi

4.2.1.1. Bio-Rad Automated Cell Counter Cihazında Hücre Sayımı

Hücre kültürünün laboratuvarımıza ilk geldiğinde donmuş hücrelerin çözülme işleminden sonra ve pasaj kontrolleri sonrası yapılan son pasaj için, ml’de hücre sayımını değerlendirmek amacıyla, hücre kültüründeki toplam hücre yoğunlukları ve yüzde canlı-ölü hücre oranları Bio-Rad Automated Cell Counter cihazında ölçüldü.

Hücre kültürünün laboratuvarımıza ilk geldiği gün donmuş hücrelerin çözülme işleminden sonra, hücre süspansiyonunun ml’sinde toplam hücre yoğunluğu, canlı ve ölü hücre oranlarının ölçümü Bio-Rad Automated Cell Counter Cihazında yapıldı. Ölçüm sonucunda %80 oranında canlılık tespit edildi.

Toplam Hücre Sayısı: $4,84 \times 10^5$ hücre/ml

Canlı Hücre Sayısı: $3,87 \times 10^5$ hücre/ml

Canlı Hücre Oranı: % 80

Hücre kültürü pasajlama aşamaları sonrası 4.son pasaj için hücre süspansiyonunun ml’sinde toplam hücre yoğunluğu, canlı ve ölü hücre oranlarının ölçümü Bio-Rad Automated Cell Counter Cihazında ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucunda %96 oranında canlılık tespit edildi.

Toplam Hücre Sayısı: $2,98 \times 10^6$ hücre/ml

Canlı Hücre Sayısı: $2,85 \times 10^6$ hücre/ml

Canlı Hücre Oranı: % 96

4.2.1.2. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

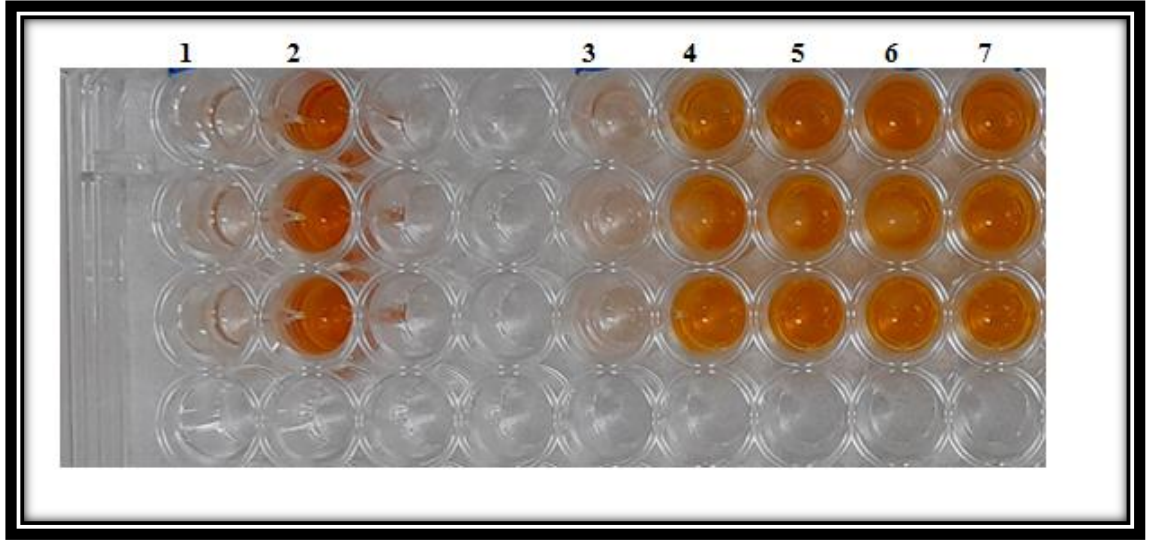
Deney setleri için hazırlanan ve invert mikroskop altında konfluent durumları kontrol edilen hücre kültür flasklarının konfluent durumu en az %90 yoğunluğa ulaşp flaskın tüm yüzeyini kapladığında deney setlerine alınmadan önce Thoma Lamı ile hücre sayımı gerçekleştirildi. Deney setlerinde kullanılmak üzere oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinin 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarındaki tedavi deney grupları için, oksidatif stres protokolünden önce thoma lamında sayılan toplam canlı hücre süspansiyonundan dilüsyon faktörleri

hesaplanarak her bir kuyucukta yaklaşık 20.000 hücre olacak şekilde hücre yoğunlukları hazırlandı. Aynı deney gruplarının sağlıklı RPE hücreleri için thoma lamında sayılan toplam canlı hücre süspansiyonundan dilüsyon faktörleri hesaplanarak her bir kuyucukta yaklaşık 10.000 hücre olacak şekilde hücre yoğunlukları hazırlandı. 12 kuyucuklu hücre kültür plaklarındaki tüm deney grupları içinse thoma lamında sayılan toplam canlı hücre süspansiyonundan dilüsyon faktörleri hesaplanarak her bir kuyucukta yaklaşık 3×10^5 /ml hücre olacak şekilde hücre yoğunlukları hazırlandı.

4.3. Kuru Tip Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyon Modeli

Literatür taraması sonucunda kuru tip YBMD modeli için RPE hücre yoğunluğunun kontrole kıyasla %35-%40 arasında hücre viabilite oranının azalması orta (standart) progresyonlu, %50 ve daha fazla hücre viabilite oranının azalması ise yüksek (ileri) progresyonlu olarak değerlendirildi (Shi vd., 2015; Zhu vd., 2016; Cui vd., 2019). Tez çalışmamızda sağlıklı RPE hücrelerine ilk etapta serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat, daha sonra 300 μ M/L H₂O₂ çözeltisinde 20 saat %95 nem, %5 CO₂ içeren 37 °C'deki steril inkübatörde inkübe edildikten sonra, kontrole kıyasla %35-%40 arasında viabilite kaybı araştırılmış olup, belirlenen konsantrasyon orta seviye (standart) oksidatif stres kaynağı olarak değerlendirmeye alındı.

Standart seviyede oksidatif stres oluşumu CCK-8 analiz yöntemi ile değerlendirildi. Oksidatif stres medyum konsantrasyon içeriğinin belirlenebilmesi için kontrole kıyasla istenilen düzeyde viabilite kaybının oluşması 3 ayrı protokol sonucu gözlemlendi. Planlanan doğrultuda kontrol grubu olarak sağlıklı RPE hücreleri, deney grubu olarak ise oksidatif stres medyumunu içeren hasarlı RPE hücrelerine CCK-8 analizi yapıldı. Hücre viabilite oranı 450 nm dalga boyundaki mikropilaya okuyucuda absorbans değeri ölçülerek belirlendi (Şekil 4.3). 3 tekrarlı ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı. Bu dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenen absorbans değeri canlı hücre sayısı ile orantılı olarak hesaplandı. Kontrol grubuna kıyasla deney grubundaki absorbans değerleri karşılaştırılarak doğru orantı sonucunda % kaç oranında hücre viabilitesinin azaldığı hesaplandı.



Şekil 4.3. CCK-8 Analiz yöntemi ile oksidatif stres protokolünün uygulanması sonucu 96 kuyucuklu mikroparka görüntüsü. 1.Sağlıklı RPE hücrelerinin blank grubu (Ask Blank), 2. Sağlıklı RPE hücreler (Ask) 3. Hasarlı RPE hücreler için blank grubu (Aok Blank), 4., 5., 6., 7., oksidatif stres medyumlarındaki hasarlı RPE hücreler (Aok)

Öncelikle viabilite deneylerinde standart protokol olan toplam hücre süspansiyonunun %10'unun etken madde solüsyonu olacak şekilde deney grubu hazırlandı (1. oksidatif stres protokolü). Oksidatif stres medyumunun %10'unun 300 $\mu\text{M/L}$ H_2O_2 çözeltisi olacak şekilde hazırlanıp, deney seti başlatıldı. Buna göre sağlıklı RPE hücreler, 90 μl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat, daha sonra 10 μl 300 $\mu\text{M/L}$ H_2O_2 çözeltisinde 20 saat %95 nem, %5 CO_2 içeren 37 °C'deki steril inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda CCK-8 analizi ile ölçüm yapıldı. 450 nm'deki mikro plaka okuyucuda 3 farklı ölçüm sonucunun ortalaması alındı ve sağlıklı kontrol grubuna kıyasla oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı deney grubunun hücre viabilite kaybı % 12.40 olarak ölçülmüş olup, deney sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Oksidatif stres medyumunun 1. oksidatif stres protokolü. Ad; Deney grubunun absorbens değeri, Ad blank; deney grubunun blank absorbens değeri, Ao; Kontrol grubunun absorbens değeri, Ao blank; Kontrol grubunun blank absorbens değeri, abs; absorbens

Kontrol ve Deney Grupları	Ad- Ad blank (abs)	Ao-Ao blank (abs)	Yüzde Viabilite Kaybı	Oksidatif Stres Medyumunu ve İnkübasyon Süreleri
Sağlıklı RPE hücreler (kontrol grubu)		2,622		
Oksidatif stres medyumunun %10'nun 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi olan deney grubu	2,297		%12,40	90 µl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri (4 saat inkübasyon) + 10 µl 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi (20 saat inkübasyon)

% Hücre viabilite oranı: $100 \times (\text{Ad} - \text{Ad blank}) / (\text{Ao} - \text{Ao blank})$

İstenilen düzeyde hücre viabilite kaybını elde etmek için oksidatif stres medyumunun %20, %30, %40 (2. oksidatif stres protokolü) ve sonrasında %50, %60, %70, %80 (3. oksidatif stres protokolü) oranında 300 µM/L H₂O₂ çözeltisi olacak şekilde deney setleri hazırlanmış olup deney sonuçları sırasıyla, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de gösterilmektedir.

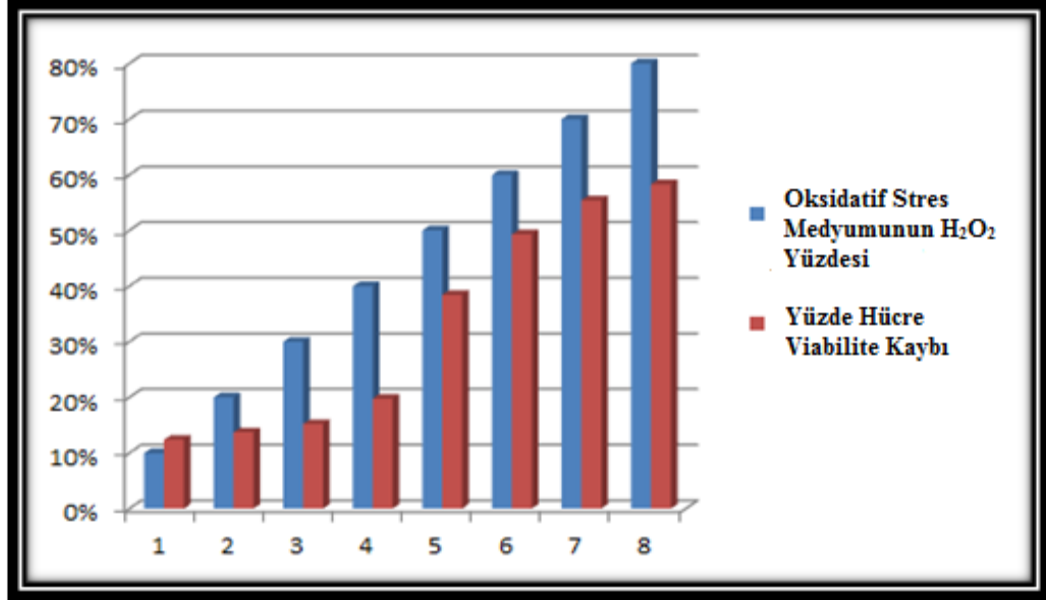
Tablo 4.2. Oksidatif stres medyumunun 2. oksidatif stres protokolü

Kontrol ve Deney Grupları	Ad- Ad blank (abs)	Ao-Ao blank (abs)	Yüzde Viabilite Kaybı	Oksidatif Stres Medyumunu ve İnkübasyon Süreleri
Sağlıklı RPE hücreler (kontrol grubu)		2,332		
Oksidatif stres medyumunun %20'sinin 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi olan deney grubu	2,012		%13.72	80 µl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri (4 saat inkübasyon) + 20 µl 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi (20 saat inkübasyon)
Oksidatif stres medyumunun %30'nun 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi olan deney grubu	1,977		%15.22	70 µl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri (4 saat inkübasyon) + 30 µl 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi (20 saat inkübasyon)
Oksidatif stres medyumunun %40'nın 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi olan deney grubu	1,871		%19,77	60 µl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri (4 saat inkübasyon) + 40 µl 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi (20 saat inkübasyon)

Tablo 4.3. Oksidatif stres medyumunun 3. oksidatif stres protokolü

Kontrol ve Deney Grupları	Ad- Ad blank (abs)	Ao-Ao blank (abs)	Yüzde Viabilite Kaybı	Oksidatif Stres Medyumunu ve İnkübasyon Süreleri
Sağlıklı RPE hücreler (kontrol grubu)		2,498		
Oksidatif stres medyumunun %50'sinin 300 µM/L H₂O₂ çözeltisi olan deney grubu	1,538		%38,43	50 µl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri (4 saat inkübasyon) + 50 µl 300 µM/L H₂O₂ çözeltisi (20 saat inkübasyon)
Oksidatif stres medyumunun %60'nın 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi olan deney grubu	1,267		%49,28	40 µl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri (4 saat inkübasyon) + 60 µl 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi (20 saat inkübasyon)
Oksidatif stres medyumunun %70'nin 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi olan deney grubu	1,114		%55,40	30 µl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri (4 saat inkübasyon) + 70 µl 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi (20 saat inkübasyon)
Oksidatif stres medyumunun %80'ninin 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi olan deney grubu	1,036		%58,27	20 µl serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri (4 saat inkübasyon) + 80 µl 300 µM/L H ₂ O ₂ çözeltisi (20 saat inkübasyon)

Kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşturmak için istenilen hücre viabilite kaybı oksidatif stres medyumunun %50'sinin 300 $\mu\text{M/L}$ H_2O_2 çözeltisi ve diğer %50'sinin serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri olacak şekilde hazırlanması belirlenmiş olup, hücre viabilite kaybı kontrol grubuna kıyasla %38,43 olarak ölçüldü (Tablo 4.3). Buna göre, tüm deney setlerinde kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşturmak için; sağlıklı hücreler, oksidatif stres medyumunun yarı hacmi olan serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyerinde 4 saat, daha sonra diğer yarı hacmi olan 300 $\mu\text{M/L}$ H_2O_2 çözeltisinde 20 saat %95 nem, %5 CO_2 içeren 37 °C'deki steril inkübatörde inkübe edildi. Oksidatif stres medyumunu olarak belirlenen bu konsantrasyon ve inkübasyon süreleri; bundan sonra yapılan tüm deney setleri için, sağlıklı RPE hücrelerinde oksidatif stres protokolü olarak kullanıldı. Oksidatif stres medyum konsantrasyon içeriğinin belirlenebilmesi için kontrole kıyasla istenilen düzeyde viabilite kaybının oluşması için yapılan 3 ayrı protokol sonucu gözlemlenen yüzde hücre viabilite kaybı Şekil 4.4'de gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Oksidatif stres medyumunun üç ayrı protokol sonucunda gözlemlenen yüzde hücre viabilite kaybı

4.4. CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Hasarlı RPE Hücrelerinde Hücre Viabilite ve Hücre Proliferasyon Analiz Sonuçları

4.4.1. Etken Maddelerin Ayır Ayır Analiz Sonuçları

Oksidatif stres protokolü uygulaması sonrası, hasarlı RPE hücrelerine 24., 48. ve 72. saat inkübasyon sürelerinde uygulanan etken maddelerinin, etken maddelerle muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla hücre viabilite oranına etkisi ve her bir grubun hücre proliferasyon indeks değerleri Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’da verilmektedir. Resveratrol için % proliferasyon indeksi; $100 \times (\text{Aort-Aort blank} / \text{Aok-Aok blank})$ formülü ile; nikotinamid için ise % proliferasyon indeksi; $100 \times (\text{Aont-Aont blank} / \text{Aok-Aok blank})$ formülü ile hesaplanmıştır. 3 tekrarlı ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alınmıştır.

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine farklı dozlarda uygulanan etken maddelerin 24. saat inkübasyon süresinin sonunda etken maddelerle muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla resveratrol için en yüksek hücre viabilite oranı ve hücre proliferasyon indeksi $100 \mu\text{mol/L}$, nikotinamid için ise en yüksek hücre viabilite oranı ve hücre proliferasyon indeksi 1mM/L konsantrasyonda elde edildi (Tablo 4.4; Şekil 4.5). En yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks sonuçları veren etken maddelerin absorbans değerleri için istatistiksel analizler yapıldı. İstatistiksel analiz sonucu test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine farklı dozlarda uygulanan etken maddelerin 48. saat inkübasyon süresinin sonunda etken maddelerle muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla resveratrol için en yüksek hücre viabilite oranı ve hücre proliferasyon indeksi $50 \mu\text{mol/L}$, nikotinamid için ise en yüksek hücre viabilite oranı ve hücre proliferasyon indeksi 1mM/L konsantrasyonda elde edildi (Tablo 4.5; Şekil 4.6). En yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks sonuçları veren etken maddelerin absorbans değerleri için istatistiksel analizler yapıldı. İstatistiksel analiz sonucu test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine farklı dozlarda uygulanan etken maddelerin 72. saat inkübasyon süresinin sonunda etken maddelerle muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla resveratrol için en yüksek hücre viabilite oranı ve hücre proliferasyon indeksi 50 $\mu\text{mol/L}$ ile 100 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonda neredeyse eşit, nikotinamid için ise en yüksek hücre viabilite oranı ve hücre proliferasyon indeksi 1mM/L konsantrasyonda elde edildi (Tablo 4.6; Şekil 4.7). 72 saat inkübasyon süresinde oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine kombine uygulamada belirlenecek olan etken madde seçenekleri için, resveratrol grubu olarak hem 50 $\mu\text{mol/L}$, hem de 100 $\mu\text{mol/L}$ konsantrastrasyon içerikleri, 1mM/L nikotinamid ile birlikte kombine doz seçenekleri olarak ele alınmıştır. En yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks sonuçları veren etken maddelerin absorbans değerleri için istatistiksel analizler yapıldı. İstatistiksel analiz sonucu test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.4. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 24 saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon analiz sonuçları

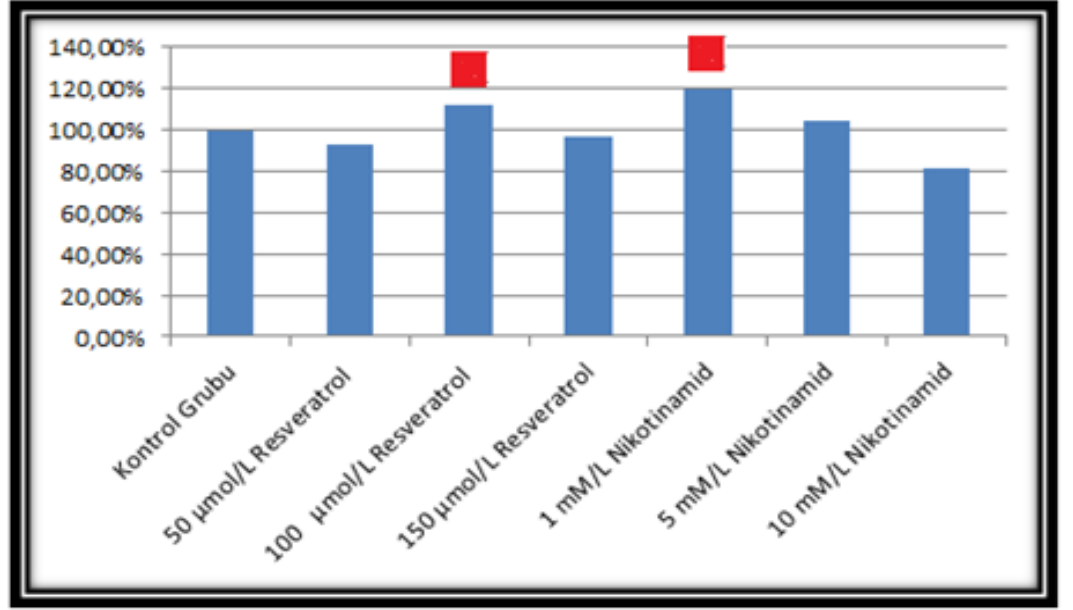
Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Aok-Aok blank)	Resveratrol Uygulaması (Tedavi deney grubu) (abs) Aort-Aort blank	Nikotinamid Uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Aont-Aont blank	Hücre Viabilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla)	Proliferasyon İndeksi (%)
Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreler	1,124			%100	100
50 µmol/L Resveratrol		1,039		%7,6 azalma	92,4
100 µmol/L Resveratrol		1,241		%10,4 artış	110,4
150 µmol/L Resveratrol		1,074		%4,4 azalma	95,6
1 mM/L Nikotinamid			1,348	%19,8 artış	119,8
5 mM/L Nikotinamid			1,171	%4,1 artış	104,1
10 mM/L Nikotinamid			0,918	%18,4 azalma	81,6

Tablo 4.5. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 48 saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon analiz sonuçları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Aok-Aok blank)	Resveratrol Uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Aort-Aort blank	Nikotinamid uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Aont-Aont blank	Hücre Viabilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla)	Proliferasyon İndeksi (%)
Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreler	0,939			%100	100
50 µmol/L Resveratrol		1,202		%28 artış	128
100 µmol/L Resveratrol		1,149		%22,36 artış	122,36
150 µmol/L Resveratrol		1,054		%12,24 artış	112,24
1 mM/L Nikotinamid			1,320	%40,58 artış	140,58
5 mM/L Nikotinamid			1,175	%25,13 artış	125,13
10 mM/L Nikotinamid			1,133	%20,66 artış	120,66

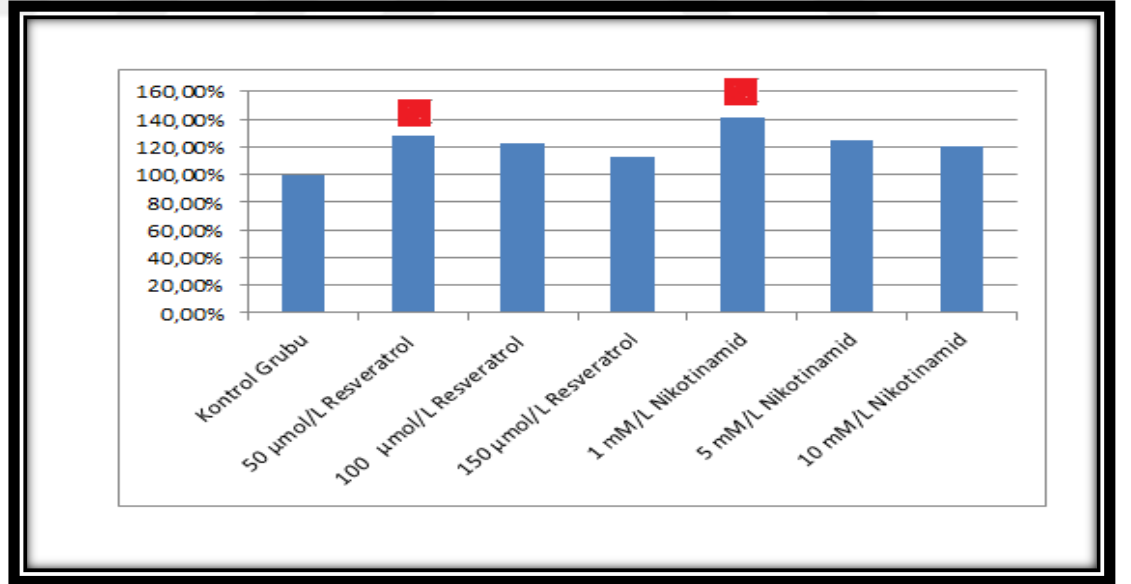
Tablo 4.6. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 72 saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon analiz sonuçları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Aok-Aok blank)	Resveratrol Uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Aort-Aort blank	Nikotinamid uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Aont-Aont blank	Hücre Viabilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla)	Proliferasyon İndeksi (%)
Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreler	0,815			%100	100
50 µmol/L Resveratrol		1,190		%46,01 artış	146,01
100 µmol/L Resveratrol		1,193		%46,38 artış	146,38
150 µmol/L Resveratrol		1,158		%42,08 artış	142,08
1 mM/L Nikotinamid			1,404	%72,27 artış	172,27
5 mM/L Nikotinamid			1,288	%58,04 artış	158,04
10 mM/L Nikotinamid			1,231	%51,04 artış	151,04



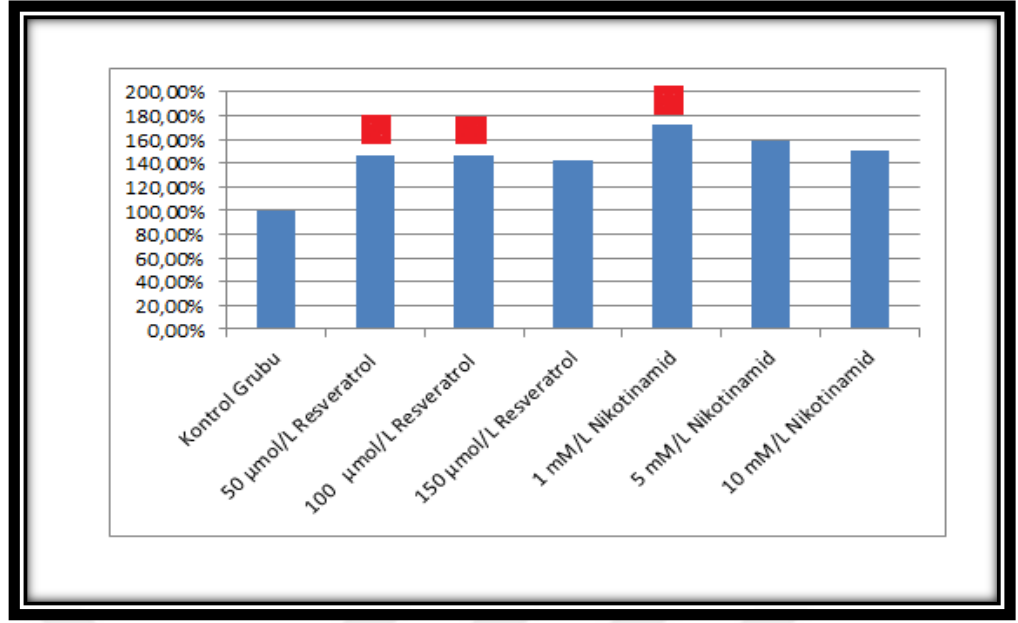
Şekil 4.5. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 24 saat inkübasyon sonrası hücre proliferasyon indekslerinin (%) karşılaştırılması

■; en yüksek hücre proliferasyon indeks (%) değeri veren etken maddeler



Şekil 4.6. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 48 saat inkübasyon sonrası hücre proliferasyon indekslerinin (%) karşılaştırılması

■; en yüksek hücre proliferasyon indeks (%) değeri veren etken maddeler



Şekil 4.7. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin 72 saat inkübasyon sonrası hücre proliferasyon indekslerinin (%) karşılaştırılması
■; en yüksek hücre proliferasyon indeks (%) değeri veren etken maddeler

4.4.2. Etken Maddelerin Kombine Uygulama Analiz Sonuçları

Oksidatif stres protokolü uygulaması sonrası, hasarlı RPE hücrelerine 24., 48. ve 72. saat inkübasyon sürelerinde uygulanan etken maddelerinin, etken maddelerle muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla CCK-8 analiz yöntemiyle ölçülen en yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerlerini veren etken madde seçenekleri her bir inkübasyon süresi için kombine doz olarak belirlendi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Farklı dozlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde en yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değeri veren etken madde seçenekleri

İnkübasyon Süresi	Etken Madde Seçenekleri (Kombine Doz)
24. Saat	100 µmol/L Resveratrol + 1mM/L Nikotinamid
48. Saat	50 µmol/L Resveratrol + 1mM/L Nikotinamid
72. Saat	50 µmol/L Resveratrol + 1mM/L Nikotinamid 100 µmol/L Resveratrol + 1mM/L Nikotinamid

Buna göre belirlenen etken madde dozları kombine uygulama olarak seçilmiş olup, oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücre grubuna aynı analiz yöntemi ile uygulanarak her bir inkübasyon süresi için hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerleri ölçüldü. 3 tekrarlı ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı.

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 24. saat inkübasyon sonrası (100 μ mol/L resveratrol+ 1mM/L nikotinamid kombine dozu), kombine dozla muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla yüzde %71,98 hücre viabilite artışı gösterdiği belirlendi (Tablo 4.8). İstatistiksel analiz sonucu test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. Student t testi analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü. Kontrol grubu için ortalama absorbans değeri $1,12 \pm 0,174$, kombine doz için ortalama absorbans değeri $1,928 \pm 0,212$ ($p=0,007$).

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 48. saat inkübasyon sonrası (50 μ mol/L resveratrol+ 1mM/L nikotinamid kombine dozu), kombine dozla muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla %122,60 hücre viabilite artışı gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.9). İstatistiksel analiz sonucu test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. Student t testi analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü. Kontrol grubu için ortalama absorbans değeri $0,938 \pm 0,208$, kombine doz için ortalama absorbans değeri $2,088 \pm 0,089$ ($p=0,001$).

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 72. saat inkübasyon sonrası birinci kombine doz seçeneği olarak; 50 μ mol/L resveratrol+ 1mM/L nikotinamid kombine uygulamasının, kombine dozla muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla yüzde %132,87 hücre viabilite artışı gösterdiği, ikinci kombine doz seçeneği olarak ise 100 μ mol/L resveratrol+ 1mM/L nikotinamid kombine uygulamasının, kombine dozla muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla yüzde %153,82 hücre viabilite artışı gösterdiği belirlendi. Bu sebeple deney sonuçlarına göre 72. saat inkübasyon süresi için, oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan ve en yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerini veren kombine uygulama; 100 μ mol/L resveratrol + 1mM/L nikotinamid olarak belirlendi (Tablo 4.10). İstatistiksel analiz sonucu test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre

gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü. Kontrol grubu için ortalama absorbans değeri $0,797 \pm 0,021$, kombine doz 1 için ortalama absorbans değeri $1,856 \pm 0,047$, kombine doz 2 için ortalama absorbans değeri $2,023 \pm 0,125$ ($p < 0,001$).

Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası uygulanan kombine dozların proliferasyon indeks karşılaştırılması Şekil 4.8’de, 72 saat inkübasyon sonrası uygulanan kombine dozların proliferasyon indeks karşılaştırılması ise Şekil 4.9’da verilmektedir.

Tablo 4.8. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 24. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks analiz sonuçları

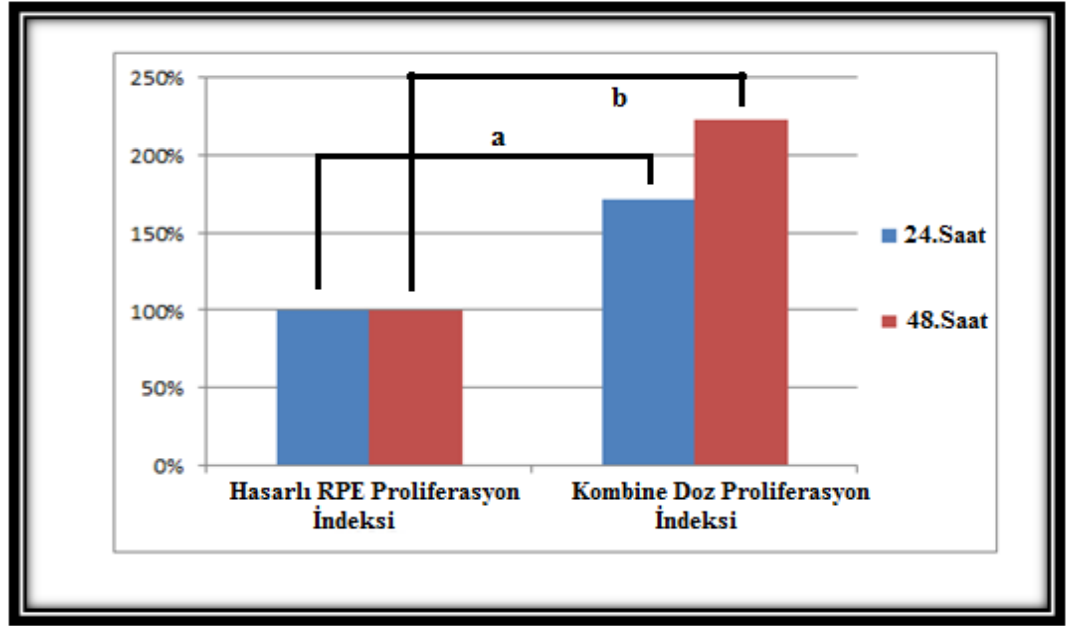
Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Aok-Aok blank)	Kombine Doz (tedavi deney grubu) (abs) (Aotc-Aotc blank)	Hücre Viabilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla) (%)	Proliferasyon İndeksi (%)
Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreler (kontrol grubu)	1,121		%100	100
Kombine Doz (tedavi deney grubu) (100µmol/L Resveratrol+ 1mM/L Nikotinamid)		1,928	%71,98 artış	171,98

Tablo 4.9. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 48. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks analiz sonuçları

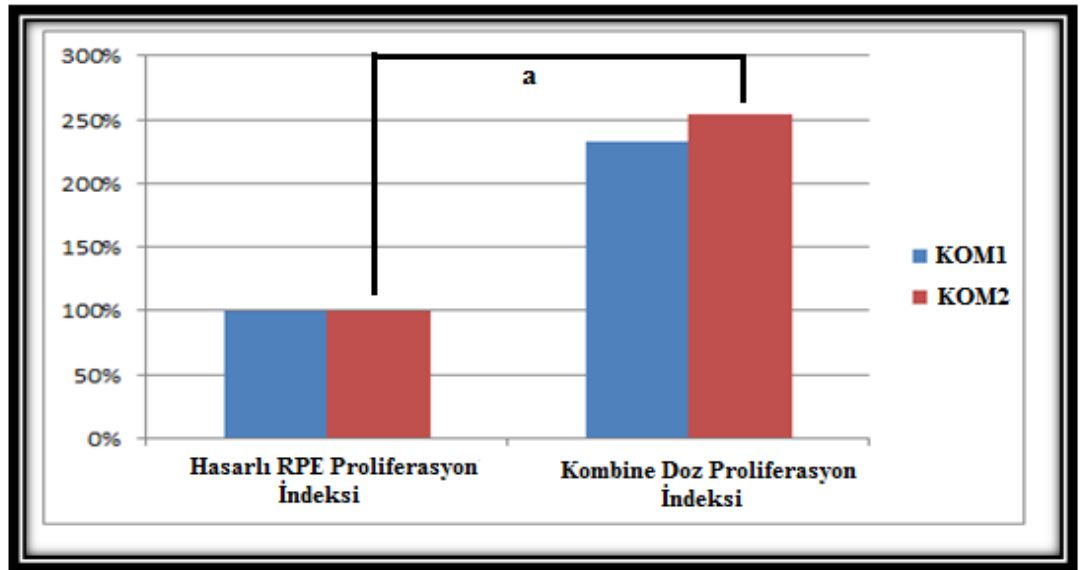
Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Aok-Aok blank)	Kombine Doz (tedavi deney grubu) (abs) (Aotc-Aotc blank)	Hücre Vaibilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla) (%)	Proliferasyon İndeksi (%)
Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreler (kontrol grubu)	0,938		%100	100
Kombine Doz (tedavi deney grubu) (50µmol/L Resveratrol+ 1mM/L Nikotinamid)		2,088	%122,60 Artış	222,60

Tablo 4.10. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 72. saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks analiz sonuçları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Aok-Aok blank)	Kombine Doz (tedavi deney grubu) (abs) (Aotc-Aotc blank)	Hücre Viabilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla) (%)	Proliferasyon İndeksi (%)
Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreler (kontrol grubu)	0,797		%100	100
Kombine Doz 1 (tedavi deney grubu) (50µmol/L Resveratrol+ 1mM/L Nikotinamid)		1,856	%132,87 artış	232,87
Kombine Doz 2 (tedavi deney grubu) (100µmol/L Resveratrol+ 1mM/L Nikotinamid)		2,023	%153,82 Artış	253,82



Şekil.4.8. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası uygulanan kombine dozların proliferasyon indeks (%) karşılaştırılması (a; $p=0,007$, b; $p=0,001$)

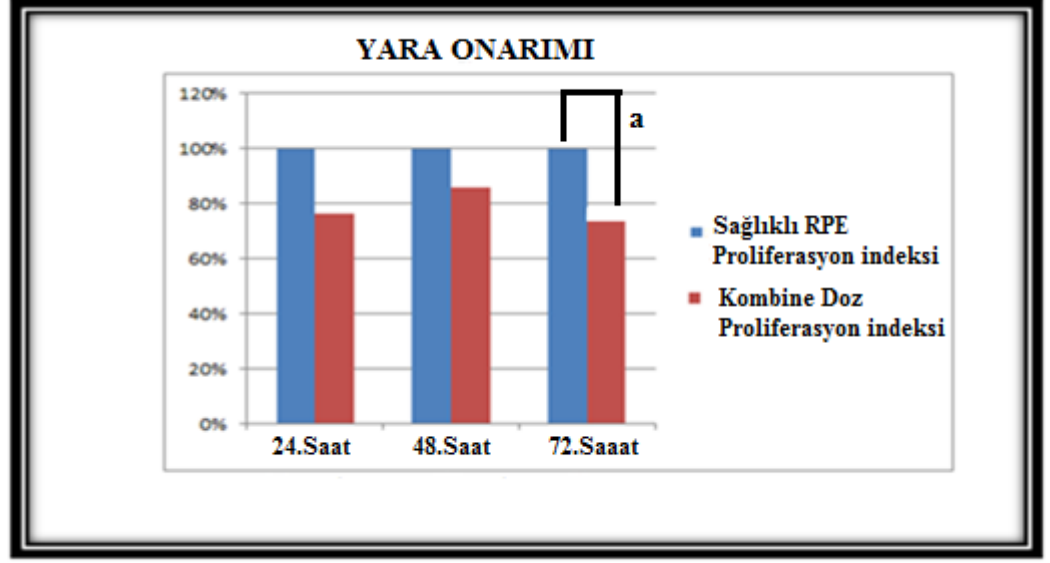


Şekil.4.9. Kontrol grubu olan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için 72 saat inkübasyon sonrası uygulanan kombine dozların proliferasyon indeks (%) karşılaştırılması, KOM1; 50 μ mol/L Resveratrol+ 1mM/L Nikotinamid, KOM2: 100 μ mol/L Resveratrol+ 1mM/L Nikotinamid (a; $p<0,001$).

4.4.2.1. Kombine Dozların Yara Onarımına Etkisi

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine her bir inkübasyon süresi için uygulanan kombine dozların bu hücrelerdeki yara onarımına etkisi aynı analiz yöntemiyle gözlemlendi.

Sağlıklı RPE hücre kontrol grubunun hücre proliferasyon indeksi %100 kabul edildi. Her bir inkübasyon süresi için belirlenen kombine dozların oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için ayrı ayrı hücre proliferasyon indeksi sağlıklı kontrol grubuna kıyasla hesaplandı (Tablo 4.11). 3 tekrarlı ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı. Deney sonuçlarına göre üç inkübasyon süresi için de kombine tedavi gruplarının hücre proliferasyon indeksi, sağlıklı kontrol grubunun hücre proliferasyon indeksi olan %100 değerinin altında kaldığı gözlemlendi. İstatistiksel analiz sonucu 24 ve 48 saat inkübasyon değerleri için test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. Student t testi analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). 72.saat inkübasyon süresi için yapılan istatistiksel analiz sonucunda test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. Student t testi analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü. Kontrol grubu için ortalama absorbans değeri $2,77 \pm 0,97$, kombine doz için ortalama absorbans değeri $2,023 \pm 0,125$ ($p=0,01$). Sonuç olarak; 72. saat inkübasyon süresi için oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde kombine uygulamanın yara onarımı düzeyinde hücre proliferasyonunu sağladığı gözlemlendi. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücrelere uygulanan ilgili kombine dozların kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücreleri ile proliferasyon indeks karşılaştırılması Şekil 4.10'da verilmektedir.



Şekil 4.10. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücrelere uygulanan ilgili kombine dozların kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücreleri ile proliferasyon indeksi (%) karşılaştırılması (a; p=0,01).

Tablo 4.11. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulanan kombine dozun 24. saat, 48.saat ve 72.saat inkübasyon sonrası bu hücrelerdeki yara onarımına etkisi

İnkübasyon Süreleri	Sağlıklı RPE hücreler (kontrol grubu) Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Ask-Ask blank)	Kombine Doz (tedavi deney grubu) (abs) (Aotc-Aotc blank)	Proliferasyon İndeksi (%) (Sağlıklı kontrol grubu; 100)
Tüm inkübasyon süreleri için sağlıklı RPE kontrol grubu			100
24. Saat	2,532	1,928 Kombine Doz (100µmol/L Resveratrol+ 1mM/L Nikotinamid)	76,15
48. Saat	2,428	2,088 Kombine Doz (50µmol/L Resveratrol+ 1mM/L Nikotinamid)	86

Tablo 4.11. (devam)

72. Saat	2,774	2,023	72,93
		Kombine Doz	
		(100µmol/L Resveratrol+	
		1mM/L Nikotinamid)	

4.5. CCK-8 (Cell Counting Kit- 8) Analiz Yöntemi İle Sağlıklı RPE Hücrelerinde Hücre Viabilite ve Hücre Proliferasyon Analizi

Sağlıklı RPE hücrelerine 24., 48. ve 72. saat inkübasyon sürelerinde uygulanan etken maddelerinin ve ilgili kombine dozların, etken maddelerle muamele edilmeyen sağlıklı kontrol grubuna kıyasla hücre viabilite oranına etkisi ve her bir grubun hücre proliferasyon indeks değerleri sırasıyla Tablo 4.12, Tablo 4.13 ve Tablo 4.14’de verilmektedir. 3 tekrarlı ölçülen absorbans değerlerinin ortalaması alındı.

Deney sonuçlarına göre her bir inkübasyon süresi için optimum güvenlik sınırlarını tanımlayan doz aralıkları belirlendi. Buna göre sağlıklı RPE hücrelerine 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 150 µmol/L resveratrol, 5mM/L nikotinamid ve 10 mM/L nikotinamid etken maddelerinin etken maddelerle muamele edilmeyen sağlıklı kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %17,89 , %14,28 ve %30,12 hücre viabilite kaybı gözlemlendi (Tablo 4.12). Sağlıklı RPE hücrelerine 48 saat inkübasyon süresinde uygulanan 150 µmol/L resveratrol, 5mM/L nikotinamid ve 10 mM/L nikotinamid etken maddelerinin etken maddelerle muamele edilmeyen sağlıklı kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %33,91 , %32,24 ve %33,96 hücre viabilite kaybı gözlemlendi (Tablo 4.13). Sağlıklı RPE hücrelerine 72 saat inkübasyon süresinde uygulanan 150 µmol/L resveratrol, 5mM/L nikotinamid ve 10 mM/L nikotinamid etken maddelerinin etken maddelerle muamele edilmeyen sağlıklı kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %52,49 , %50,12 ve %70,79 hücre viabilite kaybı gözlemlendi (Tablo 4.14). Sağlıklı RPE hücrelerinde önemli oranda viabilite kaybı oluşturduğu için; 150 µmol/L resveratrol, 5mM/L nikotinamid ve 10 mM/L nikotinamid etken maddeler analizlerdeki tüm deney gruplarından çıkarıldı.

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücelere kıyasla en yüksek viabilite sonuçları veren etken maddelerin, sağlıklı hücelere aynı inkübasyon sürelerinde uygulanması sonucu ölçülen absorbans değerleri için istatistiksel analizler yapıldı. İstatistiksel analiz sonucu her üç inkübasyon süresinde test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

İstatistiksel analizlere göre; 24., 48. ve 72. saat inkübasyon sürelerinde oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücelerde hücre viabilite oranını ve hücre proliferasyon indeksini arttıran en etkili etken madde seçeneklerinin ve buna bağlı kombine dozun, sağlıklı RPE hücelerinde kontrol grubuna kıyasla hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerlerinde anlamlı oranda herhangi bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi.

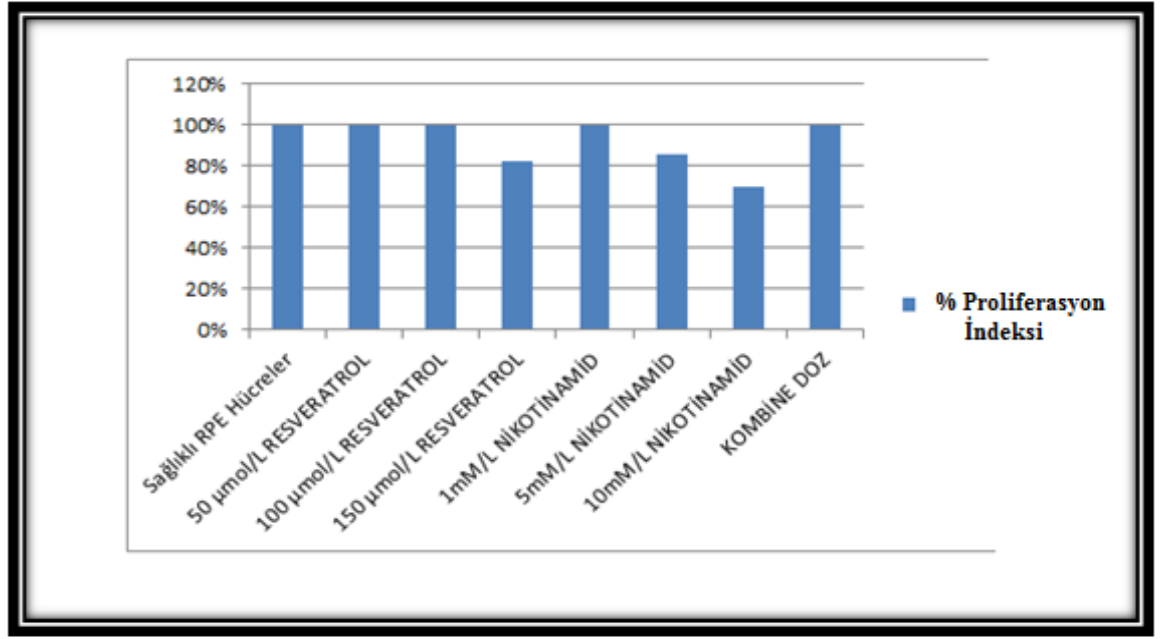
24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süresi sonrası kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücelerine kıyasla etken maddelerin ve kombine dozun hücre proliferasyon indeks karşılaştırılması sırasıyla Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de verilmektedir.

Tablo 4.12. Sağlıklı RPE hücelerine uygulanan etken maddelerin ve ilgili kombine dozun 24.saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerleri

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Ask-Ask blank)	Resveratrol Uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Asrt-Asrt blank	Nikotinamid uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Asnt-Asnt blank	Kombine Doz Uygulaması (Astc-Astc Blank) (abs)	Hücre Viabilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla)	Proliferasyon İndeksi (%)
Sağlıklı RPE hüceler (kontrol grubu)	1,660				% 100	100
50 μ mol/L Resveratrol (tedavi deney grubu)		1,662			% 0,12 artış	100,12

Tablo 4.12 (devam)

100 µmol/L	1,664		%0,24	100,24
Resveratrol (tedavi deney grubu)			artış	
150 µmol/L	1,363		%17,89	82,11
Resveratrol			azalış	
(tedavi deney grubu)				
1 mM/L		1,663	%0,18	100,18
Nikotinamid (tedavi deney grubu)			artış	
5 mM/L		1,423	%14,28	85,72
Nikotinamid			azalış	
10 mM/L		1,160	%30,12	69,88
Nikotinamid			azalış	
Kombine Doz (tedavi deney grubu)		1,660	-	100
(100 µmol/L Resveratrol + 1 mM/L Nikotinamid)				



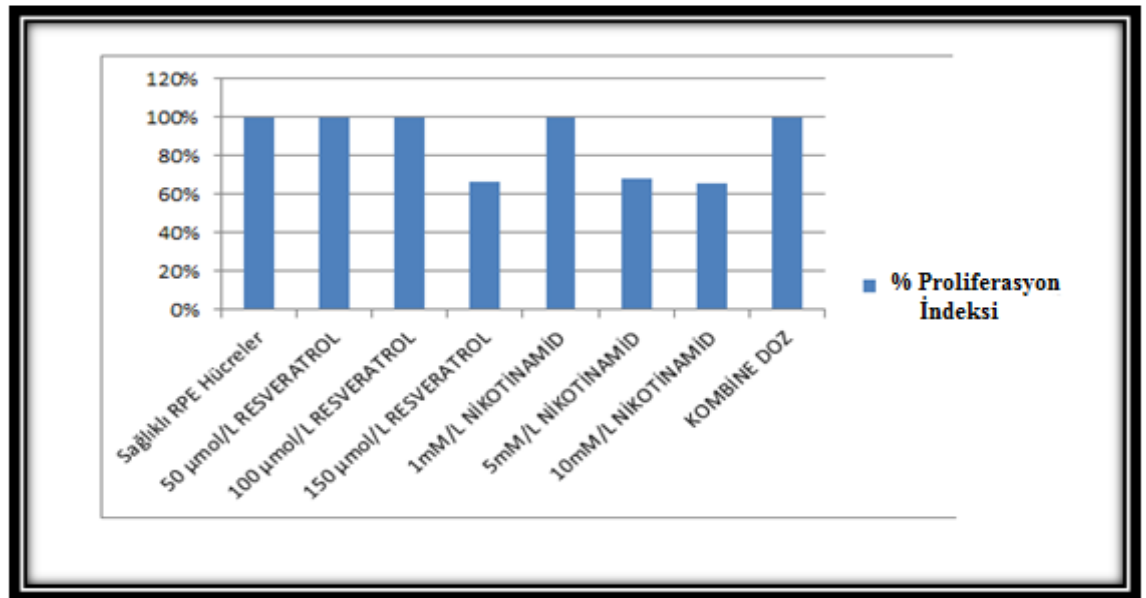
Şekil 4.11. 24 saat inkübasyon süresi sonrası kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine kıyasla etken maddelerin ve kombine dozun hücre proliferasyon indeks (%) karşılaştırılması
Kombine doz; 100 µmol/L Resveratrol +1 mM/L Nikotinamid

Tablo 4.13. Sağlıklı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin ve ilgili kombine dozun 48.saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerleri

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Ask-Ask blank)	Resveratrol Uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Asrt-Asrt blank	Nikotinamid uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Asnt-Asnt blank	Kombine Doz Uygulaması (Astc-Astc Blank) (abs)	Hücre Vaibilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla)	Proliferasyon İndeksi (%)
Sağlıklı RPE hücreler (kontrol grubu)	1,852				% 100	100
50 µmol/L Resveratrol (tedavi deney grubu)		1,856			%0,22 artış	100,22
100 µmol/L Resveratrol (tedavi deney grubu)		1,856			%0,22 artış	100,22

Tablo 4.13 (devam)

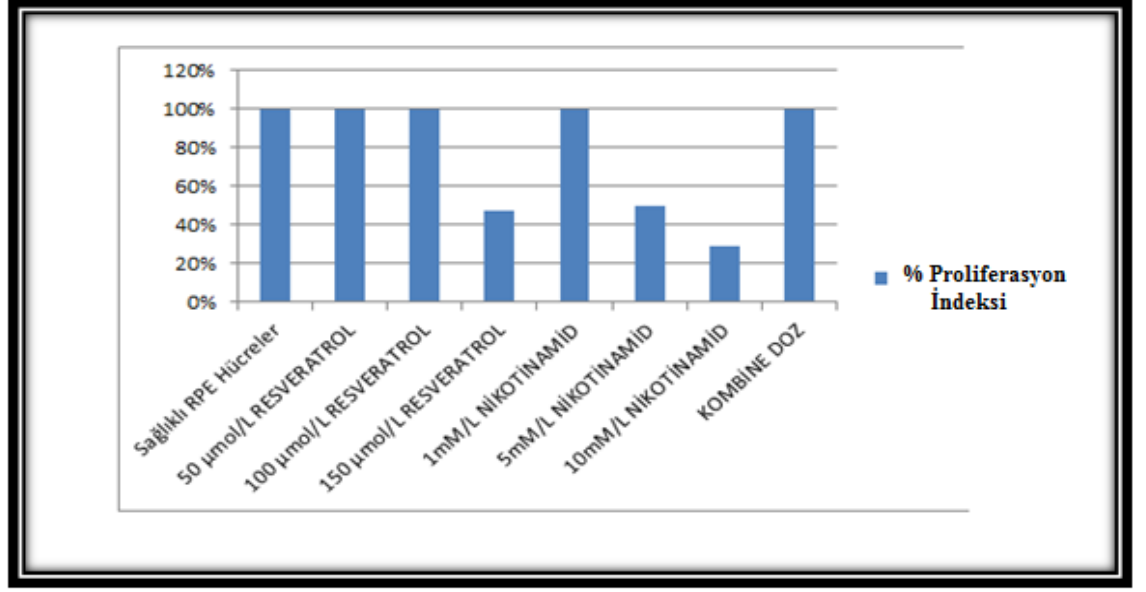
150 µmol/L Resveratrol	1,224	%33,91 azalış	66,09
1 mM/L Nikotinamid	1,850	%0,11 azalış	99,89
5 mM/L Nikotinamid (tedavi deney grubu)	1,255	%32,24 azalış	67,76
10 mM/L Nikotinamid	1,233	%33,96 azalış	66,03
Kombine Doz (tedavi deney grubu) (50 µmol/L Resveratrol + 1 mM/L Nikotinamid)	1,852	-	100



Şekil 4.12. 48 saat inkübasyon süresi sonrası kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine kıyasla etken maddelerin ve kombine dozun hücre proliferasyon indeksi (%) karşılaştırılması
Kombine doz; 50 µmol/L Resveratrol +1 mM/L Nikotinamid

Tablo 4.14. Sağlıklı RPE hücrelerine uygulanan etken maddelerin ve ilgili kombine dozun 72.saat inkübasyon sonrası hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerleri

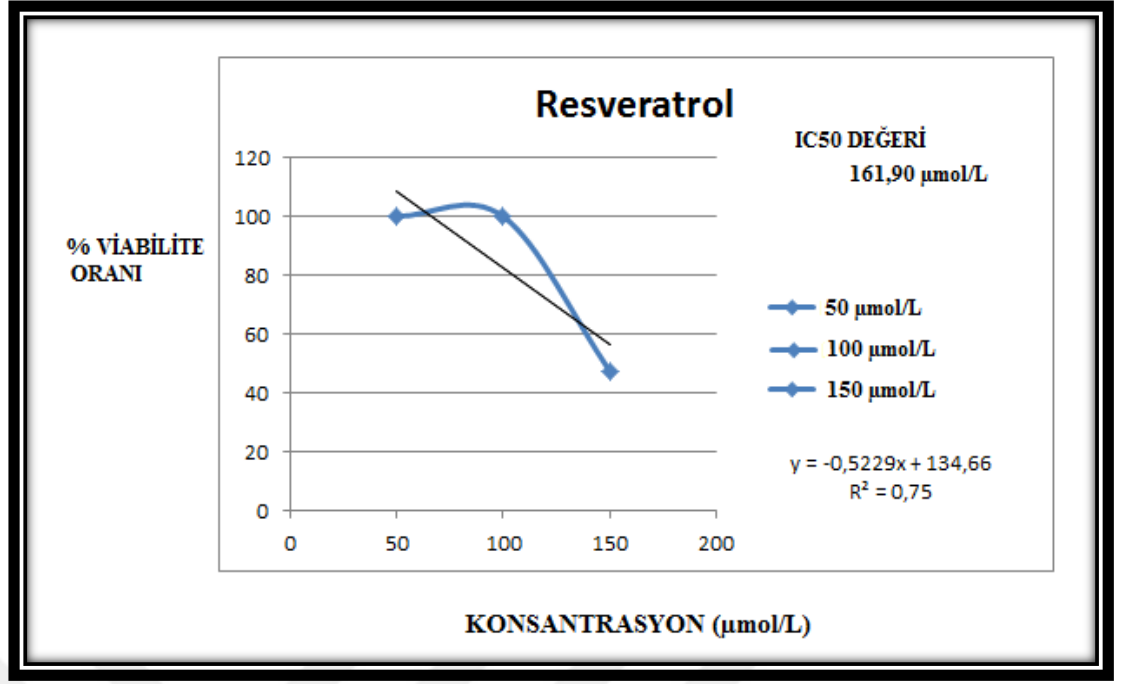
Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Kontrol Grubu-Blank Kontrol Grubu (abs) (Ask-Ask blank)	Resveratrol Uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Asrt-Asrt blank	Nikotinamid Uygulaması (tedavi deney grubu) (abs) Asnt-Asnt blank	Kombine Doz Uygulaması (Astc-Astc Blank) (abs)	Hücre Viabilite Etkisi (kontrol grubuna kıyasla)	Proliferasyon İndeksi (%)
Sağlıklı RPE hücreler	2,027				% 100	100
50 µmol/L Resveratrol		2,023			%0,20 azalış	99,80
100 µmol/L Resveratrol		2,023			%0,20 azalış	99,80
150 µmol/L Resveratrol		0,963			%52,49 azalış	47,51
1 mM/L Nikotinamid			2,028		%0,05 artış	100,05
5 mM/L Nikotinamid			1,011		%50,12 azalış	49,88
10 mM/L Nikotinamid			0,592		%70,79 azalış	29,21
Kombine Doz (100 µmol/L Resveratrol + 1mM/L Nikotinamid)				2,028	%0,05 artış	100,05



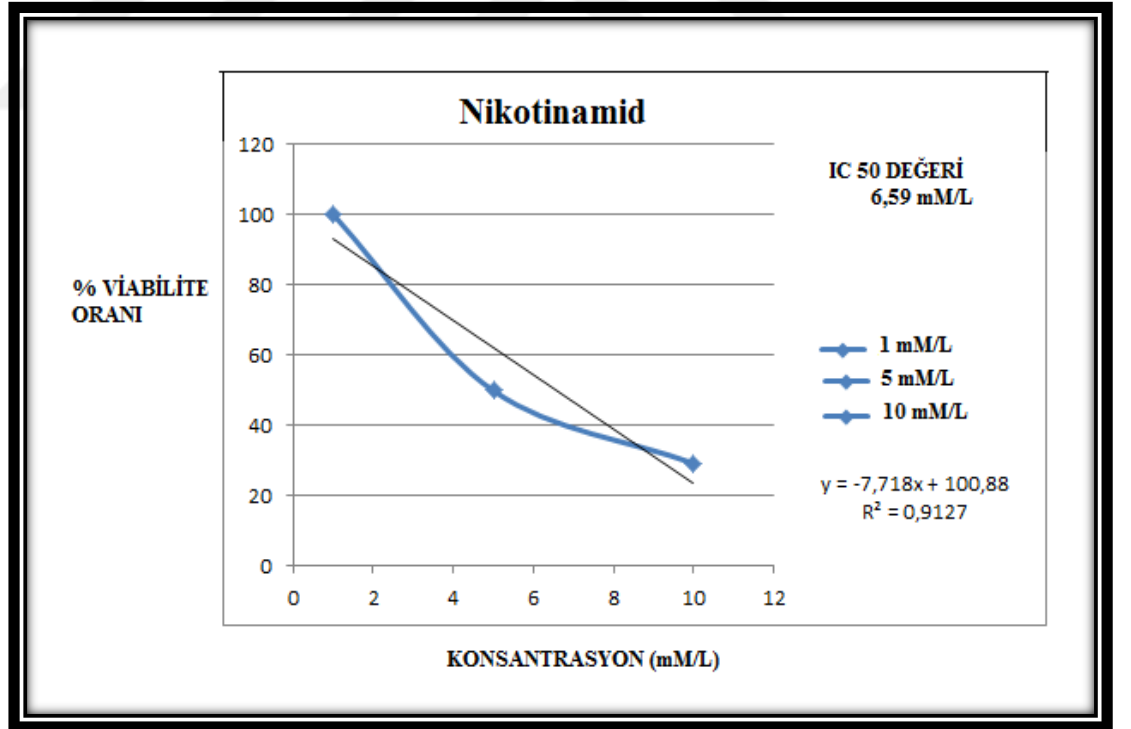
Şekil 4.13. 72 saat inkübasyon süresi sonrası kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine kıyasla etken maddelerin ve kombine dozun hücre proliferasyon indeks (%) karşılaştırılması
Kombine doz; 100 µmol/L Resveratrol +1 mM/L Nikotinamid

4.5.1. IC50 Değerinin Hesaplanması

CCK-8 analiz sonuçlarına göre IC50 değeri hesaplandı (Han vd.,2018). Sağlıklı RPE hücrelerine 24., 48. ve 72. saat inkübasyon süresinde uygulanan etken madde seçeneklerinden etken maddelerle muamele edilmeyen sağlıklı RPE kontrol grubuna kıyasla önemli oranda hücre viabilite kaybı 150 µmol/L resveratrol, 5mM/L nikotinamid ve 10 mM/L nikotinamid etken maddeleri için gözlemlendi. 72.saat inkübasyon süresi için her bir etken maddenin hücre proliferasyonunu ve hücre canlılığını %50 oranında engelleyen etken madde konsantrasyonunu belirlemek amacıyla IC50 (yarım maksimum inhibitör konsantrasyon değeri) doğrusal eğilim grafiğine göre hesaplandı. Buna göre 72 saat inkübasyon süresi için resveratrolün IC50 değeri 161,90µmol/L, nikotinamidin ise 6,59 mM/L olarak belirlendi (Şekil 4.14; Şekil 4.15).



Şekil 4.14. 72 saat inkübasyon süresi sonunda, resveratrol etken maddesi için IC₅₀ değeri



Şekil 4.15. 72 saat inkübasyon süresi sonunda, nikotinamid etken maddesi için IC₅₀ değeri

CCK-8 (cell counting kit- 8) analiz yöntemi ile sağlıklı ve oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücre analizleri sonucu, her bir inkübasyon süresi için kontrol grubuna kıyasla en etkili hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değeri belirlenen ve en etkili optimum güvenlik sınırını tanımlayan etken madde seçenekleri ve ilgili kombine doz uygulamaları apoptoz analizleri için Tablo 4.15’de verildiği şekilde seçilerek oluşturuldu.

Tablo 4.15. Apoptoz analizlerinde uygulanmak üzere her bir inkübasyon süresi için seçilen etken madde seçenekleri ve kombine dozlar

İnkübasyon Süresi	Resveratrol Etken Maddesi	Nikotinamid Etken Maddesi	Kombine Doz
24. Saat	100µmol/L Resveratrol	1mM/L Nikotinamid	100µmol/L Resveratrol + 1mM/L Nikotinamid
48. Saat	50µmol/L Resveratrol	1mM/L Nikotinamid	50µmol/L Resveratrol + 1mM/L Nikotinamid
72. Saat	100µmol/L Resveratrol	1mM/L Nikotinamid	100µmol/L Resveratrol + 1mM/L Nikotinamid

4.6. Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Hasarlı RPE Hücrelerde Apoptoz Analiz Sonuçları

Farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine dozunun oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla apoptoz ve hücre viabilite oranına etkisi flow sitometri yöntemi kullanılarak, Propidium iodide/ Annexin-V boyaması ile iki tekrarlı tespit edilmiştir. Apoptoz analizi için flow sitometri cihaz kullanımı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (KÖKMER) hizmet alımı kapsamında yararlanıldı. Farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine dozunun oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 24., 48. ve 72. saat inkübasyon süreleri sonunda ölçülen flow sitometri analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.16, Şekil 4.19 ve Şekil 4.22'de verilmektedir.

Farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine dozunun oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi sırasıyla Şekil 4.18a, Şekil 4.21a ve Şekil 4.24a'da verilmektedir. Tüm sonuçlara göre hücre viabilite değeri %90 ve üstü değerde olduğunda hücre medyum renginin sarı renge dönüştüğü gözlemlendi. Ayrıca 24., 48. ve 72. saat inkübasyon süreleri sonunda deney protokolüne geçiş için tripsin EDTA (TE) solüsyonu ile kaldırılan hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü sırasıyla Şekil 4.18b, Şekil 4.21b ve Şekil 4.24b'de verilmektedir. Tüm sonuçlara göre TE solüsyonu ile kaldırılan hücrelerin kontrol grubuna kıyasla apoptoz analizlerinden alınan hücre viabilite yüzdeliklerine paralel oranda daha yoğun oldukları gözlemlendi.

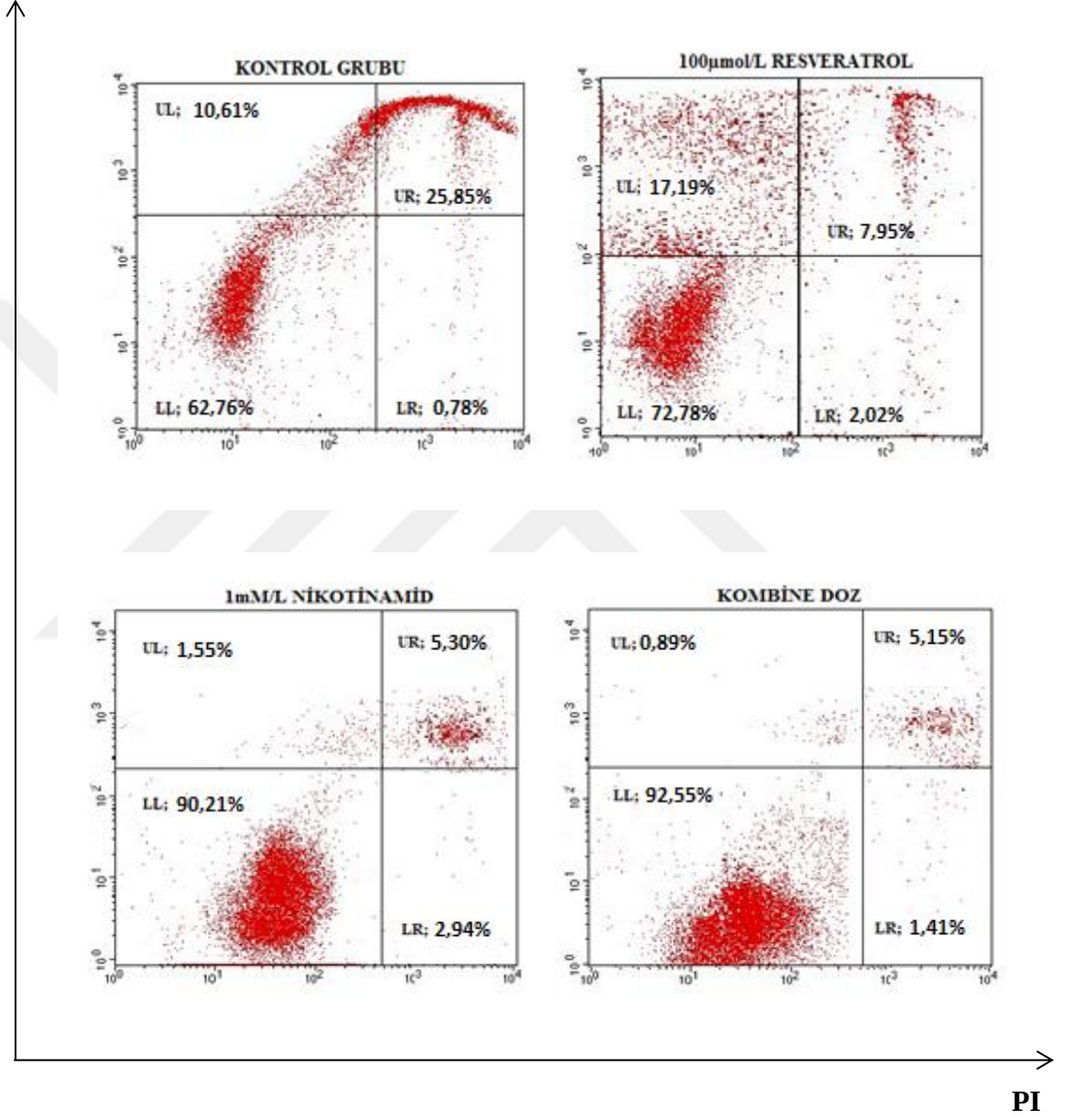
Flow sitometrik analize göre; **UL**; Erken apoptotik, **UR**; Geç apoptotik, **LL**; Canlı hücreler, **LR**; Nekrotik hücrelerdir.

24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi boyunca etken maddeler ve en etkili kombine doz uygulanan oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerindeki apoptoz analizi, flow sitometri ile ölçüldü. Kontrol grubu; hiçbir etken madde içermeyen oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE grubunu temsil etmektedir. 24. ve 72. saat inkübasyon süresi için kombine uygulama; 100µmol/L resveratrol ile 1mM/L nikotinamid etken maddelerini, 48. saat inkübasyon süresi için kombine uygulama ise 50µmol/L resveratrol ile 1mM/L nikotinamid etken maddelerini temsil etmektedir.

Flow sitometri sonuçlarına göre; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları sırasıyla Tablo 4.16, Tablo 4.18 ve Tablo 4.20’de, her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranların karşılaştırılması ise Şekil 4.17, Şekil 4.20 ve Şekil 4.23’de verilmektedir.

4.6.1. 24. saat inkübasyon süresi için apoptoz analiz sonuçları

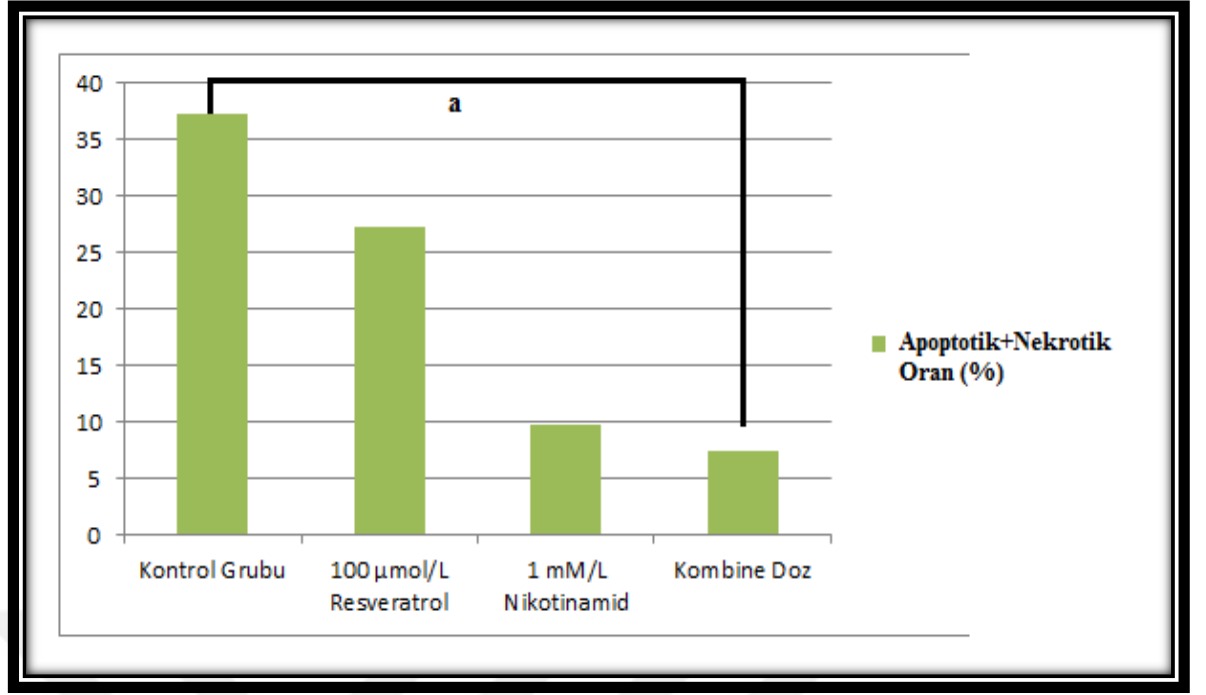
ANNEXIN V



Şekil 4.16. 24.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri

Tablo 4.16. 24 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Apoptotik+Nekrotik Oran	Viabilite Oranı
Kontrol Grubu (Hasarlı RPE Hücreler)	%37,24	%62,76
100µmol/L Resveratrol (Tedavi Deney Grubu)	%27,22	%72,78
1mM/L Nikotinamid (Tedavi Deney Grubu)	%9,79	%90,21
Kombine Doz (Tedavi Deney Grubu) (100 µmol/L Resveratrol + 1 mM/L Nikotinamid)	%7,45	%92,55

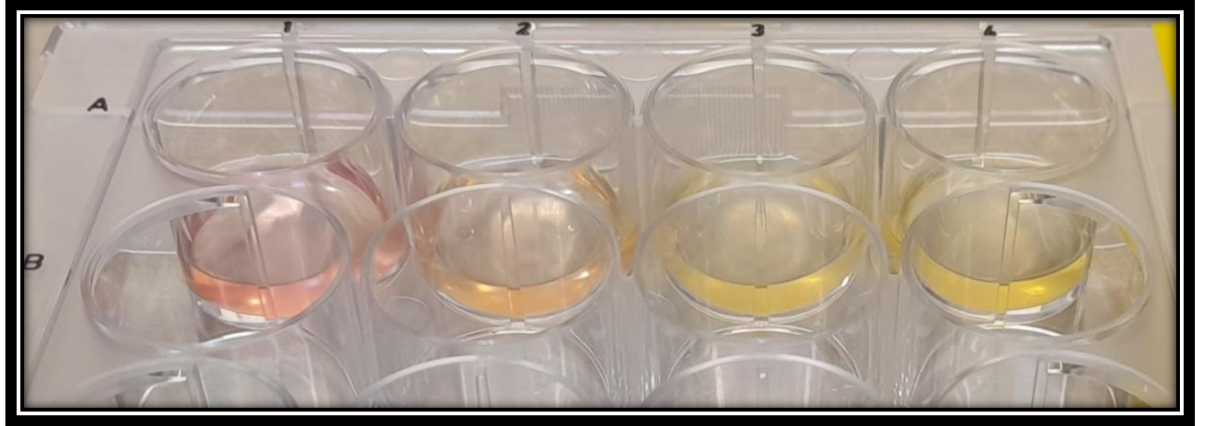


Şekil 4.17. 24 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranların karşılaştırılması (a; $p<0,001$).

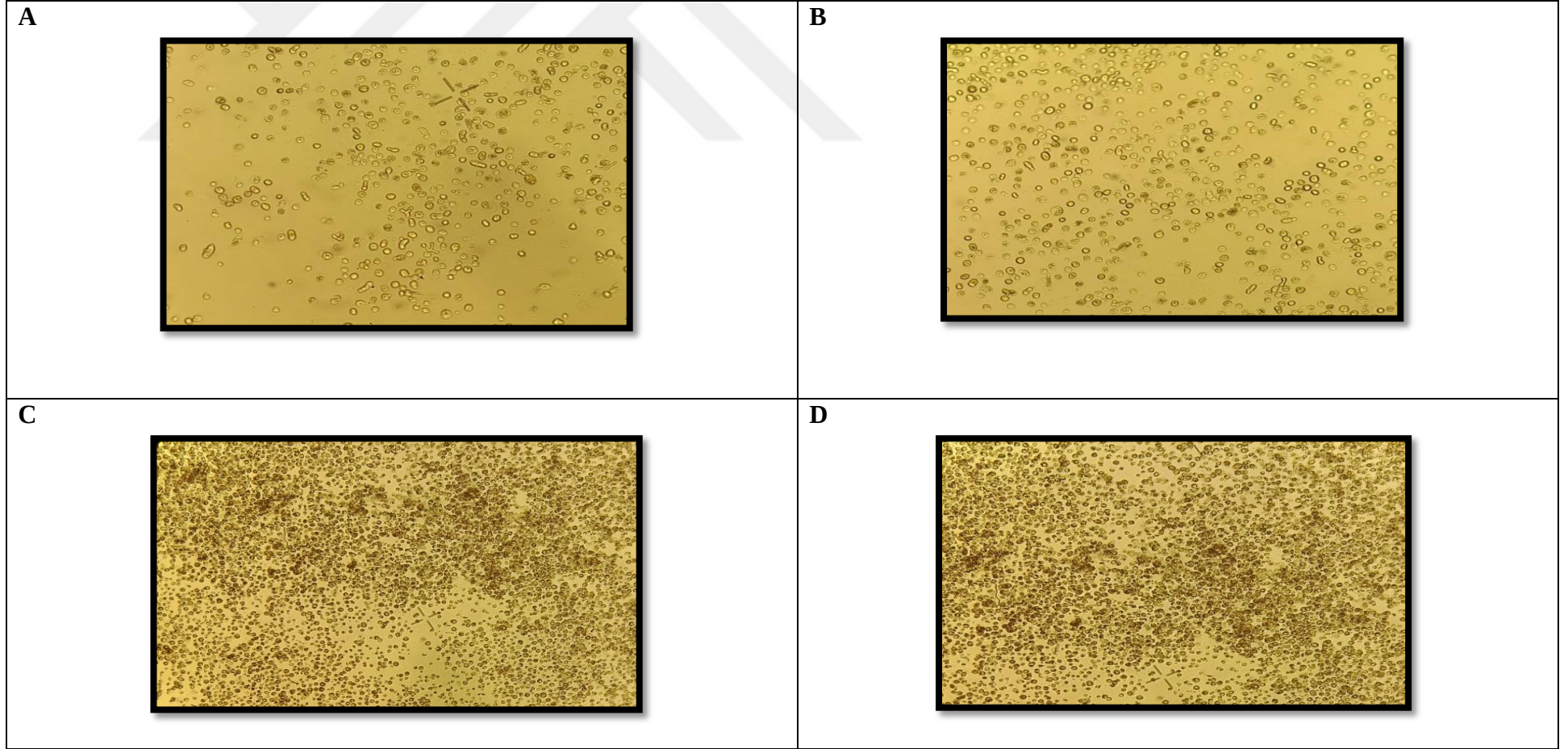
İstatistiksel analiz sonucuna göre test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı fark görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubu için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $37,21 \pm 0,60$, 100 µmol/L resveratrol uygulaması için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $27,22 \pm 1,15$, 1mM/L nikotinamid uygulaması için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $9,79 \pm 0,42$, kombine doz uygulaması (100 µmol/L resveratrol+1mM/L nikotinamid) için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $7,45 \pm 0,32$ ($p<0,001$). Post Hoc/ Tukey HSD testine göre gruplar arası p değerleri Tablo 4.17’de verilmektedir.

GRUPLAR		p değeri	
Post Hoc/ TukeyHSD	Kontrol Grubu	RES	p < 0,001
		NİK	p < 0,001
		KOM	p < 0,001
	RES	Kontrol Grubu	p < 0,001
		NİK	p < 0,001
		KOM	p < 0,001
	NİK	Kontrol Grubu	p < 0,001
		RES	p < 0,001
		KOM	p = 0,009
	KOM	Kontrol Grubu	p < 0,001
		RES	p < 0,001
		NİK	p = 0,009

Tablo 4.17. 24 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranlarının Post Hoc/Tukey HSD testine göre elde edilen p değerleri, Kontrol Grubu; Hasarlı RPE Hücreler, RES; 100 µmol/L Resveratrol, NİK; 1 mM/L Nikotinamid, KOM; 100 µmol/ Resveratrol +1 mM/L Nikotinamid kombine doz uygulaması



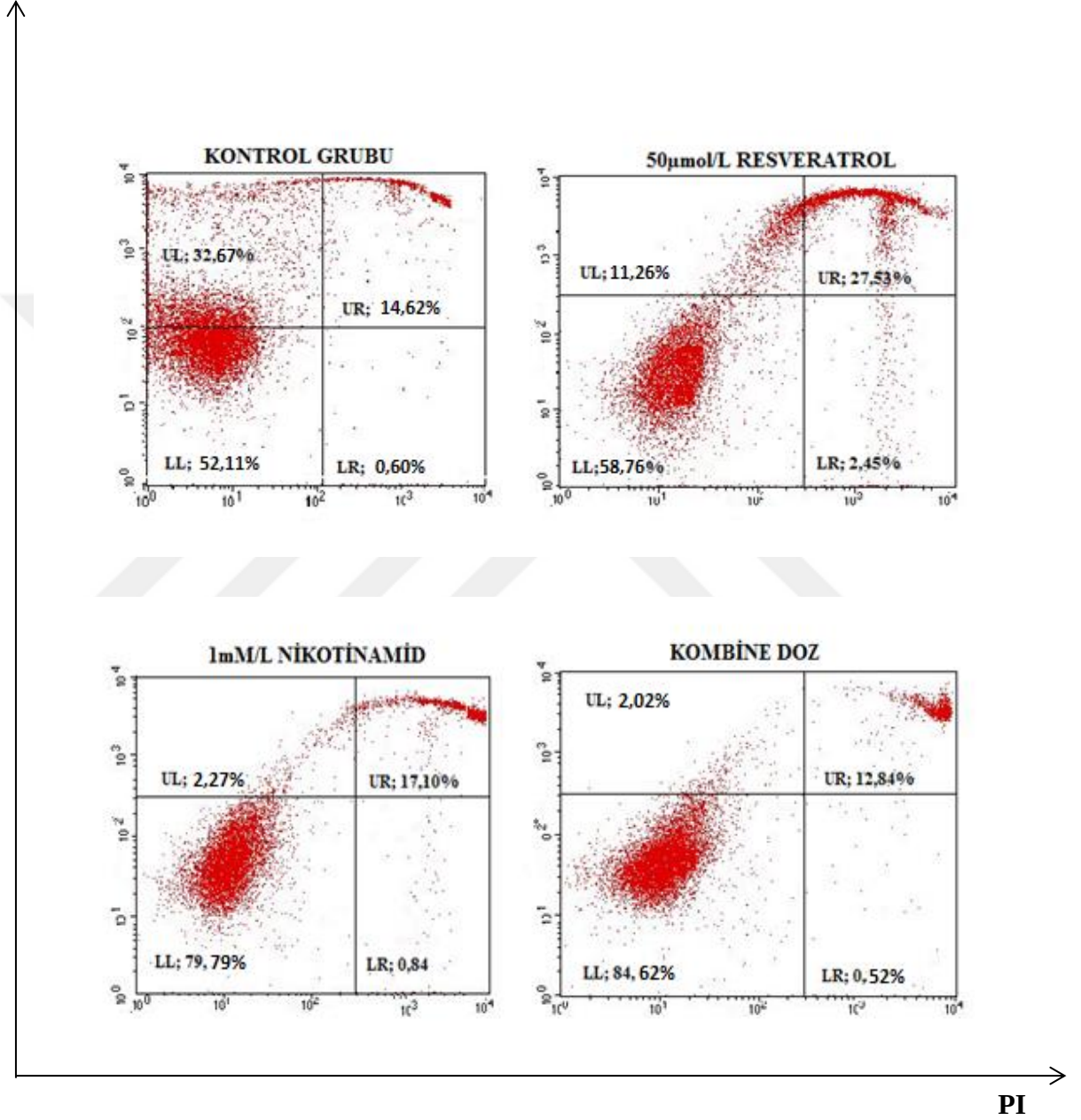
Şekil 4.18a. 24 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi, 1. Hasarlı RPE Kontrol Grubu, 2. 100µmol/L Resveratrol, 3.Kombine Doz, 4. 1mM/L Nikotinamid



Şekil 4.18b. Apoptoz analizi için 24 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü
A. Hasarlı RPE Kontrol Grubu, B. 100μmol/L Resveratrol, C. 1mM/L Nikotinamid, D. Kombine Doz

4.6.2. 48. saat inkübasyon süresi için apoptoz analiz sonuçları

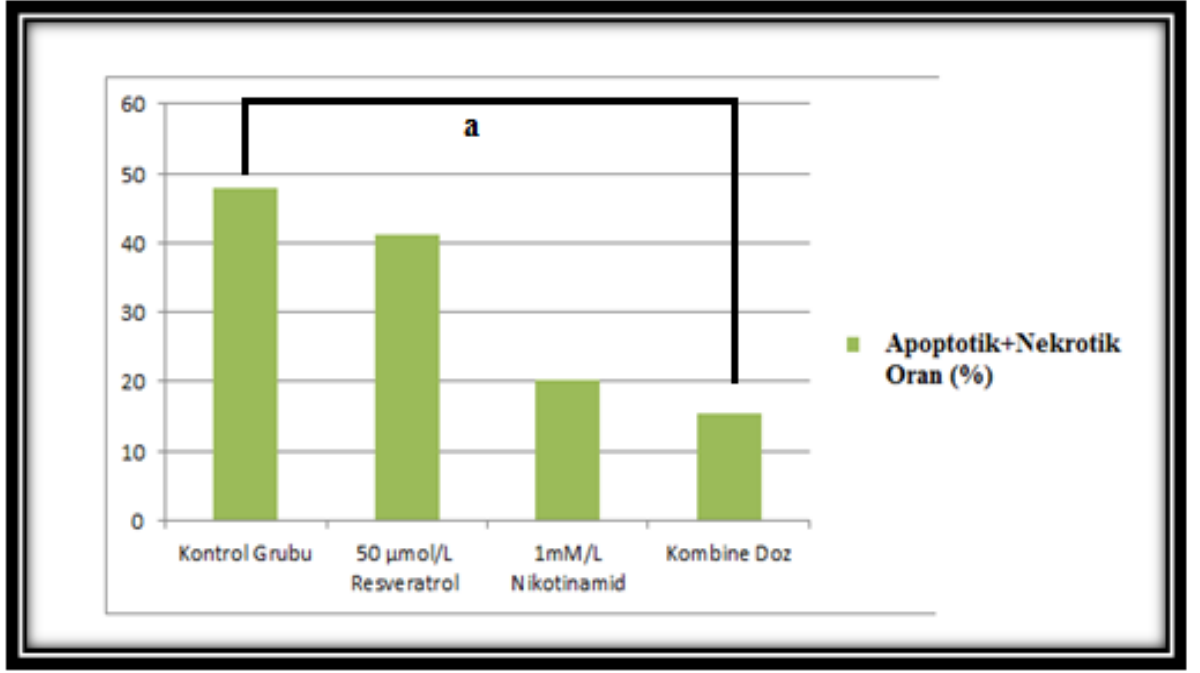
ANNEXİN V



Şekil 4.19. 48.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri

Tablo 4.18. 48 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Apoptotik+Nekrotik Oran	Viabilite Oranı
Kontrol Grubu (Hasarlı RPE Hücreler)	%47,89	%52,11
50µmol/L Resveratrol (Tedavi Deney Grubu)	%41,24	%58,76
1mM/L Nikotinamid (Tedavi Deney Grubu)	%20,21	%79,79
Kombine Doz (Tedavi Deney Grubu) (50 µmol/L Resveratrol + 1 mM/L Nikotinamid)	%15,38	%84,62



Şekil 4.20. 48 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranların karşılaştırılması (a; $p<0,001$).

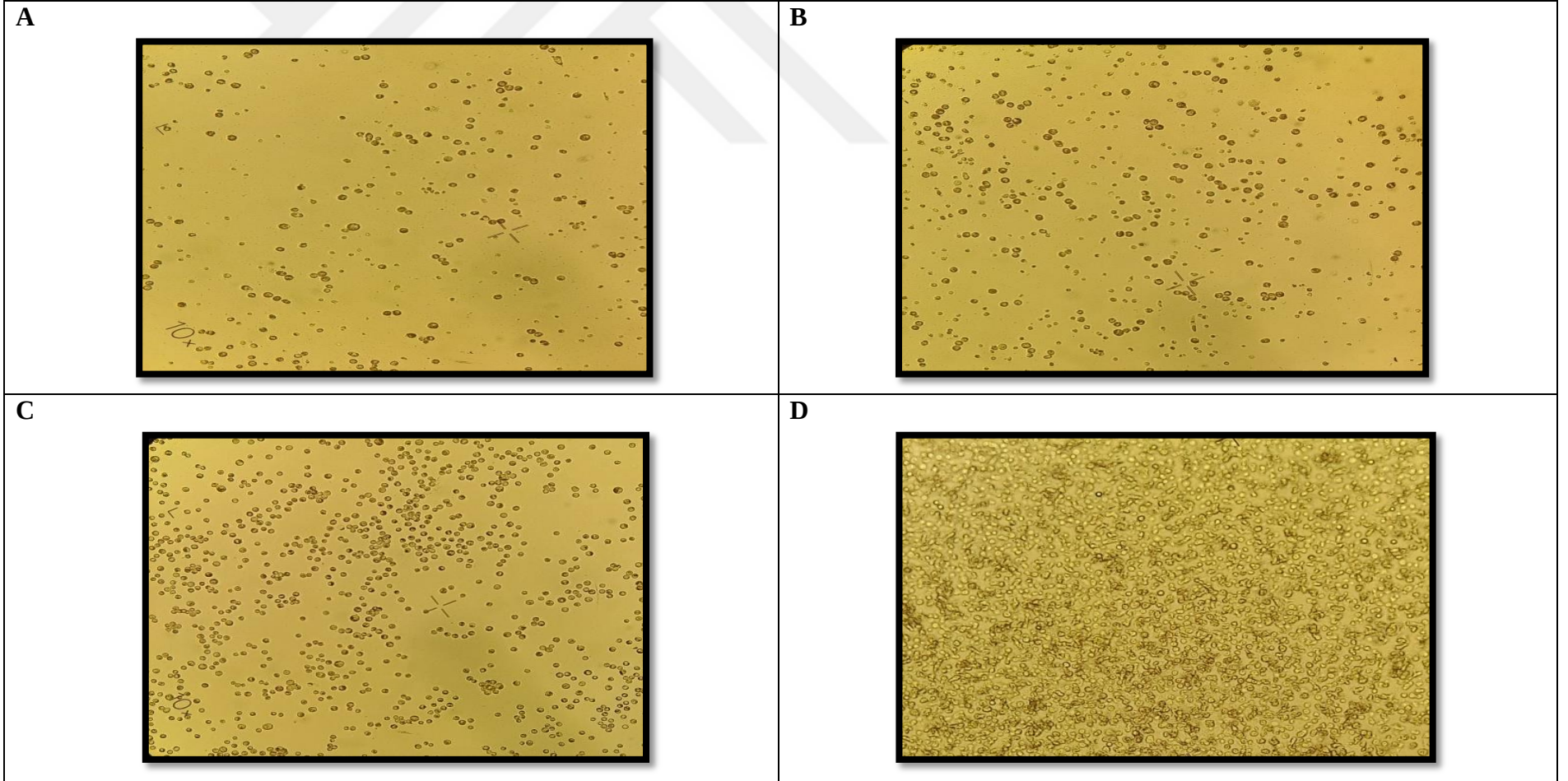
İstatistiksel analiz sonucuna göre test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı fark görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubu için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $47,89 \pm 1,75$, 50 µmol/L resveratrol uygulaması için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $41,24 \pm 0,60$, 1mM/L nikotinamid uygulaması için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $20,21 \pm 0,61$, kombine doz uygulaması (50 µmol/L resveratrol+1mM/L nikotinamid) için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $15,38 \pm 0,10$ ($p<0,001$). Post Hoc/ Tukey HSD testine göre gruplar arası p değerleri Tablo 4.19’da verilmektedir.

GRUPLAR			p değeri
Post Hoc/ TukeyHSD	Kontrol Grubu	RES	p < 0,001
		NİK	p < 0,001
		KOM	p < 0,001
	RES	Kontrol Grubu	p < 0,001
		NİK	p < 0,001
		KOM	p < 0,001
	NİK	Kontrol Grubu	p < 0,001
		RES	p < 0,001
		KOM	p = 0,001
	KOM	Kontrol Grubu	p < 0,001
		RES	p < 0,001
		NİK	p = 0,001

Tablo 4.19. 48 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranlarının Post Hoc/Tukey HSD testine göre elde edilen p değerleri, Kontrol Grubu; Hasarlı RPE Hücreler, RES; 50 µmol/L Resveratrol, NİK; 1 mM/L Nikotinamid, KOM; 50 µmol/ Resveratrol +1 mM/L Nikotinamid kombine doz uygulaması



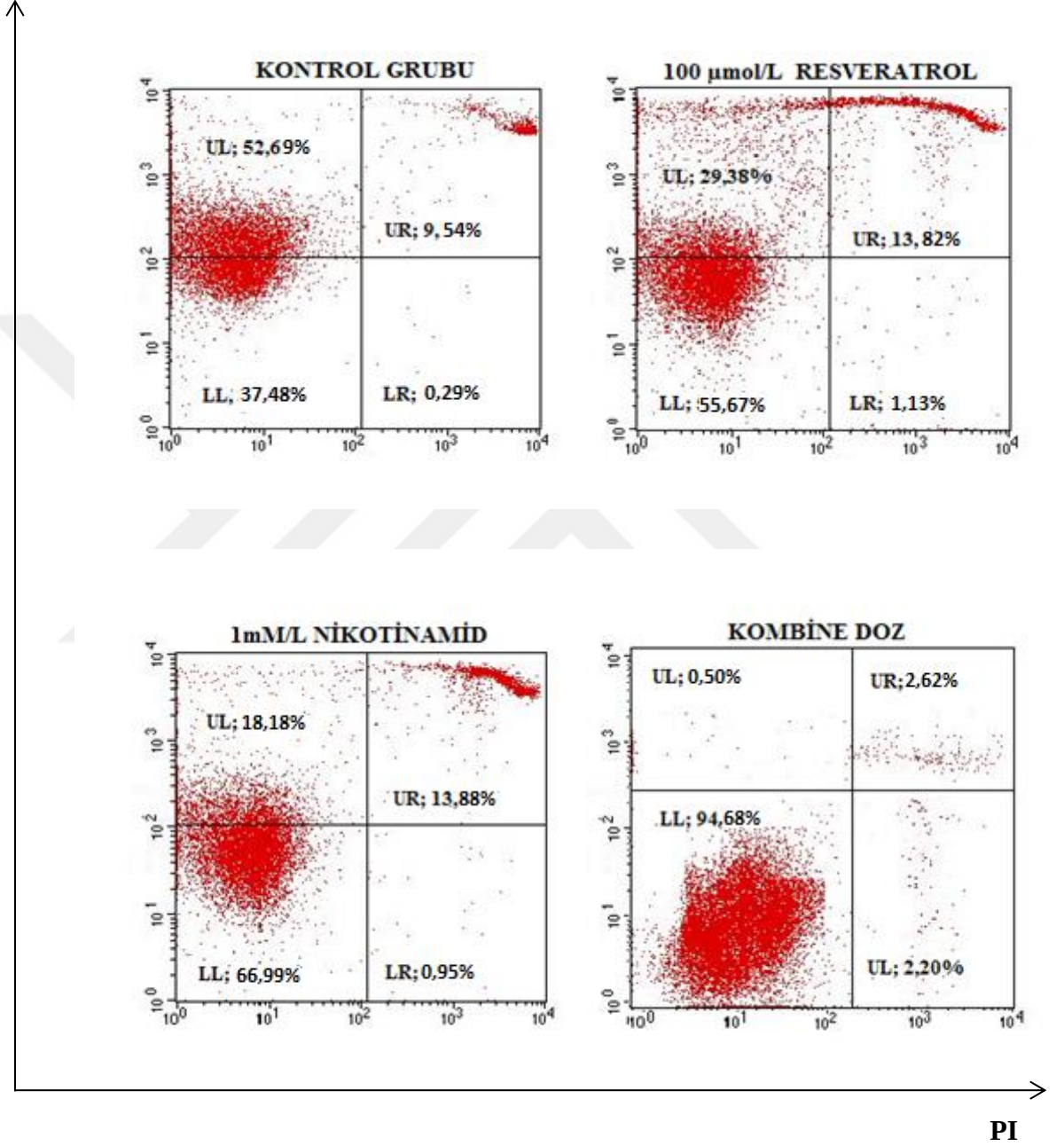
Şekil 4.21a. 48 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi, 1. Hasarlı RPE Kontrol Grubu, 2. 50µmol/L Resveratrol, 3.Kombine Doz, 4. 1mM/L Nikotinamid



Şekil 4.21b. Apoptoz analizi için 48 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü
A. Hasarlı RPE Kontrol Grubu, B. 50μmol/L Resveratrol, C. 1mM/L Nikotinamid, D. Kombine Doz

4.6.3. 72. saat inkübasyon süresinin apoptoz analiz sonuçları

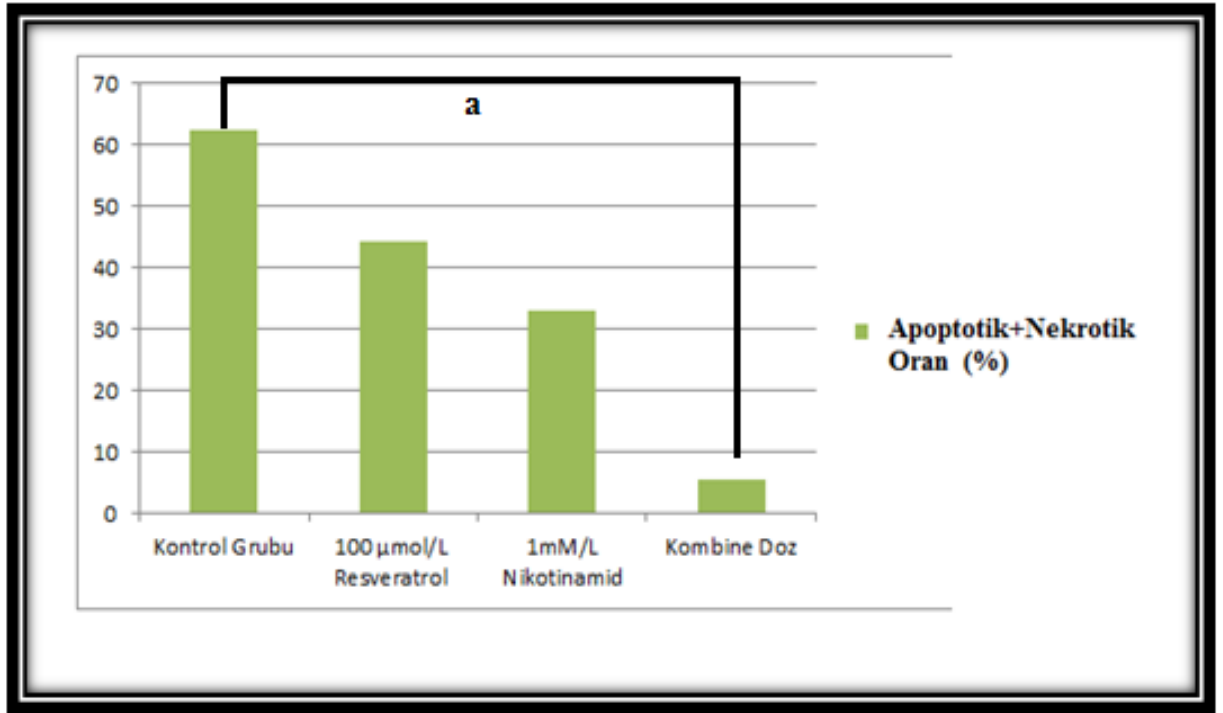
ANNEXİN V



Şekil 4.22. 72.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri

Tablo 4.20. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Apoptotik+Nekrotik Oran	Viabilite Oranı
Kontrol Grubu (Hasarlı RPE Hücreler)	%62,52	%37,48
100µmol/L Resveratrol (Tedavi Deney Grubu)	%44,33	%55,67
1mM/L Nikotinamid (Tedavi Deney Grubu)	%33,01	%66,99
Kombine Doz (Tedavi Deney Grubu) 100 µmol/L Resveratrol + 1 mM/L Nikotinamid)	%5,32	%94,68



Şekil 4.23. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranların karşılaştırılması (a; $p < 0,001$)

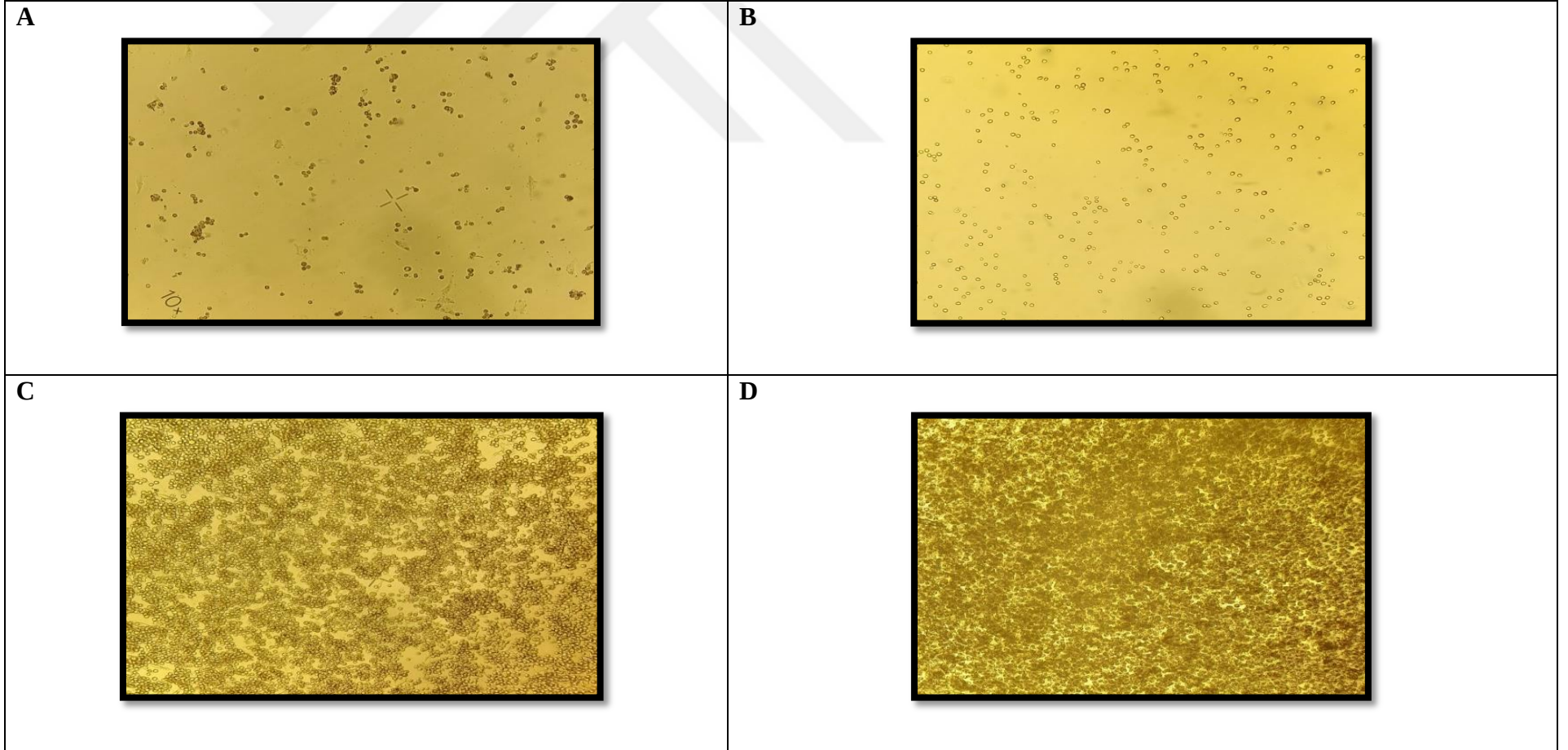
İstatistiksel analiz sonucuna göre test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). Kontrol grubu için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $62,52 \pm 0,73$, 100 µmol/L resveratrol uygulaması için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $44,33 \pm 1,26$, 1mM/L nikotinamid uygulaması için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $33,01 \pm 1,85$, kombine doz uygulaması (100 µmol/L resveratrol+1mM/L nikotinamid) için ortalama apoptotik+nekrotik yüzde değeri $5,32 \pm 0,160$ ($p < 0,001$). Post Hoc/ Tukey HSD testine göre gruplar arası p değerleri Tablo 4.21’de verilmektedir.

GRUPLAR		p değeri	
Post Hoc/ TukeyHSD	Kontrol Grubu	RES	p < 0,001
		NİK	p < 0,001
		KOM	p < 0,001
	RES	Kontrol Grubu	p < 0,001
		NİK	p < 0,001
		KOM	p < 0,001
	NİK	Kontrol Grubu	p < 0,001
		RES	p < 0,001
		KOM	p < 0,001
	KOM	Kontrol Grubu	p < 0,001
		RES	p < 0,001
		NİK	p < 0,001

Tablo 4.21. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik oranlarının Post Hoc/Tukey HSD testine göre elde edilen p değerleri, Kontrol Grubu; Hasarlı RPE Hücreler, RES; 100 µmol/L Resveratrol, NİK; 1 mM/L Nikotinamid, KOM; 100 µmol/ Resveratrol +1 mM/L Nikotinamid kombine doz uygulaması



Şekil 4.24a. 72 saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi, 1. Hasarlı RPE Kontrol Grubu, 2. 100µmol/L Resveratrol, 3.Kombine Doz, 4. 1mM/L Nikotinamid



Şeki 4.24b. Apoptoz analizi için 72 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü
A. Hasarlı RPE Kontrol Grubu, B. 100μmol/L Resveratrol, C. 1mM/L Nikotinamid, D. Kombine Doz

4.1. Sağlıklı RPE Hücrelerde Apoptoz Analiz Sonuçları

Farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine dozunun sağlıklı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla apoptoz ve hücre viabilite oranına etkisi flow sitometri yöntemi kullanılarak Annexin-V/Propidium iodide boyaması ile iki tekrarlı tespit edilmiş olup 24., 48. ve 72. saat inkübasyon süreleri sonunda ölçülen flow sitometri analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.25, Şekil 4.27 ve Şekil 4.29'da verilmektedir. Kontrol grubu; hiçbir etken madde içermeyen sağlıklı RPE grubunu temsil etmektedir. 24. ve 72. saat inkübasyon süresi için kombine grup 100µmol/L resveratrol ile 1mM/L nikotinamid etken maddelerini, 48. saat inkübasyon süresi için kombine grup ise 50µmol/L resveratrol ile 1mM/L nikotinamid etken maddelerini temsil etmektedir.

Flow sitometri sonuçlarına göre; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları sırasıyla Tablo 4.22, Tablo 4.23 ve Tablo 4.24'de verilmektedir.

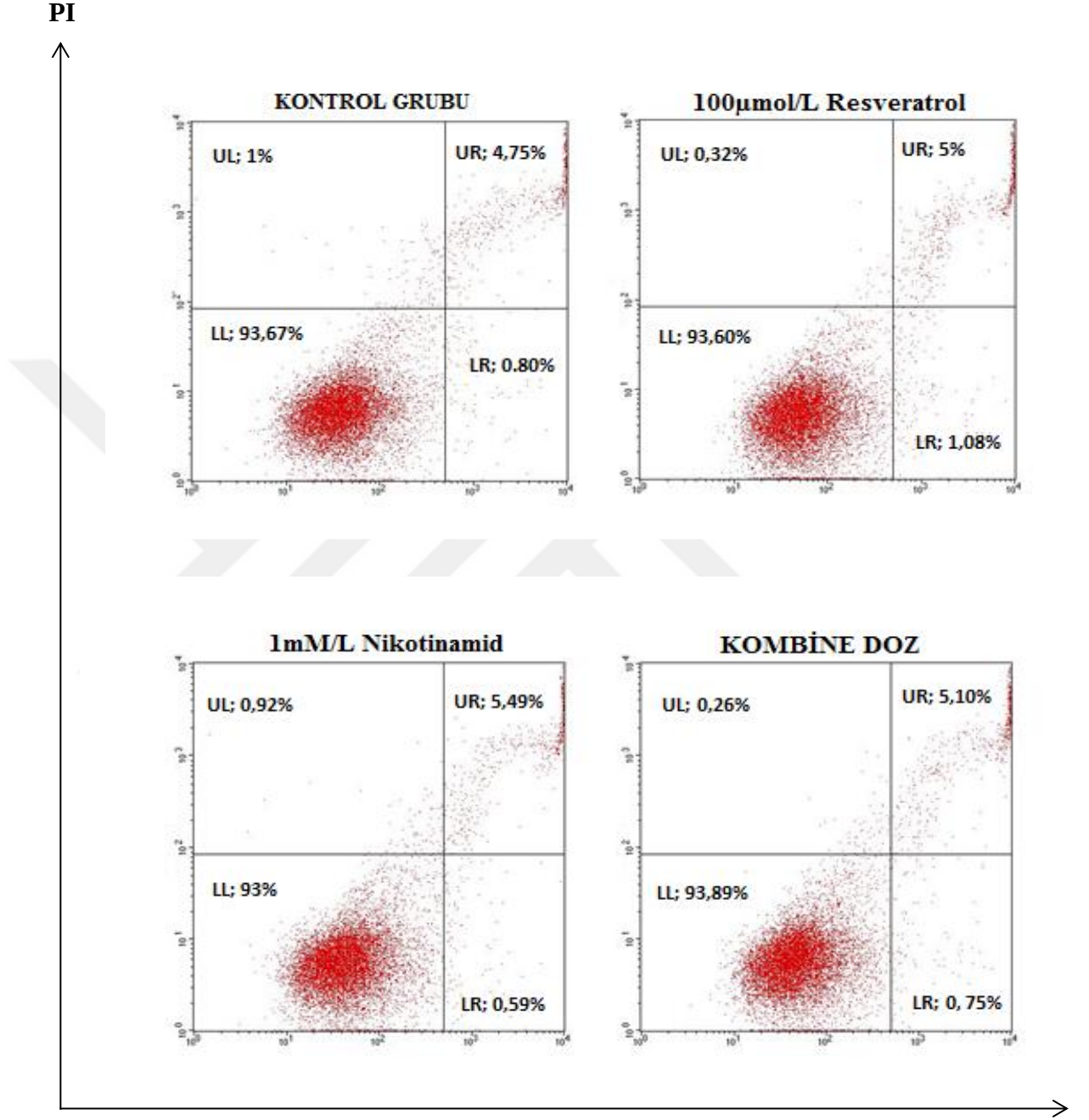
Farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine dozunun sağlıklı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 24., 48. ve 72. saat inkübasyon süreleri sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi sırasıyla Şekil 4.26a, Şekil 4.28a ve Şekil 4.30a'da verilmektedir. Tüm sonuçlara göre hücre viabilite değeri %90 ve üstü değerde olduğunda hücre medyum renginin sarı renge dönüştüğü gözlemlendi. Ayrıca 24., 48. ve 72. saat inkübasyon süreleri sonunda, deney protokolüne geçiş için tripsin EDTA (TE) solüsyonu ile kaldırılan hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü sırasıyla Şekil 4.26b, Şekil 4.28b ve Şekil 4.30b'de verilmektedir. Tüm sonuçlara TE solüsyonu ile kaldırılan hücrelerin kontrol grubuna kıyasla apoptoz analizlerinden alınan hücre viabilite yüzdeliklerine paralel oranda hücre yoğunluklarında herhangi bir artış ya da azalış gözlemlenmedi.

Flow sitometrik analize göre; **UL**; Nekrotik hücreler, **UR**; Geç apoptotik, **LL**; Canlı hücreler, **LR**; Erken apoptotik hücrelerdir.

İstatistiksel analiz sonucu her üç inkübasyon süresinde test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).



4.7.1. 24. saat inkübasyon süresinin apoptoz analiz sonuçları



ANNEXİN V

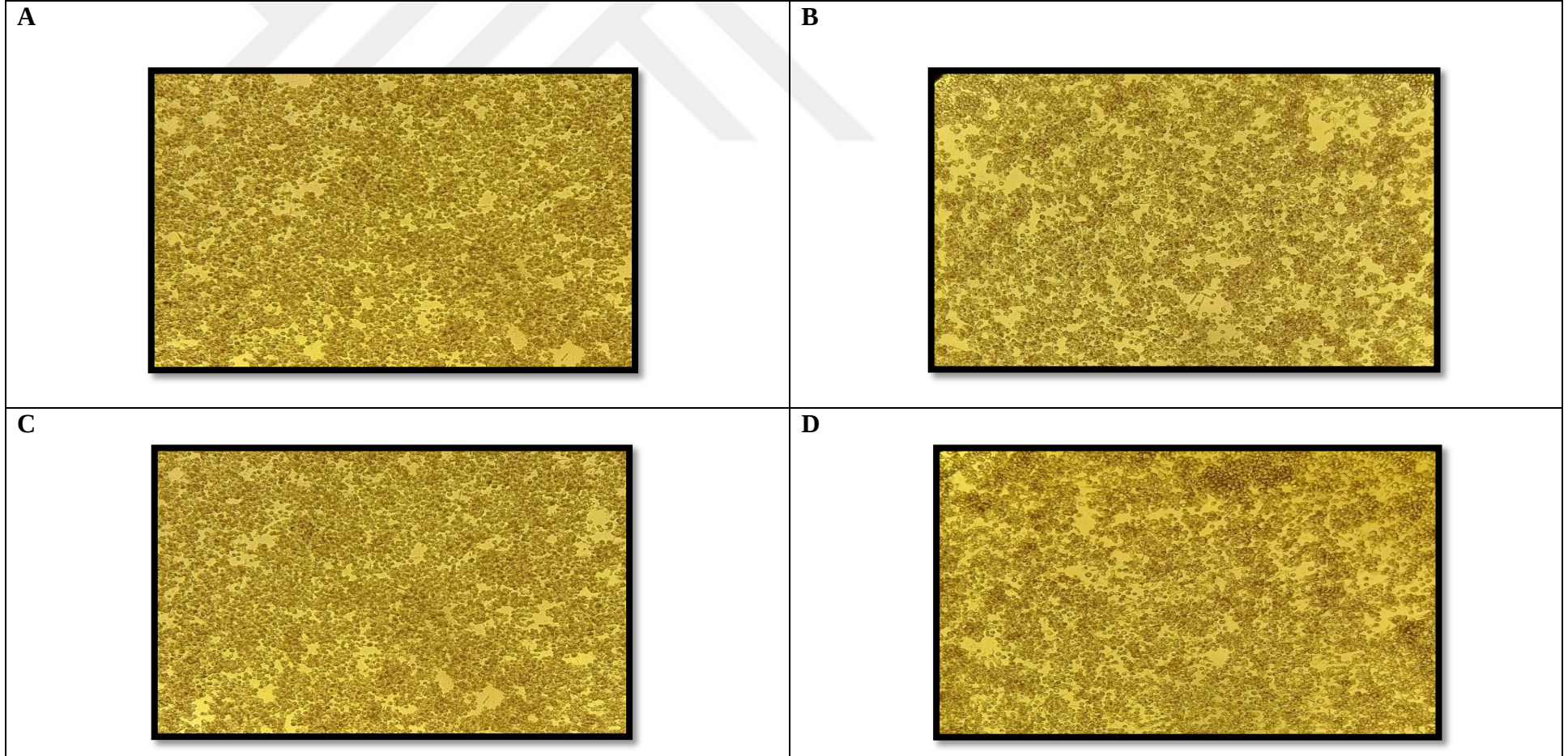
Şekil 4.25. 24.saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri

Tablo 4.22. 24 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Apoptotik+Nekrotik Oran	Viabilite Oranı
Kontrol Grubu (Sağlıklı RPE Hücreler)	%6,33	%93,67
100µmol/L Resveratrol (Tedavi Deney Grubu)	%6,40	%93,60
1mM/L Nikotinamid (Tedavi Deney Grubu)	%7	%93
Kombine Doz (Tedavi Deney Grubu) 100 µmol/L Resveratrol + 1 mM/L Nikotinamid)	%6,11	%93,89

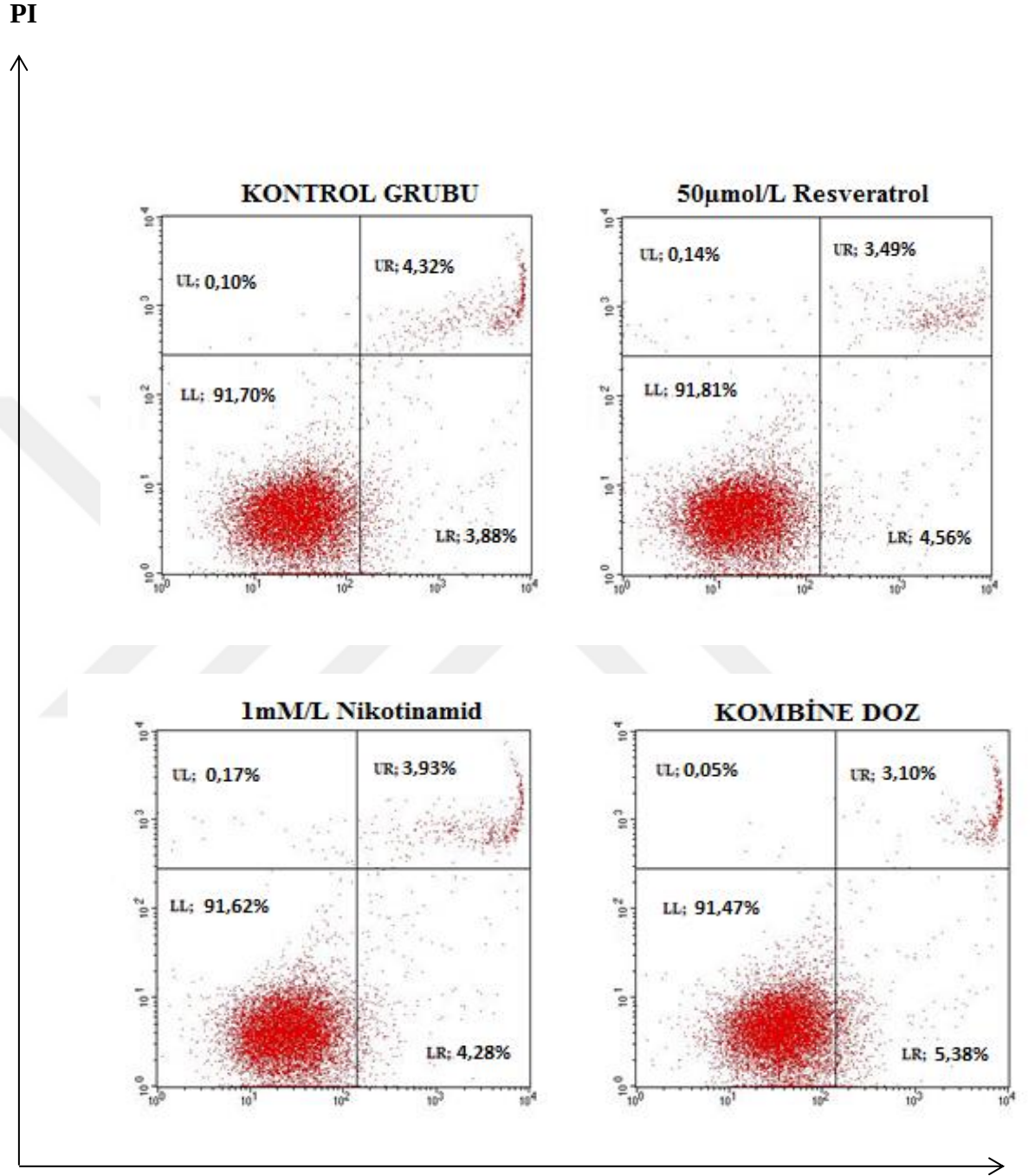


Şekil 4.26a. 24 Saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi. 1. Sağlıklı RPE Kontrol Grubu, 2. 100 µmol/L Resveratrol, 3.Kombine doz, 4. 1 mM/L Nikotinamid



Şekil 4.26b. Apoptoz analizi için 24 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü
A. Sağlıklı RPE Kontrol Grubu, B. 100μmol/L Resveratrol, C. 1mM/L Nikotinamid, D. Kombine Doz

4.7.2. 48. saat inkübasyon süresinin apoptoz sonuçları



ANNEXİN V

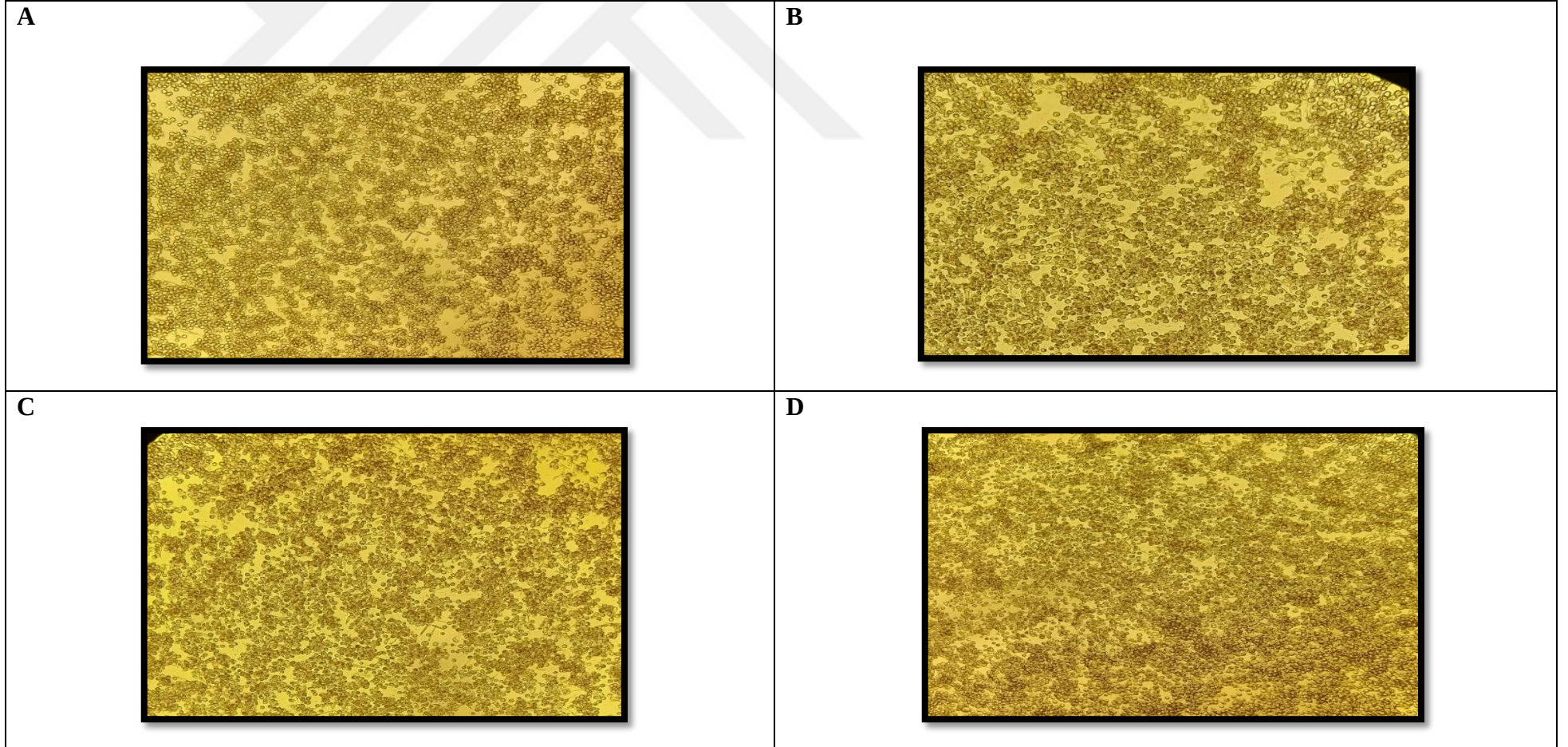
Şekil 4.27. 48. saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri

Tablo 4.23. 48 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Apoptotik+Nekrotik Oran	Viabilite Oranı
Kontrol Grubu (Sağlıklı RPE Hücreler)	%8,30	%91,70
50µmol/L Resveratrol (Tedavi Deney Grubu)	%8,19	%91,81
1mM/L Nikotinamid (Tedavi Deney Grubu)	%8,38	%91,62
Kombine Doz (Tedavi Deney Grubu) 50 µmol/L Resveratrol + 1 mM/L Nikotinamid)	%8,53	%91,47

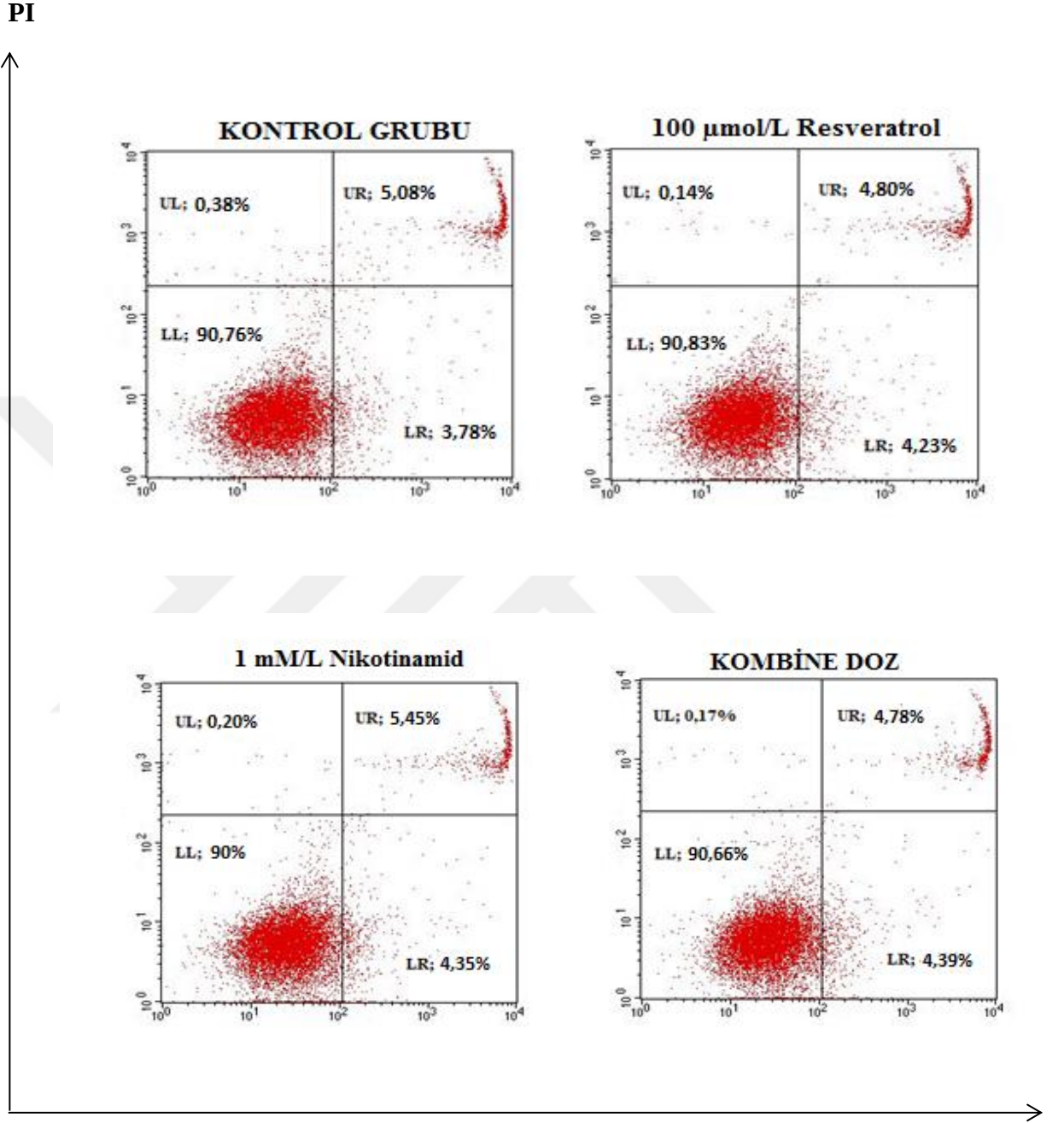


Şekil 4.28a. 48 Saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi. 1. Sağlıklı RPE Kontrol Grubu, 2. 100 µmol/L Resveratrol, 3. Kombine doz, 4. 1 mM/L Nikotinamid



Şekil 4.28b. Apoptoz analizi için 48 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü
A. Sağlıklı RPE Kontrol Grubu, B. 50µmol/L Resveratrol, C. 1mM/L Nikotinamid, D. Kombine Doz.

4.7.3. 72. saat inkübasyon süresinin apoptoz analiz sonuçları



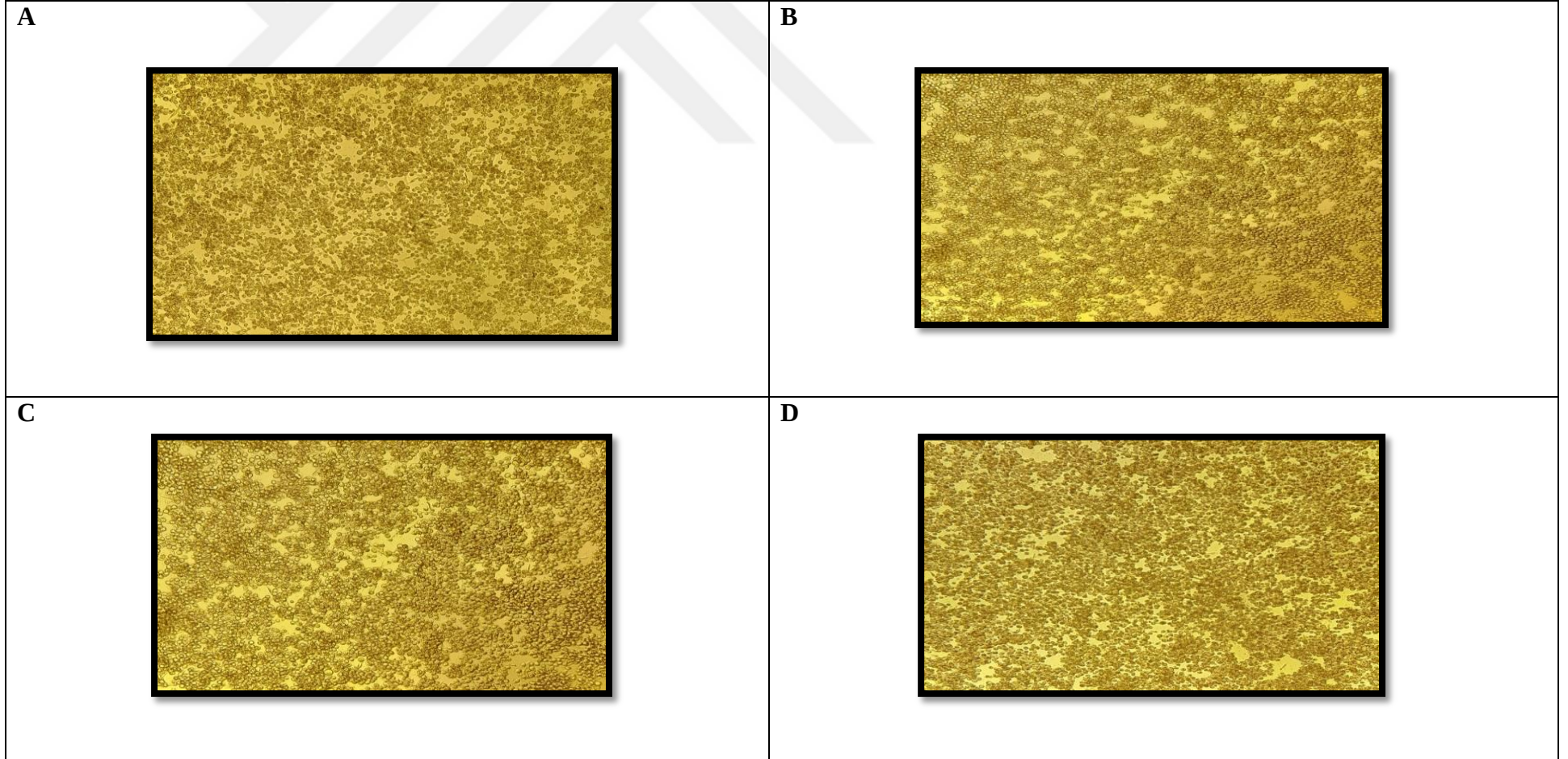
Şekil 4.29. 72. saat inkübasyon süresinde ölçülen flow sitometri görüntüleri

Tablo 4.24. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için yüzde apoptotik+nekrotik ve yüzde viabilite oranları

Kontrol ve Tedavi Deney Grupları	Apoptotik+Nekrotik Oran	Viabilite Oranı
Kontrol Grubu (Sağlıklı RPE Hücreler)	%9,24	%90,76
100µmol/L Resveratrol (Tedavi Deney Grubu)	%9,17	%90,83
1mM/L Nikotinamid (Tedavi Deney Grubu)	%10	%90
Kombine Doz (Tedavi Deney Grubu) 100 µmol/L Resveratrol + 1 mM/L Nikotinamid)	%9,34	%90,66



Şekil 4.30a. 72 Saat inkübasyon süresi sonunda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarındaki hücre medyum değişimi. 1. Sağlıklı RPE kontrol grubu, 2. 100 µmol/L Resveratrol, 3.Kombine doz, 4. 1 mM/L Nikotinamid



Şekil 4.30b. Apoptoz analizi için 72 saat inkübasyon sonrası TE ile muamele edilen hücrelerin 12 kuyucuklu hücre plakalarındaki 10X invert mikroskop görüntüsü
A. Sağlıklı RPE Kontrol Grubu, B. 100μmol/L Resveratrol, C. 1mM/L Nikotinamid, D. Kombine Doz

4.8. Kitlerden Alınan Sonuçların Değerlendirilmesi

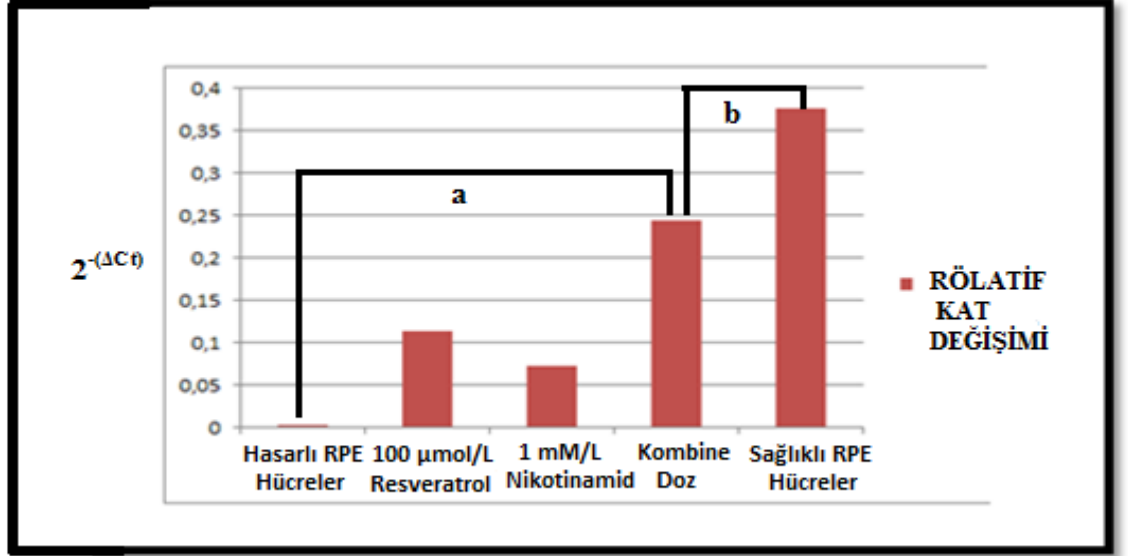
Kombine doz konsantrasyonu kontrol grubuna kıyasla en yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değeri ve en düşük apoptoz+nekroz değeri 72. saat inkübasyon süresinde elde edildiğinden, *SIRT1* geninin mRNA ifade düzeyine olan etkisini araştırmak için deney seti olarak 72. saat inkübasyon süresi, 100 µmol/L resveratrol, 1mM/L nikotinamid ve bu etken madde konsantrasyonlarının kombine uygulaması RT-qPCR metodu için seçilmiştir.

4.9. *SIRT1* Gen ifade Düzeyinin Kantitatif Değerlendirilmesi

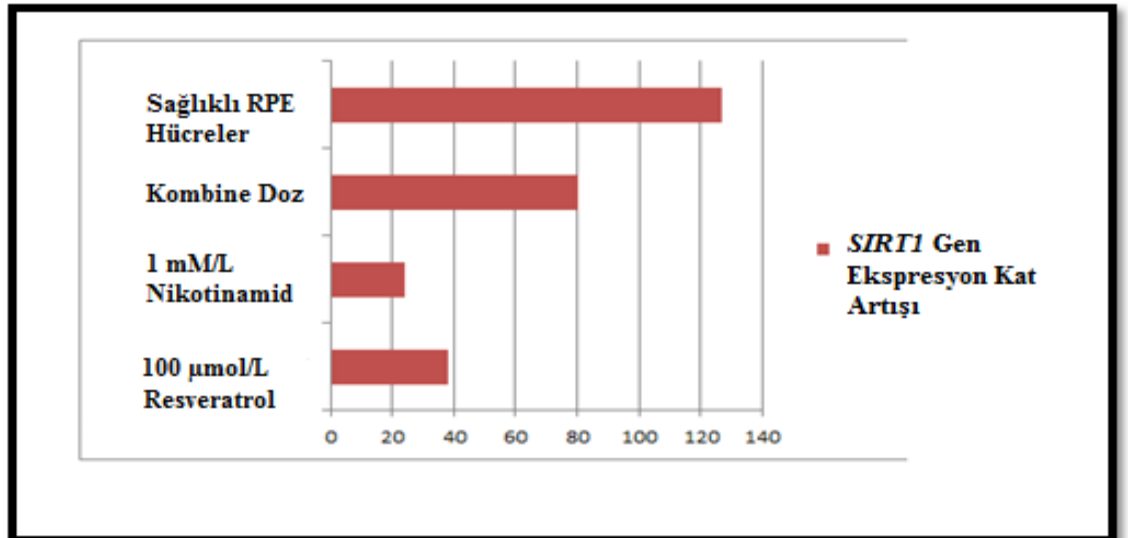
Resveratrol ve nikotinamid'in hücre proliferasyonu ve apoptoz analizlerinden alınan en etkili doz miktarları ve birlikte uygulanarak oluşan kombine dozun birçok oküler hastalığın patogeneğinde rol oynayan *SIRT1* genindeki mRNA ifade düzeylerine olan etkisinin belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR (RT-qPCR) yöntemi kullanıldı. Oksidatif stres protokolü sonrası 72 saat inkübasyon süresinde uygulanan 100 µmol/L resveratrol, 1mM/L nikotinamid ve bu iki etken madde konsantrasyonlarının kombine uygulaması, kontrol grubu olarak; hem sağlıklı ve hem de oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için *SIRT1* gen ifadesinde meydana gelen değişimler kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) metodu ile belirlendi ve sonuçların istatistiksel değerlendirilmeleri yapıldı. Tüm veriler GAPDH mRNA ifade düzeyi ile normalize edildi. Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı hücreler ile tedavi deney grupları ve sağlıklı RPE hücreler arasındaki hedef gen ekspresyon kat değişimi $2^{-(\Delta Ct)}$ hesaplamasıyla yapıldı (Şekil 4.31). Buna göre; oksidatif stres protokolü sonrası 72 saat inkübasyona bırakılan hasarlı RPE hücrelerine göre sağlıklı RPE hücrelerinde *SIRT1* geni için 127 kat ekspresyon seviyesinde artış hesaplandı. *SIRT1* geni için hasarlı RPE hücrelerine kıyasla 100 µmol/L resveratrol uygulamasında 38 kat artış, 1mM/L nikotinamid uygulamasında 24 kat artış hesaplandı. Ayrıca bu iki etken madde konsantrasyonunun kombine uygulaması ise 80 kat *SIRT1* gen ekspresyonunu arttırdığı tespit edildi (Şekil 4.32).

İstatistiksel analizler ΔCt değerlerine göre yapıldı. İstatistiksel analiz sonucu test normalitesi normal dağılım olarak ölçüldü. One way anova analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı fark görüldü. ($p < 0,001$). Sağlıklı RPE hücrelerinin ortalama ΔCt değeri $1,41 \pm 0,44$, hasarlı RPE hücrelerinin ortalama ΔCt değeri

8,51±0,23, resveratrol uygulaması için ortalama ΔCT değeri 3,14±0,11, nikotinamid uygulaması için ortalama ΔCT değeri 3,80±0,75, kombine doz uygulaması için ortalama ΔCT değeri 2,04±0,68 ($p<0,001$). Post Hoc/ Tukey HSD testine göre; kombine doz uygulanan hasarlı RPE hücreler ile sağlıklı RPE hücreler arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p= 0,32$). Post Hoc/ Tukey HSD testine göre gruplar arası p değerleri Tablo 4.25’de verilmektedir.



Şekil 4.31. *SIRT1* geni için 72 saat inkübasyon sonrası rölatif kat değişimi (a; $p<0,001$, b; $p= 0,32$)



Şekil 4.32. *SIRT1* geni için 72 saat inkübasyon sonrası oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücelere kıyasla gen ekspresyon kat artışı

	GRUPLAR		p değeri
Post Hoc/ Tukey HSD	Sağlıklı RPE Hücreler	Hasarlı RPE Hücreler RES NİK KOM	p<0,001 p=0,002 p<0,001 p=0,32
	Hasarlı RPE Hücreler	Sağlıklı RPE Hücreler RES NİK KOM	p<0,001 p<0,001 p<0,001 p<0,001
	RES	Sağlıklı RPE Hücreler Hasarlı RPE Hücreler NİK KOM	p=0,002 p<0,001 p=0,29 p=0,037
	NİK	Sağlıklı RPE Hücreler Hasarlı RPE Hücreler RES KOM	p<0,001 p<0,001 p=0,29 p=0,002
	KOM	Sağlıklı RPE Hücreler Hasarlı RPE Hücreler RES NİK	p=0,32 p<0,001 p=0,037 p=0,002

Tablo 4.25. 72 saat inkübasyon süresinin değerlendirilmesinde her bir grup için ΔCT değerlerinin Post Hoc/Tukey HSD testine göre elde edilen p değerleri, RES; 100 μmol/L Resveratrol, NİK; 1 mM/L Nikotinamid, KOM; 100 μmol/ Resveratrol +1 mM/L Nikotinamid kombine doz uygulaması

5. TARTIŞMA

Yaşla bağı makula dejenerasyonu, acil tedavi yöntemine ihtiyacı olan yaygın ve geri dönüşü olmayan dejeneratif bir hastalıktır. Bu hastalıktaki eksikliğin temeli doğrudan veya dolaylı olarak iki ana kaynağa indirgenebilir; fizyolojik yaşla bağı depo NAD⁺ seviyelerinin tükenmesi ve mitokondriyal disfonksiyon (Cimaglia vd., 2020). Dejeneratif retinal bir hastalık olan kuru tip yaşla bağı makula dejenerasyonu için yeni terapötik seçenek olarak, in vitro retinal dejenerasyon modelindeki potansiyel etkilerini analiz etmek için anti-inflamatuar, anti-aging ve antioksidan özellikte oldukları bilinen nikotinamid ve resveratrol (Abu-Amero vd., 2016; Bola vd., 2014, Saini vd.,2017; Hazim vd., 2019) tez projemizde kullanılmak üzere etken maddeler olarak seçildi.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele, in vitro oksidatif stres duyarlılığını ve in vivo oksidatif hasarı test etmek için en yaygın kullanılan modellerden biridir. Bununla birlikte, hücre çoğalması, hücre göçü, hayatta kalma ve farklılaşmasından hücre ölümüne kadar H₂O₂'nin etkisi doza bağımlıdır ve değişkenlik gösterir. H₂O₂ konsantrasyonunu stabil halde koruyan glikoz oksidaza (GOx) maruz bırakma ise alternatif olarak kullanılmaktadır. Daha önce yapılan iki önemli çalışmada araştırmacılar, ARPE-19 hücrelerinde H₂O₂ üretiminin sürekli sağlanabilmesi ve bu durumun ROS üretimine neden olması için, bu hücreleri glukoz oksidaz (GOx) ile muamele ederek bir oksidatif stres durumu oluşturmuşlardır. Bu çalışmalardan, Iloki-Assanga ve arkadaşlarının (Iloki-Assanga vd., 2015) RPE hücrelerinde 24 saat boyunca 25 mU / mL GOx (Sigma, Aspergillus niger) ile muamelesi sonucu % 50'den daha az bir sitotoksik etkiye yol açan hücre viabilitesine paralel olarak, Maugeri ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada (Maugeri vd., 2018), hücre canlılığının % 35.8 azaldığını göstermişlerdir. Kim ve arkadaşları araştırmalarında, 300µM konsantrasyondaki H₂O₂ 'nin RPE hücrelerindeki apoptotik etkisinin kontrole kıyasla %10,42 oranında arttığını, ayrıca Zhu ve arkadaşları araştırmalarında 24 saat boyunca 300 µM/L H₂O₂ ile muamele edilen RPE hücre canlılığının, kontrol hücrelerine kıyasla % 40 oranında azaldığını, Bai ve arkadaşları araştırmalarında 24 saat boyunca 300 µM/L H₂O₂ ile muamele edilen RPE hücre canlılığının, kontrol hücrelerine kıyasla yaklaşık %50 oranında azaldığını tespit etmişlerdir (Kim vd., 2015; Zhu vd., 2016; Bai vd., 2021). Daha önce yapılan bir çalışmada araştırmacılar, RPE hücrelerinde oksidatif stres kaynağı olarak UVA

radasyon ile indüklenmiş hücre hasarını oluşturmayı amaçlamışlardır. RPE hücrelerin, steril bir kabinde, UVA lambaları vasıtasıyla 355 ila 375 nm arasında 80 dakika ultraviyole ışınlarına maruz bırakılmasıyla hücre viabilite oranının yaklaşık olarak %50 oranında azaldığı görülmüştür (Chan vd., 2015). Bizim çalışmamızda , sağlıklı Retinal Pigment Epitelyal Hücre Hattında kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşturmak için uygulanan standart seviyede oksidatif stres protokolü sonucunda sağlıklı RPE hücrelerinde %38,43 oranında hücre viabilite kaybı elde edildi.

Projedeki amacımız, kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşumu sağlandıktan sonra, oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde, nikotinamid ve resveratrol kombinasyonunun aditif veya sinerjik etki göstererek, oksidatif stresin sebep olduğu mitokondriyal disfonksiyona etkisi ve etkili dozlarının araştırılmasıdır. RPE hücrelerinde yaşla birlikte artan oksidatif stres ve buna bağlı olarak azaldığı bilinen NAD^+ seviyesinin yükseltilmesi amacıyla, NAD^+ sentezinde rol oynayan ana öncüllerden biri olan nikotinamid (Johnson ve Imai, 2018) etken madde olarak kullanıldı. Nikotinamid'in yüksek dozda ve yeterli inkübasyon süresinin uygulanmasıyla *SIRT1* geninde oluşturabileceği inhibitör etkinin ortadan kalktığı ve sonuç olarak NAD^+ sentezinin arttığı doz aralığı ve inkübasyon süresi araştırıldı. NAD^+ seviyesini arttıran doz aralığı ve inkübasyon süresi, NAD^+ bağımlı bir histon deasetilaz (Zhou vd., 2018) ve mitokondriyal yeniden programlanmanın temel düzenleyicilerinden biri olan *SIRT1* geninin (Williams vd., 2017) deasetilasyon reaktivitesi için bir kofaktör olarak ihtiyaç duyduğu NAD^+ anabolizmasını teşvik ettiği (Karbaforooshana, ve Karimia, 2018) ve nikotinamid uygulamasının *SIRT1* aktivitesi üzerinde uyarıcı bir etki yaptığı görüldü. Ayrıca literatür taraması sonucunda son yıllarda yapılan çalışmalarda *SIRT1* geninin aktivatörü olarak işlev gördüğü gözlemlenen resveratrol'un (Wei vd., 2014; Jiang vd., 2019) ilgili gen için aktivatör olarak kullanılması amaçlanmıştır. Resveratrol'un ilgili gen için aktivatör olarak kullanılmasının, nikotinamid ile birlikte uygulamalarda her iki molekülün ayrı ayrı kullanımına kıyasla daha fazla antioksidan ve antiapoptotik etkiye neden olabileceği hipotezi ortaya çıkarılmıştır.

Literatür taraması sonucunda yaşa bağlı oküler hastalıkların tedavisinde resveratrol ve nikotinamid'in antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliklerinden dolayı potansiyel etken maddeler olabileceği düşünülerek son yıllarda

önemli araştırmalar mevcuttur. Resveratrolün, bu araştırmalarda diyabetik retinopati (Hua vd., 2011; Li vd., 2012), glokom (Luna vd., 2009), katarakt (Zheng vd., 2010; Chen vd., 2021), yaş tip YBMD’de (Khan vd., 2010; Nagineni vd., 2014) etkinliği gösterilmiştir. Fakat RPE hücre kültüründe oksidatif hasar modelindeki protektif etkinliğinin teyit edilmesi literatürdeki sadece birkaç çalışmada vurgulanmıştır (Pintea vd., 2011; Chan vd., 2015). Nikotinamid’in ise özellikle glokom modellerinde etkinliği gösterilmiştir (Williams vd., 2017; Hui vd., 2020; Zhang vd., 2021). Fakat yaşa bağlı retinal hastalıklar içerisinde görölen vakaların birçoğunu oluşturan kuru tip YBMD için sınırlı sayıda araştırma mevcuttur (Saini vd., 2017; Yang vd., 2019). Özellikle kapsamlı literatür taraması sonucunda bu iki etken maddenin RPE hücrelerinde aditif veya sinerjik etkisini araştıran herhangi bir çalışmanın olmadığı görölmüştür.

Literatürde yapılan hayvan çalışmalarının resveratrol’ün ve nikotinamid’in etkinliği ile ilgili pozitif sonuçlar vermiş olmakla birlikte insandaki tahmini dozların uygulanmasında etkinliğin ve güvenilirliğin kesin kanıtları bulunamamıştır. Yani literatür taraması sonucu insanda güvenlik kaygıları olmadan bu iki etken maddenin etkisini en üst düzeye çıkarmak için gereken spesifik doz ve hastalığın progresyonunu azaltacak etkili doz tartışmalıdır ve henüz tam olarak bilinmemektedir. Literatürde bu konuda daha birçok araştırmanın yapılması gerektiği belirtilmektedir (Abu-Amero vd., 2016; Pietris, 2022; Bryl vd.,2022).

Hayvan modelinde yapılan çalışmalar, yüksek dozda resveratrol uygulaması üzerinde belirgin bir olumsuz etki olmadığını göstermektedir. Ancak insanlarda yapılan çalışmalar nispeten azdır. Hayvan alışmaları farmakolojik araştırmaların çok önemli bir parçası olsa da, resveratrol’ün hayvanlar üzerinden gözlemlenen genel etkileri, insanlar üzerindeki etkilerinden büyük ölçüde farklı olabilir. Resveratrol’ün önerildiği kadar faydalı olup olmadığı konusunda bilinçli bir sonuca varmak için resveratrol’ün düzenlediği ileri sürölen birçok mekanizmanın doğrulanması adına insan çalışmaları gereklidir. Ayrıca hayvanlarda etkili olan resveratrol konsantrasyonları insanlarda değişebilir. Resveratrol’ün çok çeşitli farmakolojik aktiviteleri belgelenmesine rağmen aynı ilacın farklı hücre tiplerinde ve hatta farklı hastalıklarda nasıl farklı veya ters etkilere neden olduğu halen açık değildir. Örneğin resveratrol tümör hücrelerinde hücre ölüme ne den olurken, sinir hücrelerinde antiapoptotik veya koruyucu bir ajan olarak etkilidir. Benzer şekilde resveratrol kas

hücrelerinde mitokondriyal canlılığı arttırırken, tümör hücrelerinde mitokondri aracılı apoptozu indüklediği görülmüştür (Bola vd., 2014; Abu-Amero vd., 2016). ARPE-19 hücrelerini 48 saat inkübasyon süresinde 100 uM resveratrol ile muamelesi sonucunda toksisite etki göstermediğini bildiren birkaç çalışma mevcuttur (Ishikawa vd., 2015; Hao vd., 2016; Subramani vd., 2017). Bizim çalışmamızda 100 µmol/L resveratrol'ün oksidatif strese maruz bırakılmış kontrol grubuna kıyasla üç inkübasyon süresinde de hücre proliferasyon ve hücre viabilite oranını arttırdığı ve hücre apoptoz+nekroz oranını azalttığı görüldü. Ayrıca bu dozun aynı parametrelerde yapılan analiz sonuçlarına göre, sağlıklı RPE hücre kontrol grubuna kıyasla sitotoksik etki göstermediği belirlendi.

Farmakolojik kullanımda yüksek doz resveratrol kullanılması hala belirsizdir. Düşük dozlarda resveratrol takviyesinin etkilerini değerlendirilmesi ise zordur. Çünkü niceliksel etkilerin ortaya çıkması için uzun vadeli çalışmalar gereklidir. Güvenlik kaygıları olmadan resveratrol'ün etkisini en üst düzeye çıkarmak için gereken spesifik resveratrol dozu henüz bilinmemektedir. Çalışmalarda resveratrol'ün yararlı etkilerini en iyi gösterdiği ve deneğin güvenli olduğu konsantrasyon aralığının belirlenmesi esastır (Abu-Amero vd., 2016). Bizim çalışmamızda 150 µmol/L resveratrol sağlıklı RPE hücrelerinde inkübasyon süresine bağlı olarak hücre proliferasyon ve hücre viabilite oranını azalttığı görüldü ve 72.saat inkübasyon süresinde resveratrol için IC50 değeri 161,90 µmol/L olarak ölçüldü.

Literatürdeki çoğu çalışma, NAD⁺ öncüleri olan nikotinamid, nikotinamid ribozid, nikotinamid mononükleotid ve daha az ölçüde NAD⁺ ve NADH'nin kronik oksidatif stres birikimi, iltihaplanma ve bozulmuş mitokondriyal fonksiyonla ilişkili yaşa bağlı çeşitli bozukluklarda olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Bu bileşikler, sınırlı bir akut toksisite profili sunsa da, kanıtlar hala oldukça sınırlıdır ve uzun vadeli insan klinik deneyleri, mevcut literatürde hala başlangıç aşamasındadır (Braidı ve Liu, 2020). Yaygın görülen yaşa bağlı oküler hastalıkların tedavisi için önerilen nikotinamid'in faydalı etkilere sahip olabileceği daha çok hayvan çalışmalarında gösterilmiş olup, güvenlik sınırlarını belirlemek için insan çalışmaları gereklidir. Literatürde nikotinamid için özellikle günde 3 gram veya altında kullanıldığında (Williams vd, 2017), iyi bir güvenlik profiline sahip olduğu belirtilmesine rağmen, insan çalışmaları optimum güvenlik sınırını tanımlamak için önerilmektedir (Pientris 2021). Nikotinamid'in yan etkilerine ilişkin raporlar

oldukça azdır ve çoğunlukla çok yüksek dozların kullanıldığı vakalarla sınırlıdır (Song vd., 2019). Hem sağlıklı RPE hücreleri için optimum güvenlik sınırı hakkında bilgi sağlamak hem de oksidatif strese bağlı hasarı ortadan kaldıracak etki dozunun belirlenmesi adına proje konusu literatüre önemli ölçüde katkı sağlayacaktır. Bizim çalışmamızda 5mM/L ve 10 mM/L nikotinamid uygulaması sağlıklı RPE hücrelerinde hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeksinde önemli ölçüde azalma meydana getirdi ve 72.saat inkübasyon süresinde nikotinamid için IC50 değeri 6,59 mM/L olarak belirlendi.

Mevcut literatür ışığında insanda güvenlik kaygıları olmadan resveratrol ve nikotinamid'in etkisini en üst düzeye çıkarmak için uygulanması gereken spesifik doz ve hastalığın progresyonunu azaltacak etkili doz tartışmalıdır ve henüz tam olarak bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda 50 µmol/L resveratrol, 100 µmol/L resveratrol ve 1 mM/L nikotinamid etken maddeleri ve buna bağlı kombine doz uygulamaları, hücre viabilite, hücre proliferasyon indeksi ve hücre apoptoz+nekroz oranında kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerine kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiş olup, bu doz aralıkları sağlıklı RPE hücrelerinde sitotoksik etki göstermemiştir.

Yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklarla ilgili her iki etken maddenin etkinliğini araştıran çalışmalar mevcuttur. Fakat kuru tip YBMD modeli için çalışmaların sınırlı olduğu, ve bu sınırlı çalışmalardan elde edilen sonuçlarla ilgili etkinliklerin ileri çalışmalarla, özellikle insan RPE hücrelerinde doğrulanması gerektiği vurgulanmaktadır. Ayrıca nikotinamid'in *SIRT1* geni üzerindeki inhibitör etkisi ile ilgili çalışmalar olduğu (Wei vd., 2014; Zhou vd., 2018, Jiang vd., 2019), ancak özellikle son birkaç yılda ilgili etken maddenin *SIRT1* geni üzerinde uyarıcı etki gösterebileceği belirtilerek (Li vd., 2015; Hwang ve Song 2017), ilgili çalışmaların çok sınırlı olduğu görülmektedir. *SIRT1* geni üzerinde resveratrol'ün aktivatör etkisi bilindiğinden (Wei vd.,2017; Jaing vd., 2019) araştırmamızda her iki etken maddenin kuru tip YBMD modeli oluşturularak *SIRT1* geni üzerinde antagonistik etki göstermediği aksine etkili kombine dozun sinerjik etki göstererek, kombine uygulamaların resveratrol ve nikotinamidin tek tek kullanımına göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Kombine uygulamalar kontrol grubuna kıyasla en yüksek hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değeri ile en düşük apoptoz+nekroz değeri 72 saatlik inkübasyon süresinde elde edildiğinden, *SIRT1* geninin mRNA

ifade düzeyine olan etkisini araştırmak için deney seti olarak 72 saat inkübasyon süresi, 100 µmol/l resveratrol, 1mM/l nikotinamid ve bu etken madde konsantrasyonlarının kombine uygulaması şeklinde RT-qPCR metodu için seçilmiştir. İstatistiksel analizlere göre hasarlı RPE kontrol grubuna kıyasla resveratrol ve nikotinamidin özellikle kombine doz uygulamasında daha belirgin olmak üzere *SIRT1* gen ekspresyon düzeyini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür ($p<0,001$).

Daha önceden yapılan çalışmalar, NAD^+ seviyesinin yükseltilmesini amaçlayan terapilerle yaşa bağlı dejeneratif süreçlerin önlenebileceğini veya en azından progresyonunu azaltılabileceğini ileri sürmektedir. Son yıllarda yapılan önemli bir araştırmadaki sonuçlar, NAD^+ 'nın RPE sağlığı için önemini ve hücre tipinde NAD^+ oluşumunu artıran tedavilerin yaşlanmayı sınırlaması ve RPE canlılığını koruma açasından olumlu potansiyel etkisini doğrulamıştır (Jadeja vd., 2018). Mitokondriyal fonksiyonun desteklenmesi ve hücresel homeostazı eski haline getirmek için etkili bir yaklaşım olarak NAD^+ doğgunluğu, nörodejeneratif hastalıkların progresyonunu inhibe etmek için umut verici bir strateji olabilir (Cimaglia vd., 2020). Bizim çalışmamızda 1mM/L nikotinamid uygulaması kontrol grubu olan hasarlı RPE hücrelerine kıyasla inkübasyon süresine bağlı olarak hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerinde artışa neden oldu. Ayrıca hasarlı RPE kontrol grubuna kıyasla her üç inkübasyon süresi için apoptoz+nekroz oranında azalma sağladı.

Çoğu memeli hücresinde nikotinamid, hücresel fonksiyon ve enerji metabolizması için gerekli olan NAD^+ 'nın ana kaynağıdır (Yanez vd., 2019). NAD^+ öncülleri kıyaslandığında NAD^+ seviyesinin hızla yükselmesinin, nikotinamid ribozide kıyasla nikotinamid'de daha hızlı meydana geldiği görülmüştür. Bu durum aynı zamanda nikotinamid'in *SIRT1* geninin inhibitörü olma endişesini de giderebilir. Nikotinamid, sirtuin reaksiyonlarına geri bildirim inhibisyonu uygular. Bu sebeple, nikotinamid ribozid'in ve nikotinamid mononükleotid'in *SIRT1* inhibitör etkisinin olmaması nikotinamid'den daha üstün olduğunun inanılmasının nedenlerinden biridir. Ancak nikotinamid'in geçici varlığı göz önüne alındığında, *SIRT1*'in aktivitesinin engellemesi muhtemelen bir endişe konusu değildir. Bu inhibe edici etki, yalnızca *SIRT1*, nikotinamid uygulaması anında aktif olarak çalışırken etkili olacaktır. Öte yandan aktif *PARP*'lara karşı nikotinamid'in geçici olarak bile

işlev görmesi NAD^+ 'nın yıkıcı tükenmesini veya proinflatuar sitokinlerin üretimini önlemede etkili olabilir. Nikotinamid ribozid ve nikotinamid mononükleotid *PARP* inhibisyonunun bu etkisinden yoksundur. Özellikle nikotinamid diğer iki öncüle göre daha geniş hastalık gruplarının modülasyonunda daha üstün etkiler göstermektedir. NAD^+ hücre seviyesi, nikotinamid uygulanmasından sonra arttığı için inhibisyondan ziyade *SIRT1* aktivasyonunun nikotinamid aracılı nöral korumaya katkıda bulunması beklenir. Nikotinamid hücrelere uygulandığında, hızlı bir şekilde NAD^+ 'ya dönüşür. Bu nedenle nikotinamidin hücresel konsantrasyonu hızla azalırken, NAD^+ 'nın hücresel konsantrasyonu hızla artar. Sonuçta sınırlı bir süre için *SIRT1* inhibisyonunun ardından, *SIRT1* aktivitesinde artış olması beklenir. Yüksek doz nikotinamid ile tedavi edilen hücrelerde, bu durum desteklenmiştir. Yüksek doz nikotinamid uygulamasının inhibe edici bir etkisinin olmaması, nikotinamidin NAD^+ 'ya hızlı dönüşümü nedeniyle olabilmektedir. Hem hayvan hem de kültür hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, nikotinamid uygulamasıyla NAD^+ 'nın hücresel seviyelerinde ani bir artış olduğu bulunmuştur. Nikotinamid'in yaşlanmayla ilgili birçok hastalığa pozitif etki etmesi mantıken beklenmektedir ve sirtuin aktivite faaliyetlerinin dahil olduğu ve bu koşulların tehlikede olduğu durumlarda nikotinamid'in pozitif etkili olduğu düşünülmektedir (Hwang ve Song, 2017; Song vd., 2019). Literatürdeki birkaç çalışmada nikotinamid tedavisinin *SIRT1* aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda nikotinamid uygulamasının hücrelerde *SIRT1* genini uyaran koşulları oluşturabildiği, bu durumda Nikotinamid tedavisinin varsayımsal olarak *SIRT1* için uyarıcı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmalardan örnek verecek olursak, insan fibroblastlarında 24 saat içinde 5 mM nikotinamid tedavisi sonucu, NAD^+ seviyesi neredeyse iki kat artarken, *SIRT1* aktivitesinde de artış meydana gelmiştir. Diğer bir çalışmada fare hepatositlerinde 5mM nikotinamid ile tedavi NAD^+ düzeylerini 8 saat içerisinde %40 arttırarak, hepatositlerde *SIRT1* ekspresyonunu 2,5 kattan daha fazla arttırdığı ve sonuçta doza bağlı olarak, *SIRT1* aktivitesinin hem mRNA hem de protein düzeyinde arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak 1 mM'a yakın veya daha yüksek dozda nikotinamid tedavisinin *SIRT1* geni için uyarıcı olabileceği düşünülmektedir (Jang vd., 2012; Li vd., 2015; Hwang ve Song, 2017). Özellikle bu sınırlı sayıdaki çalışmalarda nikotinamid'in *SIRT1* geni üzerindeki inhibe edici etkisinin ortadan kalkması için önerdikleri doz göz önüne alınarak, nikotinamid konsantrasyonunun

1 mM/L, 5 mM/L ve 10 mM/L olarak projemizde kullanılması planlandı. Ayrıca literatür taraması sonucu *SIRT1* geni için aktivatör olarak kullanılan resveratrol konsantrasyonları 50 µmol/L, 100 µmol/L, 150 µmol/L olarak belirlendi. Bizim çalışmamızda 72 saat inkübasyon süresi sonunda kontrol grubu olan hasarlı RPE hücrelerine kıyasla *SIRT1* ekspresyonunu 1mM/L nikotinamid uygulamasında 24 kat arttırdığı ve 100 µmol/L resveratrol uygulamasında 38 kat arttırdığı hesaplandı ve ayrıca bu iki etken madde konsantrasyonunun kombine dozu ise 80 kat *SIRT1* gen ekspresyonunu arttırdığı tespit edildi.

Doktora tez araştırmamızda; inflamasyon, yaşlanma, oksidatif stres gibi fizyolojik ve patolojik süreçleri etkileyerek oküler hastalıklarda önemli bir rol oynadığı bilinen *SIRT1* geni için, oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde düşen ilgili gen ekspresyon seviyesini arttırmak amacıyla, resveratrol ve nikotinamid kombinasyonunun antioksidan, antiapoptotik ve proliferatif etkilerin oluşturulması hedeflenmiştir. Bu sayede kuru tip YBMD modelinde *SIRT1* gen ekspresyon seviyesini arttıran en etkili doz kombinasyonunun (100 µmol/L resveratrol+1 mM/L nikotinamid) oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinde hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeksini arttırdığı, RPE hücreleri için onarım düzeyinde hücre proliferasyonunu sağladığı, RPE hücrelerinde apoptoz+nekroz oranını azalttığı ve *SIRT1* geninin ekspresyon düzeyini arttırdığı gözlemlendi ve bu uygulamanın tedavi seçenekleri yetersiz olan bu hastalık için terapötik bir seçenek sunarak literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak doktora tez çalışmamız, bu iki etken madde kombinasyonunun kuru tip YBMD modelinde, hücre viabilite, hücre proliferasyonu ve hücre apoptoz+nekroz oranı ile birlikte *SIRT1* geninin mRNA ifade düzeyi üzerindeki sinerjik etkisini gösteren ilk çalışmadır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda retinal hastalıklar içerisinde tedavi seçenekleri yetersiz ve araştırma aşamasında olan kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon (YBMD) modeli oluşturulması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, sağlıklı retinal pigment epitelyal (RPE) hücrelerinde, kuru tip YBMD modelindeki patogeneze için birincil faktörlerden biri olarak karşımıza çıkan oksidatif stresin oluşturulması sağlandı. Bunun için RPE hücrelerinde antioksidan savunma sistemlerini devre dışı bırakıp, kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon progresyonunu başlatabilen ve progresyonun ilerlemesine neden olabilecek H_2O_2 miktarını literatür araştırması sonucunda belirleyerek, oksidatif stres protokolü oluşturuldu. Literatür taraması sonucunda kuru tip YBMD modeli için RPE hücre yoğunluğunun kontrole kıyasla %35-%40 arasında hücre viabilite oranının azalması orta (standart) progresyonlu, %50 ve daha fazla hücre viabilite oranının azalması ise yüksek (ileri) progresyonlu olarak değerlendirildi. Sağlıklı RPE hücrelerinde oluşturulmak istenen oksidatif stres, standart seviyede ($300\mu M H_2O_2$) gerçekleştirildi. Kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modeli oluşturmak için istenilen hücre viabilite kaybı oksidatif stres medyumunun %50'sinin $300 \mu M/L H_2O_2$ çözeltisi ve diğer %50'sinin serum içermeyen DMEM/F12, HEPES besiyeri olacak şekilde hazırlanması belirlenmiş olup, hücre viabilite kaybı kontrol grubuna kıyasla %38,43 olarak ölçüldü. Böylelikle tıpkı kuru tip YBMD'de olduğu gibi RPE hücrelerinde atrofiye neden olan apoptoz oranının artması ve hücre viabilitesinin azalması sağlanmış oldu. Daha sonra İnsan Retinal Pigment Epitelyal (RPE) Hücre Hattında bu iki etken madde ayrı ayrı olarak ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine dozu, sağlıklı ve oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine uygulandı. Bu doğrultuda iki deney grubunun sonuçları karşılaştırılarak bu iki etken maddenin apoptotik, sitotoksik ve hücre çoğalmasına etkileri ayrı ayrı ve birlikte incelenerek, bu iki etken madde için optimum güvenlik sınırını tanımlayan doz aralıkları ve oksidatif strese bağlı hasarı ortadan kaldıran etkili dozlar belirlendi. Son aşamada ise resveratrol ve nikotinamid'in hücre proliferasyonu ve apoptoz analizlerinden alınan en etkili inkübasyon süresindeki doz miktarları ve birlikte uygulanarak oluşan kombine dozun, birçok oküler hastalığın patogenezinde rol oynayan *SIRT1* genindeki mRNA ifade düzeylerine olan etkisi belirlendi.

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı deney grubunun hücre viabilite ve hücre proliferasyon deney uygulamalarındaki en etkili sonuçlar; serumsuz hücre kültür medyumunda içerisinde son konsantrasyonu 50 µmol/L, 100 µmol/L, 150 µmol/L olacak şekilde seyreltilen resveratrol çözeltileri içerisinde, 24 saat inkübasyon süresi için 100 µmol/L, 48 saat inkübasyon süresi için 50 µmol/L ve 72 saat inkübasyon süresi için 50 µmol/L ve 100 µmol/L konsantrasyonlarında elde edildi. Serumsuz hücre kültür medyumunda içerisinde son konsantrasyonu 1 mM/L, 5 mM/L, 10 mM/L olacak şekilde seyreltilen nikotinamid çözeltileri içerisinde ise tüm inkübasyon süreleri için en etkili sonuç 1 mM/L konsantrasyonda elde edildi.

Tüm etken madde seçenekleri ve her bir inkübasyon süresi için hasarlı RPE hücrelerinde etkili olan kombine doz seçenekleri, sağlıklı RPE hücrelerindeki sitotoksik etkisi incelendi. Buna göre; 50 µmol/L ve 100 µmol/L konsantrasyondaki resveratrol çözeltisi ve 1 mM/L konsantrasyondaki nikotinamid çözeltisi ve bu etken maddelerin kombine dozları kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerinin hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeksine göre kıyaslandığında etkili bir değişiklik oluşturmayarak sitotoksik etki göstermediği görüldü. İstatistiksel açıdan incelendiğinde ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

Resveratrol konsantrasyonu için incelenen dozlar arasında sağlıklı RPE hücrelerindeki hücre viabilite oranını ve hücre proliferasyon indeksini etkin bir şekilde azaltan ve ayrıca sitotoksik etki meydana getiren doz 150 µmol/L olarak belirlendi. Nikotinamid konsantrasyonu için ise sağlıklı RPE hücrelerindeki hücre viabilite oranını ve hücre proliferasyon indeksini etkin bir şekilde azaltan ve sitotoksik etki meydana getiren dozlar ise 5 mM/L ve 10 mM/L olarak belirlendi. Doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak kontrol grubu olan sağlıklı RPE hücrelerinde önemli oranda viabilite kaybı oluşturduğu için; 150 µmol/L konsantrasyonundaki resveratrol, 5 mM/L ve 10 mM/L konsantrasyonundaki nikotinamid etken maddeler analizlerdeki tüm deney gruplarından çıkarıldı. Son olarak bu etken maddelerin IC50 değerleri hesaplanarak optimum güvenlik sınırındaki doz miktarları belirlendi. Buna göre 72.saat inkübasyon süresinde resveratrol için IC50 değeri 161,90µmol/L nikotinamidin ise 6,59 mM/L olarak belirlendi. Sağlıklı RPE hücrelerinde önemli oranda viabilite kaybı oluşturduğu için; 150 µmol/L konsantrasyonundaki resveratrol, 5mM/L ve 10 mM/L konsantrasyonundaki nikotinamid etken maddeler analizlerdeki tüm deney gruplarından çıkarıldı.

En etkili hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerini veren etken maddelerin kombine dozları, oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerinin proliferasyonunu ve viabilitesini ayrı ayrı uygulamalarına göre kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde arttırdığı görüldü. İstatistiksel sonuçlara göre oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine resveratrol ve nikotinamid'in 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresinde ayrı ayrı uygulanması istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Ayrı ayrı etken maddelerin hasarlı RPE hücrelerine her bir inkübasyon süresinde en etkili hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerini veren etken madde seçeneklerinin kombine dozları kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. 24 saat inkübasyon süresinde 100 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol+1 mM/L nikotinamid kombine dozu kontrol grubuna kıyasla yüzde 71,98 oranında hücre viabilitesini arttırdığı görüldü ve istatistiksel açıdan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p=0,007$). 48 saat inkübasyon süresinde 50 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol +1 mM/L nikotinamid kombine dozu kontrol grubuna kıyasla yüzde 122,60 oranında hücre viabilitesini arttırdığı görüldü ve istatistiksel açıdan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p=0,001$). 72 saat inkübasyon süresinde kontrol grubuna kıyasla, 50 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol +1 mM/L nikotinamid kombine dozu yüzde %132,87, 100 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol +1 mM/L nikotinamid kombine dozu ise yüzde 153,82 oranında hücre viabilitesini arttırdığı görüldü ve istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,001$). Sonuç olarak hasarlı RPE hücrelerine en etkili etken madde konsantrasyonlarının kombine dozunun, etken maddelerin ayrı ayrı uygulamalarına kıyasla hücre viabilite ve hücre proliferasyon indeks değerlerinde daha yüksek artış meydana getirdiği ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü.

Oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücrelerine her bir inkübasyon süresi için uygulanan kombine dozların bu hücrelerdeki yara onarımına etkisi sağlıklı RPE hücrelerine kıyasla gözlemlendi. 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). 72. saat inkübasyon süresi için 100 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol +1 mM/L nikotinamid tedavisinin onarım düzeyinde yara iyileşmesi sağladığı görüldü ($p=0,01$).

Hücre viabilite ve hücre proliferasyon deneylerinden sonra her iki etken madde için belirlenen dozlar ve kombine doz tüm inkübasyon süreleri için oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı ve sağlıklı RPE hücreleri için apoptoz+nekroz oranları

kontrol grubuna kıyasla incelendi. İnkübasyon süresine bağlı olarak apoptoz+nekroz oranının azaldığı ve viabilite oranının arttığı görüldü. Hücre apoptoz analizlerine göre; 24 saat inkübasyon süresinde 100 µmol/L resveratrol+1mM/L nikotinamid konsantrasyonlu kombine doz için kontrol grubuna kıyasla hücre apoptoz+nekroz oranının yüzde 29,79 azaldığı, 48 saat inkübasyon süresinde 50 µmol/L resveratrol+1mM/L nikotinamid konsantrasyonlu kombine doz için kontrol grubuna kıyasla hücre apoptoz+nekroz oranının yüzde 32,51 azaldığı, 72 saat inkübasyon süresinde 100 µmol/L resveratrol+1mM/L nikotinamid konsantrasyonlu kombine doz için kontrol grubuna kıyasla hücre apoptoz+nekroz oranının yüzde 57,20 azaldığı görüldü. Sonuç olarak araştırmamızda etken maddelerin kombine dozunun ayrı ayrı uygulamalarına kıyasla hücre apoptoz+nekroz oranını etkili bir şekilde azalttığı görüldü. Her bir inkübasyon süresi için istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p<0,001$).

Farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı doz miktarlarında uygulanan etken maddelerin ve deneysel verilerden alınan sonuçlara göre en etkili bulunan dozların kombine dozunun, sağlıklı RPE hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla apoptoz+nekroz oranında etkili bir değişiklik oluşturmayarak sitotoksik etki göstermediği görüldü. İstatistiksel açıdan incelendiğinde ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

Kit analizlerinden alınan sonuçlara göre, sağlıklı ARPE-19 hücrelerine uygulanan standart seviye oksidatif stres protokolü sonrasında farklı dozda ve farklı inkübasyon sürelerinde resveratrol ve nikotinamid etken maddeleri ve buna bağlı kombine doz seçenekleri arasında, kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyon modelinde progresyonu azaltacak yönde belirlenen en etkili hücre viabilite, hücre proliferasyonu ve hücre apoptoz+nekroz değerinin 72.saat inkübasyon süresinde 100µmol/L resveratrol ve 1mM/L nikotinamid kombine doz uygulaması için gerçekleştiği ve istatistiksel açıdan kontrol grubuna kıyasla anlamlı olduğu ($p<0,001$), bu dozların aynı inkübasyon süresinde sağlıklı RPE hücre grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir değişikliğe yol açmayarak sitotoksik etki göstermediği ($p>0,05$) ve kombine dozun 72. saat inkübasyon süresi sonunda RPE hücrelerinde yara onarımını sağlayacak düzeyde proliferatif etki sağladığı ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,01$).

Oksidatif stres protokolü sonrası 72 saat inkübasyon süresinde uygulanan 100 µmol/L resveratrol, 1mM/L nikotinamid ve bu iki etken madde konsantrasyonlarının kombine dozu, kontrol grubu olarak oksidatif strese maruz bırakılmış hasarlı RPE hücreleri için *SIRT1* gen ifadesinde meydana gelen değişimler kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) metodu ile belirlendi. Aynı analiz metoduyla sağlıklı RPE hücreleri ile hasarlı RPE hücrelerindeki gen ifade düzeyleri ΔCt değerleri kullanılarak karşılaştırıldı. Buna göre; oksidatif stres protokolü sonrası 72 saat inkübasyona bırakılan hasarlı RPE hücrelerine göre sağlıklı RPE hücrelerinde *SIRT1* geni için 127 kat ekspresyon seviyesinde artış hesaplandı. *SIRT1* geni için hasarlı RPE hücrelerine kıyasla 100 µmol/L resveratrol uygulamasında 38 kat artış, 1mM/L nikotinamid uygulamasında 24 kat artış hesaplandı. Ayrıca bu iki etken madde konsantrasyonunun kombine dozu ise 80 kat *SIRT1* gen ekspresyonunu arttırdığı tespit edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). Sonuç olarak; hasarlı RPE kontrol grubuna, ayrı ayrı etken maddelerin uygulamasına kıyasla, kombine doz uygulamasının *SIRT1* gen ekspresyonunu daha etkili bir şekilde arttırdığı ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,001$). Kombine doz uygulanan hasarlı RPE hücreler ile sağlıklı RPE hücreler arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,32$).

Kuru tip YBMD hastalığının modeli üzerine yaptığımız deneysel araştırmamızın sonuçlarına göre; resveratrol ve nikotinamidin birlikte kullanımı ile elde edilen antioksidan ve antiapoptotik etki tek tek kullanıma göre daha fazladır ve bu iki etken maddenin kombinasyonu sinerjik etkilidir. 100 µmol/L resveratrol+1 mM/L nikotinamid kombinasyonu oksidatif hasarlı RPE hücrelerinde onarım düzeyinde hücre proliferasyonunu sağlayacak, apoptoz oranını azaltacak ve *SIRT1* geninin ekspresyon düzeyini arttıracak bir tedavi stratejisi olup, bu hücrelerde rejeneratif etki sağlayarak kuru tip YBMD’de progresyonu azaltabilecektir.

Hücre viabilite, hücre proliferasyon ve hücre apoptoz+nekroz oranlarında 1 mM/L nikotinamidin, 100 µmol/L resveratrole nazaran her bir inkübasyon süresinde kontrol grubuna kıyasla daha etkili olduğu görüldü. Ancak *SIRT1* gen ekspresyonunda meydana gelen değişimler istatistiksel olarak incelendiğinde 100 µmol/L resveratrol uygulaması kontrol grubuna kıyasla 1 mM/L nikotinamid uygulamasından daha etkili olduğu görüldü. Bu durum bize hücre proliferasyonu ve hücre apoptoz yolaklarında nikotinamidin farklı genlere etki ederek proliferasyonu

artırdığı ve apoptoz+nekroz oranını azalttığını düşündürdü. Nikotinamidin kuru tip YBMD modelinde hangi yolaklarda ve hangi genler üzerinde etkili olduğu ile ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmüş oldu.



KAYNAKLAR

- Abokyi, S., To, C.H., Lam, T.T., Tse, D.Y. (2020). "Central role of oxidative stress in age-related macular degeneration: evidence from a review of the molecular mechanisms and animal models", *Hindawi*, 2020:7901270. 1-19.
- Abu-Amero, K.K., Kondkar, A.A., Chalam, K.V. (2016). "Resveratrol and ophthalmic diseases", *Nutrients*, 8(4), 200. 1-16.
- Alp, E. (2011). Bevacizumab'in antianjiyogenik ve apoptotik etkilerinin meme kanseri hücre hattında araştırılması. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 134, Ankara.
- Arduíno, D.M., Esteves, A.R. Oliveira, C.R., Cardoso, S.M. (2010). "Mitochondrial metabolism modulation: a new therapeutic approach for parkinson's disease", *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9, 105-119.
- Bai, J., Yang, Y., Wu, D., Yang, F. (2021). "SS-31 protect retinal pigment epithelial cells from H₂O₂- induced cell injury by reducing apoptosis", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(7):1016-1023.
- Bola, C., Bartlett, H., Eperjesi, F. (2014). "Resveratrol and the eye: activity and molecular mechanisms", *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 252(5), 699-713.
- Bonilha, V.L. (2008). "Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium", *Clinical Ophthalmology*, 2(2), 413-424.
- Braidy, N., Berg, J., Clement, J., Khorshidi, F., Poljak, A., Jayasena, T., Grant, R., Sachdev, P. (2019). "Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Related Precursors as Therapeutic Targets for Age-Related Degenerative Diseases: Rationale, Biochemistry, Pharmacokinetics, and Outcomes", *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(2), 251-294.
- Braidy, N., Liu, Y. (2020). "NAD⁺ therapy in age-related degenerative disorders: A benefit/risk analysis", *Experimental Gerontology*, 132, 110831. 1-22.
- Bryl, A., Falkowski, M., Zorena, K., Mrugacz, M. (2022). "The role of resveratrol in eye disease- A review of the literature", *Nutrients*, 2022 (14) 2974. 1-15.
- Chan, C.M., Huang, C.H., Li, H.J., Hsiao, C.Y., Su, C.C., Lee, P.L., Hung C.F. (2015). "Protective effects of resveratrol against uva-induced damage in ARPE19 cells", *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5789-5802.
- Chen, Z., Zhai, Y., Zhang, W., Teng, Y., Yao, K. (2015). "Single nucleotide polymorphisms of the sirtuin 1 (sirt1) gene are associated with age-related macular degeneration in chinese han individuals", *Medicine*, 94 (49). e2238. 1-5.
- Chen, M., Xu, H. (2015). "Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration", *Journal of Leukocyte Biology*, 98, 1-13.
- Chen, P.; Yao, Z.; He, Z. (2021). "Resveratrol protects against high glucose-induced oxidative damage in human lens epithelial cells by activating autophagy", *Exp. Ther. Med.* 21(5):440, 1-8.
- Chiras, D., Kitsos, G., Petersen, M.B., Skolidakis, L., Kroupis, C. (2015). "Oxidative stress in dry age-related macular degeneration and exfoliation syndrome", *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 52(1), 12-27.
- Chung, H.T., Joe, Y. (2014). "Antagonistic crosstalk between SIRT1, PARP-1, and -2 in the regulation of chronic inflammation associated with aging and metabolic diseases", *Integrative Medicine Research*, 3(4), 198-203.

- Cillà, S.D., Farruggio, S., Cocomazzi, G., Mary, D., Alkabes, M., Rossetti L., Vujosevic, S., Grossini, E. (2020). "Aflibercept and ranibizumab modulate retinal pigment epithelial cells function by acting on their cross talk with vascular endothelial cells", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2020;54:161-179.
- Cimaglia, G., Votruba, M., Morgan, J.E., André, H., Williams, P.A. (2020). "Potential therapeutic benefit of NAD⁺ supplementation for glaucoma and age-related macular degeneration", *Nutrients*, 12(9), 2871. 1-21.
- Cui, R., Tian, L., Lu, D., Li, H., Cui, J. (2019). "Exendin-4 protects human retinal pigment epithelial cells from H₂O₂-induced oxidative damage via activation of NRF2 signaling", *Ophthalmic Research*, 63(4), 404-412.
- Fronk, A.H., Vargis, E. (2016). "Methods for culturing retinal pigment epithelial cells: a review of current protocols and future recommendations", *Journal of Tissue Engineering*, 7, 1-23.
- Gedikli, S. (2013). Melatoninin MCF-7 hücre kültüründeki apoptoz aktivasyonunun ve sitotoksitesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), MTT hücre canlılık testi ve immunsitokimya yöntemleriyle araştırılması. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 97, Erzurum.
- Han, D., Wu, X., Liu, L., Shu, W., Huang, Z. (2018). "Sodium tanshinone IIA sulfonate protects ARPE-19 cells against oxidative stress by inhibiting autophagy and apoptosis", *Scientific Reports*, 2018 (8):15137. 1-15.
- Hao, X.N., Wang, W.J., Chen, J., Zhou, Q., Qu, Y.X., Liu, X.Y., Xu, W. (2016). "Effects of resveratrol on ARPE-19 cell proliferation and migration via regulating the expression of proliferating cell nuclear antigen, P21, P27 and p38MAPK/MMP-9", *International Journal of Ophthalmology*, 9(12), 1725–1731.
- Hazim, R.A., Volland S., Yen, A., Burgess B.L., Williams D.S. (2019). "Rapid differentiation of the human RPE cell line, ARPE-19, induced by nicotinamide", *Experimental Eye Research*, 179, 18–24.
- Hellinen, L., Pirskanen, L., Tengvall-Unadike, U., Urtti, A., Reinisalo, M. (2019). "Retinal pigment epithelial cell line with fast differentiation and improved barrier properties", *Pharmaceutics*, 11(8), 412. 1-12.
- Hernández-Zimbrón, L.F., Zamora-Alvarado, R., Ochoa-De la Paz, L., Velez-Montoya, R., Zenteno, E., Gullias-Cañizo, R., Quiroz-Mercado, H., Gonzalez-Salinas, R. (2018). "Age-related macular degeneration: new paradigms for treatment and management of AMD", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 8374647. 1-14.
- Hua, J., Guerin, K.I., Chen, J., Michán, S., Stahl, A., Krah, N.M., Seaward, M.R., Dennison, R.J., Juan, A.M., Hatton, C.J., Sapieha, P., Sinclair, D.A., Smith, L. E. H. "Resveratrol inhibits pathologic retinal neovascularization in VLDLR^{-/-} mice", *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(5): 2809–2816.
- Huang S.Y, Chang, S.F., Chau, S.F., Chiu, S.C (2019). "The Protective Effect of Hispidin against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in ARPE-19 Cells via Nrf2 Signaling Pathway", *Biomolecules*, 9(8):380, 1-12.
- Hui F., Tang J., Williams P.A., McGuinness M.G., Hadoux X., Casson R.J., Coote M., Trounce I.A., Martin K.R., van Wijngaarden P., Crowston J.G. (2020). "Improvement in inner retinal function in glaucoma with nicotinamide (vitamin B3) supplementation: A crossover randomized clinical trial", *Clin Exp Ophthalmol*, 48(7): 903–914.
- Hwang, E.S., Song, S.B. (2017). "Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 in vitro, but can be a stimulator in cells", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(18), 3347-3362.

- Hwang, N., Kwon, M.Y., Woo, J.M., Chung, S. W. (2019). "Oxidative stress-induced pentraxin 3 expression human retinal pigment epithelial cells is involved in the pathogenesis of age-related macular degeneration", *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 6028. 1-12.
- Iloki-Assanga, S.B., Lewis-Luján, L.M., Fernández-Angulo, D., Gil-Salido, A.A., Lara-Espinoza, C.L., Rubio-Pino, J.L. (2015). "Retino-protective effect of Bucida buceras against oxidative stress induced by H₂O₂ in human retinal pigment epithelial cells line", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 254. 1-22.
- Ilkhani, F., Hosseini, B., Saedisomeolia, A. (2016). "Niacin and Oxidative Stress: A Mini-Review", *Journal of Nutritional Medicine and Diet Care*, 2: 014.1-5.
- Ishikawa, K., He, S., Terasaki, H., Nazari, H., Zhang, H., Spee, C., Kannan, R., Hinton, D.R. (2015). "Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium and development of proliferative vitreoretinopathy", *Scientific Report*, 5, 16386. 1-10.
- Jabbehdari, S., Handa, J.T. (2021). "Oxidative stress as a therapeutic target for the prevention and treatment of early age-related macular degeneration", *Survey of Ophthalmology*, 66 (423-440).
- Jadeja, R.N., Powell, F.L., Jones, M.A., Jasmine Fuller, J., Ethan Joseph, E., Thounaojam, M.C., Bartoli, M., Martin, P.M. (2018). "Loss of NAMPT in aging retinal pigment epithelium reduces NAD⁺ availability and promotes cellular senescence", *Aging (Albany NY)*, 10(6), 1306-1323.
- Jang, S.Y., Kang, H.T., Hwang, E.S. (2012). "Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD⁺/ NADH ratio and SIRT1 protein activation", *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19304–19314.
- Jiang, T., Gu, J., Chen, W., Chang, Q. (2019). "Resveratrol inhibits high-glucose-induced inflammatory "metabolic memory" in human retinal vascular endothelial cells through SIRT1-dependent signaling", *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 97(12):1141-1151.
- Johnson, S., Imai, S.I. (2018). "NAD⁺ biosynthesis, aging, and disease", *F1000Research*, 7,132.1-10.
- Karbasforooshana, H., Karimia, G. (2018). "The role of SIRT1 in diabetic retinopathy", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 190-194.
- Khan, A.A., Dace, D.S., Ryazanov, A.G., Kelly, J., Apte, R.S. (2010). "Resveratrol regulates pathologic angiogenesis by a eukaryotic elongation factor-2 kinase-regulated pathway", *Am. J. Pathol.*, 177(1), 481–492.
- Kim, S., Kim, Y.J., Kim, N.R., Chin, H.S. (2015). "Effects of bevacizumab on Bcl-2 expression and apoptosis in retinal pigment epithelial cells under oxidative stress", *Korean Journal of Ophthalmology*, 29(6), 424-432.
- Kim, M.H., Kim, D.H., Yang, S.G., Kim, D.Y. (2021). "Improved effect of a mitochondria-targeted antioxidant on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelium cells", *BMC Pharmacology and Toxicology*, 22, 7. 1-13.
- King, R.E., Kent, K.D., Bomser, J.A. (2005). "Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition", *Chemico-Biological Interactions*, 151(2), 143-149.
- Kirkland, J.B., Meyer-Ficca, M.L. (2018). "Niacin", *Advances in Food and Nutrition Research*, 83, 83-149.

- Kubota, S., Kurihara, T., Ebinuma, M., Kubota, M., Yuki, K., Sasaki, M., Noda, K., Ozawa, Y., Oike, Y., Ishida, S., Tsubota, K. (2010). "Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation", *Am. J. Pathol.* 177(4), 1725–1731.
- Li, C.; Wang, L.; Huang, K.; Zheng, L. (2012). "Endoplasmic reticulum stress in retinal vascular degeneration: Protective role of resveratrol", *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53(6), 3241–3249.
- Li, J., Dou, X., Li, S., Zhang, X., Zeng, Y. Song, Z. (2015). "Nicotinamide ameliorates palmitate-induced ER stress in hepatocytes via cAMP/PKA/CREB pathway-dependent Sirt1 upregulation", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(11 Pt A), 2929–2936.
- Li, F., Qi, J., Qin, C., Fu, Z., Ren, W. (2018). "Taurolidine promotes cell apoptosis by enhancing GRIM-19 expression in liver cancer", *Oncology Reports*, 40(6), 3743–3751.
- Liang, R., Zhao, Q., Zhu, Q., He, X., Gao, M., Wang, Y. (2021). "Lycium barbarum polysaccharide protects ARPE-19 cells against H₂O₂-induced oxidative stress via the Nrf2/HO-1 pathway", *Molecular Medicine REPORTS*, 24: 769, 2021. 1–8.
- Liu, B., Wang, W., Shah, A., Yu, M., Liu, Y., He, L., Dang, J., Yang, L., Yan, M., Ying, Y., Tang, Z., Liu, K. (2021). "Sodium iodate induces ferroptosis in human retinal pigment epithelium ARPE-19 cells", *Cell Death and Disease* (2021) 12:230. 1–14.
- Luna, C., Li, G., Liton, P.B., Qiu, J., Epstein, D.L., Challa, P., Gonzalez, P. (2009). "Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells", *Food Chem. Toxicol.* 47(1), 198–204.
- Massudi, H., Grant, R., Braid, N., Guest, J., Farnsworth, B., Guillemin, G.J. (2012). "Age-Associated Changes In Oxidative Stress and NAD⁺ Metabolism In Human Tissue", *PLOS ONE*, 7(7), e42357.
- Masuda, T., Shimazawa, M., Hara, H. (2017). "Retinal diseases associated with oxidative stress and the effects of a free radical scavenger (edaravone)", *Hindawi*, 2017 (9208489). 1–14.
- Maugeri, A., Barchitta, M., Mazzone, M.G., Giuliano, F., Basile, G., Agodi, A. (2018). "Resveratrol modulates SIRT1 and DNMT functions and restores line-1 methylation levels in ARPE-19 cells under oxidative stress and inflammation", *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2118. 1–14.
- Munia, I., Gafray, L., Bringer, M.A., Goldschmidt, P., Proukhnitzky, L., Jacquemot, N., Cercy, C., Otman, K.R.B., Errera, M.H., Ranchon-Cole, I. (2020). "Cytoprotective effects of natural highly bio-available vegetable derivatives on human-derived retinal cells", *Nutrients*, 12(3), 879. 1–19.
- Nagineeni, C.N., Raju, R., Nagineeni, K.K., Kommineni, V.K., Cherukuri, A., Kutty, R.K., Hooks, J.J., Detrick, B. (2014). "Resveratrol suppresses expression of VEGF by human retinal pigment epithelial cells: Potential nutraceutical for age-related macular degeneration", *Aging Dis.* 5(2), 88–100.
- Nashine, S., Nesburn, A.B., Kuppermann, B.D., Kenney, M.C. (2020). "Role of Resveratrol in Transmittochondrial AMD RPE Cells", *Nutrients*, 12(1), 159. 1–30.
- Nita, M., Grzybowski, A. (2016). "The Role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016:3164734. 1–23.

- Pietris, J. (2022). "The Role of NAD⁺ and Nicotinamide (Vitamin B3) in Glaucoma: A Literature Review", *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 68(3):151-154.
- Pintea, A., Rugina, D., Pop, R., Bunea, A., Socaciu, C., Diehl, H.A. (2011). "Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human retinal pigment epithelial cells", *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 27, 315–321.
- Rahman, S., Islam, R. (2011). "Mammalian Sirt1: insights on its biological functions", *Cell Communication and Signaling*, 9 (11). 1-8.
- Rastoin, O., Pagès, G., Maeva Dufies, M. (2020). "Experimental models in neovascular age related macular degeneration", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13): 4627. 1-18.
- Saini, J., Miller, J.D., Wang, Q., Blenkinsop, T.A., Temple, S., Corneo, B., Kiehl, T.R., Boles, N.C., Stern, J.H. (2017). "Nicotinamide ameliorates disease phenotypes in a human ipsc model of age-related macular degeneration", *Cell stem cell*, 20(5), 635–647.e7.
- Sheu, S.J., Liu, N.C., Ou, C.C., Bee, Y.S., Chen, S.C., Lin, H.C., Chan, J.Y. (2013). "Resveratrol stimulates mitochondrial bioenergetics to protect retinal pigment epithelial cells from oxidative damage", *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 54, 6426–6438.
- Shi, H., Zhang, Z., Wang, X., Li, R., Hou, W., Bi, W., Zhang, X. (2015). "Inhibition of autophagy induces IL-1b release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(4), 1071-1076.
- Song, M.K., Roufogalis, B.D., Huang, T.H. (2012). "Reversal of the caspase-dependent apoptotic cytotoxicity pathway by taurine from lycium barbarum (goji berry) in human retinal pigment epithelial cells: potential benefit in diabetic retinopathy", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 323784. 1-11.
- Song, C., Mitter, S.K., Qi, X., Beli, E., Rao, H.V., Ding, J., Ip, C.S., Gu, H., Akin, D., Jr, W.A.D., Rickman, C. B., Lewin, A.S., Grant, M.B., Boulton, M.E. (2017). "Oxidative stress-mediated NFκB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy", *PLOS ONE*, 12(2), e0171940. 1-26.
- Song, S.B., Park J.S., Chung, G. J., Lee I. H., Hwang, E.S. (2019). "Diverse therapeutic efficacies and more diverse mechanisms of nicotinamide", *Metabolomics*, 5(10), 137. 1-28.
- Stacchiotti, A., Favero, G., Rezzani, R. (2019). "Resveratrol and SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases", *Resveratrol adding life to years, not adding years to life*. Badria F.A (ed.). London: *IntechOpen*. Chapter 6, 117-135.
- Stern, J., Temple, S. (2015). "Retinal pigment epithelial cell proliferation", *Experimental Biology and Medicine*, 240, 1079–1086.
- Subramani, M., Ponnalagu, M., Krishna, L., Jeyabalan, N., Chevour, P., Sharma, A., Jayadev, C., Shetty, R., Begum, N., Archunan, G., Das, D. (2017). "Resveratrol reverses the adverse effects of bevacizumab on cultured ARPE-19 cells", *Scientific Reports*, 7, 12242. 1-16.
- Tsujinaka, H., Itaya-Hironaka, A., Yamauchi, A., Sakuramoto-Tsuchida, S., Ota, H., Takeda, M., Fujimura, T., Takasawa, S., Ogata, N. (2015). "Human retinal pigment epithelial cell proliferation by the combined stimulation of hydroquinone and advanced glycation end-products via up-regulation of VEGF gene", *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2, 123-131.

- Ung, L., Pattamatta, U., Carnt, N., Wilkinson-Berka, J.L., Liew, G., White, A.J.R. (2017). "Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease", *Clinical Science*, 131(24):2865-2883.
- Wei, W., Li, L., Zhang, Y., Geriletu, Yang, J., Zhang, Y., Xing, Y. (2014). "Vitamin C Protected Human Retinal Pigmented Epithelium from Oxidant Injury Depending on Regulating SIRT1", *Hindawi*, 2014:750634, 1-8.
- Williams, P.A., Harder, J.M., John, S.W.M. (2017). "Glaucoma as a metabolic optic neuropathy: making the case for nicotinamide treatment in glaucoma", *Journal of Glaucoma*, 26(12), 1161-1168.
- Wong, W.L., Su X., Li, X., Cheung, C.M., Klein, R., Cheng, C.Y., Wong, T.Y. (2014). "Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis", *Lancet. Glob. Health*, 2(2):e106-e116.
- Yanez, M., Jhanji, M., Murphy, K., Gower, R.M., Sajish, M., Jabbarzadeh, E. (2019). "Nicotinamide augments the anti-inflammatory properties of resveratrol through PARP1 activation", *Scientific Reports*, 9, 10219, 1-10.
- Yang, Y., Wu, Z.Z., Cheng, Y.L., Lin, W., Qu, C. (2019). "Resveratrol protects against oxidative damage of retinal pigment epithelium cells by modulating SOD/MDA activity and activating Bcl-2 expression", *Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.*, 23(1), 378-388.
- Yuan, Z., Du, W., He, X., Zhang, D., He, W. (2020). "Tribulus terrestris ameliorates oxidative stress-induced ARPE-19 cell Injury through the PI3K/Akt-Nrf2 signaling pathway zhenli", *Hindawi*, 2020 (7962393), 1-14.
- Zha, X., Wu, G., Zhao, X., Zhou, L., Zhang, H., Li, J., Ma, L., Zhang, Y. (2015). "PRDX6 protects ARPE-19 cells from oxidative damage via PI3K/AKT signaling", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(6), 2217-2228.
- Zhang, Y., Xi, X., Mei, Y., Zhao, X., Zhou, L., Ma, M., Liu, S., Zha, X., Yang, Y. (2019). "High-glucose induces retinal pigment epithelium mitochondrial pathways of apoptosis and inhibits mitophagy by regulating ROS/PINK1/Parkin signal pathway", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 1315-1325.
- Zhang X., Zhang N., Chrenek M.A., Girardot P.E., Wang J., Sellers J.T., Geisert E.E., Brenner C., Nickerson J.M., Boatright J.H., Li Y. (2021). "Systemic treatment with nicotinamide riboside is protective in two mouse models of retinal ganglion cell damage", *Pharmaceutics*, 13(6): 893, 1-16.
- Zheng, Y., Liu, Y., Ge, J., Wang, X., Liu, L., Bu, Z., Liu, P. (2010). "Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression", *Mol. Vis.* 16, 1467-1474.
- Zhou, M., Luo, J., Zhang, H. (2018). "Role of Sirtuin 1 in the pathogenesis of ocular disease (Review)", *International Journal Of Molecular Medicine*, 42, 13-20.
- Zhu, Y., Zhao, K.K., Tong, Y., Zhou Y.L., Wang, Y.X, Zhao, P.Q., Wang, Z.Y. (2016). "Exogenous NAD⁽⁺⁾ decreases oxidative stress and protects H₂O₂-treated RPE cells against necrotic death through the up-regulation of autophagy", *Scientific Reports*, 6 (1), 26322. 1-12.
- Zi, Y., Zhang, Y., Wu, Y., Zhang, L., Yang, R. Huang, Y. (2021). "Downregulation of microRNA-25-3p inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of multiple myeloma cells via targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway", *International Journal of Molecular Medicine*, 47:8,21. 1-10.

ÖZ GEÇMİŞ

Tuğba KESKİN Samsun Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünden 29.06.2007 tarihinde mezun oldu. 2008 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına girdi. 2011 yılında yüksek lisans programını bitirdi. 2011 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Sertifikasını aldı. 2017 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı, 2023 yılında bitirdi. İyi derecede İngilizce bilmektedir. (05.01.2023).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-7071-1444

Yayınlar:

1. Keskin T., Özdemir-Kocak, F., Çil, E., Işık, K. “Mikolik Asit İçerikli Aktinomisetlerden *Nocardia* ve *Dietzia* İzolatlarının 16S rDNA Yöntemi ile Tiplendirilmesi ve Antimikrobiyal Aktiviteleri”, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), İzmir-TÜRKİYE, 3-7 2012, ss. 1233.
2. Özdemir-Kocak, F., Çil, E., Gençbay, T., Keskin, T., Işık, K. “Topraktan Nadir Aktinomisetlerin Selektif İzolasyonunda Sükroz-Gradient Santrifügasyon Yönteminin Uygulanması”. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), İzmir-TÜRKİYE, 3-7 2012, ss. 1272.

Projeler:

1. İnsan Retinal Pigment Epitelyal Hücre Hattında Resveratrol ve Nikotinamid'in Hücre Çoğalması ve Apoptozise Etkilerinin Araştırılması, TÜBİTAK-1002 Hızlı Destek Programı-221S328 numaralı proje- Yürütücü (2021-2023).
2. Degradatif Özellikli Aktinomiset (*Nocardia* ve *Streptomyces*) İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri, Kemotaksonomisi ve RAPD-PCR Yöntemi ile Tiplendirilmesi (PYO.FEN.1904.09.024), Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi Bilimsel Araştırma Projeleri- Araştırmacı (2009-2011).

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. Lisans Biyoloji Bölüm İkindiliği (2007). Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi