T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

İNSAN RETİNAL GLİA HÜCRELERİNDE GLUTAMAT EKSİTOTOKSİSİTESİNE KARŞI SARI KANTARON (*Hypericum perforatum*) ÖZÜTLERİ, HİPERİSİN VE HİPERFORİNİN ETKİSİ

HİLAL METİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ ASLI UĞURLU BAYARSLAN

OCAK - 2023
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Hilal Metin tarafından hazırlanan "**İnsan Retinal Glia Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesine Karşı Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum*) Özütleri, Hiperisin ve Hiperforinin Etkisi**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **13.01.2023** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU BAYARSLAN Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Gözde GÜRELLİ Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Vuslat YILMAZ İstanbul Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü V. Doç. Dr. Osman ÇİÇEK .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Hilal METİN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN RETİNAL GLİA HÜCRELERİNDE GLUTAMAT EKSİTOTOKSİSİTESİNE KARŞI SARI KANTARON (*Hypericum perforatum*) ÖZÜTLERİ, HİPERİSİN VE HİPERFORİNİN ETKİSİ

HİLAL METİN

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN:DR. ÖĞR. ÜYESİ ASLI UĞURLU BAYARSLAN

Retina, göz yuvarlağının en iç tabakasını oluşturan ve ışık enerjisinin sinir iletisine dönüştüğü bir dokudur. Müller hücreleri, retinanın nöronları destekleyen ana glia hücreleridir. Retina boyunca uzanan Müller hücreleri hem kan damarları hem de nöronlar ile yakın temas halindedir. Müller hücreleri bu konumundan dolayı retina homeostazına, retina yapısına ve fonksiyonuna katkıda bulunan farklı işlevleri gerçekleştirebilmektedir. Müller hücrelerinin önemli işlevlerinden bir diğeri de glutamat gibi nörotransmitterlerin alınması ve geri dönüştürülmesidir. Glutamat, merkezi sinir sisteminin ana uyarıcı nörotransmitterlerinden biridir. Anormal glutamat salınımı, glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasına ve eksitotoksisite olarak bilinen hücre ölümüne yol açar. Glutamatın aşırı salınımı ile ortaya çıkan oksidatif strese bağlı olarak Müller hücrelerindeki fonksiyon bozukluğu, diyabetik retinopati, glokom gibi retinal hastalıkların patogenizini destekleyen toksisiteye yol açabilir. Sarı kantaron olarak bilinen *Hypericum perforatum, Hypericaceae* familyası içerisinde yer alan çok yıllık otsu bir bitkidir. Farmakolojik ve klinik çalışmalar, sarı kantaron özütlerinin antidepresan, antiinflamatuar, antimikrobiyal, antikanser, antioksidan ve nöroprotektif aktiviteleri olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, sarı kantaron özütleri (su, etil asetat, metanol), sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforin bileşenlerinin MIO-M1 retinal glia hücreleri ve SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesi test edilmiştir. Sarı kantaron özütleri, sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforinin toksik etki göstermeyen konsantrasyonları belirlenerek glutamat eksitotoksisitesine karşı koruyucu etkinlik araştırılmıştır. Hücre canlılığı analizi sonuçlarına göre hem glia hem de nöron hücrelerinde koruma aktivitesi sarı kantaron yağı muamelesi ile tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Retina, Müller hücreleri, glutamat, sarı kantaron, *Hypericum perforatum*, hiperisin, hiperforin

Ocak 2023, 76 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

THE EFFECT OF ST. JOHN'S WORT (*Hypericum perforatum*) EXTRACTS, HYPERICIN AND HYPERFORIN AGAINST GLUTAMATE INDUCED EXCITOTOXICITY IN HUMAN RETINAL GLIAL CELLS

HİLAL METİN

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

SUPERVISOR:ASSIST. PROF. DR. ASLI UĞURLU BAYARSLAN

The retina is the tissue that forms the innermost layer of the eye and converts light into nerve impulses. Müller cells are the main glial cells of the retina that are in close contact with both blood vessels and neurons. Thanks to this position, Müller cells can contribute to retinal homeostasis, retinal structure and function. One of the important functions of Müller glia is the uptake and recycling of neurotransmitters such as glutamate. Glutamate is one of the the main neurotransmitters of the central nervous system. Abnormal glutamate release causes overstimulation of glutamate receptors and can lead to damage known as the excitotoxicity. Excessive glutamate release causes oxidative stress which leads to Müller cell dysfunction. Müller cell dysfunstion affects the pathogenesis of retinal diseases such as diabetic retinopathy and glaucoma. *Hypericum perforatum* is a perennial herbaceous plant belongs to Hypericaceae family. Pharmacological and clinical studies demonstrated that *Hypericum perforatum* exerts antidepressant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, antioxidant and neuroprotective effect. In this study, cytotoxicity of *Hypericum perforatum* extracts, oil, hypericin and hyperforin on MIO-M1 retinal glial cells and SH-SY5Y neuronal cells were analyzed. The protective effect of extracts, oil, hypericin and hyperforin against glutamate excitotoxicity were determined. According to the cell viability analysis, the gliaprotective and neuroprotective activity were detected with oil treatment.

KEYWORDS: Retina, Müller cells, glutamate, St. John's wort, *Hypericum perforatum*, hypericin, hyperforin

January 2023, 76 Page

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen, değerli bilgileriyle bana yol gösteren, tez çalışmalarım boyunca bana çeşitli olanaklar sağlayan, değerli bilgilerini ve fikirlerini benimle paylaşarak kendimi geliştirmemde büyük rolü olan sevgili ve çok değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU BAYARSLAN' a teşekkür ederim.

Jüri üyelerim, Prof. Dr. Gözde Gürelli ve Doç. Dr. Vuslat YILMAZ'a zamanlarını ayırarak bu tezi değerlendirdikleri için teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım için bana olanak sağlayan Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'na teşekkür ederim. Çalışmada kullanmış olduğum hücrelerin ve bitki materyallerinin temini ve özütlerin elde edilmesinde katkısı olan Prof. Dr. Kuyaş BUĞRA, Doç. Dr. Adnan AYNA, Prof. Dr.Gökhan ZENGİN ve Dr. Öğr. Üyesi Kerim GÜNEY'e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen annem Sebahat METİN'e, sevgili kardeşim Hicran METİN ve ağabeyim Harun METİN'e, beni her zaman yüreklendiren, zor zamanlarımda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Elit ÖZELÇAĞLAYAN, Talha TÜSÜZ ve Belma BERBER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

HİLAL METİN

Kastamonu, 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**
GRAFİKLER DİZİNİ ..... **xi**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xii**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Göz 1
1.1.1 Retina 3
1.1.2 Müller Glia 5
1.1.3 Gliozis 6
1.2 Glutamat 7
1.2.1 İyonotropik Reseptörler 7
1.2.2 Metabotropik Reseptörler 9
1.2.3 Glutamat Taşınımı ve Glutamat-Glutamin Döngüsü 10
1.2.4 Glutamat Eksitotoksisitesi 11
1.3 Sarı Kantaron 12
1.3.1 Hiperisin 13
1.3.2 Hiperforin 14
2. KAYNAK ÖZETLERİ **16**
2.1 Antidepresan Aktivite 16
2.2 Antikanser Aktivite 16
2.3 Antimikrobiyal Aktivite 17
2.4 Antioksidan Aktivite 18
2.5 Nöroptotektif Aktivite 18
2.6 Diğer Biyolojik Aktiviteler 19
2.7 Çalışmanın Amacı 20
3. MALZEMELER VE YÖNTEM **21**
3.1 Malzemeler 21
3.1.1 Bitki Örnekleri 21
3.1.2 Plastik Ürünler, Kimyasallar, Cihazlar 21
3.2 Yöntem 23
3.2.1 Hücre Kültürü 23
3.2.2 Sitotoksik Aktivite 23
3.2.3 Glutamat Eksitotoksisitesi 24
3.2.4 Koruma Deneyleri 24
3.2.5 MTT Analizi 24
3.2.6 İstatistiksel Analiz 25
4. BULGULAR **26**
4.1 MIO-M1 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivite 26

4.1.1 Su Özütü 26
4.1.2 EA Özütü 27
4.1.3 MetOH Özütü 29
4.1.4 Sarı Kantaron Yağı 31
4.1.5 Hiperisin 32
4.1.6 Hiperforin 34
4.2 SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivite 35
4.2.1 Su Özütü 35
4.2.2 EA Özütü 37
4.2.3 Sarı Kantaron MetOH Özütü 38
4.2.4 Sarı Kantaron Yağı 40
4.2.5 Hiperisin 41
4.2.6 Hiperforin 43
4.3 MIO-M1 Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesi 44
4.4 SH-SY5Y Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesi 46
4.5 MIO-M1 Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesine Karşı Koruma Aktivitesi 47
4.5.1 Su Özütü 47
4.5.2 EA Özütü 49
4.5.3 MetOH Özütü 50
4.5.4 Sarı Kantaron Yağı 51
4.5.5 Hiperisin 53
4.5.6 Hiperforin 54
4.6 SH-SY5Y Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesine Karşı Koruma Aktivitesi 56
4.6.1 Su Özütü 56
4.6.2 EA Özütü 58
4.6.3 MetOH Özütü 59
4.6.4 Sarı Kantaron Yağı 60
4.6.5 Hiperisin 62
4.6.6 Hiperforin 63
5. TARTIŞMA 65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 69
KAYNAKLAR 70
ÖZGEÇMİŞ 76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Göz anatomisi 2
Şekil 1.2 Retina hücreleri ve katmanları 3
Şekil 1.3 Müller hücresi 6
Şekil 1.4 Glutamatın kimyasal yapısı 7
Şekil 1.5 Glumat reseptörlerinin sınıflandırılması 8
Şekil 1.6 NMDA reseptörlerinin çalışma mekanizması 9
Şekil 1.7 Glutumat-Glutamin döngüsü şematik gösterimi 10
Şekil 1.8 Sarı kantaron 12
Şekil 1.9 Hiperisinin kimyasal yapısı 14
Şekil 1.10 Hiperforinin kimyasal yapısı 15
Şekil 4.1 Su özütü ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 28
Şekil 4.2 EA özütü ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 29
Şekil 4.3 MetOH özütü ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 31
Şekil 4.4 Sarı kantaron yağı ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 32
Şekil 4.5 Hiperisin ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 34
Şekil 4.6 Hiperforin ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 35
Şekil 4.7 Su özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 36
Şekil 4.8 EA özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 38
Şekil 4.9 MetOH özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 39
Şekil 4.10 Sarı kantaron yağı ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 41
Şekil 4.11 Hiperisin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 42
Şekil 4.12 Hiperforin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 43
Şekil 4.13 Glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 45
Şekil 4.14 Glutamat ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 47
Şekil 4.15 Su özütü ve glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 48
Şekil 4.16 EA özütü ve glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 50
Şekil 4.17 MetOH özütü ve glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 51
Şekil 4.18 Sarı kantaron yağı ve glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 52
Şekil 4.19 Hiperisin ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 54
Şekil 4.20 Hiperforin ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri 55
Şekil 4.21 Su özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 57
Şekil 4.22 EA özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 58
Şekil 4.23 MetOH özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 60
Şekil 4.24 Sarı kantaron yağı ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 61
Şekil 4.25 Hiperisin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 62
Şekil 4.26 Hiperforin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri 63

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1 Metabotropik glutamat reseptörleri ve iletim yolu mekanizmaları.....9
Tablo 1.2 Glutamat taşıyıcıları ve ifadeleri.....11
Tablo 1.3 Sarı kantaron aktif bileşenleri…….....13
Tablo 3.1 Kimyasallar …….…….33
Tablo 3.2 Cihazlar ...…….….....34
Tablo 5.1 MIO-M1 ve SH-SY5Y hücrelerinde IC_{50} değerleri …….....85
Tablo 5.2 Glutamat eksitotoksisitesine karşı koruma aktivitesi karşılaştırması…...86

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1 Su özütünün MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 28
Grafik 4.2 EA özütünün MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 30
Grafik 4.3 MetOH özütünün MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 31
Grafik 4.4 Sarı kantaron yağının MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi..... 33
Grafik 4.5 Hiperisinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 34
Grafik 4.6 Hiperforinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 35
Grafik 4.7 Su özütünün SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 36
Grafik 4.8 EA özütünün SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 38
Grafik 4.9 MetOH özütünün SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 40
Grafik 4.10 Sarı kantaron yağının SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi..... 41
Grafik 4.11 Hiperisinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 43
Grafik 4.12 Hiperforinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 44
Grafik 4.13 Glutamatın MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 46
Grafik 4.14 Glutamatın SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 47
Grafik 4.15 Su özütü ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 49
Grafik 4.16 EA özütü ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 50
Grafik 4.17 MetOH ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 51
Grafik 4.18 Sarı kantaron yağı ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 53
Grafik 4.19 Hiperisin ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 54
Grafik 4.20 Hiperforin ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 56
Grafik 4.21 Su özütü ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 57
Grafik 4.22 EA özütü ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 59
Grafik 4.23 MetOH özütü ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 60
Grafik 4.24 Sarı kantaron yağı ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 61
Grafik 4.25 Hiperisin ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 62
Grafik 4.26 Hiperforin ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi 64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	**:** Santigrat Derece
%	**:** Yüzde
·O2-	**:** Süperoksit Anyon
·OH	**:** Hidroksil
ACl_3	**:** Alüminyum Klorür
Aβ	**:** Amiloid Beta
K^+	**:** Potasyum
mg	**:** Miligram
Mg^{+2}	**:** Magnezyum
ml	**:** Mililitre
mm	**:** Milimetre
mM	**:** Milimolar
Na^+	**:** Sodyum
NO	**:** Nitrik Oksit
pH	**:** Potansiyel Hidrojen
ROO·	**:** Alkoksil
Zn^{+2}	**:** Çinko
µl	**:** Miktolitre
µM	**:** Mikromolar

Kısaltmalar

AMPA	**:** Alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoazolpropiyonik Asit
CaMKII	**:** Ca^{+2} Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II
DMEM	**:** Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	**:** Dimetil Sülfoksit
EA	**:** Etil Asetat
EAAT	**:** Uyarıcı Aminoait Taşıyıcı
EDTA	**:** Etilendiamin Tetraasetik Asit
FBS	**:** Fetal Sığır Serum
FGF	**:** Fibroblast Büyüme Faktörü
GLAST	**:** Glutamat Taşıyıcı
iGluRs	**:** İyonotropik Glutamat Reseptörleri
LDL	**:** Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
M.Ö.	**:** Milattan Önce
MetOH	**:** Metanol
mGluRs	**:** Metabotropik Glutamat Reseptörleri
NMDA	**:** N-Metil-D-Aspartik Asit
NOS	**:** Nitrik Oksit Sentaz
PBS	**:** Fosfat Tampon Çözeltisi
ROT	**:** Reaktif Oksijen Türleri
RPE	**:** Retina Pigment Epiteli

TGF **:** Dönüştürücü Büyüme Faktörü
UV **:** Ultraviyole
VEGF **:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanılması insanlık tarihinin başlangıcına kadar uzanmakta ve modern tıbbın kökenini oluşturmaktadır. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımının avcı toplayıcı dönemde yara tedavisinde uygulanmaları ile başladığı düşünülmektedir. Antik Mezopotamya döneminde tarım ve hayvancılığın artması sebebiyle insanlarda zararlı mikroorganizmalara bağlı hastalıklar ortaya çıkmıştır. Sümer yazıtlarında bu dönemde ortaya çıkan hastalıkların bitkisel ilaçlar ile tedavi edildiği bilgisi bulunmaktadır. M.Ö. 1500'lü yıllara ait Ebers Tıp Papirüsü'nde 800'den fazla bitki ismi ve bu bitkilerin tedavi amaçlı nasıl kullanılabileceğine dair tarifler bulunmaktadır. Modern tıbbın temellerini oluşturan Hipokrat, İbn-i Sina, Gaius Plinius Secundus, Dioscorides, Claudius Galen gibi tarihin en önemli hekimleri bitkilerin tedavi amaçlı kullanımına dair bilgilere ve terapötik özelliklerine ilişkin kitaplar yazmışlardır.

Günümüzde kalp hastalıkları, hipertansiyon, depresyon, ağrı, kanser, astım, karaciğer hastalıkları, hassas bağırsak sendromu ve nörolojik bozukluklar gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların %40'ından fazlası, doğal ürünlere dayanmaktadır (URL-1, 2022). Doğal ürünler kolayca elde edilebilir, uygun maliyetlidir ve sentetik bileşiklerden daha az toksiktir. Ayrıca, doğal bileşenler aynı anda birden fazla sinyal yolağını hedefleyerek avantaj sağlamaktadır.

Retina, merkezi sinir sisteminin diğer dokularında olduğu gibi oksidatif hasar, inflamasyon ve eksitotoksisiteye bağlı olarak nörodejeneratif hasara uğramakta ve glokom, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, diyabetik retinopati gibi göz hastalıkları ortaya çıkmaktadır. Antioksidan, antiinflamatuar ve nöroprotektif özelliklere sahip doğal ürünlerin kullanımının retinal hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ai vd., 2020; Bosch-Morell vd., 2020; Sim vd., 2022). Bu tez çalışmasında da sarı kantaron özütleri ve bileşenlerinin *in vitro* retinal hücreler üzerindeki etkinliği irdelenmiştir.

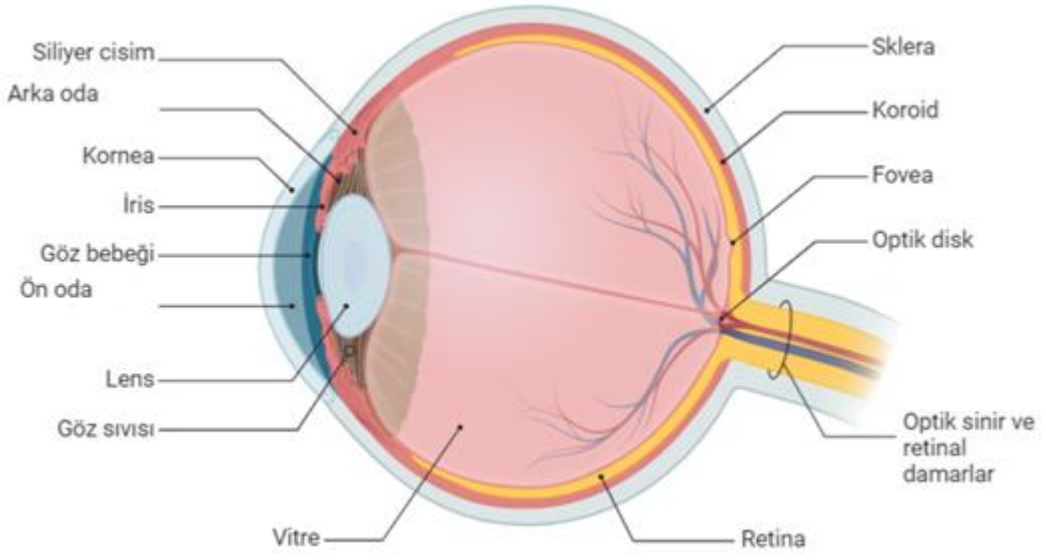
1.1 Göz

Göz, insan vücudunun en karmaşık organlarından biri olup temel olarak dış, orta ve iç olmak üzere üç katmandan oluşur. Dış katmanda kornea ve sklera bulunur. Kornea

gözümüzün en ön kısmındaki saydam tabakadır. Göze gelen ışık korneada kırılarak merceğe ve retinaya iletilir. Beyaz ve lifli dokuda olan sklera (sert tabaka) gözü enfeksiyona ve yapısal hasarlara karşı korur. Kornea ile skleranın birleşme yerine limbus denir. Skleranın görünen kısmı, konjonktiva adı verilen şeffaf bir mukoza zarı ile kaplıdır (Şekil 1.1) (Willoughby vd., 2010).

Gözün orta katmanı çok damarlı bağ dokudan oluşur ve damar tabaka olarak da adlandırılır. Orta katman, iris, göz bebeği, siliyer cisim ve koroidden oluşur. İris, kas liflerini içerir ve göz bebeğinin büyüyüp küçülmesini sağlayarak retinaya ulaşan ışık miktarını kontrol eder. Siliyer cisim merceğin gücünü ve şeklini kontrol eder. Kornea ve iris arasında kalan boşluğa ön oda; mercek ve siliyer cisim arasında kalan boşluğa ise arka oda denir. Koroid ise dış retina katmanlarına besin ve oksijen sağlayan damarsı bir tabakadır (Şekil 1.1) (Rüfer vd., 2005).

Retina (ağ tabaka) gözün iç katmanını oluşturan çok hassas bir yapıdır. Retinal nöronları içerdiği için nöral tabaka olarak da bilinir. Retina, ışığı yakalayan ve işleyen nöronların karmaşık, katmanlı bir yapısını oluşturur. Görme sinyali optik sinir aracılığıyla retinadan beyne iletilir. Göz küresini dolduran ve retinaya yapışık konumda olan sıvı kısma ise vitre denir. Retinal ve koroid kan damarları ise retinada kan dolaşımını sağlar (Şekil 1.1) (Willoughby vd., 2010).

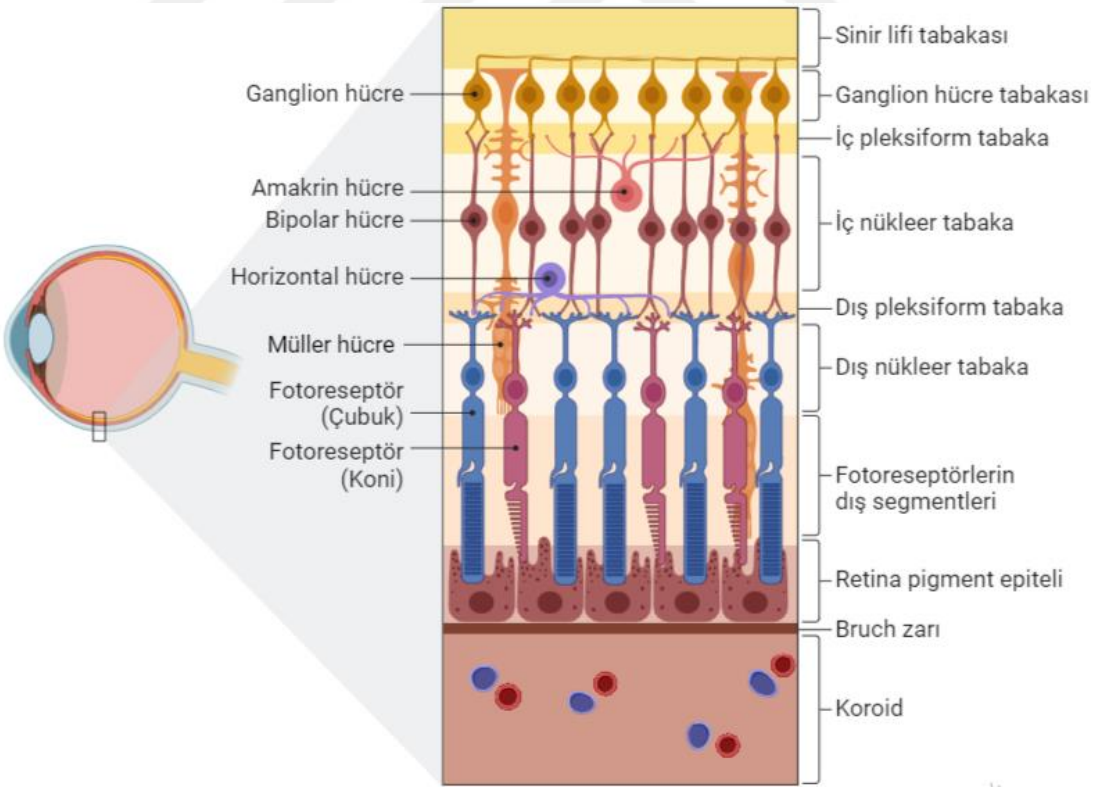


Şekil 1.1 Göz anatomisi (URL-2, 2022)

1.1.1 Retina

Retina, gözün iç yüzeyini kaplayan ve vitre boşluğunu çevreleyen dokudur. Embriyogenez sırasında, ön beynin bir uzantısı olarak optik vezikülün invajinasyonu ile oluşur. Optik vezikülün iç duvarı nöral retina, dış duvarı ise koroid ve sklera ile çevrili retina pigment epiteli (RPE) haline gelir. Retina, kendisini çevreleyen sklera ve koroid tarafından korunur (Müller vd., 2003). Nöral retina, çubuk ve koni fotoreseptörleri, bipolar hücreler, horizontal hücreler, amakrin hücreler ve ganglion hücreleri olmak üzere altı çeşit nöron içermektedir. Müller glia hücreleri de nöral retinanın organizasyonel omurgası olarak görev yapmaktadır.

Retina çok katmanlı bir yapıda olup dıştan içe doğru sinir lifi tabakası, ganglion hücre tabakası, iç pleksiform tabaka, iç nükleer tabaka, dış pleksiform tabaka, dış nükleer tabaka, fotoreseptörlerin dış segmentleri, RPE, Bruch zarı ve koroid olmak üzere 10 paralel tabakadan oluşur (Şekil 1.2) (Rüfer vd., 2003).



Şekil 1.2 Retina hücreleri ve katmanları (URL-3, 2022)

RPE, nöral retina ile koroid arasında uzanan, melanin içeren epitel hücrelerinin bulunduğu tabakadır. Melanin toksik maddeleri tutabilen bir ajandır. Retina pigmentleri melanin ve melanozom adı verilen sitoplazmik granüller içinde bulunur. Embriyolojik olarak RPE vücutta ilk pigmente olan dokudur. RPE, retina boyunca nispeten eşit bir yoğunluğa sahip, altıgen bir düzende yaklaşık 3,5 milyon epitel hücreden oluşur. Apikal tarafta RPE hücreleri, çubuk fotoreseptörlerin dış bölümlerinin arasına ulaşan uzun mikrovilluslar oluşturur. RPE hücrelerinin apikal sitoplazmasında çok sayıda pigment granülleri (melanin ve lipofuksin) bulunur. RPE'nin önemli işlevleri, fotoreseptör atıklarının fagositozunu, pigmentlerin rejenerasyonu ve sentezini, retina adhezyonunu, subretinal alandaki sıvı ve besin kontrolünü sağlayarak yakın dokular için gerekli büyüme faktörlerinin üretimini, A vitamini metabolizmasını ve rodopsin sentezini düzenlemektir. Ayrıca RPE, kan-retina bariyeri işlevinde önemli bir rol oynar. Komşu RPE hücreleri birbirlerine zonula okludens ve zonula adherens olarak adlandırılan kompleksler ile bağlanır ve dış kan-retina bariyerini oluşturur. Bu bağlantılar sayesinde su ve iyonların serbest geçişi önlenir (Kur vd., 2012).

Çoğu omurgalının gözleri, ışığı algılayabilen koniler ve çubuklar olarak adlandırılan iki tip fotoreseptör içerir ve bu hücreler fotoreseptör tabakayı oluşturur. Fotoreseptörler, ışığın elektrik sinyaline dönüştürülmesinden (fototransdüksiyon) sorumludur. Bu amaçla fotoreseptörlerin dış segment disklerinin zarları pigmentler içerir (Kur vd., 2012). Çubuk hücreleri ışığa karşı daha hassas olup düşük ışık seviyelerinde aktiftir ve alacakaranlıkta ve gece görmeden sorumludur. Parlak ışıkta aktif olan koni hücreleri ise farklı dalga boylarındaki ışığa farklı tepki vererek renkli görmeyi sağlar. Koni ve çubuk çekirdeklerinin bulunduğu tabakaya dış nükleer tabaka denir. Fotoreseptörlerin sinapsları ile horizontal ve bipolar hücreler arası sinapsları içeren tabaka ise dış pleksiform tabakadır (Şekil 1.2) (Sarks ve Killingsworth, 1988).

Horizontal hücreler, bipolar hücreler ve Müller hücrelerin çekirdeklerini içeren tabakaya iç nükleer tabaka denir. Bipolar hücrelerin dendritleri, koni ve çubuklarla sinaps yaparken aksonları ise iç pleksiform tabakada ganglion ve amakrin hücrelerle sinaps yapar. İç pleksiform tabaka ayrıca ganglion hücrelerin dendritlerini içerir. Ganglion hücrelerinin çekirdekleri ganglion tabakasında, aksonları ise sinir lifi tabakasında bulunur (Şekil 1.2) (Willoughby vd., 2010).

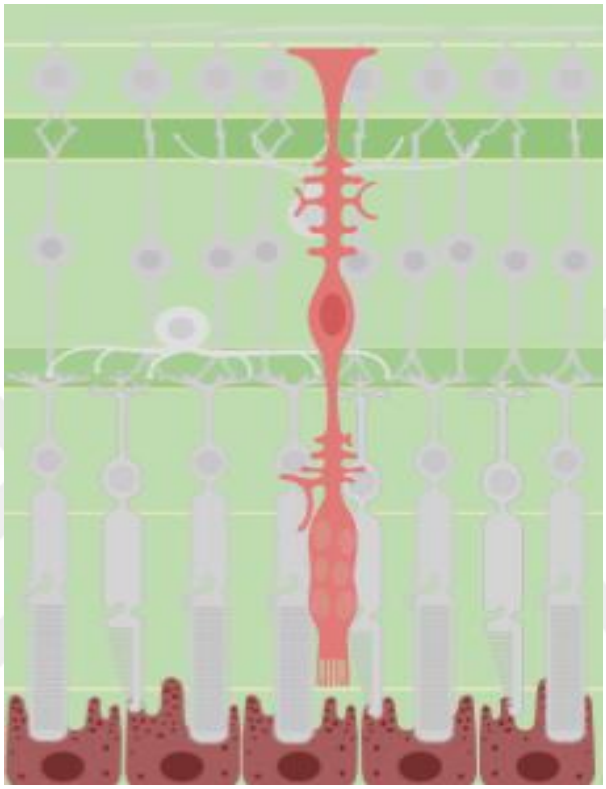
1.1.2 Müller Glia

Glia hücreleri, sinir sisteminin korunmasında önemli homeostatik roller oynar. Hastalıklara, inflamasyona ve yaralanmaya karşı doku tepkilerine belirgin bir şekilde katılır. Retinada glia hücreleri mikroglia ve makroglia olarak iki alt tipe ayrılır (Lee vd., 2000).

Retina boyunca dağılmış olan mikroglialar önemli gelişimsel ve fagositik rollere sahiptir. Mikroglialar, retinada istilacı mikroorganizmalara karşı konak savunmasında, inflamatuar süreçlerin başlatılmasında ve doku onarımında görev alır. Bu nedenle, makrofaj yapılarının özelleşmiş ve evrimleşmiş biçimleri olarak kabul edilir. Makroglialar ise nöronlara önemli yapısal ve metobolik destek sağlar. Patolojik yaralanmalara yanıt olarak değişiklikler gösterir. Retinada başlıca makroglialar Müller hücreleridir. Omurgalı canlılarda makroglialar hücre popülasyonunun %90'ını oluşturmaktadır (Jessen, 2004).

Müller glia, tüm retinal tabakaları kapsayan ve komşu nöronlarla temas eden retinanın ana glial bileşenidir. Hücre gövdeleri iç nükleer tabakada yer alan Müller hücreleri, dış nükleer tabakadan sinir lifi tabakasına doğru yayılım göstermektedir (Şekil 1.3). Müller glia konumundan dolayı retina homeostazına, yapısına ve fonksiyonuna katkıda bulunan farklı işlevleri gerçekleştirebilmektedir. Müller hücreleri retinada su, iyon ve pH dengesini düzenleyerek doku homeostazını sağlamaktadır (Nagelhus vd., 1998; Newman, 1984; 1994). Bu hücreler, oksidatif metabolizma için gerekli besin maddelerini sağlamakta ve tüm doku için enerji rezervi olarak kullanılmak üzere glikojeni sentezlemekte ve depolamaktadır (Kuwabara ve Cogan, 1961; Poitry-Yamate vd., 1995; Winkler vd., 2000). Kan akışı ve anjiyogenezde rol oynayan Müller hücreleri, nöronların canlılığı ve fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için FGF, VEGF ve TGF gibi gerekli faktörleri salgılarlar (Bugra ve Hicks, 1997; Cao vd., 1997; Chakrabarti vd., 1990; Cinaroglu vd., 2005; Gao ve Hollyfield, 1992; Neophytou vd., 1997; Seki vd., 2005). Müller hücreleri, hücre dışı glutamat konsantrasyonunu düzenleyerek eksitotoksisitenin önlenmesinde ve çeşitli nörotransmitterlerin geri dönüştürülmesinde önemlidir (Biedermann vd., 2002; Brew ve Attwell, 1987; Qian ve Dowling, 1993). Ayrıca, glutamat ve sisteinden radikal temizleyici glutatyonu sentezleyerek oksidatif strese karşı nöroprotektif etki gösterirler (Pow ve Crook, 1995;

Reichelt vd., 1997; Schütte ve Werner, 1998). Müller gliaların optik kablolar gibi davranarak ışığı fotoreseptörlere yönlendirdiği bulunmuştur (Franze vd., 2007). Müller gliaların sayısı ve yoğunluğu türler arasında farklılık göstermektedir. (Yip, 2014).



Şekil 1.3 Müller hücresi (URL-4, 2022)

1.1.3 Gliozis

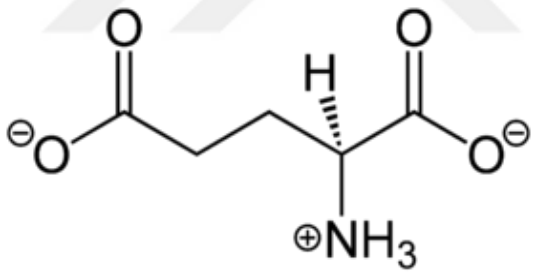
Fotik hasar, retina travması, iskemi, retina dekolmanı, glokom, diyabetik retinopati ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon dahil olmak üzere retinanın hemen hemen her patolojik değişikliğine yanıt olarak Müller hücreleri aktive olmaktadır. Müller hücrelerinin hasar durumundaki aktivasyonuna reaktif gliozis denir. Reaktif gliozis, Müller hücrelerinin morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklerini içerir; bu değişiklikler hasarın türü ve ciddiyetine göre değişir (Wan vd., 2008). Retinal hasarlara yanıt olarak Müller hücrelerinin aktivasyonu hem koruyucu hem de zararlı etkilere sahiptir. Müller hücrelerinin koruyucu ve rejeneratif tepkileri, nörotrofik faktörlerin üretimini, antioksidan ajanların salınımını, aşırı glutamatın alımını, kan-beyin bariyerinin restorasyonunu, neovaskülarizasyonun ve remiyelinizasyonun teşvik

edilmesini ve aksonal desteği içerir. Ayrıca, Müller hücreleri progenitör benzeri hücrelere farklılaşarak doku rejenerasyonuna katılabilir (Graca vd., 2018).

Retinal hastalıklarda Müller hücreleri bir yandan nöronların hayatta kalmasını desteklerken diğer yandan nöronal dejenerasyonun ilerlemesini de hızlandırabilir. Akson rejenerasyonunu ve nörit büyümesini engelleyen skar dokuları oluşturarak rejeneratif süreçler engellenebilir. Reaktif gliozisin daha şiddetli formlarında, Müller hücreleri işlevselliklerini kaybeder ve oluşan skar dokuları nöron ölümü ile sonuçlanır (Bringmann vd, 2009).

1.2 Glutamat

Glutamat, esansiyel olmayan bir amino asittir. Merkezi sinir sisteminin ana uyarıcı nörotransmitteri olan glutamat, öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonlarda rol alır. Sinaptik bağlantıların yaklaşık %90'ında bulunur. Glutamat ve azotun etkileşime girmesi ile glutamin oluşur (Şekil 1.4) (Brosnan, 2013; Ishikawa, 2013).



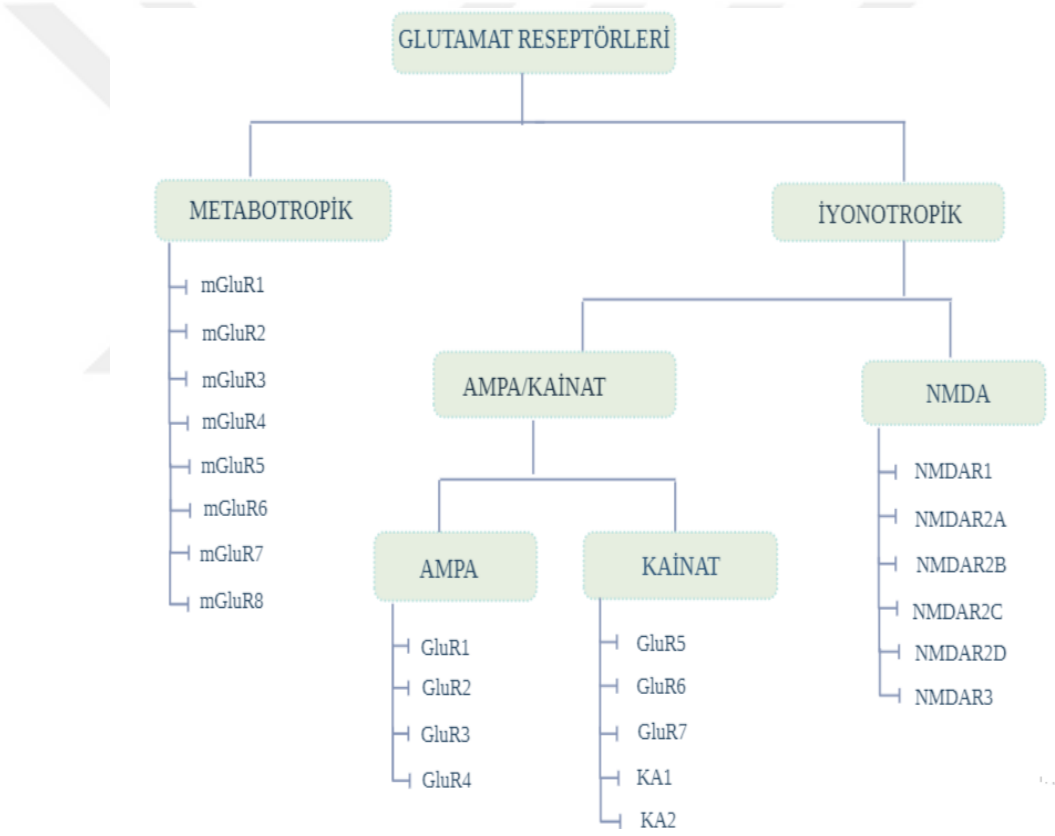
Şekil 1.4 Glutamatın kimyasal yapısı (URL-5, 2022)

Moleküler yapıları, elektrofizyolojik ve farmokolojik özelliklerine göre glutamat reseptörleri iyonotropik (iGluRs) ve metabotropik (mGluRs) olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

1.2.1 İyonotropik Reseptörler

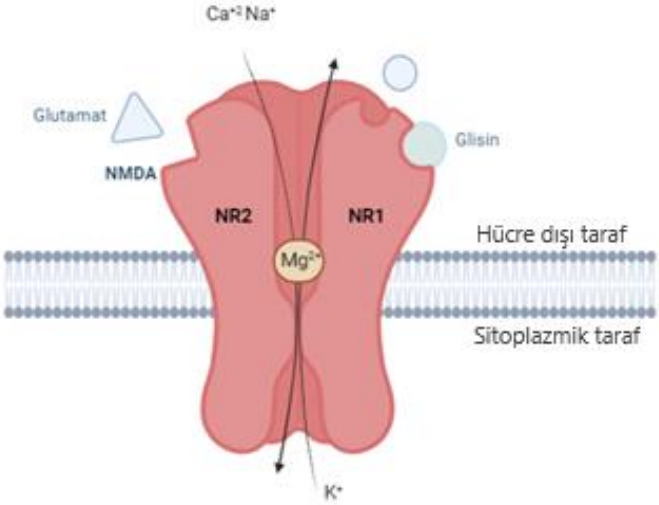
N-metil-D-aspartat (NMDA), α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazolpropiyonik asit (AMPA) ve 2-karboksil-3-karboksimetil-4-izopropenilpirrolidin (kainat) reseptörleri olmak üzere üç çeşit iyonotropik glutamat reseptörü (iGluRs) vardır (Şekil 1.5).

NMDA reseptörleri, beyin gelişimi, sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda anahtar rol oynayan tetramerik protein kompleksleridir (Kew ve Kemp, 2005). Glutamin, Zn^{+2}, Mg^{+2}, glutamat ve poliamin gibi agonistlere özel bağlanma bölgeleri bulunduran NMDA reseptörleri, aktive olduklarında hücre içi ve dışı arasındaki Ca^{+2}, Na^{+}, K^{+} iyonlarının değişimleri gerçekleşir (Rose vd., 2018). Glutamat bağlayıcı NR2 alt ünitesi ile glisin bağlayıcı NR1 alt ünitesinden oluşan protein kompleksi Mg^{+2} bağlanması ile bloke olur. Aynı anda glutamat ve Mg^{+2} bağlanması durumunda kanal aktive olur ve postsinaptik nöronlara Ca^{+2} akışı sağlanır (Şekil 1.6). Artan hücre içi Ca^{+2}, Ca^{+2} kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) gibi çeşitli enzimlerin aktifleştirir ve sinaptik iletimde değişikliklere yol açar (Suwanjang vd., 2013).



Şekil 1.5 Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması (URL-6, 2022)

AMPA reseptörleri dört alt birimden (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), kainat reseptörleri ise beş alt birimden (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2) oluşur (Şekil 1.5). AMPA ve kainat reseptörleri Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının hücre içi ve hücre dışı sıvılar arasındaki geçişi ile glutamat taşınmasına öncülük eden reseptörlerdir (Sommer ve Seeburg, 1992).



Şekil 1.6 NMDA reseptörlerinin çalışma mekanizması (URL-7, 2022)

1.2.2 Metabotropik Reseptörler

Metabotropik reseptörler, post-sinaptik iyon kanallarının açılıp kapanmasını sağlayan G-protein bağlı reseptörlerdir. Metabotropik reseptörler nörotransmitter bağlanma bölgeleri içerir ve monomerik yapılı proteinlerdir.

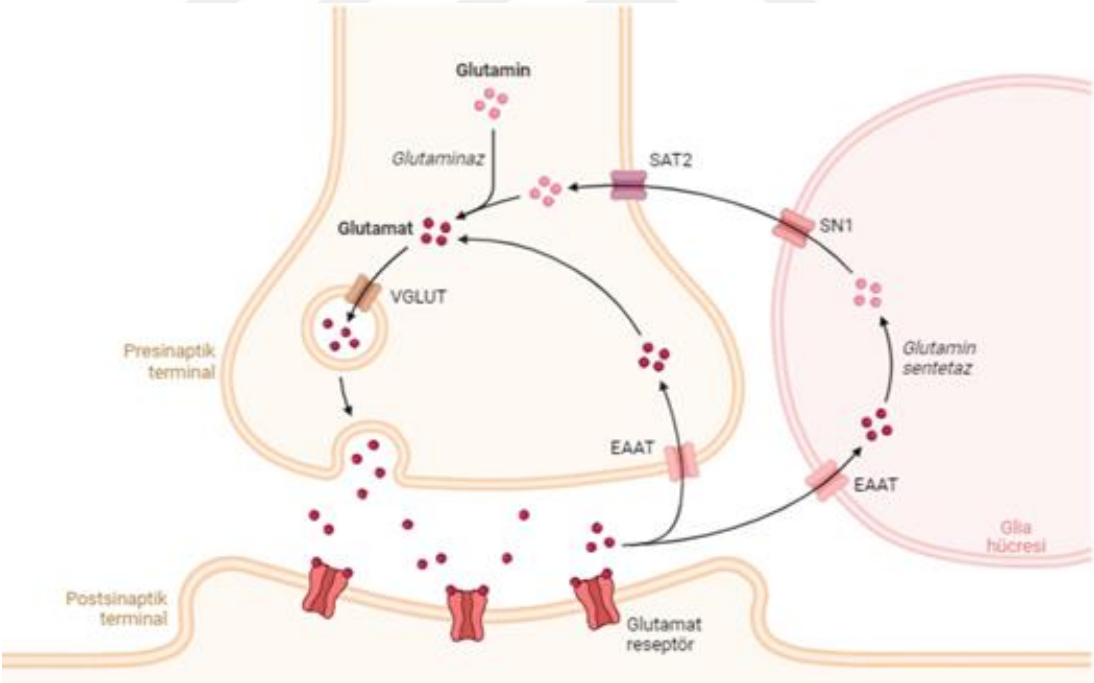
Metabotropik glutamat reseptörleri dizi benzerliklerine, sinyal iletim mekanizmalarına ve ligand bağlama profillerine (farmakolojik profillere) göre grup I (mGluR1 ve 5), grup II (mGluR2 ve 3) ve grup III (mGluR4, 6, 7 ve 8) olarak üçe ayrılmaktadır (Tablo 1.1). Grup I ve grup II metabotropik glutamat reseptörleri fosfolipaz C'nin aktivasyonunda, grup III metabotropik glutamat reseptörleri ise adenilat siklaz inhibisyonunda rol oynar (Özdemir, 2016).

Tablo 1-1 Metabotropik glutamat reseptörleri ve iletim yolu mekanizmaları

RESEPTÖR		**İLETİM YOLU MEKANİZMASI**
Grup 1	mGluR1	Fosfolipaz C'nin aktivasyonu
	mGluR5	
Grup 2	mGluR2	Adenilat siklazın inhibisyonu
	mGluR3	
Grup 3	mGluR4	Adenilat siklazın inhibisyonu
	mGluR6	
	mGluR7	
	mGluR8	

1.2.3 Glutamat Taşınımı ve Glutamat-Glutamin Döngüsü

Glutamat retinada görsel sinyallerin iletimi için gerekli olan ana uyarıcı nörotransmitterdir (Bringmann ve Reichenbach, 2013). Glutamat, fotoreseptörlerin sinaptik terminalinden Ca^{2+} bağımlı depolarizasyon yoluyla salınmaktadır. Salınan glutamat, glial hücreler tarafından Na^{+} bağımlı uyarıcı amino asit taşıyıcıları (EAAT) aracılığıyla alınır ve glutamin sentetaz aracılığı ile glutamine dönüştürülür ve geri salınır. Salınan glutamin fotoreseptörler tarafından geri alınır ve glutaminaz enzimi ile tekrar glutamata dönüşümü sağlanır (Şekil 1.7) (Rose vd., 2018). Glial hücreler tarafından alınan glutamatın glutamine dönüştürülmesiyle sinapslarda glutamat birikimi önlenmektedir. Sinaptik boşluktaki glutamat seviyeleri, glutamat salınımı ve sinaptik boşluktaki fazla glutamatın temizlenmesi sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Aşırı glutamat salınımı, nöronların aşırı uyarılmasına neden olarak hücre ölümüne yol açabilir.



Şekil 1.7 Glutamat-Glutamin döngüsü şematik gösterimi (URL-8, 2022)

Memeli dokularda EAAT'lerin beş alt tipi tanımlanmıştır. Retinal glialarda EAAT1 ve EAAT2 ifade edilmektedir (Tablo 1.2). Retinada, Müller glia tarafından glutamat alımının önemli bir nöroprotektif fonksiyon olduğu kabul edilir. Anormal glutamat salınımı sonucu glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması, glutamat alımının

inhibisyonu veya glutamin sentetazın inhibisyonu retinal nöronlarda toksisiteye yol açabilir (Kew ve Kemp, 2005).

Tablo 1-2 Glutamat taşıyıcıları ve ifadeleri

Glutamat Taşıyıcı	**Kodlayıcı Gen**	**Hücresel İfade**	**Anatomik Yeri**
EAAT1 (GLAST)	SLC1A3	Astrositler Müller glialar	Serebellum Korteks Retina
EAAT2 (GLT-1)	SLC1A2	Astrositler Müller glialar Nöronlar	Tüm beyin Retina
EAAT3 (EAAC1)	SLC1A1	Astrositler Nöronlar	Serebellum Hipokampus
EAAT4	SLC1A6	Astrositler Nöronlar	Serebellum Hipokampus Korteks
EAAT5	SLC1A7	Fotoreseptörler Bipolar hücreler	Retina

1.2.4 Glutamat Eksitotoksisitesi

Eksitotoksisite, glutamatın sinaptik boşluğa aşırı salınımı ile bu boşluktan alınımı için postsinaptik reseptörlerin aşırı aktifleşmesiyle o hücrelerin hasar görmesine neden olan homeostatik denge bozukluğudur. Eksitotoksisite, en yaygın incelenen nöronal hücre ölümü süreçlerinden biridir (Sun vd., 2010). Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), demans ve Parkinson hastalığı, glioblastoma, Müller hücre işlev bozukluğu, retinal iskemi, kalıtsal fotoreseptör dejenerasyonu ve glokom dâhil olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Homeostatik dengenin korunması için hücre içi Ca^{+2} seviyeleri, Ca^{+2} iyonlarının yerleşimi, Ca^{+2}'un hücre içi ve hücre dışı akışı, Ca^{+2} tamponlaması, Ca^{+2}'nin depolanması, kontrolü ve stabilitesinin sağlanması önemlidir. Glutamat eksitotoksisitesi, nöronal hücrelerde anormal Ca^{+2} akışına neden olmaktadır. Bu

durum proteaz, lipaz, nitrik oksit sentaz (NOS) ve reaktif oksijen türlerinde (ROT) artışa neden olmakta ve nöronal hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca AMPA reseptörleri GluR1 alt biriminin yukarı regülasyonu inflamasyonu tetiklemektedir (Liu vd., 2019). Eksitotoksisiteyi indükleyen, glutamat gibi nörotransmitterler, eksitotoksin ya da nörotoksin olarak adlandırılmaktadır (Cheng vd., 2019; Danbolt vd., 2016).

1.3 Sarı Kantaron

Sarı kantaron olarak bilinen *Hypericum perforarum* L., Hypericaceae familyası içerisinde yer alan çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 1.8) (Lavie vd., 1995). Sarı kantaron, Batı Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika'da yayılım göstermektedir. Sarı kantaron dünyadaki en önemli bitkisel ilaçlardan biridir ve yaygın olarak yetiştirilmektedir. Sarı kantaron, hafif ve orta şiddette depresyon tedavisinde kullanımıyla bilinmektedir. Bunun yanı sıra cilt problemleri, yanıklar, yaralar, mide ülseri, soğuk algınlığı, migren, baş ağrısı, şeker hastalığı ve obezitenin geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır (Aksu ve Altinterim, 2015; Wurglics vd., 2006).



Şekil 1.8 Sarı kantaron (URL-9, 2022)

Sarı kantaron içeriğinde naftodiantronlar, floroglusinoller, flavonoidler, prosiyanidinler ve uçucu yağlar başta olmak üzere çok çeşitli kimyasal bileşikler içerir. (Tablo 1.3) (Mullaicharam ve Halligudi, 2018). Sarı kantaron sahip olduğu yoğun sarı rengini, içerdiği naftodiantronlardan almaktadır. Işığa duyarlı bileşenler olan hiperisin,

psödohiperisin ve izohiperisin, bu bitkilerden izole edilen ana naftodiantronlardır. Bu bileşenler yaklaşık olarak %0,3 oranında çiçek ve yapraklarda bulunur. Naftadiantronları çözebilen sınırlı sayıda madde bulunmaktadır. Saf bileşenleri, özellikle hiperisin, oda sıcaklığında su içerisinde neredeyse hiç çözünmez (Mullaicharam ve Halligudi, 2018). Hiperforin ve adhiperforin en önemli floroglusinollerdir. Bu bileşenlerin bitkide bulunma oranları yaklaşık %2,0-4,5 ve %0,2-1,9'dur. Sarı kantaronun toprak üstü kısımlarında kersetin, hiperosid, kersitrin, izokersitrin, rutin, kampferol, mirisetin ve amontoflavon olmak üzere farklı flavonoidler bulunmaktadır Uçucu yağlar ise sarı kantaronun yaprak yüzeyinde yer alan yarı şeffaf bezlerde bulunur. Aktif bileşenleri terpenler ve alkollerdir. Monoterpenler ve seskiterpenler en bol tanımlanmış terpen türleridir (Mullaicharam ve Halligudi, 2018; Yılmaz vd., 2021). Kateşin ve epikateşinler sarı kantaronda bulunan başlıca prosiyanidinlerdir.

Tablo 1-3 Sarı kantaron aktif bileşenleri

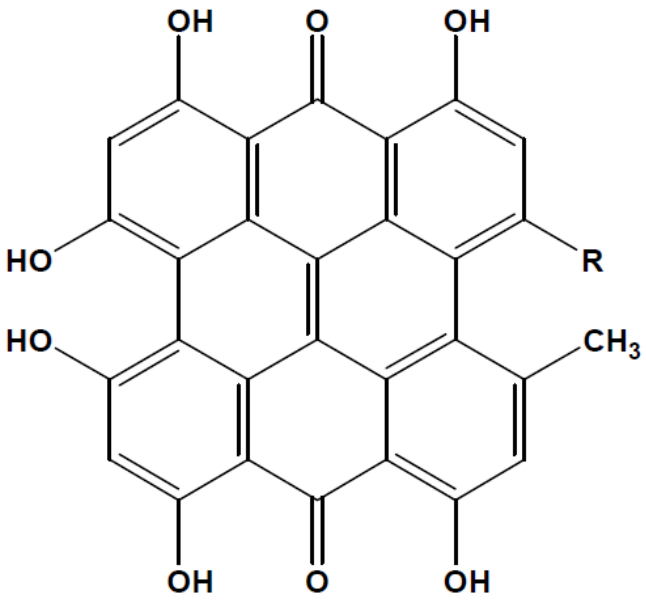
Biyokimyasal sınıf	**Bitkide bulunduğu kısımlar**	**Aktif bileşenler**
Naftodiantronlar	Çiçekler, tomurcuklar	Hiperisin, psödohiperisin, izohiperisin
Floroglusinoller	Çiçekler, tomurcuklar	Hiperforin, Adhiperforin
Flavonoidler	Yapraklar, sap, tomurcuklar	Kersetin, Hiperozit, Kersitrin, İzokersitrin, Rutin, Kampferol, Mirisetin, Amentoflavon
Prosiyanidinler	Bitkinin toprak üstü kısımları,çiçekler, tomurcukları	Prosiyanidin, Kateşin, Epikateşin
Uçucu yağlar	Çiçekler, yapraklar	Terpenler, Alkoller

1.3.1 Hiperisin

Hiperisin (4,5,7,4',5',7'-hekzahidroksi-2,2'-dimetilnaftodiantron), sarı kantaronda bulunan doğal bir kromofordur (Şekil 1.9). Hiperisin, siyah nodüller içerisinde yer alır ve bitkinin taç yapraklarında bulunur (Zou vd., 2004). Hiperisin sarı kantaronun pek

çok farmakolojik özelliğine katkı sağlamaktadır. Uzun yıllar boyunca sarı kantaronun antidepresan aktivitesinden sorumlu aktif bileşenin hiperisin olduğu varsayılmış ve tüm ilaçlar %0,3 hiperisin içerecek şekilde standartlaştırılmıştır. Buna rağmen, sarı kantaronun bir bütün olarak oluşturduğu etki, sadece hiperisin etkinliğinden daha güçlüdür. Bu nedenle, sarı kantaronun antidepresan aktivitesinin tek bir mekanik bileşen değil, biyoaktif bileşenlerin çokluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Zou vd., 2004).

Hiperisin aynı zamanda güçlü bir ışığa duyarlılaştırıcıdır. Hiperisin, kanserli dokuda normal dokuya göre daha fazla biriktiği için tümör teşhisinde etkili bir belirteç olarak kullanılabilir. Ayrıca, hiperisin çeşitli kanser türlerinin fotodinamik tedavisinde uygulanmaktadır (Jendželovská vd., 2016).



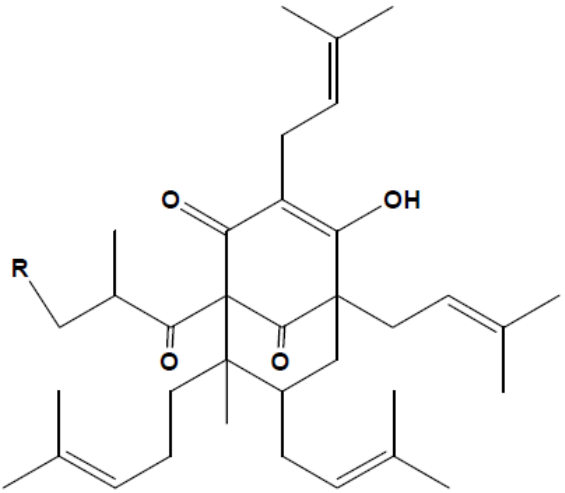
Hiperisin **R = CH_3**

Şekil 1.9 Hiperisinin kimyasal yapısı (Kashiwada ve Tanaka, 2021)

1.3.2 Hiperforin

Hiperforin ((1R,5S,6R,7S)-4-hydroxy-6-methyl-1,3,7-tris(3-methylbut-2-en-1-yl)-6-(4-methylpent-3-en-1-yl)-5-(2-methylpropanoyl)bicyclo[3.3.1]non-3-ene-2,9-dione), sarı kantaronun yaprak ve çiçeklerinde en bol bulunan (kuru ağırlığın %5'i) biyoaktif

bileşenlerden biridir (Şekil 1.10). Kimyasal kararsızlığı nedeniyle, uygun şekilde kurutulmayan ürünlerdeki hiperforin içeriği önemli ölçüde azalır. Hiperforinin biyolojik ve farmokolojik özellikleri üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır. *In vitro* çalışmalarda hiperforinin çeşitli nörotransmitterları etkilediği için sarı kantaronun antidepresan aktivitesinde rolü olabileceği düşünülmektedir (Kasai vd., 2015). Hiperforin içeriği standardize edilmiş sarı kantaron özütleri, klinik antidepresif etkinlik ile doza bağımlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Russo vd., 2014).



Hiperforin **R = H**

Şekil 1.10 Hiperforinin kimyasal yapısı (Tanaka ve Kashiwada, 2021)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sarı kantaron, aktif bileşenleri sayesinde antidepresan, antikanser, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuar ve nöroprotektif özellikler gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedir (Mullaicharam ve Halligudi, 2018)

2.1 Antidepresan Aktivite

Dünya Sağlık Örgütü, depresyonu, dünya çapında 350 milyondan fazla kişiyi etkileyen, sürekli üzüntü ve farklı etkinliklere karşı ilgi kaybı ile karakterize olan, yaygın bir ruhsal bozukluk olarak tanımlamaktadır. Depresyon, terapiler veya antidepresan ilaçlar veya terapi/antidepresan kombinasyonu ile tedavi edilebilmektedir. Sarı kantaron ürünleri, hafif ila orta şiddette depresyon tedavisi için önemli doğal ürünlerdir. Sarı kantaron özütlerinin, hafif ve orta şiddette depresyon tedavisinde plasebo grubuna kıyasla antidepresanlara benzer şekilde etkili olduğu gösterilmiştir (Marrelli vd., 2019). Duygudurum bozukluklarının gelişimine inflamatuar yolakların aktivasyonu glutamat metabolizması ve nöronal plastisitedeki değişikliklerin neden olduğu bilinmektedir. Sarı kantaron özütü muamelesinin fare hipokampal nöron hücrelerini N-metil-D-aspartat (NMDA) kaynaklı eksitotoksisiteye karşı koruyucu etkinliği rapor edilmiştir. Ayrıca, sarı kantaron özütü muamelesi, LPS ile uyarılmış insan makrofajlarında sitokin üretimini inhibe ederek anti-inflamatuar etkinliği arttırmıştır (Bonaterra vd., 2018). Nöronları koruyucu ve anti-inflamatuar özelliklerin, depresif bozuklukların tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir.

2.2 Antikanser Aktivite

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölündüğü ve çevre dokulara yayıldığı hastalıklardır. 2020 yılındaki tahmini yeni vakalara göre meme kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, kolon kanseri ve melanom en sık görülen kanser türleri arasındadır (URL-10, 2022). Sarı kantaron ve bileşenlerinin anti-kanser aktivitesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Sarı kantaron hidroalkolik özütünün belirli dozda UV ışıması sonrası insan melanom hücreleri üzerinde fototoksisite gösterdiği belirlenmiştir (Marrelli vd., 2019). Sarı kantaron çiçeklerinden farklı yer ve zamanlarda toplanan ve farklı çözücülerle

özütlenen numunelerin, insan eritrolösemik K562 hücrelerinin büyümesini engellediği ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Valletta vd., 2018). Sarı kantaron etanol özütünün doza bağlı olarak MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkisi olduğunu ve bu etkilerin AMPK/mTOR yolağının inhibisyonu ve mitokondriyal apoptoz yolağının aktivasyonundan kaynaklandığı rapor edilmiştir (Kim vd., 2018).

Sarı kantarondan izole edilen hiperisin, fotodinamik terapi yoluyla kanseri tedavi etmek için kullanılan güçlü bir ışığa duyarlılaştırıcıdır. Hiperisine bağlı ışığa duyarlılık esas olarak mitokondri veya endoplazmik retikulum-golgi kompleksini etkileyerek hücre apoptozuna yol açmaktadır (Theodossiou vd., 2009). Hiperisinin, melanom ve tiroid kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerine karşı aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Kim vd., 2018; Theodossiou vd., 2009). Hiperforin, *in vitro* endotel hücre organizasyonunu ve *in vivo* anjiyogenezi engellemektedir (Brito vd., 2017)

2.3 Antimikrobiyal Aktivite

Sarı kantaron çiçeğinden elde edilen metanol özütleri, mastit bakterilerine karşı anti-bakteriyel aktivite göstermektedir (Okmen ve Balpınar, 2017). Sarı kantaron aynı zamanda antifungal etkiye sahiptir. Hiperisin, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporum canis*, *Pichia fermentans*, *Exophiala dermatitidis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi patojenik mantar ve mayalara karşı aktivite göstermiştir (Sytar vd., 2016). Sarı kantaron özütlerinin enfeksiyöz bronşit virüsü ve influenza A virüsüne karşı antiviral etkinliği de rapor edilmiştir (Chen vd., 2019; Pu vd., 2009). Ayrıca, sarı kantaron bileşenlerinin COVID-19 için ilaç olma özellikleri moleküler yerleştirme analizleri ile araştırılmış, en kararlı kompleksin COVID-19 ana proteaz ve hiperisin/izohiperisin ligandları ile elde edildiği gösterilmiştir (Yalçın vd., 2021). Mohamed ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışma, moleküler yerleştirme analizleri sonuçları ile tutarlı bir şekilde sarı kantaron ve aktif bileşeni hiperisinin SARS-CoV-2 ve farklı varyantlarına (Alfa, Beta, Delta ve Omikron) karşı güçlü bir antiviral aktiviteye sahip olduğunu rapor etmiştir.

2.4 Antioksidan Aktivite

Reaktif oksijen türleri (ROT), dış yörüngede bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan serbest radikaller olup süperoksit anyon (·O2-), hidroksil (·OH), peroksil (ROO·), alkoksil (RO·) ve nitrik oksiti (NO) içerir. ROT, aerobik metabolizma sonucunda üretilir ve proteinler, DNA ve lipidler gibi önemli moleküllere zarar verebilir. Oksidatif stres, kardiyovasküler disfonksiyonlar, ateroskleroz, inflamasyon, karsinogenez ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlara neden olabilir (Jovin vd., 2011).

Sarı kantaron özütlerinin antioksidan etkileri %10'a kadar flavonoid içeriğinden kaynaklanmaktadır. Polifenol bakımından zengin sarı kantaron türlerinin tümü belirgin antioksidan özellikler gösterir. Spesifik olarak flavonoid bakımından zenginleştirilmiş bir sarı kantaron özütünün süperoksit radikalini konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, 150 µg'dan daha yüksek miktarlarda özüt eklendiğinde, lipid peroksidasyonu üzerindeki koruyucu etki kaybolmuştur. Sarı kantaron özütünün antioksidatif kapasiteleri, çok yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidatife geçebilir (Zou vd., 2004).

2.5 Nöroptotektif Aktivite

Merkezi Sinir Sistemi'nin oksidatif strese karşı özellikle duyarlı olması Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Nöroprotektif ajanların antioksidanlar aracılığıyla, anti-inflamatuar etkinlik göstererek ve nörotransmitter salınımını düzenleyerek nörodejeneratif patolojileri önleyebileceği düşünülmektedir (Kumar ve Khanum, 2012). Çeşitli çalışmalar, sarı kantarondan elde edilen bileşiklerin, nöroprotektif mekanizmalar veya antioksidan aktivite aracılığıyla toksik ajanlara karşı koruma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Sıçanlarda $AlCl_3$ ile indüklenen Alzheimer modelinde sarı kantaron özütleri amiloid-beta (Aβ) birikimini azaltmıştır (Cao vd., 2017). Amiloid-beta (Aβ) birikimi sonucu oluşan plaklar mikroglia hücrelerini de etkilemektedir. Sarı kantaron EA özütü ile muamele edilen mikroglia hücrelerinde amiloid-beta (Aβ) birikimin engellendiği tespit edilmiştir (Kraus vd., 2007).

Sarı kantaron hidrofilik özütünün *in vitro* oksaliplatin kaynaklı nörotoksisite modeli üzerinde etkinliği değerlendirilmiştir. Nöropatik ağrı, oksaliplatin bazlı kemoterapinin yaygın bir yan etkisidir ve sıklıkla tedavinin yarıda kalmasına neden olmaktadır. Sıçan astrosit hücrelerinde sarı kantaron muamelesinin oksaliplatin kaynaklı apoptozu azalttığı gösterilmiş ve kemoterapi kaynaklı nöropatiye karşı potansiyel kullanımı önerilmiştir (Marrelli vd., 2019).

Breyer ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada fare hipokampal HT22 hücre hattında glutamat maruziyetine bağlı hücre hasarına karşı sarı kantaronun nöroprotektif aktivitesini araştırmış ve sarı kantaron ile inkübasyonun ilk 8 saatinde hücrelerin glutamat hasarına karşı neredeyse tamamen korunduğunu ancak ilerleyen saatlerde sarı kantaronun hücrelerde indüklenen hasara karşı etkili olmadığını rapor etmişlerdir.

Lu ve arkadaşları (2004) H_2O_2 ile indüklenen oksidatif hasara karşı sarı kantaron özütlerinin sıçan PC12 nöral hücrelerin hayatta kalma oranını arttırdığını, hem hücre içi hem de hücre dışı ROT seviyelerini azalttığını ve DNA parçalanması ve apoptozu engellediğini göstermiştir.

Sarı kantaronun da içinde bulunduğu karışım aksotomi sonrası retinal ganglion hücre canlılığını arttırmıştır (Cheung vd., 2002). Sarı kantaron özütü ve hiperisinin iskemili farelerde patolojik kan damarı oluşumuna karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir (Higuchi vd., 2008).

2.6 Diğer Biyolojik Aktiviteler

Sarı kantaron özütünün düşük dozlarda, akut ve kronik ağrı modellerinde analjezik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile hiperisin ve hiperforinin ağrı kesici etkiden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Galeotti, 2017).

Sarı kantaron özütü ve hiperforinin, sitokinler tarafından uyarılan STAT-1, NF-kB yolaklarını inhibe ederek pankreatik β hücre hasarını engellediği gösterilmiştir. Bu nedenle, sarı kantaronun tip 1 diyabete yol açan immün aracılı β hücre fonksiyon bozukluğunun önlenmesinde potansiyel bir rolü olabileceği önerilmektedir (Novelli vd., 2016).

Sarı kantaron özütünün hiperlipidemik sıçanlarda serum lipid profili, aminotransferaz, alkalin fosfataz ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolü ve hiperlipideminin neden olduğu oksidatif stres ve lipid peroksidasyon belirteçlerini azalttığı rapor edilmiştir (Moghaddam vd., 2016).

2.7 Çalışmanın Amacı

Sarı kantaronun özellikle antioksidan ve nöroprotektif özellikleri göz önünde bulundurularak bu tez çalışmasında insan retinal Müller hücrelerinde ve SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde, sarı kantaron özütlerinin, sarı kantaron yağının, hiperisin ve hiperforin bileşenlerinin glutamat eksitotoksisitesine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

3. MALZEMELER VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

3.1.1 Bitki Örnekleri

Sarı kantaron örnekleri Kastamonu-Daday/Ballıdağ Mevkii'nden toplanmış ve Dr. Kerim GÜNEY tarafından taksonomik olarak tanımlanmıştır. Örnekler kurutularak toz haline getiirlmiş, su, etil asetat, metanol ile özütlenmiştir. 40°C döner buharlaştırıcı (Heidolph, Almanya) ile çözücü uzaklaştırılmıştır. Sitotoksisite ve koruma deneylerinde kullanmak için su özütü fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde, etil asetat (EA) özütü, metanol (metOH) özütü, yağ örnekleri ve hiperisin %5 dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür. 250 µg hiperforin 227 µl metOH içerisinde çözünmüş halde teslim alınmış ve deneyler için PBS ile seyreltilmiştir.

3.1.2 Plastik Ürünler, Kimyasallar, Cihazlar

Tez çalışması boyunca kullanılan plastik ürünler TPP (İsviçre), CAPP (Danimarka), Isolab (Almanya)'dan satın alınmıştır. Tüm solüsyonlar ve plastik ürünler 20 dakika 121°C'de otoklav ile sterilize edilmiştir. Kullanılan kimyasallar ve cihazlar Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1 Kimyasallar

Kimyasal adı	**Marka**
3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT)	Neofroxx, Almanya
DMSO	Sigma Aldrich, ABD
PBS	Thermo Fisher Scientific, Gibco, ABD
Penisilin/Streptomisin	Panbiotech, Almanya

Tablo 3.1'in devamı

Kimyasal adı	**Marka**
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Gibco, ABD
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Gibco, ABD
Glutamat	Sigma Aldrich, ABD
Hiperisin	Biosynth, İsviçre
Hiperforin	Biosynth, İsviçre
Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA)	Panbiotech, Almanya

Tablo 3.2 Cihazlar

Cihaz Adı	**Marka**
Biyogüvenlik Kabini	Hedlab
-20 Derin Dondurucu	Indesit
-86 Derin Dondurucu	VWR
Hassas Terazi	Precisa
Karbondioksit (CO_2 İnkübatörü)	Nüve, Panasonic
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir
Masaüstü Santrifüj	Nüve, Medwelt
Mikropipetler (Tek ve Çok Kanallı)	Capp
Otoklav	Nüve
Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific
Ters Mikroskop	Leica
Vortex	Witeg

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Kültürü

Hücre kültürü deneyleri için insan retinasından izole edilmiş Müller hücre hattı (MIO-M1) ve insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hattı kullanılmıştır. MIO-M1 hücre hattı Prof. Dr. Kuyaş Buğra (Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü), SH-SY5Y hücre hattı Doç. Dr. Adnan AYNA (Bingöl Üniversitesi, Kimya Bölümü) tarafından hediye edilmiştir.

Hücreler %10 FBS, 100 ünite/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM besiyerinde, %5CO_2 ve 37˚C'de kültür edilmiştir. İki günlük periyotlar halinde besiyeri değiştirilmiş ve hücreler %80 yoğunluğa ulaşana kadar büyütülmüştür. Hücrelerin besiyeri aspire edilerek PBS ile yıkanmış ve petri yüzeyinden kaldırılması için %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Tripsin aktivitesini durdurmak amacıyla serum içeren besiyeri eklenmiş ve kazıyıcı yardımı ile hücreler petri yüzeyinden kaldırılmıştır. 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilerek hücreler pelet halinde elde edilmiş ve taze besiyeri içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Hücreler dondurma solüsyonunda (%70 DMEM, %20 FBS, %10 DMSO) süspanse edilerek kriyotüplere aktarılarak stoklanmıştır. Hücreler aşamalı olarak dondurmak için öncelikle 24 saat -20 °C'de bekletilmiş ve daha sonra uzun süreli muhafaza edilmesi için -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2 Sitotoksik Aktivite

Sarı kantaron özütleri, sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforinin MIO-M1 ve SH-SY5Y hücre hatları üzerinde öncelikle toksisite deneyleri yapılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu petrilerde 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Her örnek ve konsantrasyon için 3 kuyucuk hazırlanmıştır. Ertesi gün, 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında su özütü, EA özütü, metOH özütü, sarı kantaron yağı; 0,5-50 µM konsantrasyon aralığında hiperisin ve hiperforin ile hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak hücrelere PBS veya %0,5 DMSO eklenmiştir. İnkübasyonun ardından MTT analizi ile hücre canlılığındaki değişiklikler analiz

edilmiştir. IC_{50} değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak log(inhibitör) vs normalized response – variable slope fonksiyonu kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3 Glutamat Eksitotoksisitesi

Hücreler 96 kuyucuklu petrilerde 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Her konsantrasyon için 3 kuyucuk hazırlanmıştır. Ertesi gün hücreler serumsuz besiyerine aktarılmıştır. Glutamat eksitotoksisitesi oluşturmak için MIO-M1 hücreleri 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mM glutamat ile 4 saat, SH-SY5Y hücreleri 20, 40, 60, 80, 100 mM glutamat ile 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna glutamat yerine PBS eklenmiştir. MTT analizi ile hücre canlılığındaki değişiklikler analiz edilmiştir. IC_{50} değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak log(inhibitör) vs normalized response – variable slope fonksiyonu kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.4 Koruma Deneyleri

Sarı kantaron özütleri, sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforinin glutamat eksitotoksisitesine karşı koruyucu aktivitesini belirlemek için MIO-M1 ve SH-SY5Y hücreleri üzerinde toksisite göstermeyen konsantrasyonlar seçilmiştir. 96 kuyucuklu petrilerde 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Her örnek ve konsantrasyon için 3 kuyucuk hazırlanmıştır. Ertesi gün, MIO-M1 ve SH-SY5Y hücrelerine, su özütü (31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığı), EA özütü (31,25-250 µg/ml konsantrasyon aralığı), metOH özütü (31,25-125 µg/ml konsantrasyon aralığı), sarı kantaron yağı (31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığı), hiperisin (0,5-2,5 µM konsantrasyon aralığı) ve hiperforin (0,5-50 µM konsantrasyon aralığı) ile 24 saat ön inkübasyon yapılmıştır. Ardından MIO-M1 hücreleri IC_{50} konsantrasyonunda (367,5 mM) glutamat ile 4 saat, SH-SY5Y hücreleri ise IC_{50} konsantrasyonunda (91,95 mM) glutamat ile 24 saat muamele edilmiş ve MTT analizi ile hücre canlılığındaki değişiklikler değerlendirilmiştir.

3.2.5 MTT Analizi

İnkübasyonların ardından besiyerleri aspire edilmiş ve hücreler 0,5 mg/ml MTT içeren besiyerinde 4 saat inkübe edilmiştir. Mitokondrideki dehidrogenaz enzimleri

tarafından parçalanan tetrazolium halkası mor renkli formozanı oluşturur. Formazan DMSO ile çözüldükten sonra mikroplaka okuyucu (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 570 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.6 İstatistiksel Analiz

Deneyler 3 bağımsız örnek ile tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler, ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. GraphPad Prism programı kullanılarak t-test ile istatistiksel analizler gerçekleştirilmiş, $p \leq 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

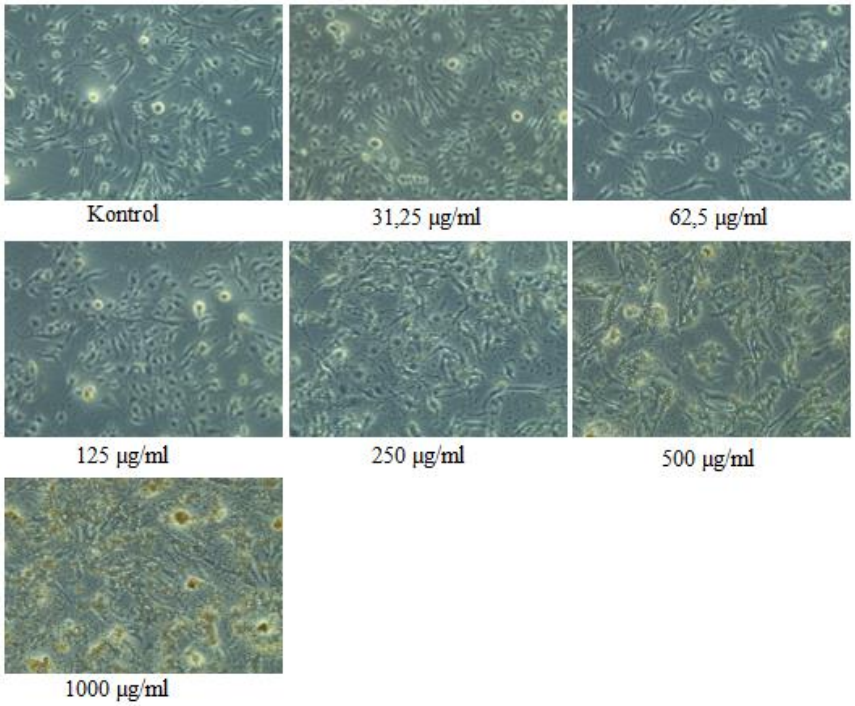
4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında sarı kantaron su, EA, metOH özütleri, sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforinin, MIO-M1 ve SH-SY5Y hücre hatları üzerinde glutamata bağlı eksitotoksisiteye karşı koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, öncelikle sarı kantaron su, EA, metOH özütleri, sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforinin MIO-M1 ve SHSY5Y hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteleri analiz edilmiştir. Glutamat muamelesi ile eksitotoksisite modeli oluşturulan MIO-M1 ve SH-SY5Y hücrelerinde, sitotoksisite göstermeyen (%50 üzerinde hücre canlılığı elde edilen) konsantrasyonlar ile koruma deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücre morfolojisindeki değişiklikler ters mikroskop görüntüleri ile takip edilmiştir. MTT analizi, hücre canlılığının değerlendirilmesi için uygulanmıştır.

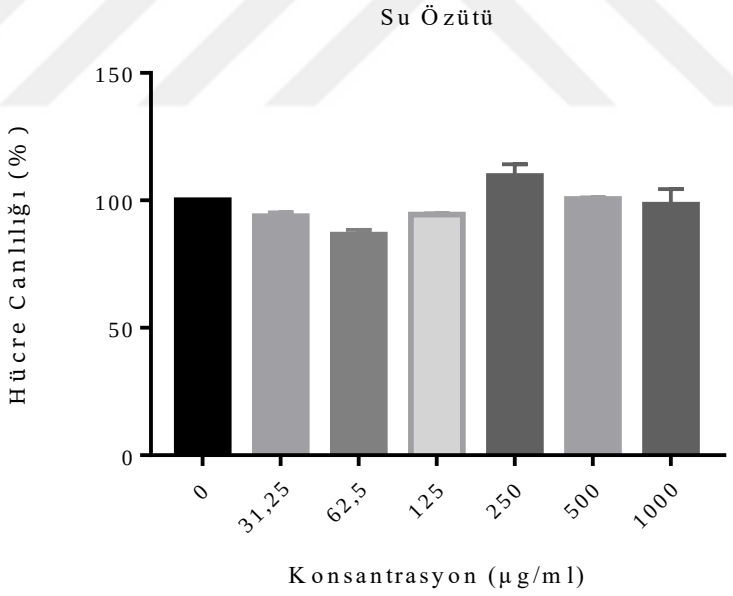
4.1 MIO-M1 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivite

4.1.1 Su Özütü

MIO-M1 hücreleri; 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron su özütü ile 24 saat inkübe edilmiştir. Hücre morfolojilerinde (Şekil 4.1) ve hücre canlılık oranlarında (Grafik 4.1) kontrol hücrelere kıyasla su özütü ile muamele edilen hücrelerde değişiklik tespit edilmemiştir ve IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.1 Su özütü ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri

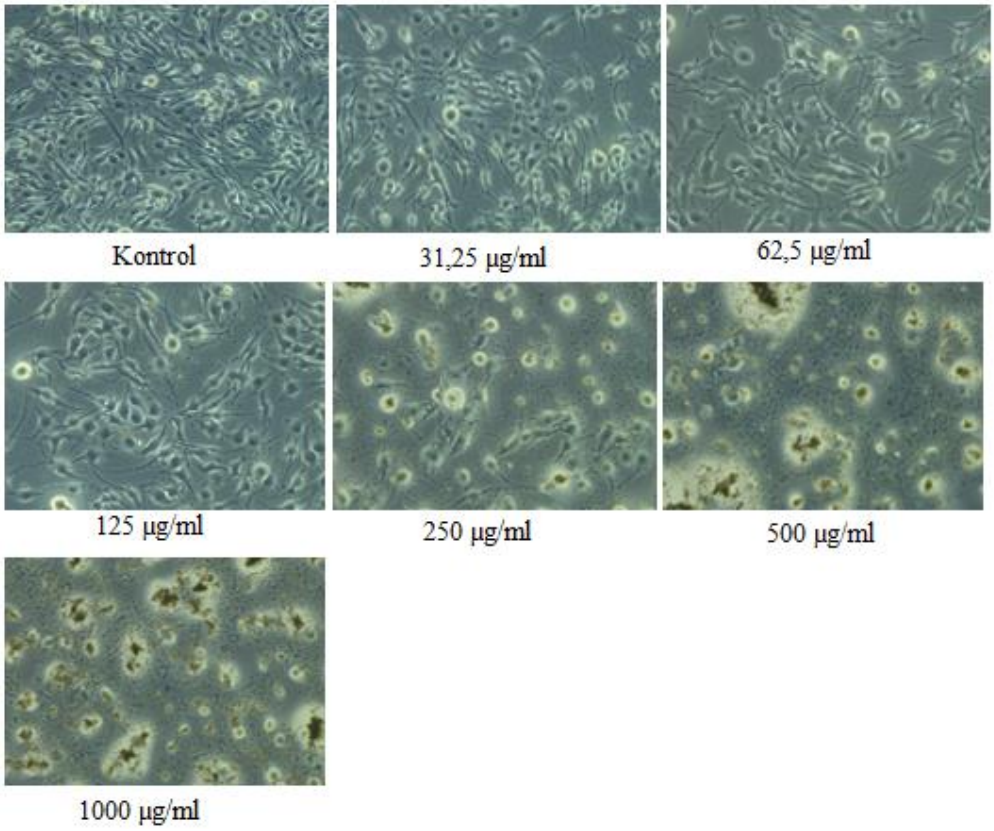


Grafik 4.1 Su özütünün MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3).

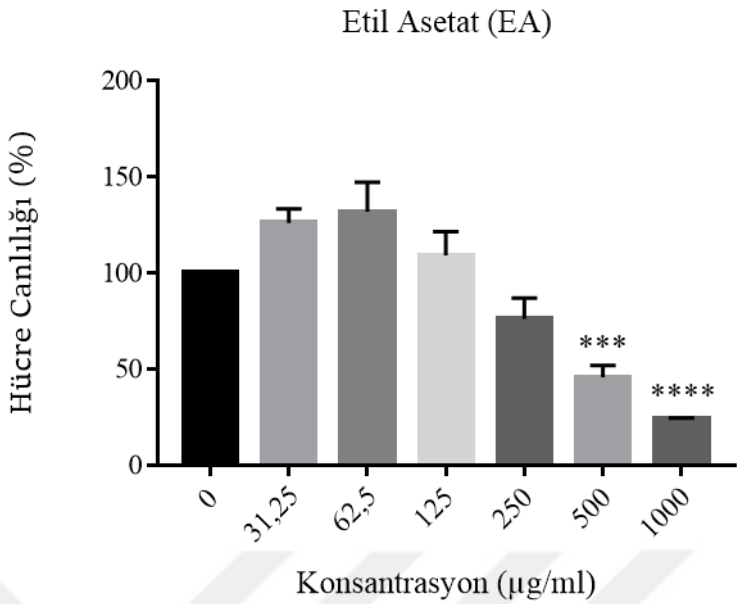
4.1.2 EA Özütü

MIO-M1 hücreleri; 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron EA özütü ile 24 saat inkübe edilmiştir. 31,25-125 µg/ml konsantrasyon aralığında EA özütü muamelesi sonucunda sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. 500 µg/ml EA özütü

muamelesi ile hücrelerin %45,85'inin ve 1000 µg/ml'de ise %24,08'inin canlı kaldığı belirlenmiştir (Grafik 4.2). IC_{50} değeri 495,6 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.2). Hücre canlılık oranında azalma ve anormal hücre morfolojileri saptanmıştır (Şekil 4.2).



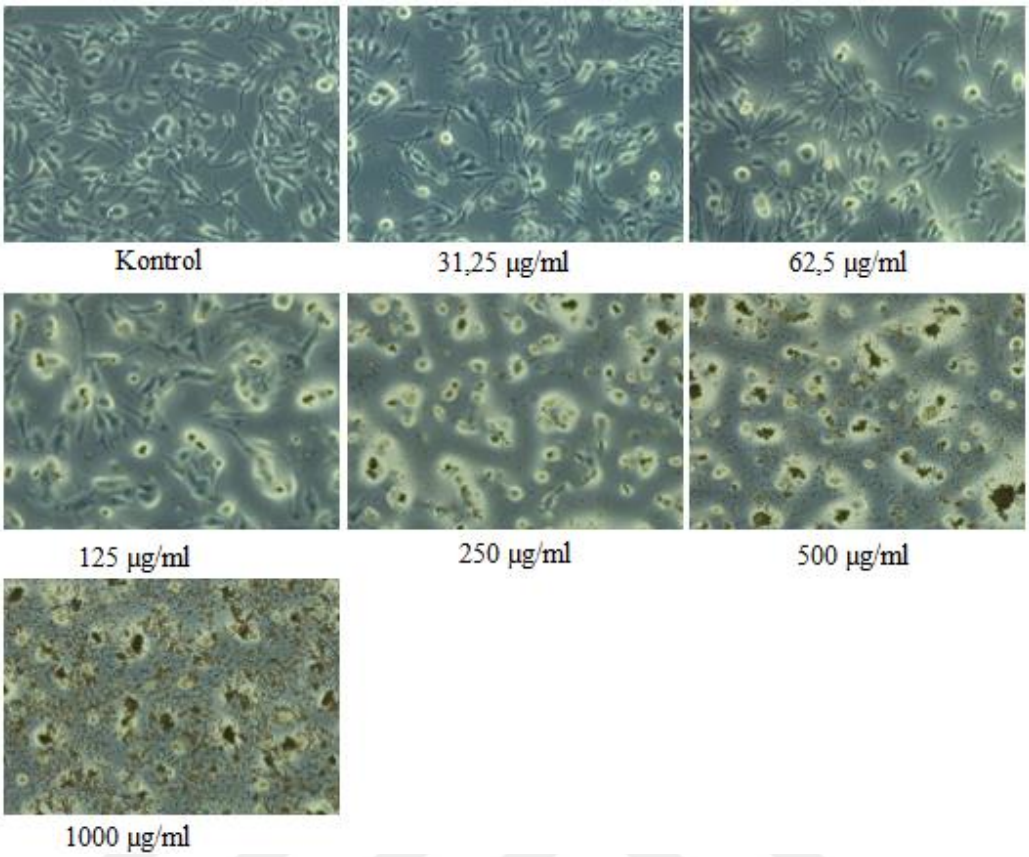
Şekil 4.2 EA özütü ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



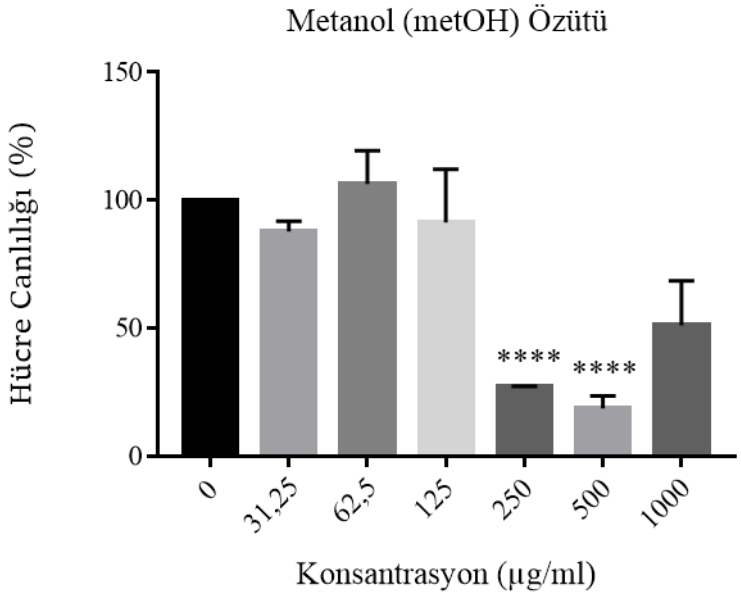
Grafik 4.2 EA özütünün MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ***, p<0,001; ****, p<0,0001

4.1.3 MetOH Özütü

MIO-M1 hücreleri; 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron metOH özütü ile 24 saat inkübe edilmiştir. 31,25-62,5-125 µg/ml konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. 250 µg/ml EA özütü muamelesi ile hücrelerin %27,14'ünün, 500 µg/ml'de %18,83'ünün canlı kaldığı belirlenmiştir. IC_{50} değeri 286,6 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.3). Hücre canlılık oranında azalma ve anormal hücre morfolojileri saptanmıştır (Şekil 4.3).



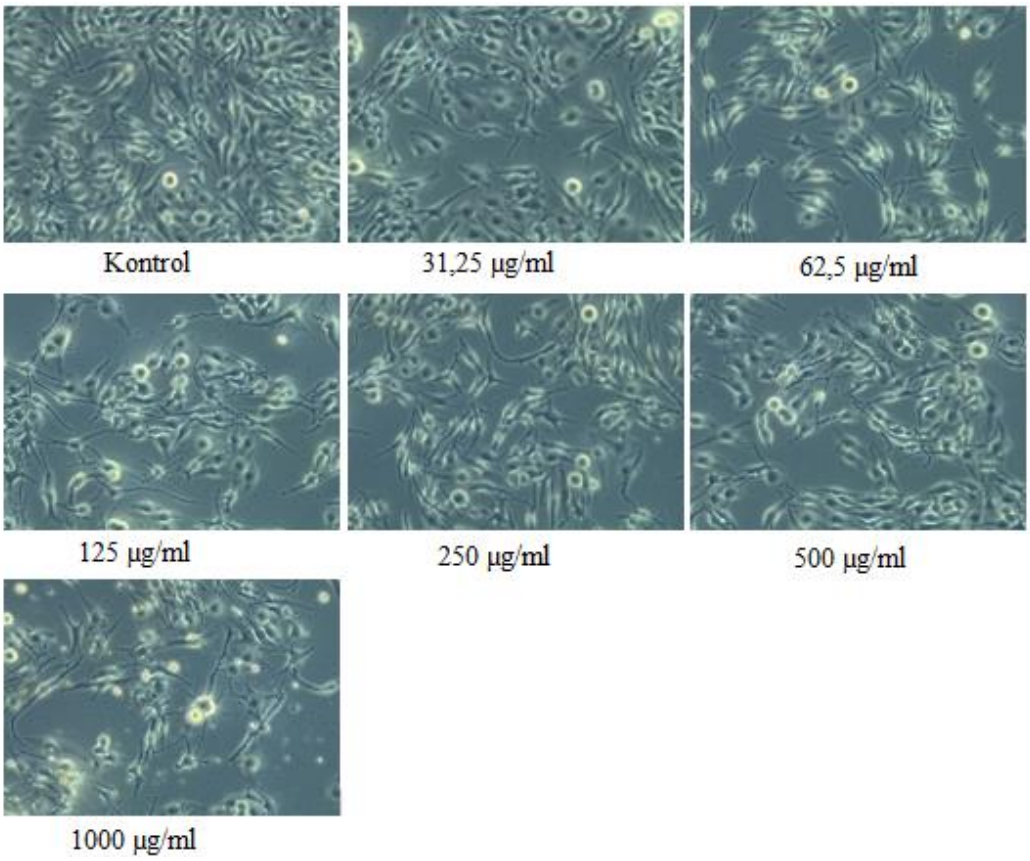
Şekil 4.3 MetOH özütü ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



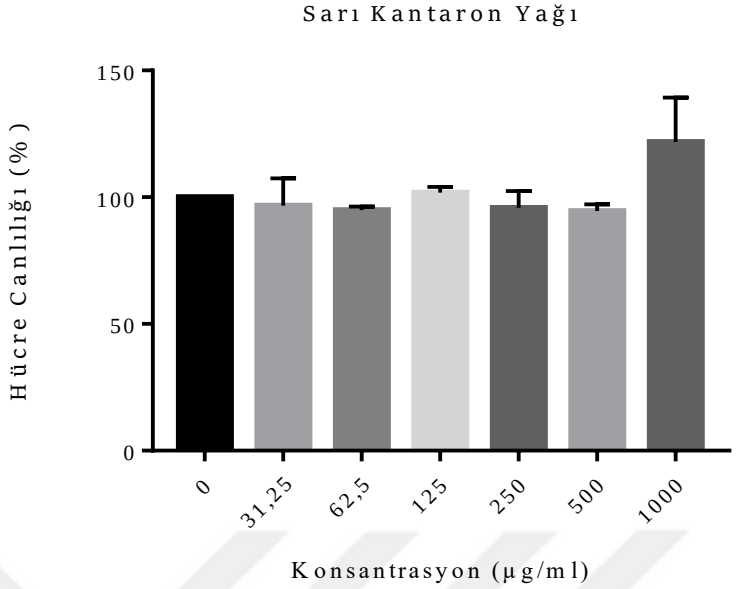
Grafik 4.3 MetOH özütünün MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

4.1.4 Sarı Kantaron Yağı

MIO-M1 hücreleri; 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron yağı ile 24 saat inkübe edilmiştir. Sarı Hücre morfolojilerinde (Şekil 4.4) ve hücre canlılık oranında (Grafik 4.4) kontrol hücrelere kıyasla sarı kantaron yağı ile muamele edilen hücrelerde değişiklik tespit edilmemiştir ve IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



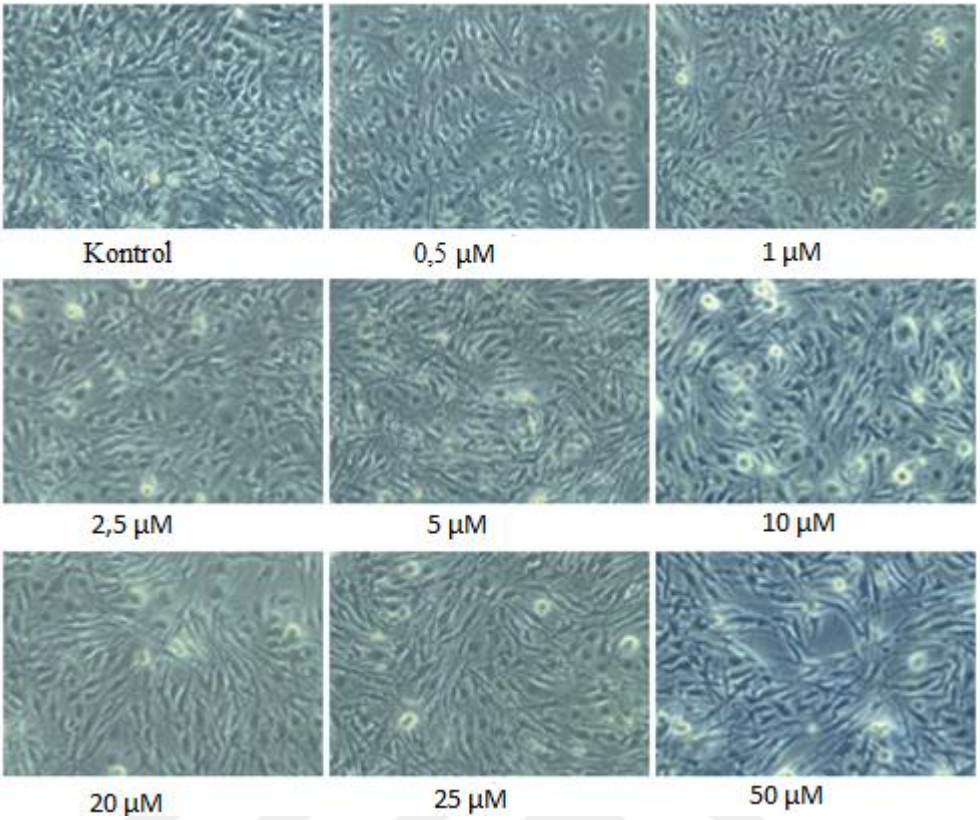
Şekil 4.4 Sarı kantaron yağı ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



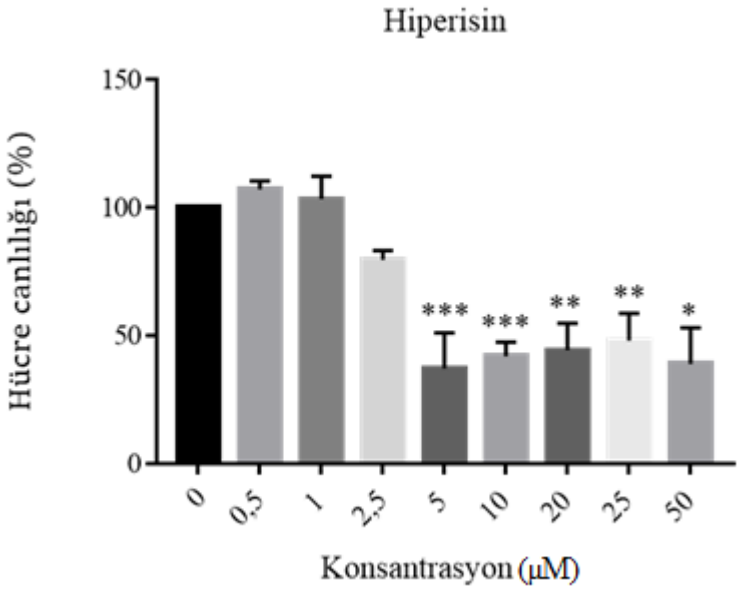
Grafik 4.4 Sarı kantaron yağının MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3).

4.1.5 Hiperisin

MIO-M1 hücreleri; 0,5-50 µM konsantrasyon aralığında hiperisin ile 24 saat inkübe edilmiştir. 0,5-1-2,5 µM konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. 5 µM hiperisin muamelesi ile hücrelerin %37,35'inin, 10 µM'da %42,09'unun, 20 µM'da %44,43'ünün, 25 µM'da %48,24'ünün ve 50 µM'da ise %39,02'sinin canlı kaldığı belirlenmiştir. IC_{50} değeri 12,83 µM olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.5). Hücre canlılık oranında gözlemlenen düşüş gözlenmiştir ancak anormal hücre morfolojisi tespit edilmemiştir (Şekil 4.5).



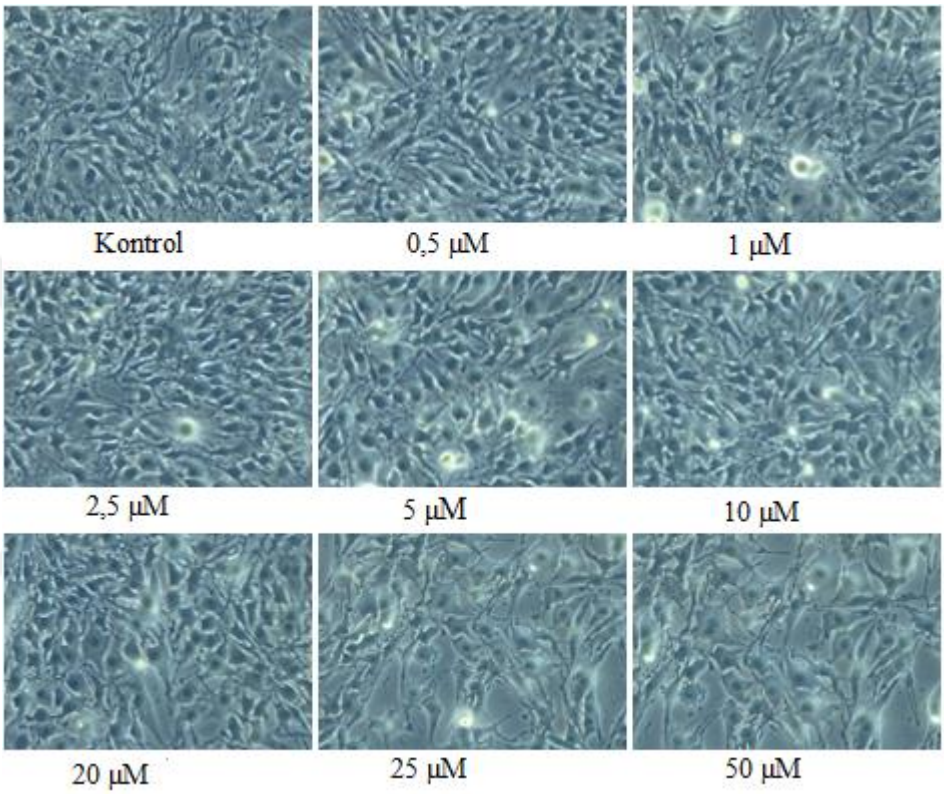
Şekil 4.5 Hiperisin ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



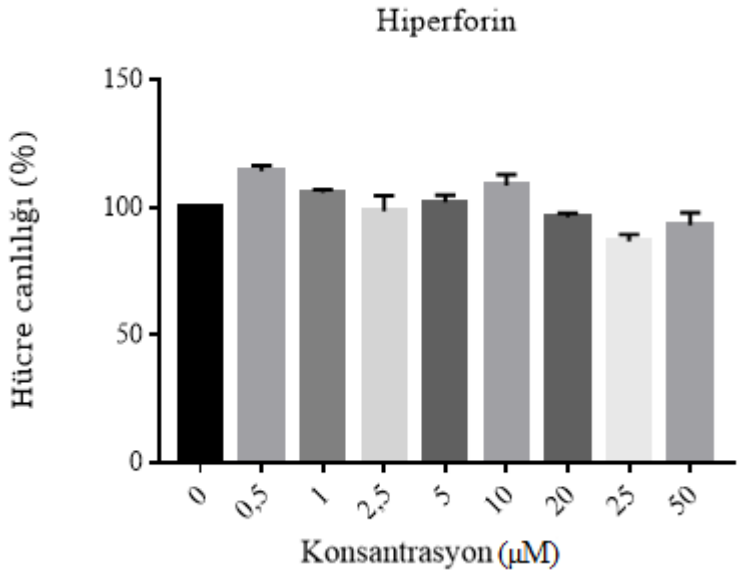
Grafik 4.5 Hiperisinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). *, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001

4.1.6 Hiperforin

MIO-M1 hücreleri; 0,5-50 µM konsantrasyon aralığında hiperforin ile 24 saat muamele edilmiştir. Hücre morfolojilerinde (Şekil 4.6) ve hücre canlılık oranında (Grafik 4.6) kontrol hücrelere kıyasla hiperforin ile muamele edilen hücrelerde değişiklik tespit edilmemiştir ve IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.6 Hiperforin ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri

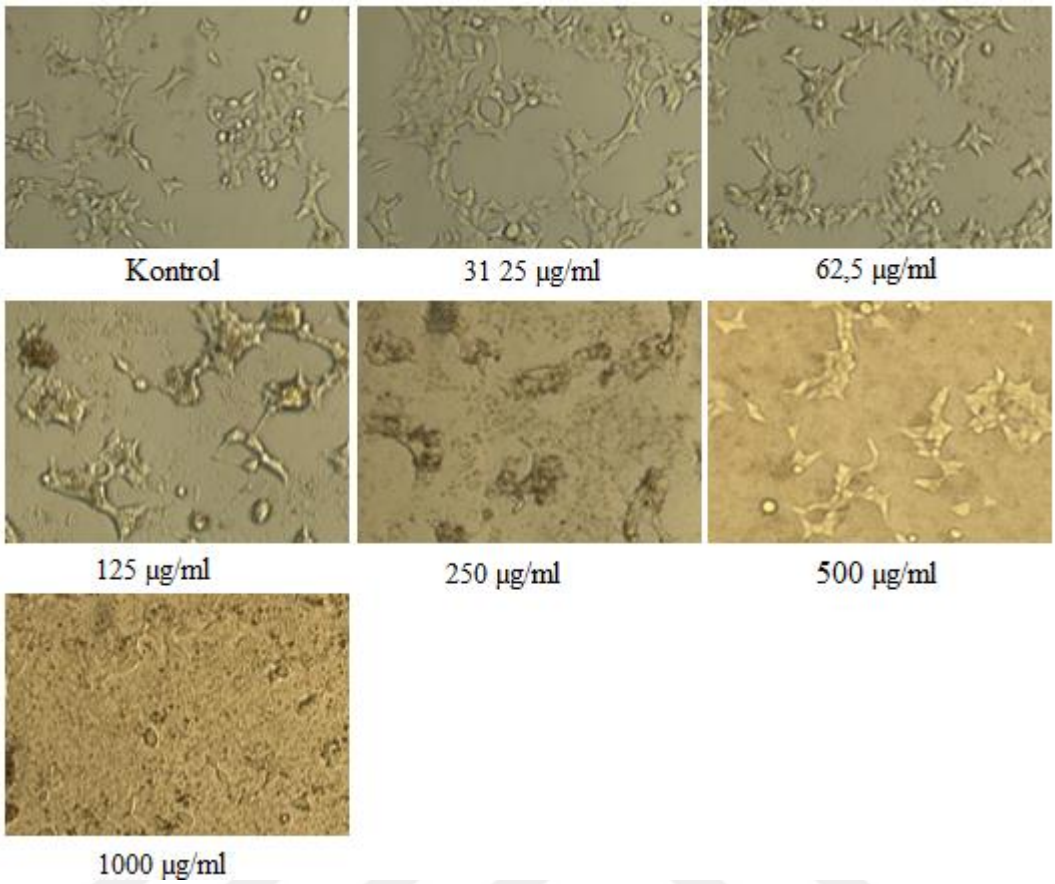


Grafik 4.6 Hiperforinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3).

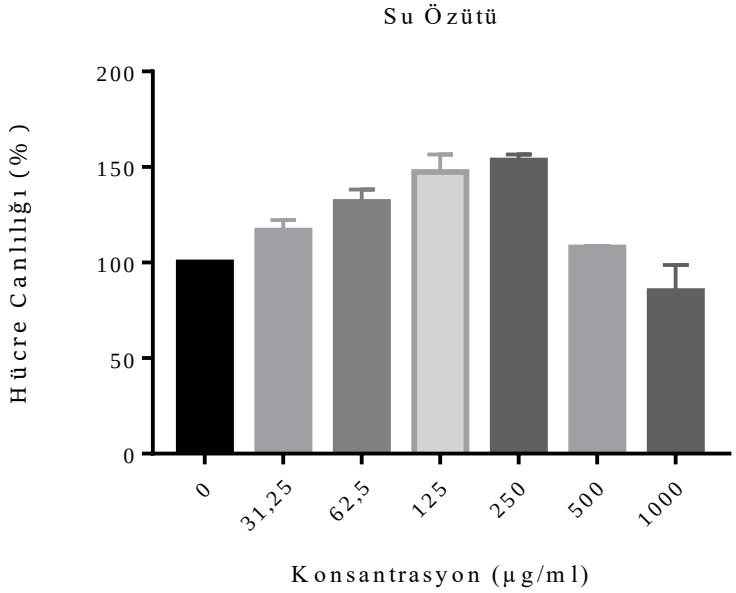
4.2 SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivite

4.2.1 Su Özütü

SH-SY5Y hücreleri; 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron su özütü ile 24 saat inkübe edilmiştir. Hücre morfolojilerinde (Şekil 4.7) kontrol hücrelere kıyasla su özütü ile muamele edilen hücrelerde değişiklik tespit edilmemiştir. Su özütü SH-SY5Y hücreleri üzerinde sitotoksik etkinlik göstermemiştir ve IC_{50} değeri hesaplanamamıştır (Grafik 4.7).



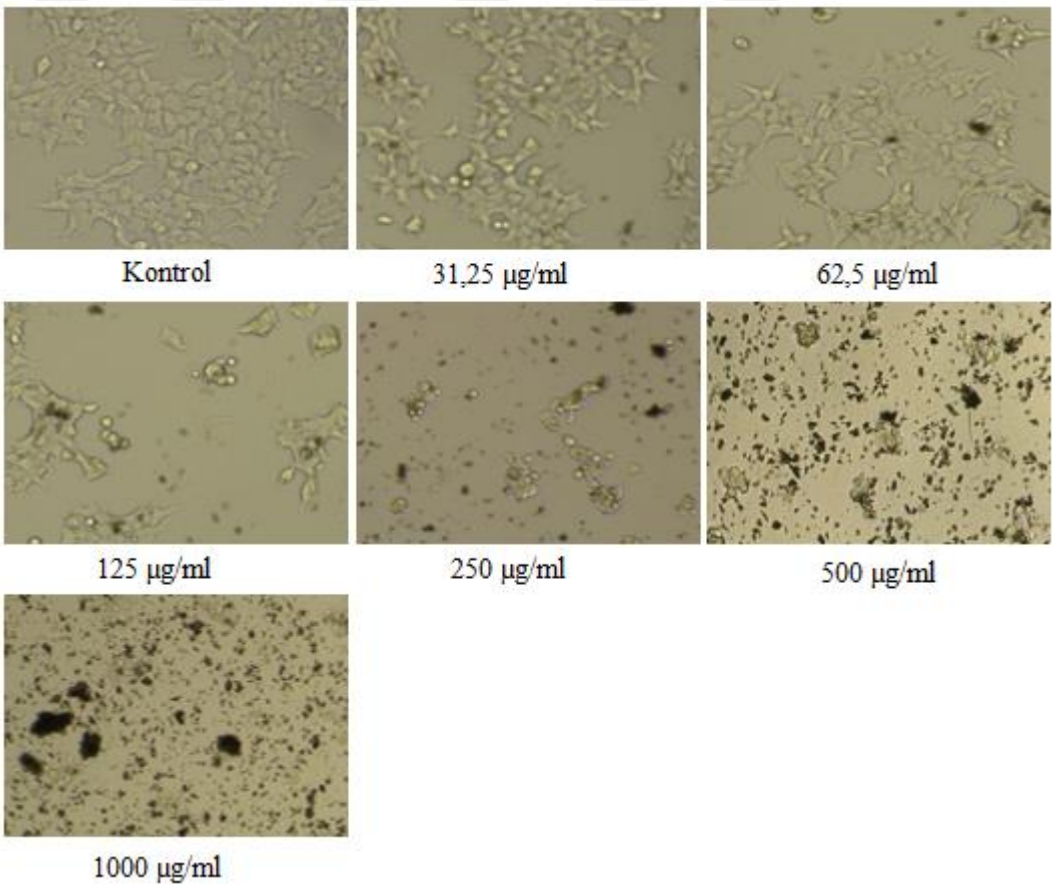
Şekil 4.7 Su özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



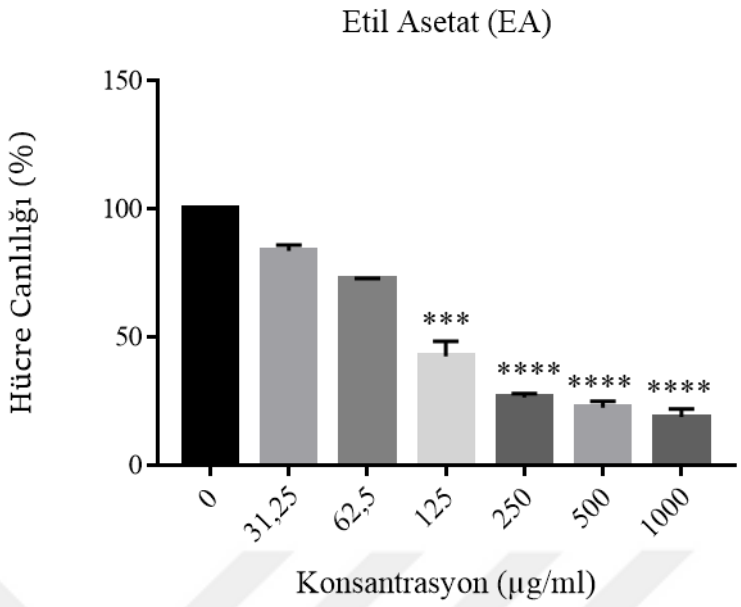
Grafik 4.7 Su özütünün SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3).

4.2.2 EA Özütü

SH-SY5Y hücreleri; 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron EA özütü ile 24 saat inkübe edilmiştir. EA özütü muamelesi ile SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı oranının azaldığı gözlenmiştir. 125 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının %50 altına düştüğü tespit edilmiştir. 125 µg/ml EA özütü muamelesi ile hücrelerin %42,62'sinin, 250 µg/ml'de EA özütü %26,62'sinin, 500 µg/ml'de %22,58'inin ve 1000 µg/ml'de ise %18,78'inin canlı kaldığı belirlenmiştir. IC_{50} değeri 123,5 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.8). Hücre canlılık oranında azalma ve hücre morfolojilerinde anormallikler saptanmıştır (Şekil 4.8).



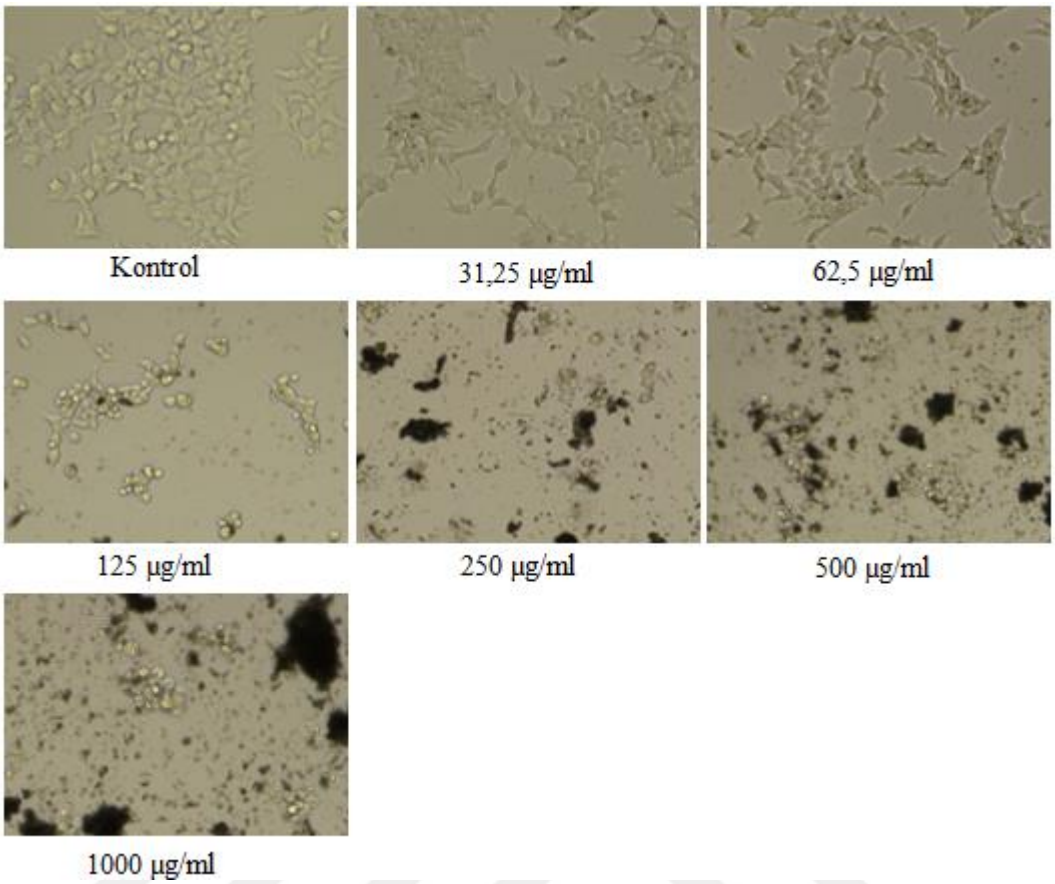
Şekil 4.8 EA özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



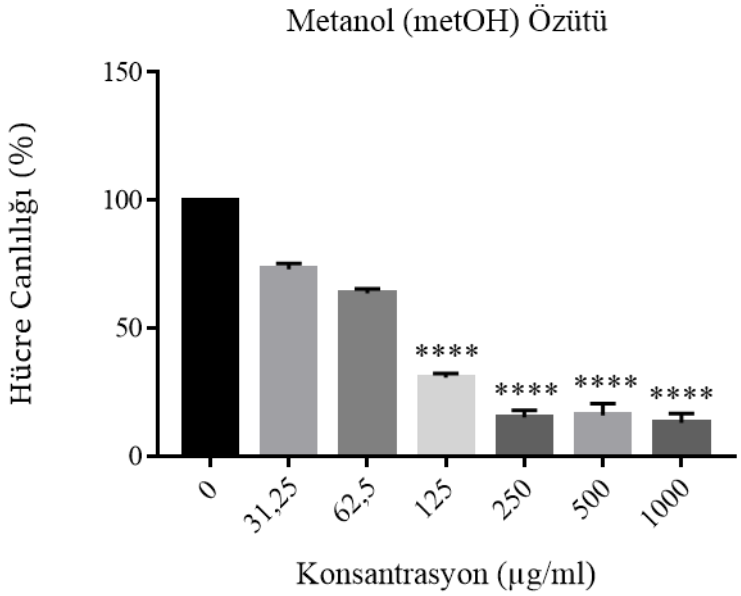
Grafik 4.8 EA özütünün SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ***, p<0,001; ****, p<0,0001

4.2.3 MetOH Özütü

SH-SY5Y hücreleri; 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron metOH özütü ile 24 saat inkübe edilmiştir. MetOH özütü muamelesi ile SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı oranının azaldığı gözlenmiştir. 125 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının %50 altına düştüğü tespit edilmiştir. 125 µg/ml metOH özütü muamelesi ile hücrelerin %30,86'sının, 250 µg/ml metOH özütü muamelesi ile %15,34'ünün, 500 µg/ml'de %16,01'inin ve 1000 µg/ml'de ise %13,22'sinin canlı kaldığı belirlenmiştir. IC_{50} değeri 78,82 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.9). Hücre canlılık oranında azalma ve hücre morfolojilerinde anormallikler saptanmıştır (Şekil 4.9).



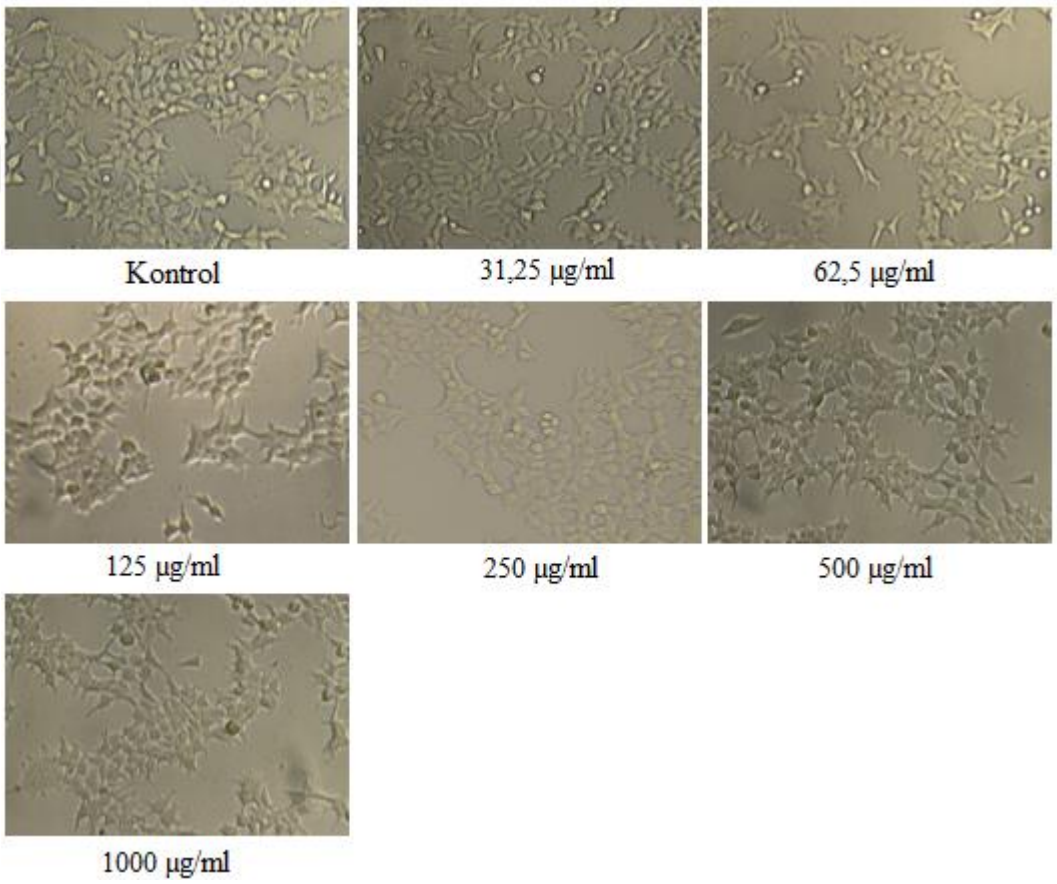
Şekil 4.9 MetOH özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



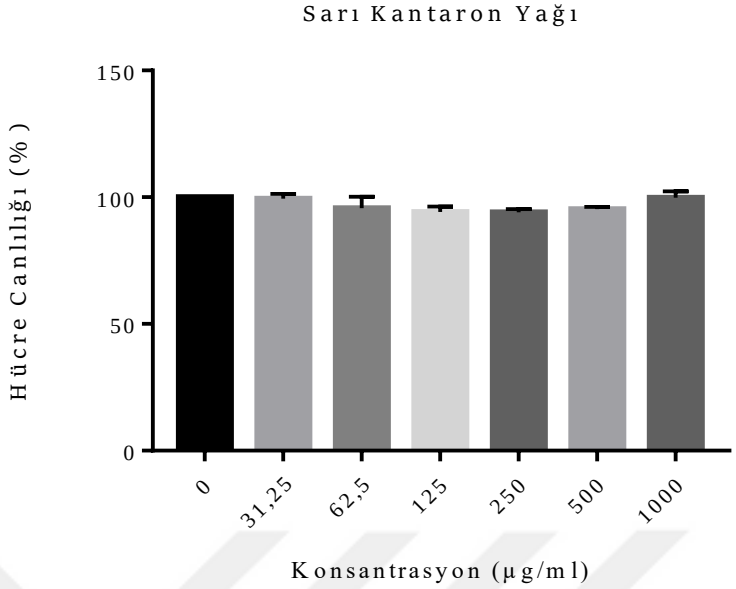
Grafik 4.9 MetOH özütünün SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

4.2.4 Sarı Kantaron Yağı

SH-SY5Y hücreleri; 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron yağı ile 24 saat muamele edilmiştir. Hücre morfolojilerinde (Şekil 4.10) ve hücre canlılık oranında (Grafik 4.10) kontrol hücrelere kıyasla sarı kantaron yağı ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde değişiklik tespit edilmemiştir ve IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



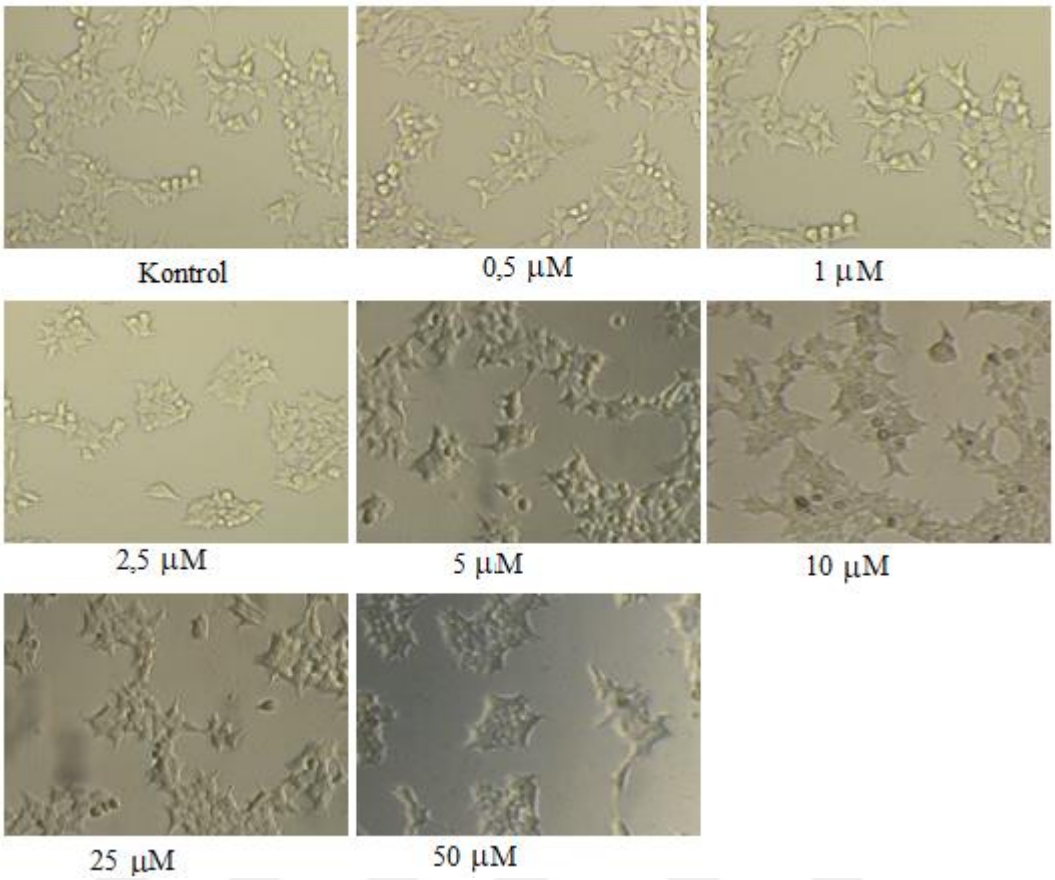
Şekil 4.10 Sarı kantaron yağı ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



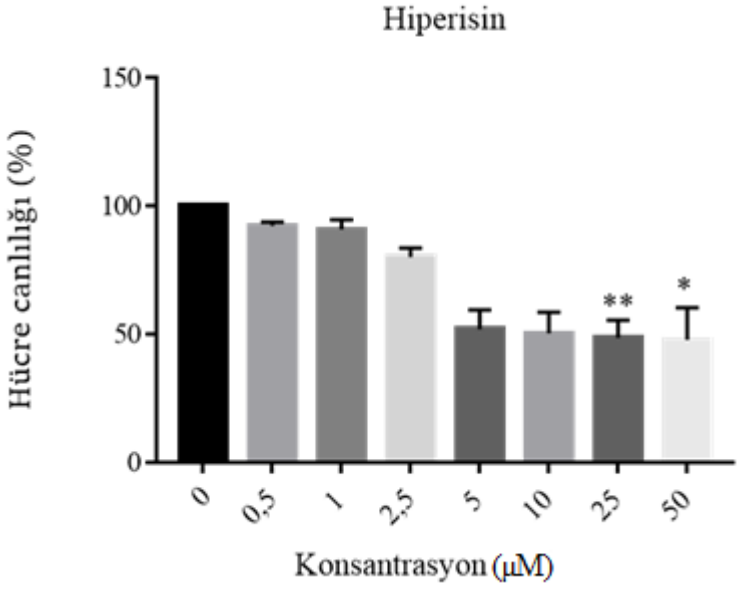
Grafik 4.10 Sarı kantaron yağının SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3).

4.2.5 Hiperisin

SH-SY5Y hücreleri; 0,5-50 µM konsantrasyon aralığında hiperisin ile 24 saat muamele edilmiştir. 0,5 µM, 1 µM ve 2,5 µM konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. 5 µM hiperisin muamelesi ile hücrelerin %52,09'unun, 10 µM'da %50,39'unun, 25 µM'da %48,73'ünün ve 50 µM'da ise %47,88'inin canlı kaldığı belirlenmiştir. IC_{50} değeri 20,37 µM olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.11). Hücre canlılık oranında düşüş gözlenmiştir ancak hücre morfolojilerinde anormallikler tespit edilmemiştir (Şekil 4.11).



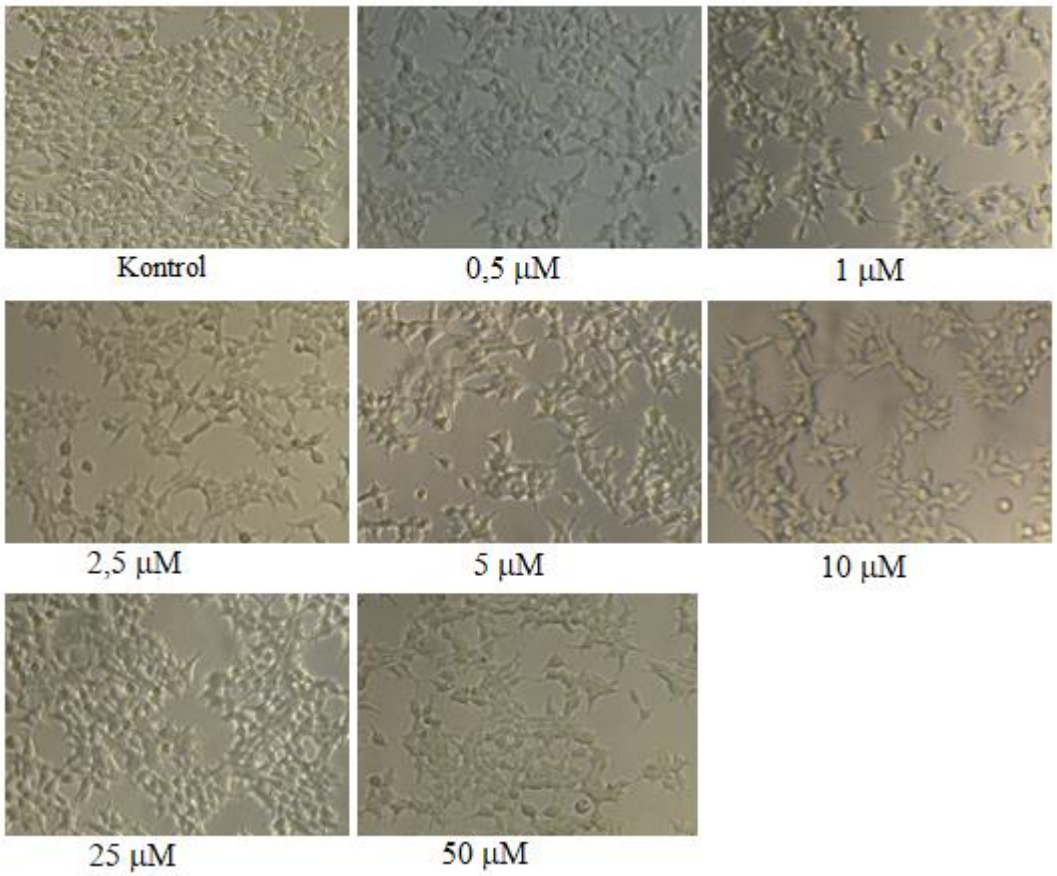
Şekil 4.11 Hiperisin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



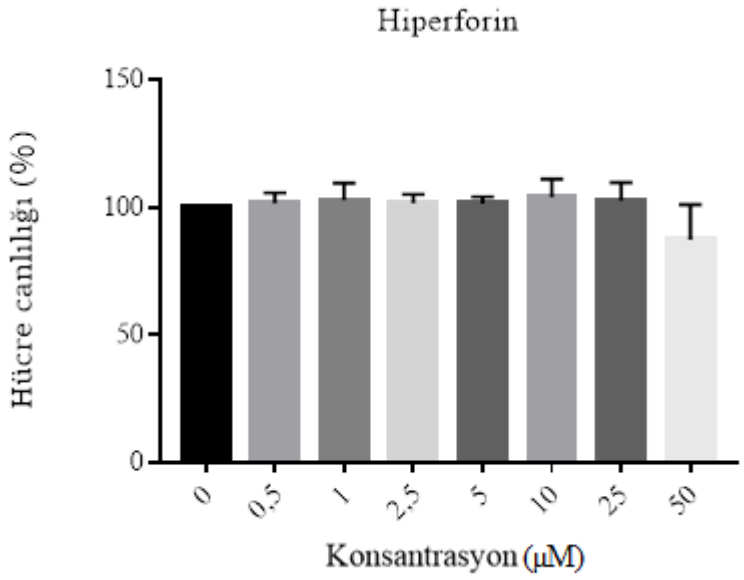
Grafik 4.11 Hiperisinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). *, p<0,5; **, p<0,01

4.2.6 Hiperforin

SH-SY5Y hücreleri; 0,5-50 µM konsantrasyon aralığında hiperforin ile 24 saat inkübe edilmiştir. Hücre morfolojilerinde (Şekil 4.12) ve hücre canlılık oranında (Grafik 4.12) kontrol hücrelere kıyasla hiperforin ile muamele edilen hücrelerde değişiklik tespit edilmemiştir ve IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



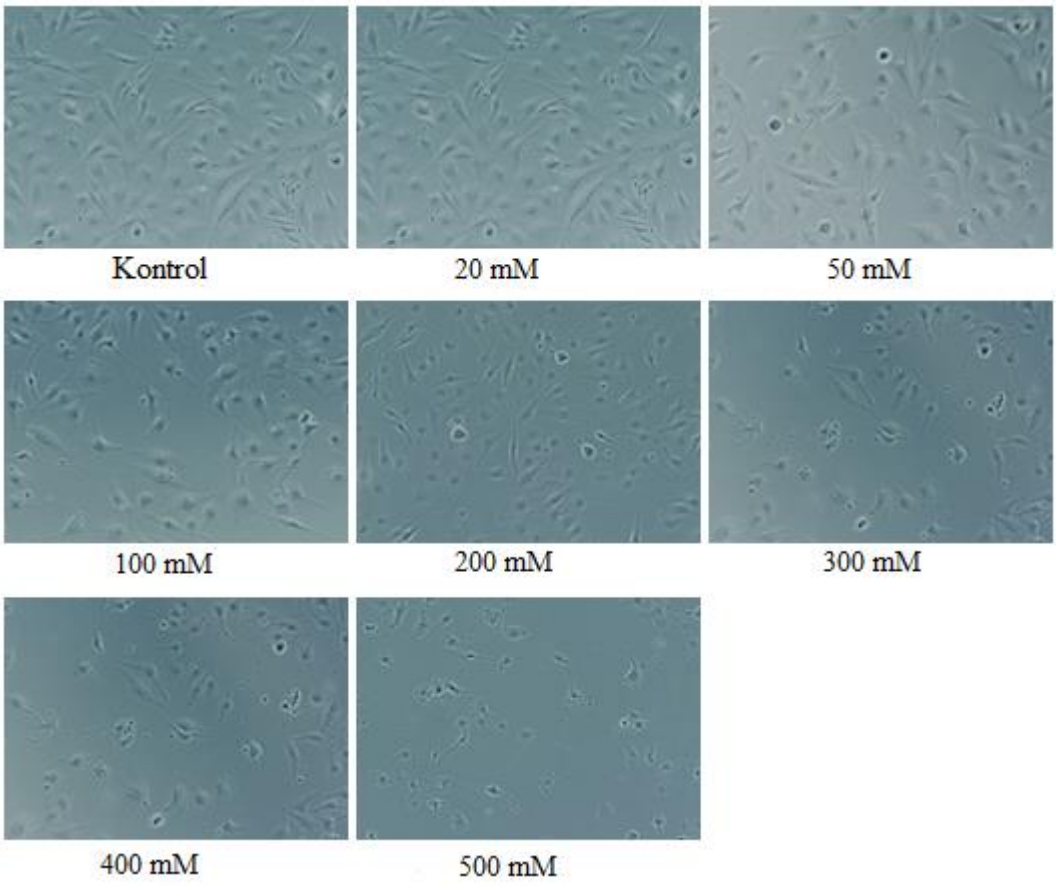
Şekil 4.12 Hiperforin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



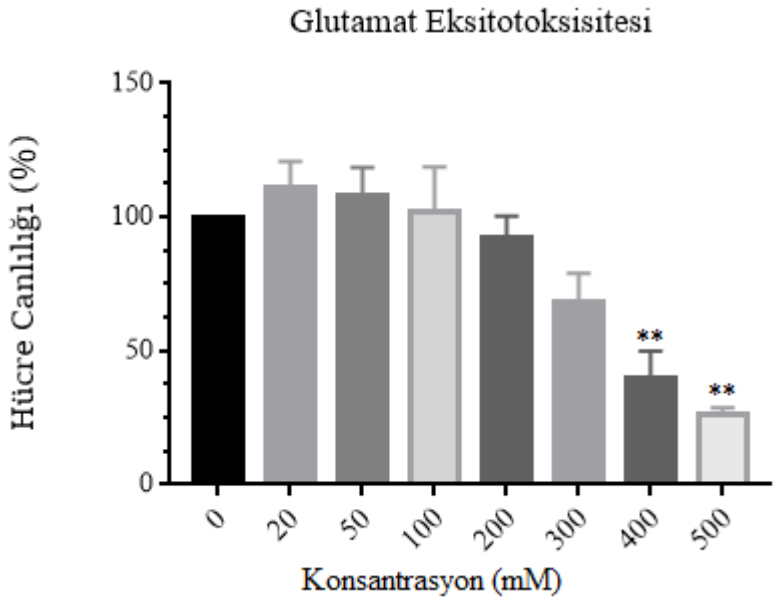
Grafik 4.12 Hiperforinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3).

4.3 MIO-M1 Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesi

MIO-M1 hücrelerinde glutamat eksitotoksisite modeli oluşturmak için hücreler 0, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mM glutamat ile 4 saat inkübe edilmiştir. MTT analizi ile hücre canlılığındaki değişiklikler analiz edilmiştir. Kontrol hücrelere kıyasla 20, 50, 100 ve 200 mM konsantrasyonlarda hücre morfolojisi ve hücre canlılığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. 300 mM glutamat muamelesi ile hücrelerin %68,32'sinin, 400 mM glutamat muamelesi ile hücrelerin %39,79'unun ve 500 mM glutamat muamelesi ile hücrelerin %25,91'inin canlı kaldığı belirlenmiştir. IC_{50} değeri 367,5 mM olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.13). Hücre canlılık oranında görülen azalma ile birlikte hücre morfolojilerinde de anormallikler saptanmıştır (Şekil 4.13).



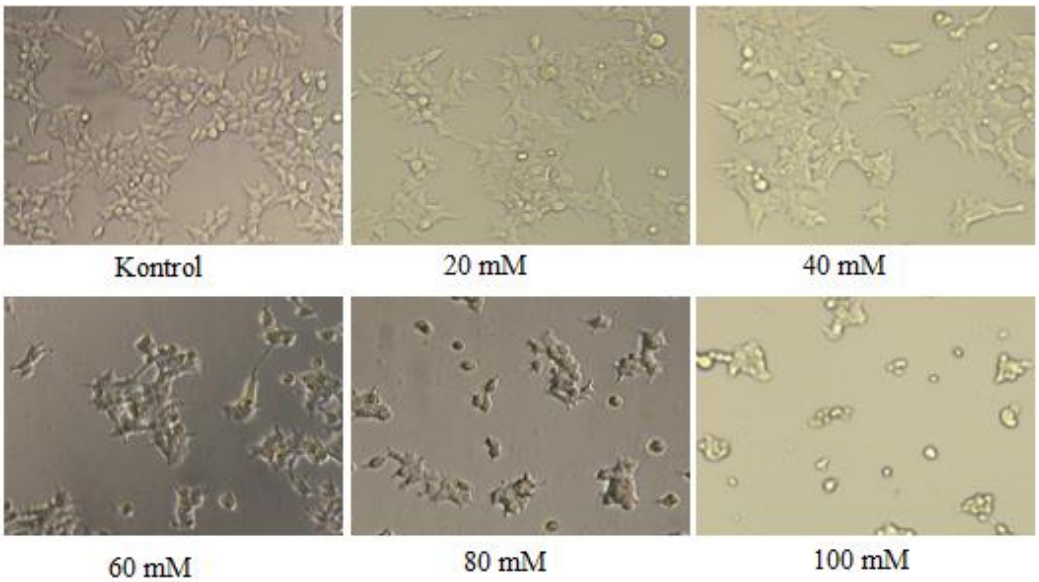
Şekil 4.13 Glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



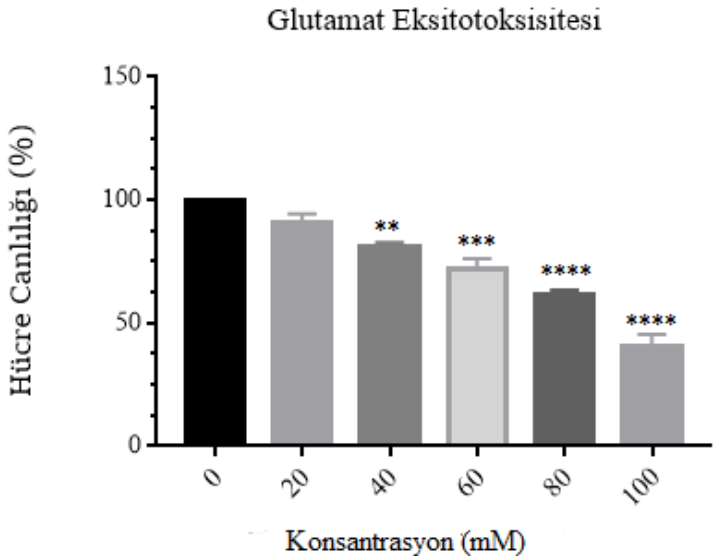
Grafik 4.13 Glutamatın MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). **, p<0,01

4.4 SH-SY5Y Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesi

SH-SY5Y hücrelerinde glutamat eksitotoksisite modeli oluşturmak için hücreler 0, 20, 40, 60, 80, 100 mM glutamat ile 24 saat inkübe edilmiştir. MTT analizi ile hücre canlılığındaki değişiklikler analiz edilmiştir. Glutamat konsantrasyonuna bağlı olarak SH-SY5Y hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. 100 mM glutamat muamelesi hücrelerin morfolojisini değiştirmiş (Şekil 4.14) ve hücre canlılığı oranı %40,85'e düşmüştür. IC_{50} değeri 91,95 mM olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.14).



Şekil 4.14 Glutamat ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



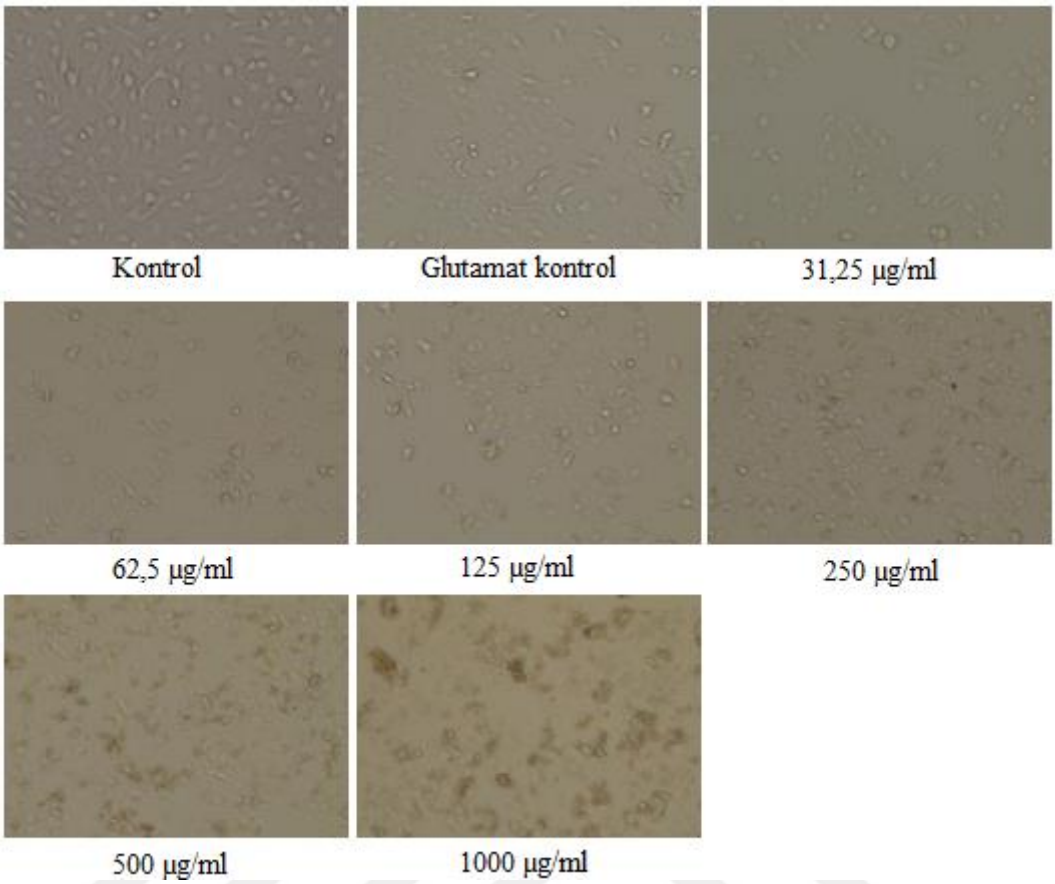
Grafik 4.14 Glutamatın SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p<0,0001

4.5 MIO-M1 Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesine Karşı Koruma Aktivitesi

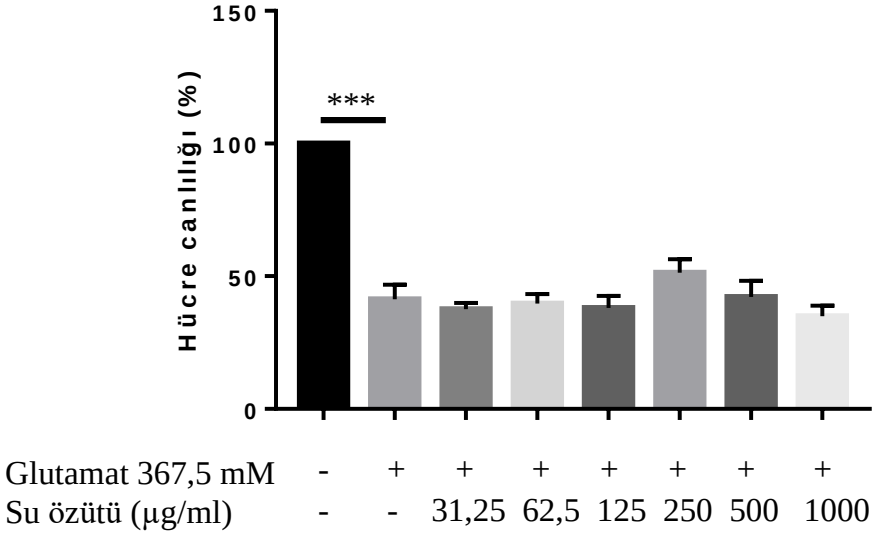
Glutamat eksitotoksisitesinin önlenmesi retina hastalıklarının tedavisi için potansiyel bir yaklaşımdır. Sarı kantaron özütleri, sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforinin koruyucu etkileri glutamat eksitotoksisitesi modeli oluşturularak MIO-M1 glia hücrelerinde analiz edilmiştir. Koruma deneylerinde özütlerin, sarı kantaron yağının, hiperisin ve hiperforinin sitotoksisite analizlerine göre toksik etkinlik göstermeyen konsantrasyonları kullanılmıştır.

4.5.1 Su Özütü

MIO-M1 hücreleri 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında su özütü ile 24 saat boyunca ön inkübasyon sonrasında, 367,5 mM glutamat ile 4 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. PBS kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %41.36'ya düşürmüştür (Grafik 4.15). Uygulanan tüm su özütü konsantrasyonlarında hücre canlılığı glutamat kontrol seviyesinde kalmıştır. Su özütü ile ön inkübasyon yapıldığında, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Grafik 4.15). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



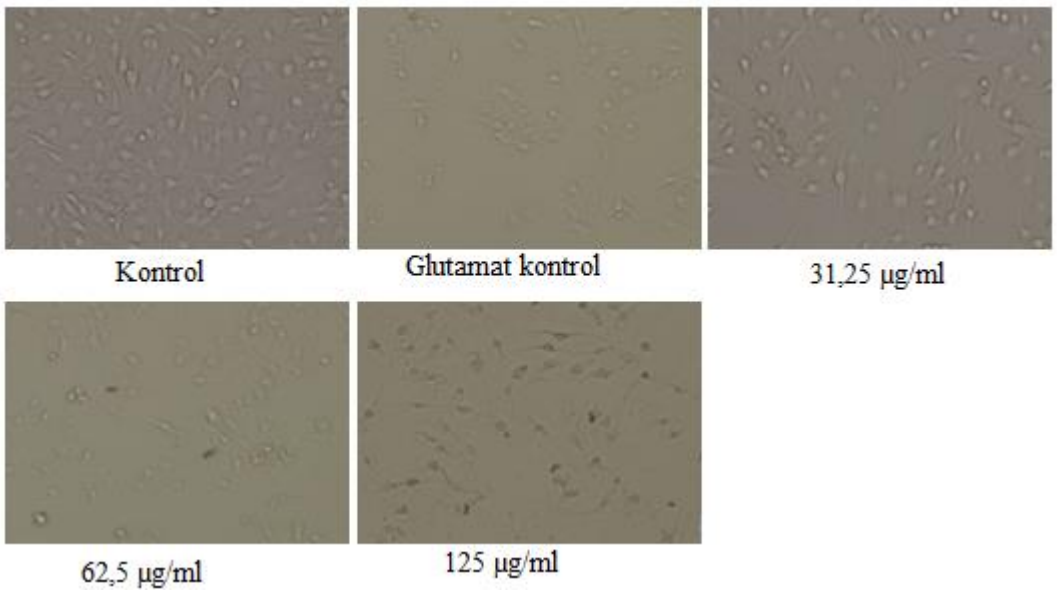
Şekil 4.15 Su özütü ve glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



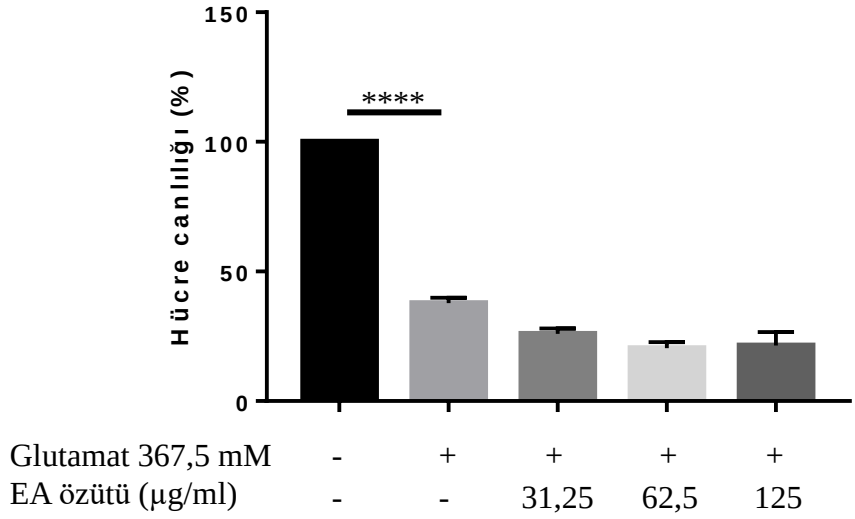
Grafik 4.15 Su özütü ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ***, p<0,001

4.5.2 EA Özütü

MIO-M1 hücreleri 31,25-125 µg/ml konsantrasyon aralığında EA özütü ile 24 saat boyunca ön inkübasyon sonrasında, 367,5 mM glutamat ile 4 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. DMSO kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %38'e düşürmüştür (Grafik 4.16). EA özütü uygulanan tüm konsantrasyonlarda, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir (Grafik 4.16). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



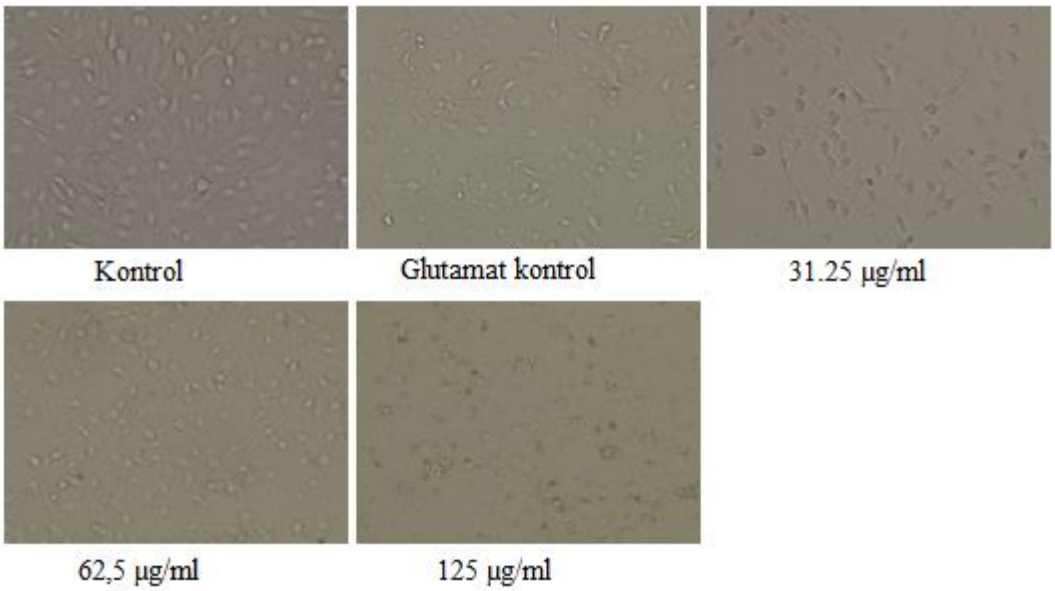
Şekil 4.16 EA özütü ve glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



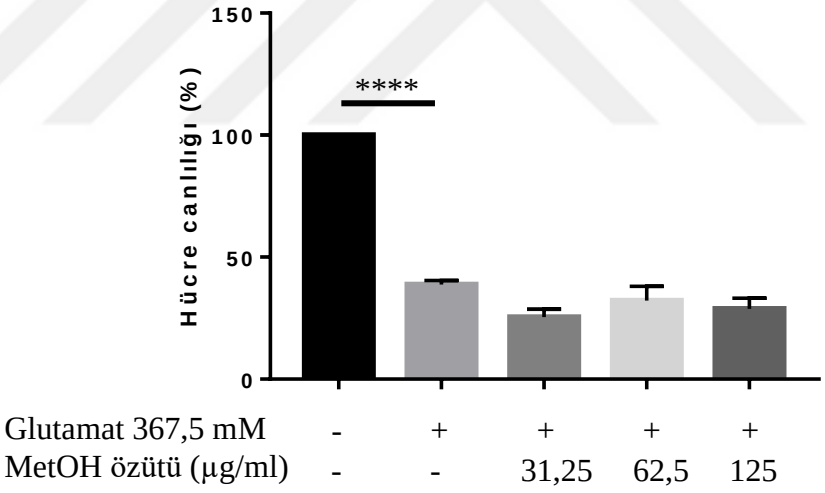
Grafik 4.16 EA özütü ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

4.5.3 MetOH Özütü

MIO-M1 hücreleri 31,25-125 µg/ml konsantrasyon aralığında metOH özütü ile 24 saat boyunca ön inkübasyon sonrasında, 367,5 mM glutamat ile 4 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. DMSO kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %38,85'e düşürmüştür (Grafik 4.17). MetOH özütü uygulanan tüm konsantrasyonlarda, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir (Grafik 4.17). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17 MetOH özütü ve glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri

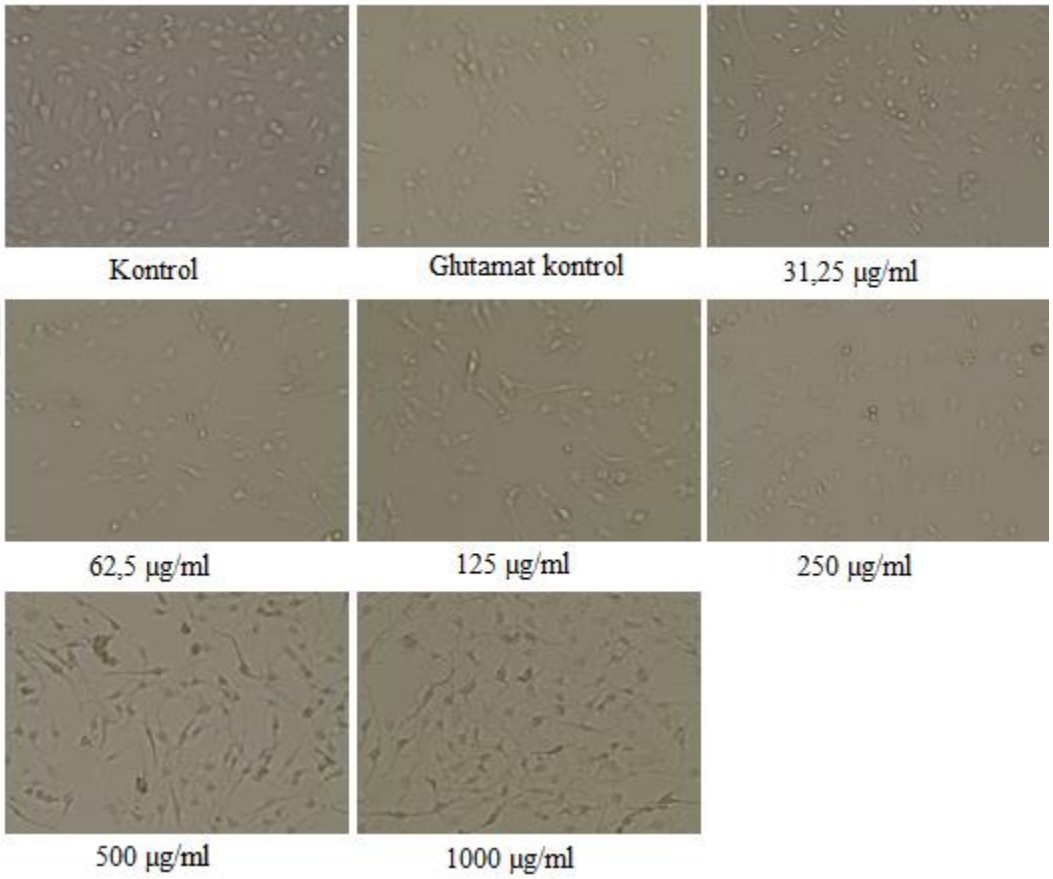


Grafik 4.17 MetOH ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

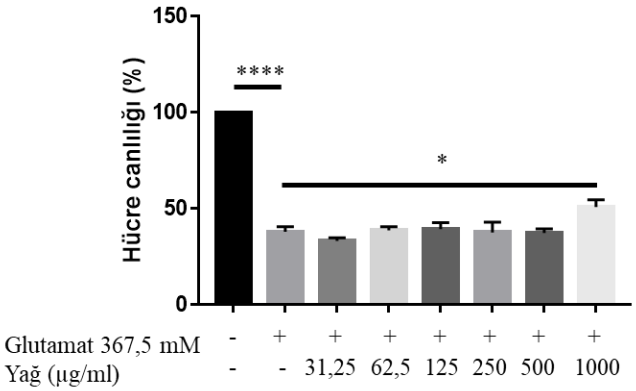
4.5.4 Sarı Kantaron Yağı

MIO-M1 hücreleri 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron yağı ile 24 saat boyunca ön inkübasyon sonrasında, 367,5 mM glutamat ile 4 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. DMSO kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %38,04'e düşürmüştür (Grafik 4.18). Sarı kantaron

yağının 1000 µg/ml konsantrasyonu ile ön inkübasyon yapıldığında, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında %13 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (Grafik 4.18). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



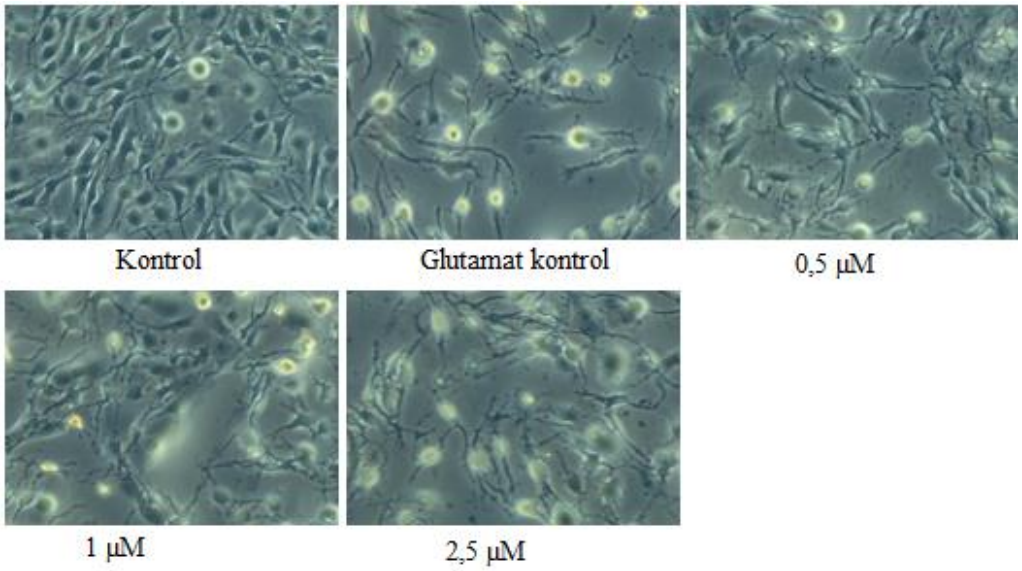
Şekil 4.18 Sarı kantaron yağı ve glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



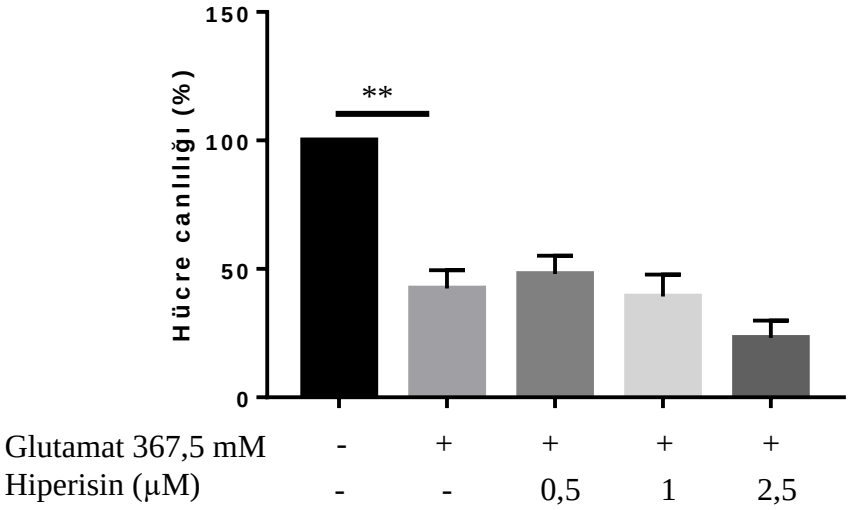
Grafik 4.18 Sarı kantaron yağı ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). *, p<0,05; ****, p<0,0001

4.5.5 Hiperisin

MIO-M1 hücreleri 0,5-2,5 µM konsantrasyon aralığında hiperisin ile 24 saat boyunca ön inkübasyon sonrasında, 367,5 mM glutamat ile 4 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. DMSO kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %42,45'e düşürmüştür (Grafik 4.19). Hiperisin uygulanan tüm konsantrasyonlarda, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir (Grafik 4.19). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



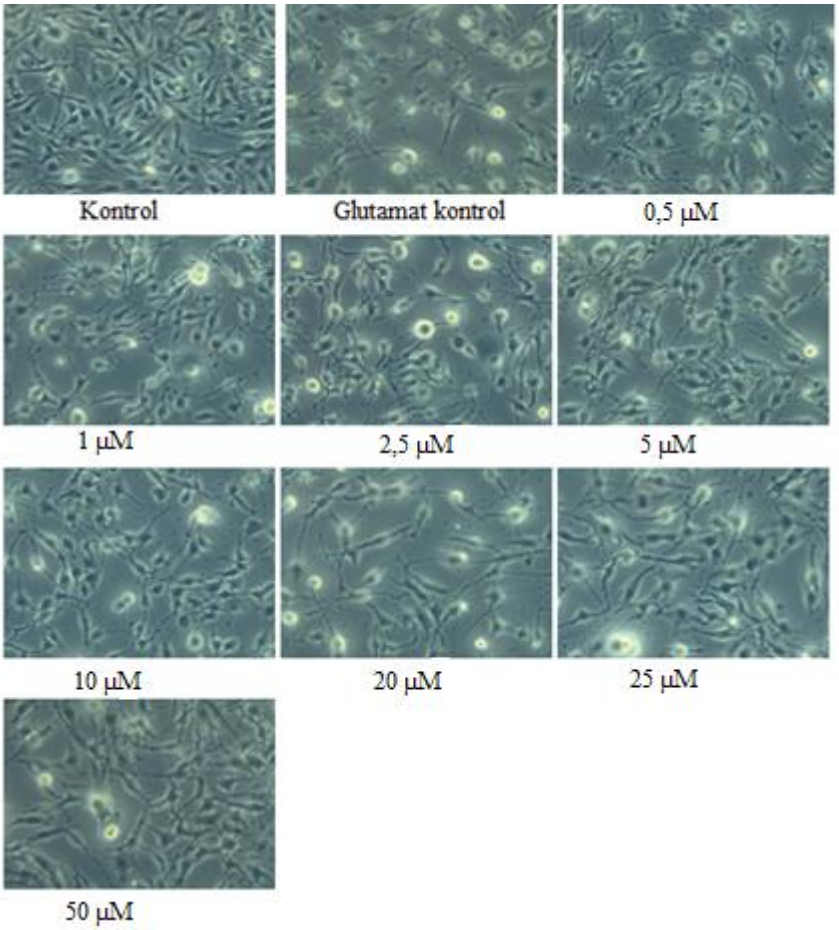
Şekil 4.19 Hiperisin ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



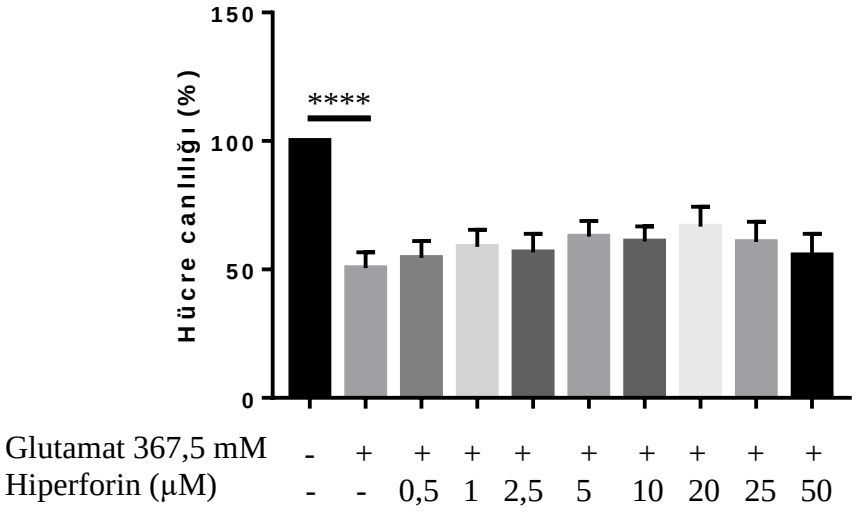
Grafik 4.19 Hiperisin ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). **, p<0,01

4.5.6 Hiperforin

MIO-M1 hücreleri 0,5-50 μM konsantrasyon aralığında hiperforin ile 24 saat boyunca ön inkübasyon sonrasında, 367,5 mM glutamat ile 4 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. PBS kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %44,61 düşürmüştür (Grafik 4.20). Uygulanan tüm hiperforin konsantrasyonlarında hücre canlılığı glutamat kontrol seviyesinde kalmıştır. Hiperforin ile ön inkübasyon yapıldığında, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Grafik 4.20). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20 Hiperforin ile muamele edilen MIO-M1 hücrelerinin morfolojileri



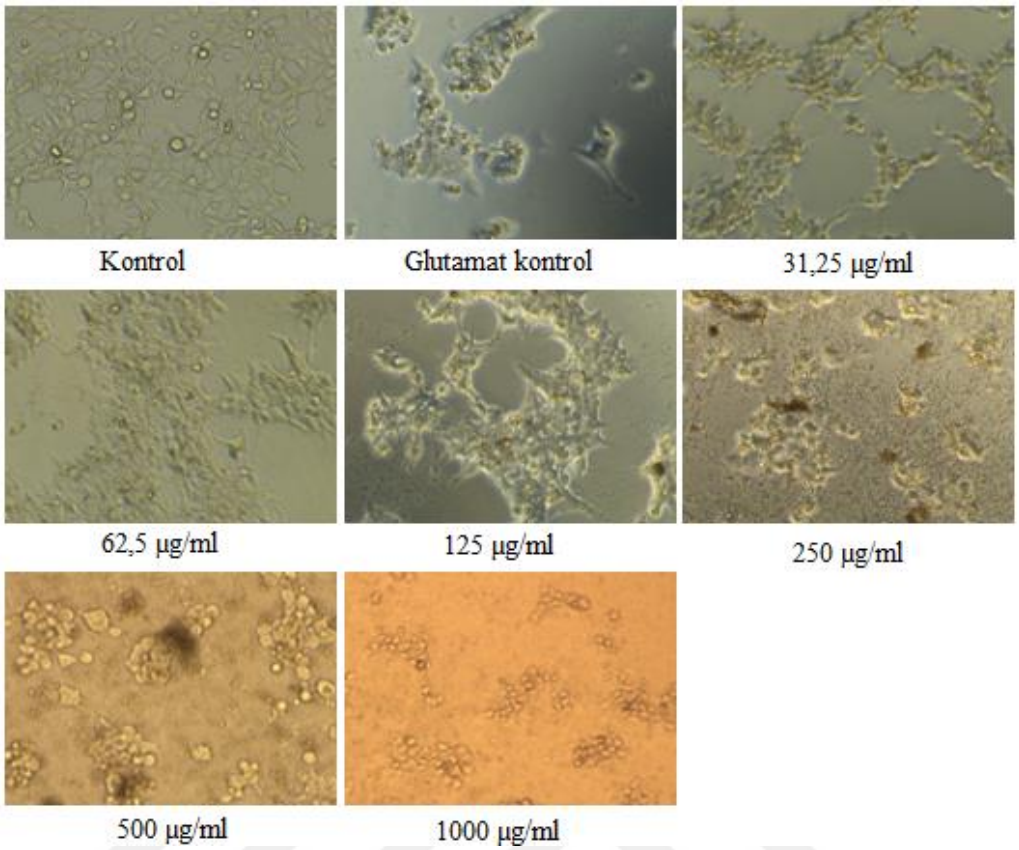
Grafik 4.20 Hiperforin ve glutamat muamelesinin MIO-M1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

4.6 SH-SY5Y Hücrelerinde Glutamat Eksitotoksisitesine Karşı Koruma Aktivitesi

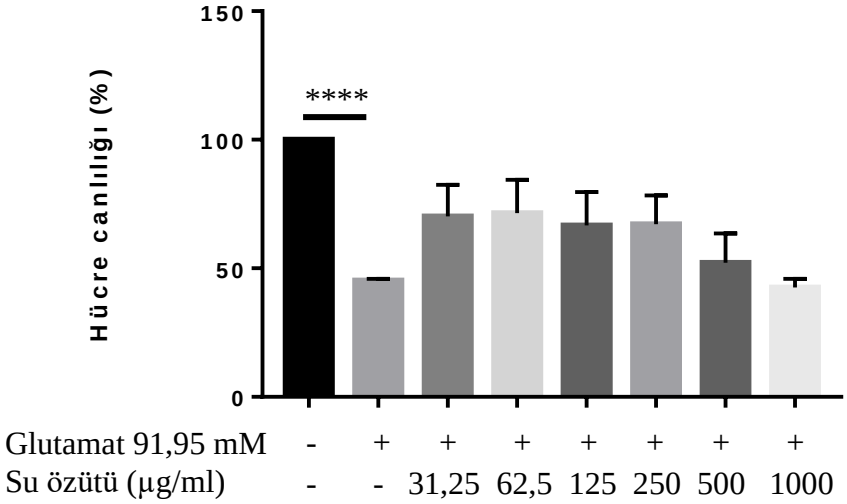
Sarı kantaron su, etil asetat, metanol özütleri, sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforinin glutamat eksitotoksisitesine karşı koruyucu etkileri SH-SY5Y nöron hücrelerinde analiz edilmiştir. Koruma deneylerinde özütlerin, sarı kantaron yağının, hiperisin ve hiperforinin sitotoksisite analizlerine göre toksik etkinlik göstermeyen konsantrasyonları kullanılmıştır.

4.6.1 Su Özütü

SH-SY5Y hücreleri 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında su özütü ile 24 saat ön inkübasyon sonrasında, 91,95 mM glutamat ile 24 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. PBS kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %45,28 düşürmüştür (Grafik 4.21). Su özütünün 31,25-62,5-125-250 µg/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığı glutamat kontrol seviyesine kıyasla artış göstermesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir. (Grafik 4.21). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



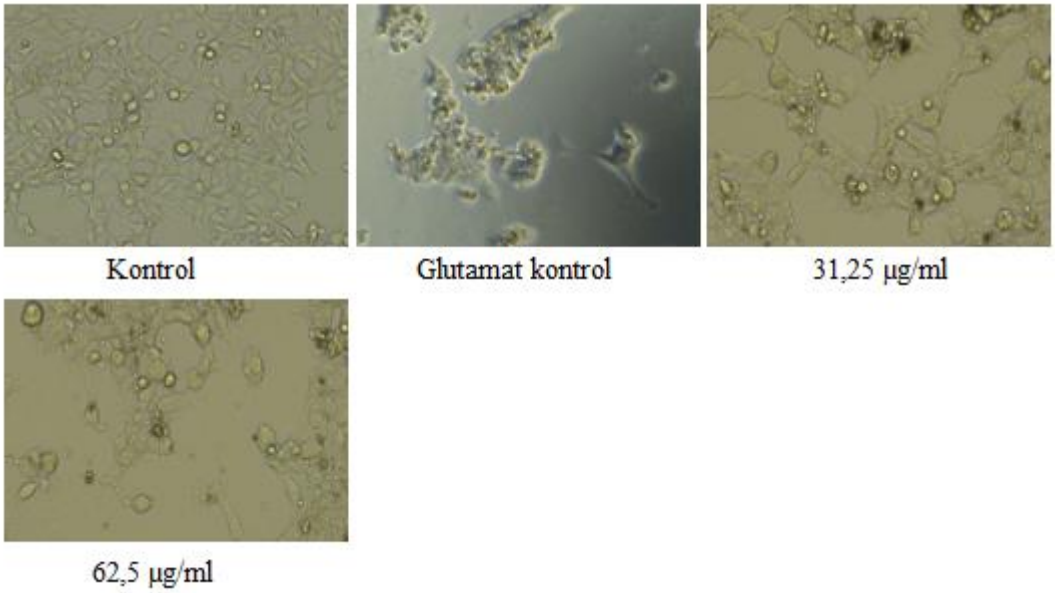
Şekil 4.21 Su özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



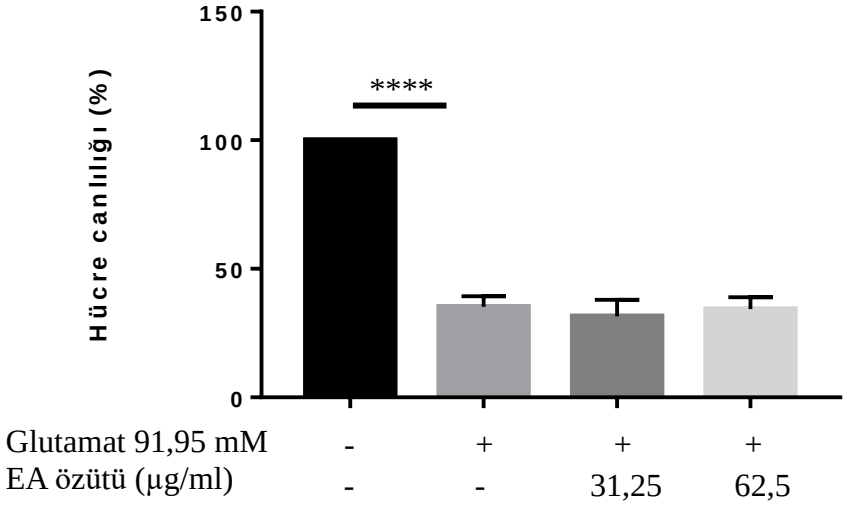
Grafik 4.21 Su özütü ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

4.6.2 EA Özütü

SH-SY5Y hücreleri 31,25 ve 62,5 µg/ml konsantrasyonlarda EA özütü ile 24 saat ön inkübasyon sonrasında, 91,95 mM glutamat ile 24 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. DMSO kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %45'e düşürmüştür (Grafik 4.22). Uygulanan tüm EA özütü konsantrasyonlarında hücre canlılığı glutamat kontrol seviyesinde kalmıştır. EA özütü ile ön inkübasyon yapıldığında, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Grafik 4.22). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



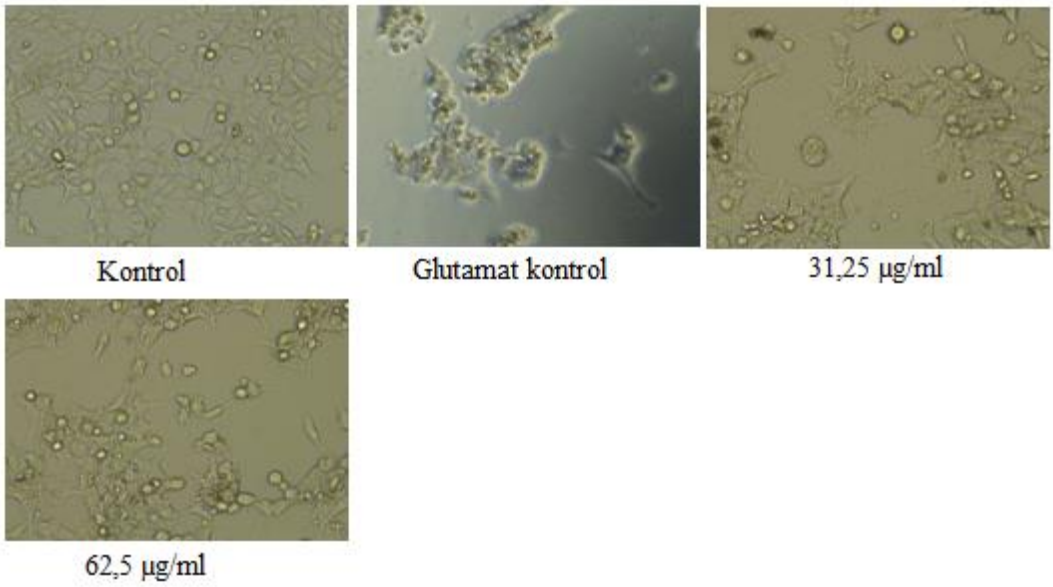
Şekil 4.22 EA özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



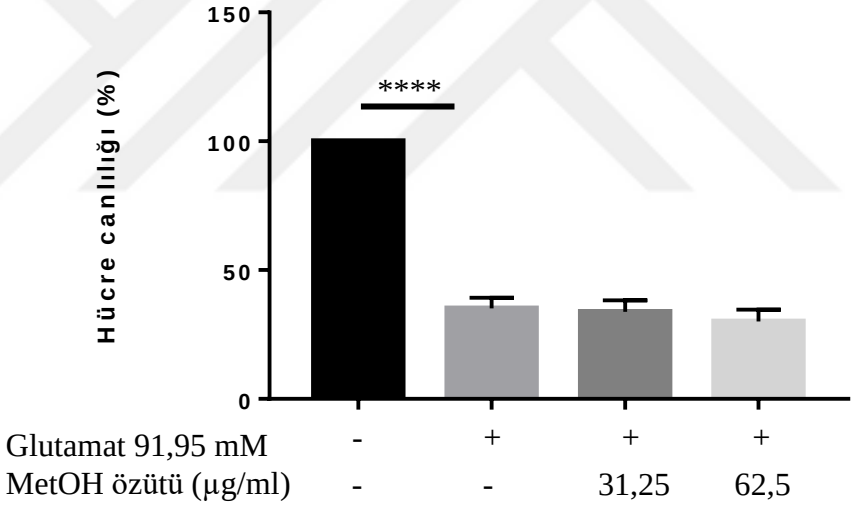
Grafik 4.22 EA özütü ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

4.6.3 MetOH Özütü

SH-SY5Y hücreleri 31,25 ve 62,5 µg/ml konsantrasyonlarda metOH özütü ile 24 saat ön inkübasyon sonrasında, 91,95 mM glutamat ile 24 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. DMSO kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %45'e düşürmüştür (Grafik 4.23). Uygulanan tüm metOH özütü konsantrasyonlarında hücre canlılığı glutamat kontrol seviyesinde kalmıştır. MetOH özütü ile ön inkübasyon yapıldığında, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Grafik 4.23). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



Şekil 4.23 MetOH özütü ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri

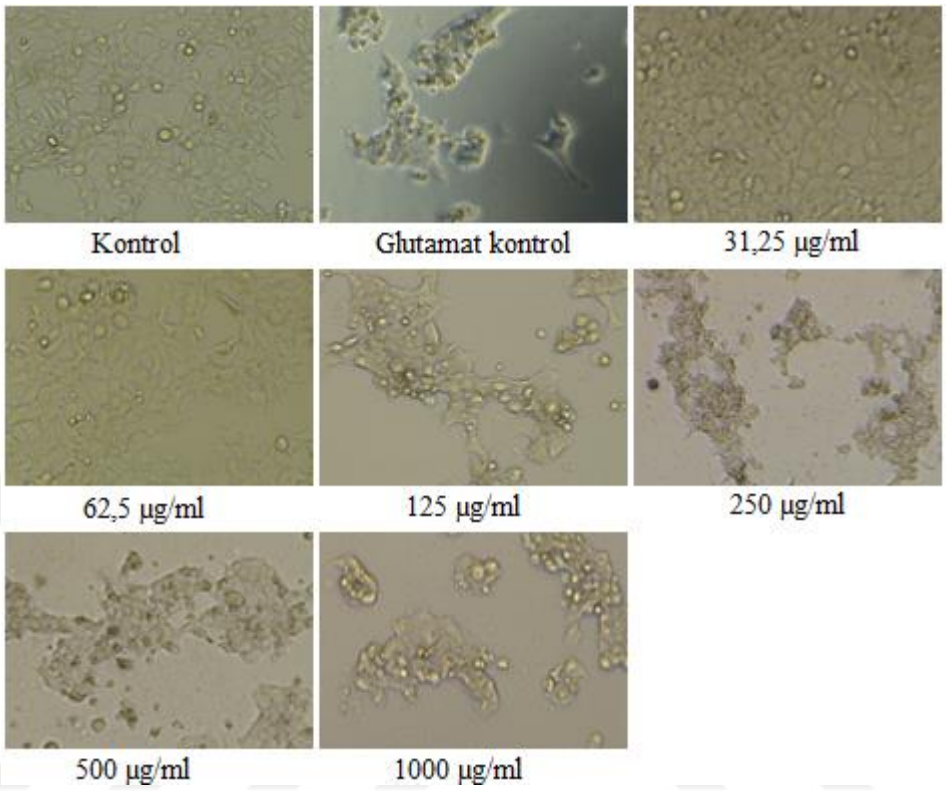


Grafik 4.23 MetOH özütü ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

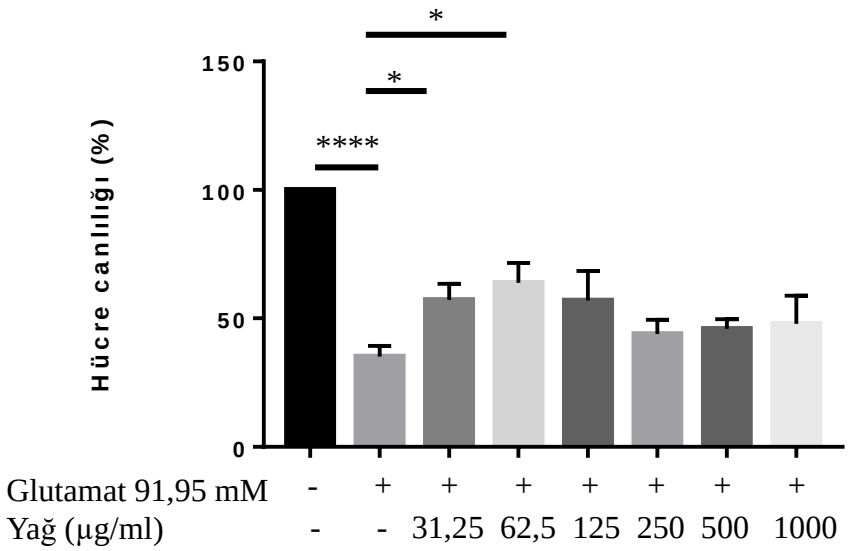
4.6.4 Sarı Kantaron Yağı

SH-SY5Y hücreleri 31,25-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sarı kantaron yağı ile 24 saat ön inkübasyon sonrasında, 91,95 mM glutamat ile 24 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. DMSO kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %45'e düşürmüştür (Grafik 4.24). Sarı kantaron yağının 31,25 µg/ml ve 62,5 µg/ml konsantrasyonları ile ön inkübasyon yapıldığında, sadece glutamat ile muamele edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığında sırasıyla %18 ve %21 oranında

istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir (Grafik 4.24). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



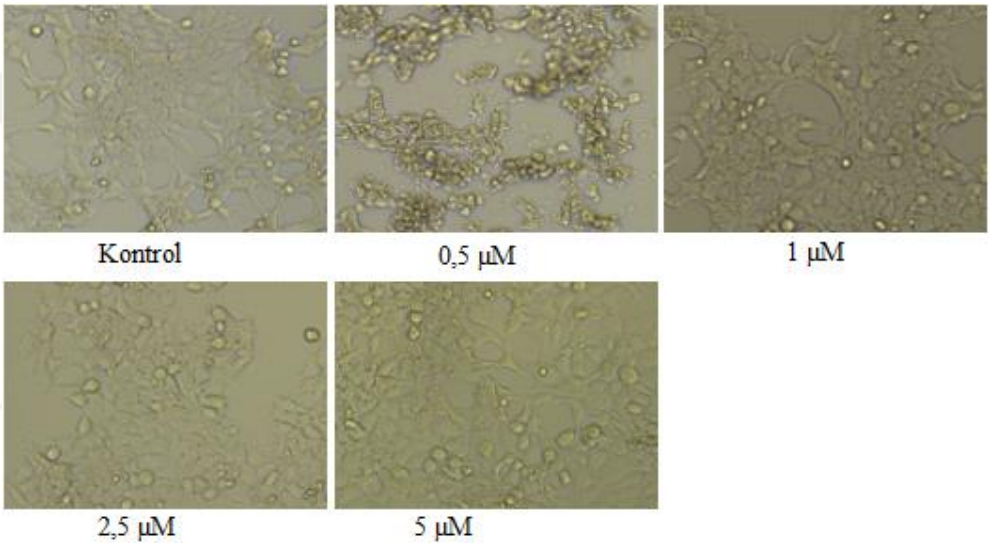
Şekil 4.24 Sarı kantaron yağı ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



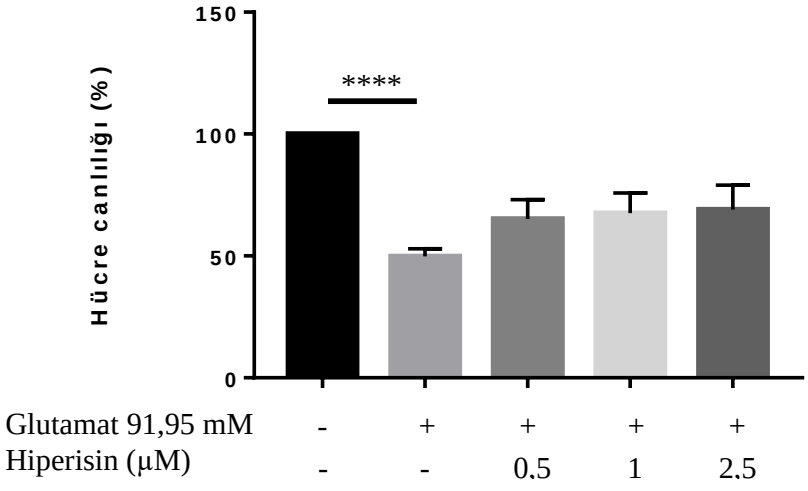
Grafik 4.24 Sarı kantaron yağı ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). *, p<0,05; ****, p<0,0001

4.6.5 Hiperisin

SH-SY5Y hücreleri 0,5-2,5 µM konsantrasyon aralığında hiperisin ile 24 saat ön inkübasyon sonrasında, 91,95 mM glutamat ile 24 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. DMSO kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %49 düşürmüştür (Grafik 4.25). Hiperisinin uygulanan tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığı glutamat kontrol seviyesine kıyasla artış göstermesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir. (Grafik 4.25). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.25'de gösterilmiştir.



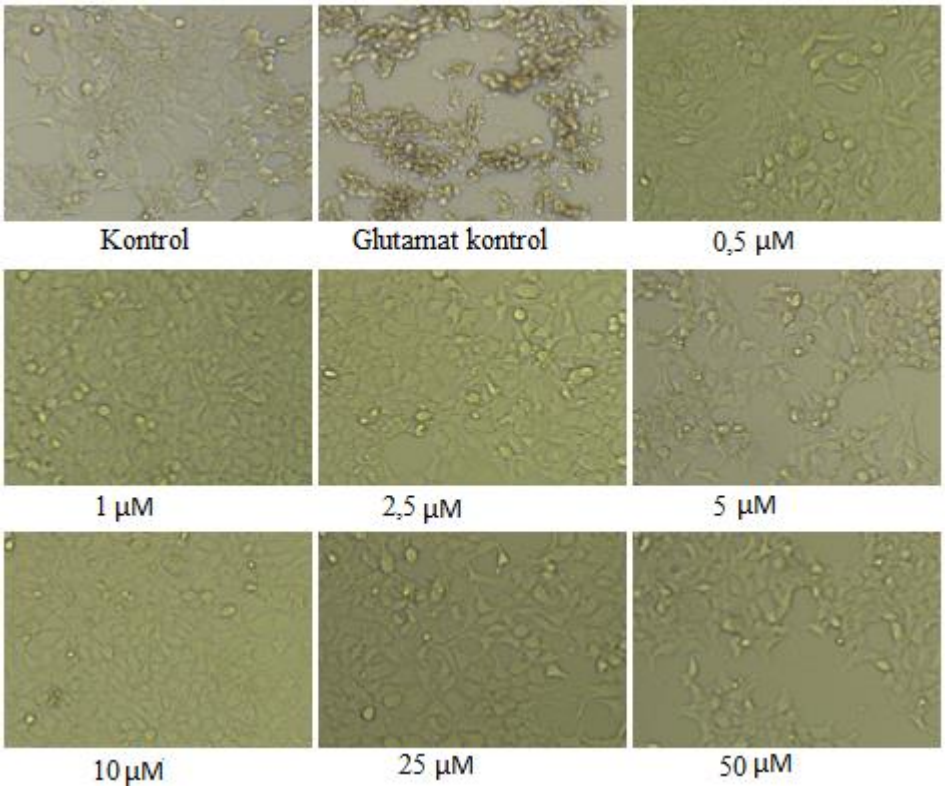
Şekil 4.25 Hiperisin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



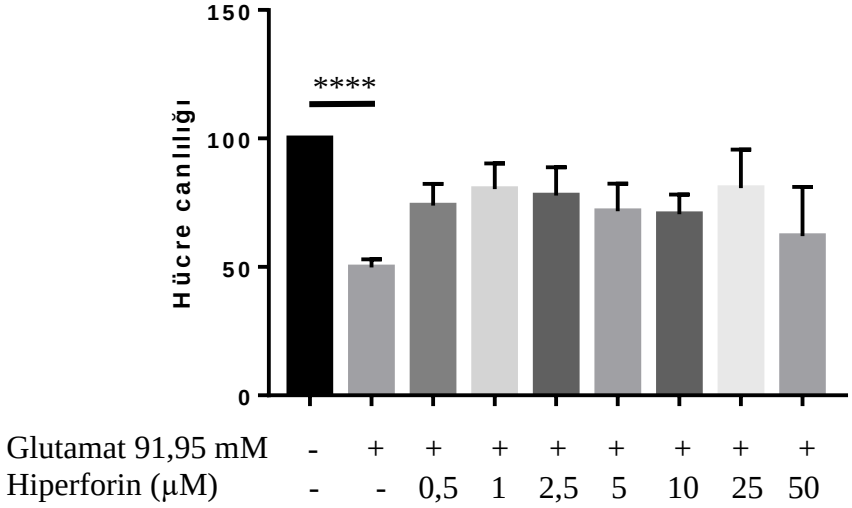
Grafik 4.25 Hiperisin ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

4.6.6 Hiperforin

SH-SY5Y hücreleri 0,5-50 µM konsantrasyon aralığında hiperforin ile 24 saat boyunca ön inkübasyon sonrasında, 91,95 mM glutamat ile 24 saat muamele edilerek eksitotoksik koşullar oluşturulmuştur. PBS kontrole kıyasla glutamat muamelesi hücre canlılığını %49'a düşürmüştür (Grafik 4.26). Hiperforinin uygulanan tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığı glutamat kontrol seviyesine kıyasla artış göstermesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir. (Grafik 4.26). Hücre morfolojisindeki değişiklikler Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26 Hiperforin ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin morfolojileri



Grafik 4.26 Hiperforin ve glutamat muamelesinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi, ± SH (n=3). ****, p<0,0001

5. TARTIŞMA

Glia hücreleri ve nöron hücreleri glutamat eksitotoksisitesine karşı oldukça hassastır. Fazla glutamat salınımı, glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasına neden olur ve eksitotoksisite olarak bilinen nöronal hasara yol açabilir. Eksitotoksisite retinada oksidatif stres seviyesinin artışına ve buna bağlı olarak GLAST ve glutamin sentetaz aktivitesinde azalmaya yol açarak Müller hücrelerinin hücre dışı glutamatı temizleme fonksiyonunda bozukluğa neden olur. Bu hasar ilerleyerek nöronların ölümüne ve diyabetik retinopati, glokom, iskemi ve kalıtsal fotoreseptör dejenerasyonu gibi retinal hastalıklara neden olabilir. Bu hastalıkların önlenmesi için glutamat salınımı, geri alınımı ve glutamat-glutamin döngüsü sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir.

Eksitotoksisiteye neden olan ana mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Eksitotoksisitenin meydana gelmesi Müller hücrelerinin mitokondrilerindeki işlev bozukluğundan kaynaklanıyor olabilir (Toft Kehler vd., 2014). Glutamatın hücre içine alınımı sodyum ve potasyum pompaları aracılığıyla gerçekleşir ve bu pompalar ATP ile aktif hale gelmektedir. Mitokondride meydana gelen herhangi bir işlev bozukluğu gerekli olan ATP'nin üretilememesi, dolayısıyla sodyum ve potasyum pompalarının inaktif hale gelmesi demektir. Bu durum glutamatın hücre içine alınamayıp hücre dışında birikmesine sebep olabilir (Toft-Kehler vd., 2014).

Bu tez çalışmasında, öncelikle MIO-M1 insan retinal Müller hücrelerinde ve SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde sarı kantaron özütlerinin, sarı kantaron yağının, hiperisin ve hiperforin bileşenlerinin sitotoksik etkinliği analiz edilmiştir. Daha sonra, glutamat eksitotoksisitesi indüklenmiş ve sarı kantaron özütlerinin, sarı kantaron yağının, hiperisin ve hiperforin bileşenlerinin glutamat eksitotoksisitesine karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Laboratuvarımızda retinal nöron hücre hattı bulunmadığı için SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı çalışmaya dahil edilmiştir.

Sitotoksisite deneylerinde sarı kantaron su özütü, sarı kantaron yağı ve hiperforinin her iki hücre hattı için de toksik aktivite göstermediği saptanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda EA özütü, metOH özütü ve hiperisinin MIO-M1 ve SH-SY5Y hücrelerine sitotoksik olduğu belirlenmiştir. EA özütü ve metOH özütü için SH-SY5Y

hücrelerinde daha düşük IC_{50} değerlerinin elde edilmesi, bu hücrelerin EA özütü ve metOH özütü muamelesine karşı daha hassas olduğunu göstermektedir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1 MIO-M1 ve SH-SY5Y hücrelerinde IC_{50} değerleri

Özüt/Yağ/Bileşen	MIO-M1	SH-SY5Y
Su özütü	-	-
EA asetat özütü	495,6 μg/ml	123,5 μg/ml
MetOH	286,6 μg/ml	78,82 μg/ml
Sarı kantaron yağı	-	-
Hiperisin	12,83 μM	20,37 μM
Hiperforin	-	-

Cheng ve arkadaşları (2006) glutamat eksitotoksisitesinin neden olduğu oksidatif strese karşı betulinik asit türevlerinin koruma aktivitesini araştırmak için 100-500 mM konsantrasyon aralığında glutamat ile MIO-M1 hücrelerini muamele etmişler ve 300 mM ve üstü konsantrasyonlarda glutamatın sitotoksik olduğunu bulmuşlardır. Zong ve arkadaşları (2010) 60 mM ve daha yüksek glutamat konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücreleri için toksik olduğunu bulmuşlardır. Literatürle uyumlu bir şekilde glutamat ile muamele edilen MIO-M1 hücreleri için IC_{50} değeri 365,7 mM, SH-SY5Y hücreleri için 91,95 mM olarak hesaplanmıştır. Glutamat eksitotoksisitesi modeli oluşturmak için hesaplanan IC_{50} değerleri kullanılmıştır.

Glutamat eksitotoksisitesi modeli oluşturulduktan sonra, sitotoksik etki göstermeyen özüt, yağ, hiperisin, hiperforin konsantrasyonları ile koruma deneyleri yapılmıştır Assis ve arkadaşları (2014) C6 glioma hücrelerinde glutamat ile indüklenen hasara karşı kariofilenin koruyucu aktivitesini araştırdıkları çalışmada, eksitotoksisite öncesi inkübasyonun eksitotoksisite ile eş zamanlı inkübasyona kıyasla daha etkin koruma aktivitesi sağladığını rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında da koruma deneyleri hem eş-zamanlı inkübasyon hem ön inkübasyon şeklinde gerçekleştirilmiş ve benzer şekilde ön inkübasyon ile daha verimli koruma aktivitesi elde edilmiştir.

Tablo 5.2 Glutamat eksitotoksisitesine karşı koruma aktivitesi karşılaştırması

Özüt/Yağ/Bileşen	Konsantrasyon	MIO-M1	SH-SY5Y
Su özütü	31,25 µg/ml	-	%24
	62,5 µg/ml	-	%26
	125 µg/ml	-	%21
	250 µg/ml	%10	%21
	500 µg/ml	-	%6
	1000 µg/ml	-	-
EA asetat özütü	31,25 µg/ml	-	-
	62,5 µg/ml	-	-
MetOH	31,25 µg/ml	-	-
	62,5 µg/ml	-	-
Yağ	31,25 µg/ml	-	**%22***
	62,5 µg/ml	-	**%28***
	125 µg/ml	%1	%21
	250 µg/ml	-	%8
	500 µg/ml	-	%10
	1000 µg/ml	**%13***	%12
Hiperisin	0,5 µM	%5	%9
	1 µM	-	%11
	2,5 µM	-	%10
Hiperforin	0,5 µM	%4	%17
	1 µM	%10	%22
	2,5 µM	%6	%19
	5 µM	%13	%16
	10 µM	%11	%14
	20 µM	%18	-
	25 µM	%9	%16
	50 µM	%3	-

Sarı kantaronun su özütü muamelesi ile yapılan koruma deneylerinde MIO-M1 hücre hattı üzerinde 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml konsantrasyonlarda; SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 250 µg/ml konsantrasyonda eksitotoksisite koşuluna kıyasla artış gözlemlenmiş olmasına rağmen bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. EA ve metOH özütlerinin her iki hücre hattında da koruma aktivitesi gözlenmemiştir. Sarı kantaron yağı muamelesi ile yapılan koruma deneylerinde MIO-M1 hücre hattı üzerinde 1000 µg/ml ve SH-SYSY hücre hattı için 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml konsantrasyonlarda eksitotoksisite koşullarına karşı koruma aktivitesi saptanmıştır. Hiperisin ile yapılan koruma deneylerinde MIO-M1 hücre hattı üzerinde 0,5 µM konsantrasyonda; SH-SY5Y hücre hattı üzerinde 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM konsantrasyonlarda hücre canlılığında artış gözlemlenmiş olmasına rağmen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Hiperforin ile yapılan koruma deneylerinde hem MIO-M1 hücreleri hem SH-SY5Y hücrelerinde eksitotoksisite koşullarına kıyasla hücre canlılığında artışlar gözlemlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (Tablo 5.2).

Yapılan bir çalışmada merkezi sinir sisteminde demiyelinizasyon ve aksonal kayıp ile karakterize olan maltple skleroz hastalığının patogenezinde sorumlu olduğu bilinen JAK-STAT sinyal yolu üzerinde sarı kantaron yağının etkisi incelenmiştir. MS modeli oluşturulan farelerde JAK/STAT yolundaki protein ekspresyon düzeyini önemli derecede azalttığı gösterilmiş ve sarı kantaron yağının nöroprotektif aktivitesine dair yeni bulgular bulunmuştur (Bulut vd., 2022).

Özetle, sarı kantaron yağı ile glutamat eksitotoksisitesi öncesi ön inkübasyon hem MIO-M1 hem de SH-SY5Y hücrelerini hasara karşı koruyabilmiştir. Ji ve arkadaşlarının çalışmasında da (2021) *H. perforatum ve H. bellum*'un uçucu yağlarının, nörit büyümesini teşvik ettiği ve nöroprotektif aktivite gösterdiği rapor edilmiş ve yağların doğal nöroprotektif ajanların umut verici kaynakları oldukları belirtilmiştir (Ji vd., 2021).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında sarı kantaron su, etil asetat, metanol özütleri, sarı kantaron yağı, hiperisin ve hiperforinin MIO-M1 ve SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik aktivitesi belirlenmiştir. Su özütü, sarı kantaron yağı ve hiperforin glial ve nöron hücreleri üzerinde sitotoksisite göstermezken, EA özütü, metOH özütü ve hiperisin belirli konsantrasyonlarda toksiktir.

Aşırı glutamat salınımı ve buna bağlı olarak gelişen hastalıkların tedavisi için sarı kantaron ve bileşenlerinin ilaç olma potansiyelini analiz edebilmek amacıyla glutamat eksitotoksisitesi modeli oluşturulmuştur. Hem glia hem de nöron hücrelerinde sarı kantaron yağı muamelesininin eksitotoksisiteye karşı koruma etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Sarı kantaron yağının glutamat eksitotoksisitesine karşı koruma etkinliğinin retinal nöronlar ve Müller hücreleri birlikte kültüre alınarak ve 3D kültür yöntemleri kullanılarak analiz edilmesi, sürecin daha net bir şekilde anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Glutamat eksitotoksisitesi indüklenen glial hücrelerde olası mitokondri işlev bozukluğu ve glutamatın hücre dışından alınımı için mitokondriler tarafından üretilen enerjinin yetersiz kalması durumu göz önünde bulundurularak ATP testlerinin yapılması ve sarı kantaron yağı muamelesinin mitokondri fonksiyon bozukluğu üzerindeki etkisinin analiz edilmesi, koruma aktivitesinin mekanizmasına dair bilgi verecektir. Ayrıca, sarı kantaron yağının glutamat taşıyıcılarının gen ifadesine ve protein seviyesine etkisi irdelenerek koruma aktivitesi sağlayan mekanizmanın detayları belirlenebilecektir. Hücre kültürü çalışmalarıile elde edilen bu bulgular model organizmalar kullanılarak *in vivo* hayvan deneyleri ile desteklenebilir.

KAYNAKLAR

Aksu, Ö., & Altinterim, B. (2015). Kantaron Otu (*Hypericum perforatum*) ve Hiperisin. *Bilim ve Gençlik*, *3*(1), 58–64.

Bonaterra, G. A., Schwendler, A., Hüther, J., Schwarzbach, H., Schwarz, A., Kolb, C., Kinscherf, R. (2018). Neurotrophic, cytoprotective, and anti-inflammatory effects of St. John's wort extract on differentiated mouse hippocampal HT-22 neurons. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(JAN), 1–13. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00955

Breyer, A., Elstner, M., Gillessen, T., Weiser, D., & Elstner, E. (2007). Glutamate-induced cell death in neuronal HT22 cells is attenuated by extracts from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Phytomedicine*, *14*(4), 250-255.

Bringmann, A., Grosche, A., Pannicke, T., & Reichenbach, A. (2013). GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells. *Frontiers in Endocrinology*, *4*(APR). https://doi.org/10.3389/FENDO.2013.00048/FULL

Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A. (2009). Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research*. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.07.001

Brito, L. de C., Berenger, A. L. R., & Figueiredo, M. R. (2017). An overview of anticancer activity of Garcinia and *Hypericum*. *Food and Chemical Toxicology*, *109*, 847–862. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.053

Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E. (2013). Glutamate: A truly functional amino acid. *Amino Acids*, *45*(3), 413–418. https://doi.org/10.1007/s00726-012-1280-4

Bulut, H., Teloğlu, E. Ş., Şentürk, H., Üstünova, S., Güleken, Z., & Selek, Ş. (2022). Çuha çiçeği ve sarı kantaron yağlarının multiple skleroz modeli oluşturulmuş farelerdeki jak/stat sinyal yolakları üzerine etkisi. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, *24*(2), 225-235.

Cao, Z., Wang, F., Xiu, C., Zhang, J., & Li, Y. (2017). *Hypericum perforatum* extract attenuates behavioral, biochemical, and neurochemical abnormalities in Aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *91*, 931–937. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.022

Chen, H., Muhammad, I., Zhang, Y., Ren, Y., Zhang, R., Huang, X., Li, G. (2019). Antiviral activity against infectious bronchitis virus and bioactive components of *Hypericum perforatum* L. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(OCT), 1–22. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01272

Cheng, Z., Zhang, T., Zheng, J., Ding, W., Wang, Y., Li, Y., Zhou, F. (2019). Betulinic acid derivatives can protect human Müller cells from glutamate-induced

oxidative stress. *Experimental Cell Research*, *383*(1). https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111509

Cheung, Z. H., So, K. F., Lu, Q., Yip, H. K., Wu, W., Shan, J. J., & Chen, C. F. (2002). Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal ganglion cells by a mixture of herbal extracts. *Journal of neurotrauma*, *19*(3), 369-378.

Galeotti, N. (2017). *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. *Journal of Ethnopharmacology*, *200*(October 2016), 136–146. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.016

Graca, A. B., Hippert, C., & Pearson, R. A. (2018). Müller glia reactivity and development of gliosis in response to pathological conditions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1074*, 303–308. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4_37

Higuchi, A., Yamada, H., Yamada, E., Jo, N., & Matsumura, M. (2008). Hypericin inhibits pathological retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Molecular Vision*, *14*, 249.

Ishikawa, M. (2013). Abnormalities in Glutamate Metabolism and Excitotoxicity in the Retinal Diseases. *Scientifica*, *2013*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2013/528940

Jendželovská, Z., Jendželovský, R., Kuchárová, B., & Fedoročko, P. (2016). Hypericin in the light and in the dark: Two sides of the same coin. *Frontiers in Plant Science*, *7*(MAY2016), 1–20. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00560

Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.023

Ji, Y. yuan, Yang, J. yi, Zhang, R. fei, Chen, Q. yu, Xu, R., Wei, X. jin, Long, C. lin. (2021). Chemical characterization, neuroprotective, antimicrobial and enzyme inhibitory activities of *Hypericum* volatile oils. *Industrial Crops and Products*, *172*(August), 113991. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113991

Kasai, C., Sugimoto, K., Moritani, I., Tanaka, J., Oya, Y., Inoue, H., Takase, K. (2015). Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterology*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/S12876-015-0330-2

Kew, J. N. C., & Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, *179*(1), 4–29. https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z

Kim, H., Kim, S. W., Seok, K. H., Hwang, C. W., Ahn, J. C., Jin, J. O., & Kang, H. W. (2018). Hypericin-assisted photodynamic therapy against anaplastic thyroid cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *24*(August), 15–21. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.08.008

Kumar, G. P., & Khanum, F. (2012). Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacognosy Reviews*, *6*(12), 81–90. https://doi.org/10.4103/0973-7847.99898

Kur, J., Newman, E. A., & Chan-Ling, T. (2012). Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, *31*(5), 377–406. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.04.004

Lavie, G., Mazur, Y., Lavie, D., & Meruelo, D. (n.d.). *The Chemical and Biological Properties of Hypericin-A Compound with a Broad Spectrum of Biological Activities*.

Lee, J. C., Mayer-Proschel, M., & Rao, M. S. (2000). Gliogenesis in the central nervous system. *GLIA*. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(200004)30:2<105:AID-GLIA1>3.0.CO;2-H

Liu, Y., Wang, S., Kan, J., Zhang, J., Zhou, L., Huang, Y., & Zhang, Y. (2019). Chinese Herbal Medicine Interventions in Neurological Disorder Therapeutics by Regulating Glutamate Signaling. *Current Neuropharmacology*, *18*(4), 260–276. https://doi.org/10.2174/1570159x17666191101125530

Lu, Y. H., Du, C. B., Liu, J. W., Hong, W., & Wei, D. Z. (2004). Neuroprotective effects of *Hypericum perforatum* on trauma induced by hydrogen peroxide in PC12 cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, *32*(03), 397-405.

Marrelli, M., Statti, G., & Conforti, F. (2019). *Hypericum* spp.: An Update on the Biological Activities and Metabolic Profiles . *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *20*(1), 66–87. https://doi.org/10.2174/1389557519666190926120211

Mullaicharam, A., & Halligudi, N. (2018). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A Review of its Chemistry, Pharmacology and Clinical properties. *International Journal of Research In Phytochemical And Pharmacological Sciences*, *1*(1), 5–11. https://doi.org/10.33974/ijrpps.v1i1.7

Müller, L. J., Marfurt, C. F., Kruse, F., & Tervo, T. M. T. (2003). Corneal nerves: Structure, contents and function. *Experimental Eye Research*, *76*(5), 521–542. https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00050-2

Novelli, M., Menegazzi, M., Beffy, P., Porozov, S., Gregorelli, A., Giacopelli, D., Masiello, P. (2016). St. John's wort extract and hyperforin inhibit multiple phosphorylation steps of cytokine signaling and prevent inflammatory and apoptotic gene induction in pancreatic β cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *81*, 92–104. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.10.017

Okmen, G., & Balpınar, N. (2017). the Biological Activities of *Hypericum Perforatum* L. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines : AJTCAM*, *14*(1), 213–218. https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.23

Orčić, D. Z., Mimica-Dukić, N. M., Francišković, M. M., Petrović, S. S., & Jovin, E. T. (2011). Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chemistry Central Journal*, *5*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-34

Özdemir, O., & Güzel Özdemir, P. (2016). Glutamat Sistemi ve Şizofreni. *Psikiyatride Guncel Yaklasimlar - Current Approaches in Psychiatry*, *8*(23775), 394–405. https://doi.org/10.18863/pgy.253445

Pu, X. ying, Liang, J. ping, Wang, X. hong, Xu, T., Hua, L. ying, Shang, R. feng, Xing, Y. mei. (2009). Anti-influenza A virus effect of *Hypericum perforatum* L. extract. *Virologica Sinica*, *24*(1), 19–27. https://doi.org/10.1007/s12250-009-2983-x

Rose, C. R., Ziemens, D., Untiet, V., & Fahlke, C. (2018). Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain Research Bulletin*, *136*, 3–16. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.013

Rüfer, F., Schröder, A., & Erb, C. (n.d.). *White-to-White Corneal Diameter Normal Values in Healthy Humans Obtained With the Orbscan II Topography System*.

Russo, E., Scicchitano, F., Whalley, B. J., Mazzitello, C., Ciriaco, M., Esposito, S., De Sarro, G. (2014). *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions. *Phytotherapy Research*, *28*(5), 643–655. https://doi.org/10.1002/ptr.5050

Sarks, J. P., Sarks, S. H., & Killingsworth, M. C. (1988). Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye (Basingstoke)*. https://doi.org/10.1038/eye.1988.106

Sommer, B., & Seeburg, P. H. (1992). Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends in Pharmacological Sciences*. https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90088-N

Sun, Z.-W., Zhang, L., Zhu, S.-J., Chen, W.-C., & Mei, B. (2010). ·Original Article· Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Neurosci Bull*, *26*(1), 8–16. https://doi.org/10.1007/s12264-010-0813-7

Suwanjang, W., Holmström, K. M., Chetsawang, B., & Abramov, A. Y. (2013). Glucocorticoids reduce intracellular calcium concentration and protects neurons against glutamate toxicity. *Cell Calcium*, *53*(4), 256–263. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.12.006

Sytar, O., Švedienė, J., Ložienė, K., Paškevičius, A., Kosyan, A., & Taran, N. (2016). Antifungal properties of hypericin, hypericin tetrasulphonic acid and fagopyrin on pathogenic fungi and spoilage yeasts. *Pharmaceutical Biology*, *54*(12), 3121–3125. https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1211716

Tanaka, N., & Kashiwada, Y. (2021). Characteristic metabolites of *Hypericum* plants: their chemical structures and biological activities. *Journal of Natural Medicines*,

75(3), 423–433. https://doi.org/10.1007/s11418-021-01489-y

Theodossiou, T. A., Hothersall, J. S., De Witte, P. A., Pantos, A., & Agostinis, P. (2009). The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin. *Molecular Pharmaceutics*, *6*(6), 1775–1789. https://doi.org/10.1021/mp900166q

Valletta, E., Rinaldi, A., Marini, M., Franzese, O., & Roscetti, G. (2018). Distinct *Hypericum perforatum* L. total extracts exert different antitumour activity on erythroleukemic K562 cells. *Phytotherapy Research*, *32*(9), 1803–1811. https://doi.org/10.1002/ptr.6114

Wan, J., Zheng, H., Chen, Z. L., Xiao, H. L., Shen, Z. J., & Zhou, G. M. (2008). Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Research*. https://doi.org/10.1016/j.visres.2007.11.002

Willoughby, C. E., Ponzin, D., Ferrari, S., Lobo, A., Landau, K., & Omidi, Y. (2010). Anatomy and physiology of the human eye: Effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function - a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2010.02363.x

Wurglics, M., & Schubert-Zsilavecz, M. (2006). *Hypericum perforatum*: A "modern" herbal antidepressant - Pharmacokinetics of active ingredients. *Clinical Pharmacokinetics*, *45*(5), 449–468. https://doi.org/10.2165/00003088-200645050-00002

Yalçın, S., Yalçınkaya, S., & Ercan, F. (2021). Determination of Potential Drug Candidate Molecules of the *Hypericum perforatum* for COVID-19 Treatment. *Current Pharmacology Reports*, *7*(2), 42–48. https://doi.org/10.1007/s40495-021-00254-9

Yip, H. K. (2014). Retinal stem cells and regeneration of vision system. *Anatomical Record*. https://doi.org/10.1002/ar.22800

Yılmaz, M. S., Köşker, K., Arslan, H., Altunkara, F., Eraslan, S., & Şakıyan, Ö. (2021). Investigation of herbal extracts from St John's wort (*Hypericum perforatum*) and geranium (*Perlargonium graveolens*) and their usage as instant herbal tea. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, *27*(7), 826–834. https://doi.org/10.5505/pajes.2021.40403

Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(16), 5032–5039. https://doi.org/10.1021/jf049571r

URL-1 https://www.who.int/initiatives/who-global-centre-for-traditional-medicine Erişim Tarihi: 21/12/2022

URL-2 https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t5fcfe72c9065d900a614fa40-anatomy-of-the-human-eye Erişim Tarihi: 02/11/2022

URL-3 https://app.biorender.com/illustrations/634ee5ac28c1dd880cef4093 Erişim Tarihi: 04/11/2022

URL-4…https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-63a36326e177c564cd18c3eb-virtual-background-cerebellum Erişim Tarihi: 07/11/2022

URL-5 https://tr.wikipedia.org/wiki/Glutamat Erişim Tarihi: 21/11/2022

URL-6 https://app.biorender.com/gallery/illustrations/i-634b112a193dc54ecb6656bf-untitled Erişim Tarihi: 10/11/2022

URL-7 https://app.biorender.com/illustrations/634c08bbd29d97b78a754627 Erişim Tarihi: 10/11/2022

URL-8 https://app.biorender.com/gallery/illustrations/i-634c1c54608ee02bcf105fb5-untitled Erişim Tarihi: 12/11/2022

URL-9 https://elements.envato.com/?adposition=&gclid=CjwKCAiAhqCdBhB0EiwAH8M_GixxmVOwnf7796ARasv6euVRKZCp5EWon7dVJeCiw6yGF0jq_ESPcBoCejgQAvD_BwE Erişim Tarihi: 10/11/2022

URL-10 https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics Erişim Tarihi: 08.04.2022