



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SUMAK EKŞİSİNDEN ELDE EDİLEN MALİK ASİT
KALSİYUM KOMPLEKSİNİN YAPISAL
KARAKTERİZASYONU VE RETİNA HÜCRESİNDE
HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN
HÜCRE HASARINDA KORUYUCU ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

BİLGE ALLI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2018

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SUMAK EKŞİSİNDEN ELDE EDİLEN MALİK ASİT
KALSİYUM KOMPLEKSİNİN YAPISAL
KARAKTERİZASYONU VE RETİNA HÜCRESİNDE
HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN
HÜCRE HASARINDA KORUYUCU ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

BİLGE ALLI

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

KAHRAMANMARAŞ 2018

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Bilge ALLI tarafından hazırlanan “*Sumak Ekşisinden Elde Edilen Malik Asit Kalsiyum Kompleksinin Yapısal Karakterizasyonu ve Retina Hücresinde Hidrojen Peroksit ile Oluşturulan Hücre Hasarında Koruyucu Rolünün Araştırılması*” adlı bu tez, jürimiz tarafından 18/05/2018 tarihinde oy birliği ile Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Gökhan CEYHAN (DANIŞMAN)
Biyomühendislik ve Bilimi Anabilim Dalı
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. A. Hakan KURT (2. DANIŞMAN)
Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ (ÜYE)
Kimya Anabilim Dalı
Gaziantep Üniversitesi

Doç. Dr. Atila YOLDAŞ (ÜYE)
Anatomi Anabilim Dalı
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Elife KAYA (ÜYE)
Biyomühendislik ve Bilimi Anabilim Dalı
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Bilge ALLI



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

**SUMAK EKŞİSİNDEN ELDE EDİLEN MALİK ASİT KALSİYUM
KOMPLEKSİNİN YAPISAL KARAKTERİZASYONU VE RETİNA
HÜCRESİNDE HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN HÜCRE
HASARINDA KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**BİLGE ALLI
ÖZET**

Ülkemizde yaygın yayılış alanları olan ve doğal olarak gıda kaynaklı kullanımı bulunan sumak örneği içerisinde majör organik asit olarak bulunan malik asit farklı endüstri kollarında önemli bir ham madde konumundadır. Sumak ekşisinden doğal elde edilen malik asit kalsiyum kompleksinin yapısal karakterizasyonu ve retina hücresinde hidrojen peroksit ile oluşturulan hücre hasarında koruyucu rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamından elde edilen kompleksin karakterizasyonu için; spektroskopik olarak Uv-vis, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, XRD kullanılmıştır. Bunun yanında elektrokimyasal, fotoluminesans ve termal özellikleri incelenmiştir. Antimikrobiyal çalışmalarda 6 bakteri ve 4 maya suşu kullanılmıştır. Aynı zamanda elde edilen kompleksin ARPE-19 hücre hatlarında yaşa bağlı makula dejenerasyonu incelenmiştir. Elde edilen bulgular istatistiksel olarak araştırılmıştır.

Bu çalışmada, sumak ekşisinden doğal olarak elde edilen malik asit kalsiyum kompleksinin yapısal karakterizasyonu yapıldı ve malik asit kalsiyum kompleksinin retinal pigment epitelyum hücrelerinde oksidatif strese bağlı retinal hasar üzerindeki koruyucu etkilerini araştırıldı. Elde ettiğimiz bulgulara göre malik asit kalsiyum uygulamasının H₂O₂'in oluşturduğu hasara karşı koruyucu etkisi bulunduğunu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Malik asit, yapısal karakterizasyon, retina hücresi, hücre hasarı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Bilimi Anabilim Dalı, Mayıs / 2018

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökhan CEYHAN

2. Danışman: Doç. Dr. A. Hakan KURT

Sayfa sayısı: 110

**STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF MALIC ACID CALCIUM COMPLEX
OBTAINED FROM SUMAK PARTICLES AND RESEARCH OF PROTECTIVE
ROLLER IN CELL CAVITY WITH HYDROGEN PEROXIDE IN RETINA CELL
(M.Sc. THESIS)**

**BİLGE ALLI
ABSTRACT**

Malic acid, which is a major organic acid in the sumac sample which has widespread distribution in our country and which is naturally used as food source, is an important raw material in different industrial branches. The structural characterization of calcium complex of naturally occurring malic acid from the Sumac suture and the protective role of it in cell damage induced by hydrogen peroxide in the retinal cell were investigated.

For the characterization of the complex obtained from the study; Uv-vis, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, XRD were used spectroscopically. Besides, electrochemical, photoluminescence and thermal properties have been investigated. Six bacteria and four yeast strains were used in antimicrobial studies. At the same time, age-related macular degeneration of the complex obtained on ARPE-19 cell lines was examined. Obtained findings were statistically researched.

In this study, we performed structural characterization of the malic acid calcium complex naturally obtained from sumac minus and investigated the protective effect of the malic acid calcium complex on oxidative stress induced retinal damage in retinal pigment epithelial cells. According to our findings, we found that the application of malic acid had a protective effect against damage caused by H₂O₂.

Keywords: Malic acid, structural characterization, retinal cell, cell damage

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering and Sciences, May / 2018

Supervisor: Asst.Prof.Dr. Gökhan CEYHAN

Second supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Hakan KURT

Page Numbers: 110

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıŐması sűresince engin bilgi ve tecrűbelerinden faydalandıĐım ve çalıŐmamın her aŐamasında saĐladıĐı bilimsel katkılardan dolayı danıŐmanlarım Dr. ŐĐr. Őyesi Gűkhan CEYHAN ve Doç. Dr. A. Hakan KURT'a her fırsatta bilgi ve birikimlerinden yararlandıĐım tűm bűlűm hocalarıma,

Tez çalıŐmam sűresince istatistik çalıŐmalarımda deneyimlerini benimle paylaŐan ve bilgilerini esirgemeyen sayın Dr. ŐĐr. Őyesi Adem DOĐANER, engin bilgi ve deneyimlerinden destek aldıĐım Kimya bűlűműnden sayın Prof. Dr. Mehmet TŪMER ve Doç. Dr. Muhammet KűSE hocalarıma, deney aŐamasında desteklerini gűrdűĐűm ŐĐretim Gűrevlisi Derya KILIÇASLAN'a,

Son olarak, bu gűnlere gelmemde her tűrlű maddi ve manevi desteklerini gűrdűĐűm aileme sonsuz teŐekkűrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Malik Asit	1
1.1.1. α -Hidroksikarboksilik asitler	2
1.1.2. Monokarboksilik asitler	3
1.1.3. Polikarboksilik asitler	3
1.1.4. Bağlanma modları	4
1.1.5. Metal α -hidroksikarboksilatlar	7
1.1.6. α -Hidroksikarboksilik asit ve yardımcı ligandların metal kompleksleri	8
1.1.7. L-malik asit üretim çalışmaları	9
1.2. Göz Anatomisi	13
1.2.1 Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YMD)	16
1.2.2 Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda epidemiyoloji	16
1.2.3 Yaşa bağlı makula dejenerasyonun etiyojisi	17
1.2.4 Yaşa bağlı makula dejenerasyonu tedavi	19
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	20
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	35
3.1.2. Kullanılan cihazlar	36
3.2. Metot	38
3.2.1. Malik asit kalsiyum sentez ve karakterizasyonu	38
3.2.2. Malik asit kalsiyum kompleksinin doğal yöntemle sentezi	38
3.2.3. Elektrokimyasal çalışmalar	39

3.2.4. X-ışını yapılarının aydınlatılması	40
3.2.5. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	40
3.2.6. Hücre kültürü uygulamaları	41
3.2.7. İstatistiksel analizler	47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	49
4.1. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Sumak Ekşiden Doğal Yöntemle Ekstraksiyonu	49
4.2. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Uv-vis. Spektrum Bulguları	50
4.3. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksi FT-IR Spektrumlarının Bulguları	53
4.4. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksi ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR Spektrumlarının Bulguları.....	55
4.5. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Kütle Spektrum Bulguları	58
4.6. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Elektrokimyasal Bulguları.....	59
4.7. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Fotoluminesans Özellikleri	65
4.8. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Termal Özelliklerinin İncelenmesi.....	69
4.9. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin X-ışını Bulguları.....	71
4.10. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Antimikrobiyal Aktivite Bulguları	76
4.11. ARPE-19 Hücre Kültürüne Uygulanan Konsantrasyonlara Ait Bulguları	78
5. SONUÇ.....	84
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. 1. Bazı monokarboksilik α -hidroksi asitlerin yapısı.....	3
Şekil 1. 2. Bazı polikarboksilik α -hidroksi asitlerin yapısı	4
Şekil 1. 3. Katı fazda temel koordinasyon modları	6
Şekil 1. 4. Malat M(II) kompozisyonunun koordinasyon modu	8
Şekil 1. 5. Krebs döngüsü ve malik asit oluşumu.....	12
Şekil 1. 6. Gözün genel yapısı	13
Şekil 1. 7. Retinal pigment epitel tabakası	14
Şekil 1. 8. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda retinanın şematik diyagramı	16
Şekil 1. 9. Normal göz ve retina yapısı.....	18
Şekil 2. 1. Tek kristal malik asidin UV-vis-NIR spektrumu	20
Şekil 2. 2. Nb-MA kompleksinin termogravimetri ve termal analizi	21
Şekil 2. 3. Dişi sıçanlarda gavaj uygulamasıyla farklı dozlar için maleik asitin serumda zamana bağlı absorpsiyonu.....	21
Şekil 2. 4. L-malik asit biyosensörünün şematik diyagram.....	22
Şekil 2. 5. Kompleksin ve doksürubisin yüklü ve yüksüz nanoparçacıklarının dağılımı....	23
Şekil 2. 6. L-Epedrin malik asit H ₂ O tuz oluşumunun şematik gösterimi; (MH=monohidrat, TH=Trihidrat)	24
Şekil 2. 7. Çinko laktat kristallerinin SEM görüntüleri: a) saf çinko laktat b) 1 ⁺ çinko laktat c) 6 ⁺ laktat formu	25
Şekil 2. 8. Kompleksleşme reaksiyonları	26
Şekil 2. 9. (A) bis (L-malat) Cu (II) dihidrat kompleksi, (B) bis (D-malat) Cu (II) dihidrat kompleksi (C) bis (DL-malat) Cu (II) dihidrat kompleksi	27
Şekil 2. 10. Malik asit enantiyomerleri	28
Şekil 2. 11. Magnezyum kristal paket yapıları	28
Şekil 2. 12. <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Enteritidis</i> ve <i>E. coli</i> O157: H7 hücrelerinin transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) mikrografıları saf kültür (a, d, g), kavun (b), armut (e) elma suyu (h), kavun suyu ile %0.6 malik asit (c) armut suyu ile %0.6 malik asit (f), elma suyu ile %0.8 malik asit (i)	30
Şekil 2. 13. IRA-67 ile temas süresi ve sıcaklığın malik asit adsorpsiyonu üzerine etkisi .	31
Şekil 2. 14. Malik asit ve poli malik asit	31

Şekil 2. 15. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ uygulaması ve kalsiyum etkisi	34
Şekil 3. 1. Malik asit kalsiyum kompleksinin doğal yöntemle sentezi.....	38
Şekil 3. 2. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O sentez tepkimesi.....	39
Şekil 3. 3. ELISA okuyucu cihazı	44
Şekil 3. 4. H ₂ O ₂ uygulaması için mikrolaka yerleşimi	44
Şekil 3. 5. ARPE 19 hücre hatlarının invert mikroskop ile görünümü.....	45
Şekil 3. 6. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin mikrolaka yerleşimi	46
Şekil 4. 1. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O teklif edilen sentez tepkimesi	49
Şekil 4. 2. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin DMF çözücüsündeki Uv-Görünür bölge spektrumları	51
Şekil 4. 3. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin DMSO çözücüsündeki Uv-Görünür bölge spektrumları	51
Şekil 4. 4. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin H ₂ O çözücüsündeki Uv-Görünür bölge spektrumları	52
Şekil 4. 5. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksi Uv-Görünür bölge spektrumları.....	52
Şekil 4. 6. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin MIR ve FIR spektrumu.....	53
Şekil 4. 7. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin FIR infrared spektrumu.....	54
Şekil 4. 8. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin ¹ H-NMR spektrumu.....	55
Şekil 4. 9. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	56
Şekil 4. 10. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin COSY, HMBC, TOCSY ve HETCOR spektrumu	57
Şekil 4. 11. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksi COSY, HMBC, TOCSY ve HETCOR spektrumu	57
Şekil 4. 12. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksi COSY, HMBC, TOCSY ve HETCOR spektrumu	58
Şekil 4. 13. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksine ait kütle spektrumu.....	59
Şekil 4. 14. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O 1x10 ⁻³ M, DMF ortamında siklik voltammogramı .	62
Şekil 4. 15. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O 1x10 ⁻⁴ M, DMF ortamında siklik voltammogramı .	62
Şekil 4. 16. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O 1x10 ⁻³ M, DMSO ortamında siklik voltammogramı	63
Şekil 4. 17. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O 1x10 ⁻⁴ M, DMSO ortamında siklik voltammogramı	63
Şekil 4. 18. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksine ait ait redoks işlemi	65
Şekil 4. 19. DMF ortamında ve 1x10 ⁻³ -1x10 ⁻⁷ M aralığında fotoluminesans ölçümleri	67

Şekil 4. 20. DMSO ortamında ve 1×10^{-3} - 1×10^{-7} M aralığında fotoluminesans ölçümleri ..	67
Şekil 4. 21. H ₂ O ortamında ve 1×10^{-3} - 1×10^{-7} M aralığında fotoluminesans ölçümleri.....	68
Şekil 4. 22. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksine ait termal eğri	70
Şekil 4. 23. [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksine ait termal eğri	70
Şekil 4. 24. Atom numaralandırması ile [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin asimetrik birimi (Hidrojen atomları açıklık için ihmal edilmiştir.)	74
Şekil 4. 25. Hidrojen bağı etkileşimlerini gösteren [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O kompleksinin paket diyagramı (Hidrojen atomları daha net gözükmesi için gösterilmemiştir.) ...	75
Şekil 4. 26. 3D hidrojen bağı ağında çoklu hidrojen koordinasyonu	75
Şekil 4. 27. ARPE-19 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda (100-500 µM) uygulanması *Kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; One way Anova; Post-Hoc: Dunnett test; Tukey HSD test; Tamhane T2 test; α :0.05.....	78
Şekil 4. 28. ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksinin tek başına uygulaması *Kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; One way Anova; Post-Hoc: Dunnett test; Tukey HSD test; Tamhane T2 test; α :0.05.....	79
Şekil 4. 29. ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksitten dört saat önce uygulaması *Kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ¹ H ₂ O ₂ grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; One way Anova; Post-Hoc: Dunnett test; Tukey HSD test; Tamhane T2 test; α :0.05	80
Şekil 4. 30. ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksit ile birlikte uygulaması *Kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; One way Anova; Post-Hoc: Dunnett test; Tukey HSD test; Tamhane T2 test; α : 0.05	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. 1. L-Malik asidin kimyasal özellikleri	2
Çizelge 3. 1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	35
Çizelge 3. 2. Malik asit kalsiyum kompleksi dört saat öncesi uygulaması	48
Çizelge 4. 1. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin dalga boyu (λ) geçiş değerleri.....	53
Çizelge 4. 2. Malik asit kalsiyum kompleksine ait elektrokimyasal datalar	61
Çizelge 4. 3. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin fotoluminesans datalar	66
Çizelge 4. 4. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksine ait kütle kayıpları	69
Çizelge 4. 5. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin kristalografik veriler	71
Çizelge 4. 6. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin bağ uzunlukları ve açıları.....	72
Çizelge 4. 7. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksi hidrojen bağı geometrisi (Å , $^\circ$)	73
Çizelge 4. 8. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin antimikrobiyal aktivitesi	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μM	: Mikromol
$\mu\text{mol/L}$: Mikromol litre
$^{13}\text{C-NMR}$: Karbon Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi
$^1\text{H-NMR}$: Proton Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi
3D	: 3 Dimension
ATP	: Adenozin trifosfat
CV	: Cyclic Voltammetry
DMF	: Dimetilformamit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı
DTA	: Diferansiyel Termal Analiz
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbend Assay
EtOH	: Etilalkol
FBS	: Fetal Bovine Serum
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
IR	: Infrared Spektroskopisi
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
M	: Molarite
M.A.	: Molekül ağırlığı
MTT	: 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
nm	: Nanometre
PBS	: Phosphate Buffered Saline

ppm	: Milyonda bir
TCA	: Trikarboksilik asit döngüsü
TGA	: Termogravimetrik
Uv-Vis	: Ultraviyole Görünür Alan Spektroskopisi
XRD	: X-Ray Powder Diffraction
δ	: Kimyasal Kayma
λ_{\max}	: Maksimum Dalga Boyu
μl	: Mikrolitre
ν	: Frekans



1. GİRİŞ

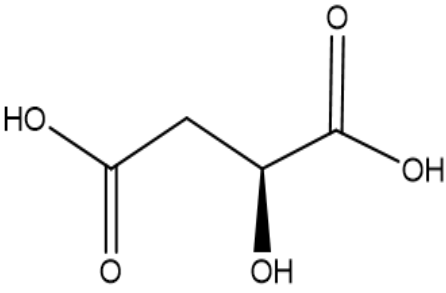
1.1. Malik Asit

Sumak, *Rhus coriaria* L. (Anacardiaceae), Akdeniz bölgesinde yetişen yabancı yenilebilir bir bitkidir. *Rhus coriaria* L. antik çağlardan beri Akdeniz bölgesinde Rhus cinsinin önemli ve en çok kullanılan türüdür [1]. Kahramanmaraş bölgesinde doğal olarak yetişen *Rhus coriaria* (Sumak) türü yaygın olarak bulunmakta ve halk tarafından bu bitki tıbbi amaçlar içinde kullanılmıştır. Sumak tohumlarının içeriğinde, mum, flavonoidler, sitrik, malik ve tartarik asitler bulunur. Son yıllarda biyomühendislik uygulama alanındaki modern gelişmelerin ışığında bitkilerde bulunan etken maddelerin tanımlanmasıyla saflaştırılması, yoğunlaştırılması, kompozit oluşturulması ve karakterizasyonunun yapılması sonucunda giderek daha fazla ilgi odağı haline gelmiştir. Bu konu ile ilgili araştırmalar hakkında literatürde güncel bilgiler yer almaktadır.

Malik asit, biyoteknolojik değeri olan hidroksi dikarboksilik asitlerden olup, IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) kimyasal adı 2-Hidroksibütandioik asittir. Malik asitin iki stereo izomerik formu (L- ve D-enantiomerleri) vardır (Çizelge 1. 1).

Bazı küçük α -hidroksikarboksilat anyonlarının kimyasal olarak önemli özelliği, bazı özelliklerinden fulvik ve humik asitler (topraklarda bulunan yüksek molekül ağırlıklı biopolimerler) veya şekerler gibi daha karmaşık doğal ligandlara benzer davranış göstermesidir. Özellikle, çoğunluğu α -hidroksikarboksilat grubu içeren, deniz sideroforlarını taklit edebilirler. Aslında, sitrik asit bile demir alımında belirli bir dış membran sitrat reseptörü tarafından tanınan bis-demir (III) -sitrato kompleksi olarak işlev gören bir siderofor olduğuna inanılmaktadır. α -Hidroksikarboksilat ligandlarının koordinasyonu sadece demir alımına değil, aynı zamanda bir dizi diğer metallerin *in vivo* kullanımı için gereklidir. Örneğin, vanadyum ve molibden içeren ligandların koordinasyonunun hareketi ve indirgenmesi için gerekli olduğu görülmektedir.

Çizelge 1. 1. L-Malik asidin kimyasal özellikleri

	Sistemik adı	2-Hidroksibütandioik asit
	Kimyasal formülü	C ₄ H ₆ O ₅
	Molekül kütlesi	134.09 g/mol
	Erime noktası	128°C-130°C
	Kaynama noktası	225 °C ve <235 °C
	Yoğunluğu	1.609 g/cm ³
	Renk	Beyaz kristal yapı
	Tat	Ekşi

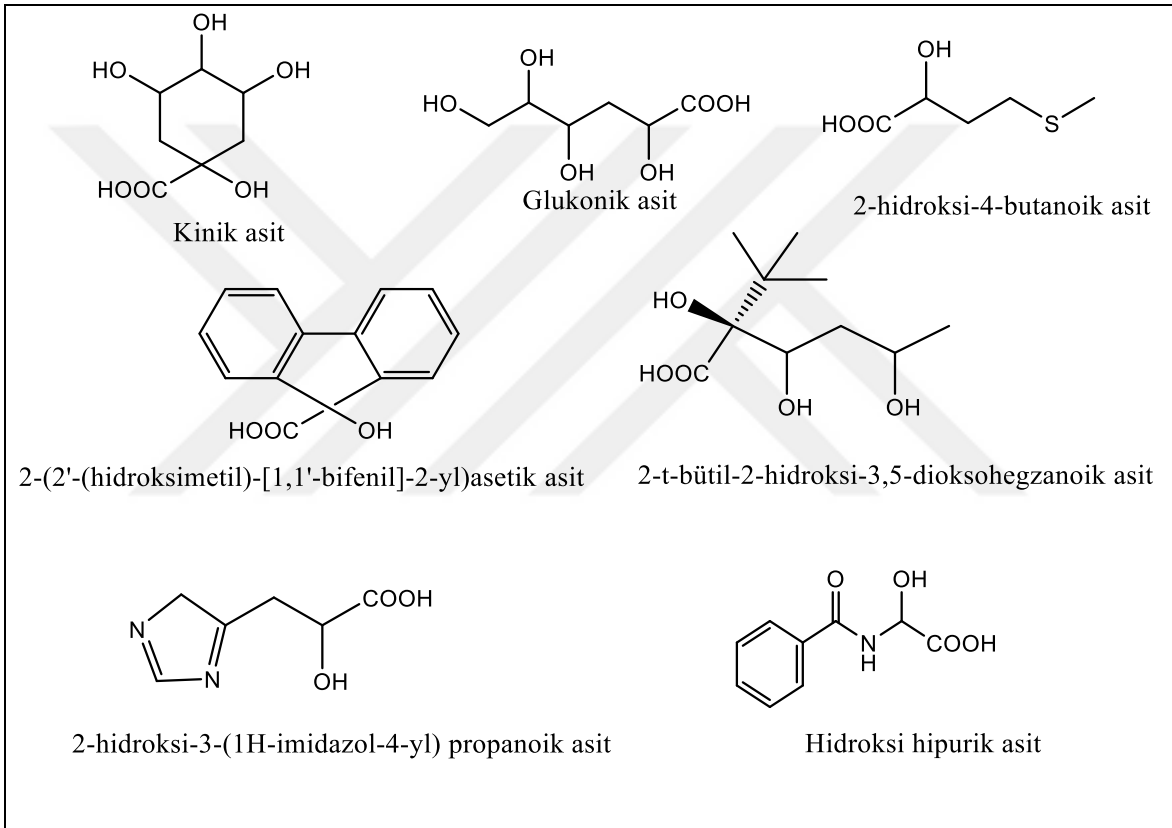
α -hidroksikarboksilat ligandlarının metal kompleksleri, tıbbi alanlarda kullanılmaktadır. Bizmut (III) sitrat, antibakteriyel ve antiülser, üçüncü nesil platin içerikli Lobaplatin ve Nedaplatin bileşikleri gibi anti kanser aktivitelerine sahiptir. Terapötik olmayan tıbbi kullanımları: ferrik amonyum sitrat onkoloji teşhisinde ajan olarak kullanılır. Gastrointestinal sistemde manyetik rezonans'da galyumun (⁶⁷Ga), α -hidroksikarboksilat ligandı ile şelat oluşturmasıyla hidroliz olayını engeller. manyetik rezonans görüntülerinde kontrast madde olarak ferrik amonyum sitrat kullanılır ve ⁶⁷Ga, sitrat olarak diagnostik onkolojide, hidrolizi önleyerek α -hidroksikarboksilat ligandı ile galyum arasında şelat oluşturur [2, 3].

1.1.1. α -Hidroksikarboksilik asitler

α -Hidroksikarboksilik asitler, metalleri koordine edebilen: bir karboksilat kısmı ve alkol grubu içeren iki fonksiyonel gruba sahip organik bileşiklerdir. Birlikte, bu gruplar, farklı düzenlemelerde çoklu metal iyonlarının koordinasyonunun yanı sıra, moleküler arası etkileşimler yoluyla supramoleküler dizilerin oluşturulması için sayısız olasılıklar yaratmaya olanak sağlar. α -Hidroksil grubu elektronegatif bir karaktere sahip olması ile birlikte karboksilik asidin kuvveti artar [4] ve metal iyonları ile kararlı metal kompleksler oluşturur. Laktik, mandelik ve malik asitler içeren α -hidroksi asidin ilavesinde, karışık sentetik prosedürlere gerek duymaksızın merkezi olmayan simetrik metal komplekslerinin oluşumuna olanak sağlamaktadır.

1.1.2. Monokarboksilik asitler

Literatürde birçok monokarboksilik α -hidroksi asitler bulunmaktadır. Bu asitler koordinasyon kimyasında sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde; glikolik, laktik, mandelik, benzilik veya kinik asitler ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, yeni bir çalışmada kinik asitin kuinat kısmı ile çinko ve kobalt arasındaki etkileşimleri yapıları ve özellikleri katı halde susuz ortamda pH ve sitokimetriye bakılarak incelenmiştir [4]. Aşağıda bazı monokarboksilik α -hidroksi asitlerin yapıları gösterilmektedir (Şekil 1. 1).

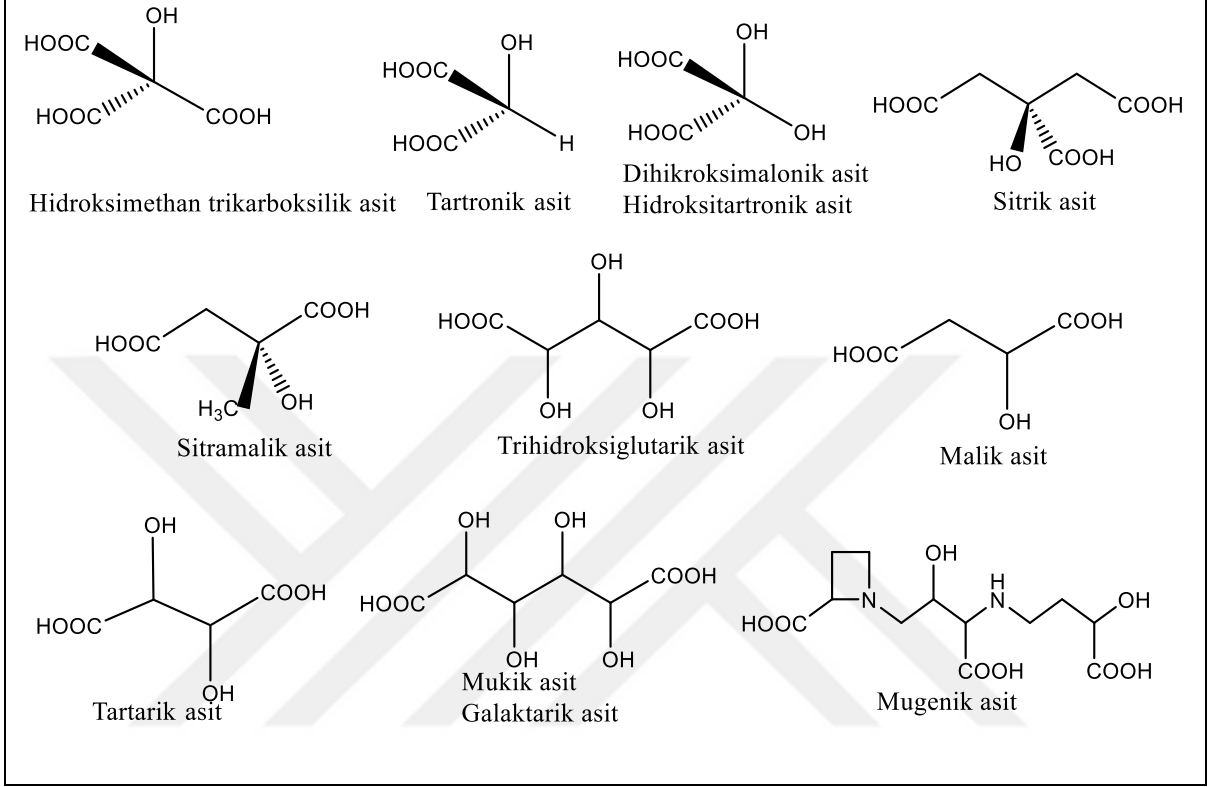


Şekil 1. 1. Bazı monokarboksilik α -hidroksi asitlerin yapısı

1.1.3. Polikarboksilik asitler

Bazı polikarboksilik α -hidroksi asitler, Şekil 1. 2'de gösterilmektedir. Ketomalonik, trihidroksiglutarik, tartarik ve müsik asitler dört tane α -hidroksikarboksilat içerir. Polinükleer türlerin hem çözeltide hem de katı halde stabilize edilmesine olanak tanıyan iki farklı α -hidroksikarboksilik kısım ihtiva ederler. Diğer ikisi tek bir hidroksil grup ve iki veya üç karboksil grup içerir. Birçok çalışmada polikarboksilik α -hidroksi asitlerin koordinasyonları sitrik, malik ve tartarik asit ile ilgilidir. Örneğin, sitrik asit, karboksil grubundaki üç protonu kolayca verebildiği gibi alkol yapısındaki protonuda kolayca

verebildiği, ^{13}C -NMR çalışmalarında gösterilmiştir. Bu protonlar, Fe (III) ve Al (III) gibi üç değerlikli metallere seçici koordinasyon için ideal olup, bilinen kristal yapılarının hidroksi grubunun sitrik komplekslerinde güçlü Lewis baz yapılarını oluşturduğunu göstermektedir [5].



Şekil 1. 2. Bazı polikarboksilik α -hidroksi asitlerin yapısı

1.1.4. Bağlanma modları

α -Hidroksi karboksilat anyonları kompleks sentezleri sadece metallere bağlı değil aynı zamanda reaksiyona girenlerin mol oranları da bağlıdır. Örneğin, bazı durumlarda yardımcı ligand kullanıldığında; monokarboksilik α -hidroksi asit ile hacimli substitüe gruplar benzilik asit (H_2B) kombinasyonu bazı durumlarda, hidroksi asitin anyonu genellikle ikinci koordinasyon küresinde $((\text{Cu}(\text{en})_2(\text{OH}_2))(\text{HB})_2$ [6], $[\text{Zn}(\text{Im})_6](\text{HB})_2$ ve $[\text{Ni}(\text{phen})_3](\text{HB})_2$ ancak uzun kristalleşme süresinde tutulursa, $[\text{Zn}(\text{HM})(\text{NN})_2]$ (HM =mandelato, NN =phen veya bpy) ve $[\text{Cu}(\text{HM})(\text{bpy})_2](\text{HM})\cdot\text{H}_2\text{M}\cdot\text{CH}_3\text{CN}$ [7] gibi birinci koordinasyon küresinde yer alır. Mono veya polikarboksilik asitler içerisinde gözlemlenen α -hidroksikarboksilat biriminin koordinasyonları Şekil 1. 3'de gösterilmektedir. Çoğu durumda bir ile dört metal merkezi arasında koordine olurlar, tartarat ise beş metal ile koordine ettiği gözlemlenmiştir [8]. Tek bir katyonun üç farklı şekilde koordinasyonu gözlemlenmiştir. Bunlar; karboksilat ve alkolik hidroksi gruplarının iki dişli şelat

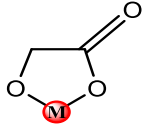
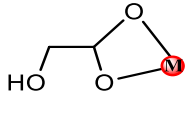
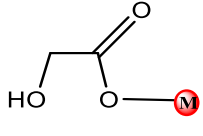
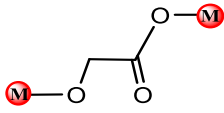
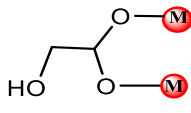
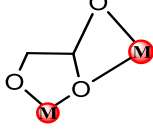
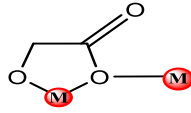
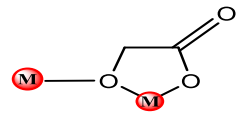
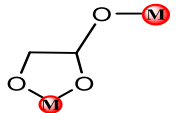
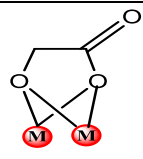
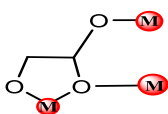
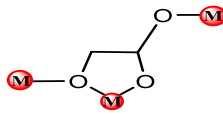
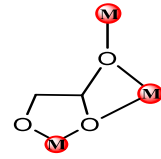
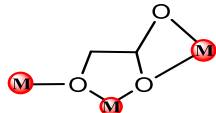
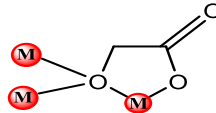
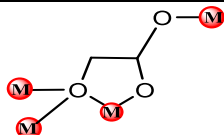
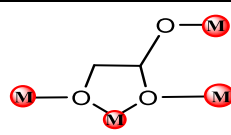
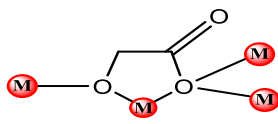
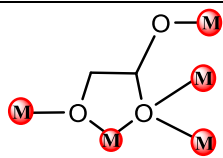
($\kappa^2(\text{O},\text{O}'')$), sadece karboksilat grubunun iki dişli şelat oluşturması ($\kappa^2(\text{O},\text{O}')$) ve son olarak karboksilat üzerinden tek dişli şelat (κO) oluşturması şeklindedir.

Çift dişli şelat modu ($\kappa^2(\text{O},\text{O}'')$), M^{II} komplekslerinde genellikle monoanyonik kabul edilen moddur α -hidroksikarboksilatlar ve H_2O [9], NH_3 , piridin [10] veya imidazol gibi yardımcı ligandlar ve aynı zamanda doğrusal bir N,N' -ligand kullanıldığında koordinasyon polimerleri üretirler [11]. Doğrusal olsa da, böyle N,N' -ligandları, genellikle, malik asit gibi polikarboksilik α -hidroksi asitler, doğrusal köprü olarak işlev gören α -hidroksikarboksilat parçasına ait olmayan karboksilat grubu ile kombine edildiğinde, yüksek boyutluluk derecesinde koordinasyon polimerlerine neden olur [12]. İlginç bir şekilde, N,N' -ligandı spinal olarak monodentat olan molekül kompleksi farklı özelliklerinden dolayı, α -hidroksikarboksilat halkalarının metaloaromatik olduğu yapısal olarak kanıtlanmıştır [13].

($\kappa^2(\text{O},\text{O}'')$), modu ayrıca karışık ligand kompleksleri, N,N' -kenetleme ligandları, örneğin 1,10-fenantrolin [14], 2,2'-bipiridin [15] 2,2'-dipiridilamin [16] veya etilendiamin [17] sıklıkla bulunur.

Bunların çoğunda, ($\kappa^2(\text{O},\text{O}'')$), modunu sergileyen bileşiklerin çoğunun dahil olduğu koordinasyon bileşiklerinde, α -hidroksikarboksilat ligandları monoanyonik, ancak bazı durumlarda belirli sentez ve kristalleşme koşulları dianyonik şelasyon davranışına yol açmıştır.

Çift dişli şelat modu ($\kappa^2(\text{O},\text{O}')$), nadir kullanılmaktadır, Monokarboksilik α -hidroksi karboksilik asitlerin (mandelato ve benzilato) fenil grupları ile Cu^{II} bileşikleri bu moda örnek olarak gösterilebilir.

BİR METAL			
			
$\kappa^2\text{O},\text{O}''$	$\kappa^2\text{O},\text{O}'$	κO	
İKİLİ METAL			
			
$\kappa^2\text{O},\text{O}''$	$\kappa^2\text{O},\text{O}'$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa^2\text{O},\text{O}''$	
			
$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}''$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa^2\text{O},\text{O}'$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa^2\text{O},\text{O}''$
ÜÇLÜ METAL			
			
$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}; \kappa\text{O}'$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}''; \kappa\text{O}'$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa^2\text{O},\text{O}'; \kappa\text{O}'$	
			
$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa^2\text{O}, \kappa\text{O}'; \kappa\text{O}''$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}''; \kappa\text{O}''$		
DÖRTLÜ METAL			
			
$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}''; \kappa\text{O}''; \kappa\text{O}'$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}''; \kappa\text{O}; \kappa\text{O}'$	$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}''; \kappa\text{O}; \kappa\text{O}'$	
BEŞLİ METAL			
			
$\kappa^2\text{O},\text{O}''; \kappa\text{O}''; \kappa\text{O}; \kappa\text{O}; \kappa\text{O}'$			

Şekil 1. 3. Katı fazda temel koordinasyon modları

Tek dişli şelat modu (κO), karboksilat grubu ile ligand arasında veya metal merkez atomu ve yardımcı ligand arasında oluşan şelat şeklidir. α -Hidroksi asitler çoğunlukla bu modu gösterir. Bazı bileşikler aynı anda farklı modlarda gösterebilir. Örneğin glikolato, κO ve $\kappa^2(\text{O},\text{O}')$ modları sergilerler.

1.1.5. Metal α -hidroksikarboksilatlar

Metal α -hidroksikarboksilatlar ayrı mono- veya polinükleer bileşikler veya koordinasyon polimeri olabilir. Aslında, α -hidroksikarboksilatların olası birden fazla koordinasyon modları, çoklu donör atomlar ve bu ligandların iki veya daha fazla iyonlaşması olasılığı, belirli bir asit ve katyonun genellikle farklı koşullar altında farklı yük ve nükleik özelliklere sahip çeşitli kompleksler oluşturabildiği anlamına gelir [18]. Örneğin, malatın β -karboksilat grubu, α -hidroksikarboksilat grubu ile kenetlendiği gibi aynı metal iyonunu koordine edebilir, bu da malatı üçlü hale getirir veya koordinasyon polimerlerine yol açarak diğer metal iyonlarını koordine edebilir. Örneğin malat çeşitli metal iyonları ile α -hidroksikarboksilat gruplarını şelatlaştırdığı gibi β -karboksilat grupları ile metal iyonlarına kordine olarak şelatlaşma yapabilir ve üç dişli malat oluşturarak polimer koordinasyonu sağlayabilir. Çift dişli şelat modu sıklıkla oktahedral tek çekirdekli kompleksler verme eğilimindedir. Formül olarak $[\text{M}^{\text{II}}(\text{Hhc})_2(\text{OH}_2)]$, ($\text{H}_2\text{hc}=\alpha$ -hidroksikarboksilik asit) şeklinde gösterilir. Koordinasyon polimerlerini α -hidroksikarboksilik asit liganlarıyla hazırlamak için farklı koordinasyon modları vardır. Örneğin, Mn_2 , Fe_2 , Co_2 , Ni_2 ve Zn_2 kompleksleri L-malat ile kiralleşir; karboksilat grupları α -hidroksikarboksilatların etrafını sarar [19] (Şekil 1. 4).

1.1.7. L-malik asit üretim çalışmaları

L-malik asit ilaç, kozmetik ve yiyecek endüstrisinde kullanılan önemli bir maddedir. L-malik asidin ticari üretimi esas olarak iki yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi kimyasal yöntem, diğeri ise mikrobiyal yöntemdir.

L-malik asit formu asetondan veya aseton-kloroform karışımından kristallendirilir. Benzende çözünmez [20]. Malik asit üretiminde, kimyasal yöntem olarak fumarik aside su katılması ile rasemik karışım elde edilir. Mikrobiyal yöntemde ise mikroorganizma kullanılmaya dayanan bir yöntem olup fumarik asit, L-malik aside fumaraz enzimi ile dönüştürülür.

Yaptığımız literatür araştırmalarında 2000 yılına kadar saf enzimle yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Daha sonraki yıllarda Giorno ve arkadaşları [21] asimetric kapiler membranlara hapsedilmiş fumaraz içeren membran reaktör kullanarak fumarik asidi L-malik aside dönüştürmüştür.

Bélafi-Bakó ve arkadaşları [22] ile Chi ve arkadaşları [23] jel içinde hapsedilmiş fumaraz enzimi içeren sabit yataklı reaktörden amonyum fumaratı (fumarik asidin sudaki çözünürlüğünün az olması nedeniyle) geçirerek bir çalışma yapmışlardır. Çalışma ağırlıklı olarak reaktörden toplanan fumarik ve malik asidin amonyum tuzlarının ayrılmasıyla ilgilidir. Ayırma işlemi için elektrodializ çalışmaları yapılmıştır.

Mikrobiyal hücreler kullanılarak yapılan çalışmaların temeli 1924 yılına dayanmaktadır [24]. Çalışmada maya kullanılarak alkol fermantasyonu ile L-malik asit elde edilmiştir.

Poliakrilamid jel elektroforezi matrikste immobilize yöntemiyle 1960'lı yıllarda *Lactobacillus brevis* hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalarda devam eden enzim sistemi nedeniyle reaksiyonun istenilen basamakta durdurulamaması, yan ürünlerin oluşumu (özellikle süksinat birikmesi) ürünün kirlenmesine ve verimin düşük çıkmasına neden olmuştur. 1974 yılında ise yüksek miktarda fumaraz aktivitesine sahip *Brevibacterium ammoniagenes* hücreleri poliakrilamid jel matrikste immobilize edilerek kullanılmıştır [25].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise bakteri hücreleri yerine maya hücrelerinin kullanıldığı çalışmalara rastlanılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan maya ise *Saccharomyces cerevisia*'dır. Bu organizmanın genetik yapısı değiştirilerek de kullanılmıştır; avantajları sıralanabilir; süksinat yığılmasını azaltmakta, yüzde verimliliği artırmakta, gıda sanayinde daha güvenle kullanılmasını sağlamaktadır [26-28].

L-malik asit ilaç ve kozmetik alanlarda kullanılan ürünlerin içeriğinde de bulunmaktadır. Çünkü derinin güneş ile direkt temasında deri, güneşten aldığı enerjiyi toplar ve dağıtır; aynı zamanda zararlı etkilerinden alttaki yapıları korur. Bunun içinde derinin güneşten yararlanırken zarar görmesini engeller. Bu zararlı etkiler, kanser türlerinin gelişimini tetikler, uzun vadede de erken yaşlanmaya sebep olur. L-malik asidin ise cildi koruyucu etkisi olduğu için güneş koruyucularında kullanılarak foto-yaşlanma izlerini, UV ye bağlı kronik güneş hasarlarını azaltır ve özellikle bazı deri kanserlerini ve kanser öncülerinin oluşumunu engeller. Aynı zamanda meyve asitlerinin (malik asit, laktik asit, sitrik asit, glukolik asit gibi) cilt üzerinde yenileyici etkileri olduğu da bilinmektedir. Meyve asitleri cildin üst katmanındaki ölü hücre tabakasını yok edip, düzensiz çalışan hücreleri onararak genç hücrelerin üst katmana çıkmasını sağlar. Derideki geniş gözeneklerini sıkıştırır, pürüz, kırıışıklık ve lekelerin (kahverengi leke, çil, siğil ve akne izleri gibi) giderilmesini sağlar, cildin daha yumuşak, canlı, berrak ve sıkı görünmesini sağlar.

Ayrıca boğaz tahrişlerinde kullanılan ilaçlarda, öksürük şuruplarında ilaca meyve tadını vermek için kullanılmaktadır. Gargaralarda ve diş temizlik maddelerinde antiseptik özelliğinden faydalanılarak kullanılmaktadır. Yalnız malik asitteki iki karboksil grubundan dolayı tahriş edici özelliği vardır. Bunu ortadan kaldırmak için alkollerle esterleşme reaksiyonuna tabi tutulurlar. Malik asidin mono esterleri de yine ilaç, kozmetik ve yiyecek sanayinde malik asit yerine kullanılabilir.

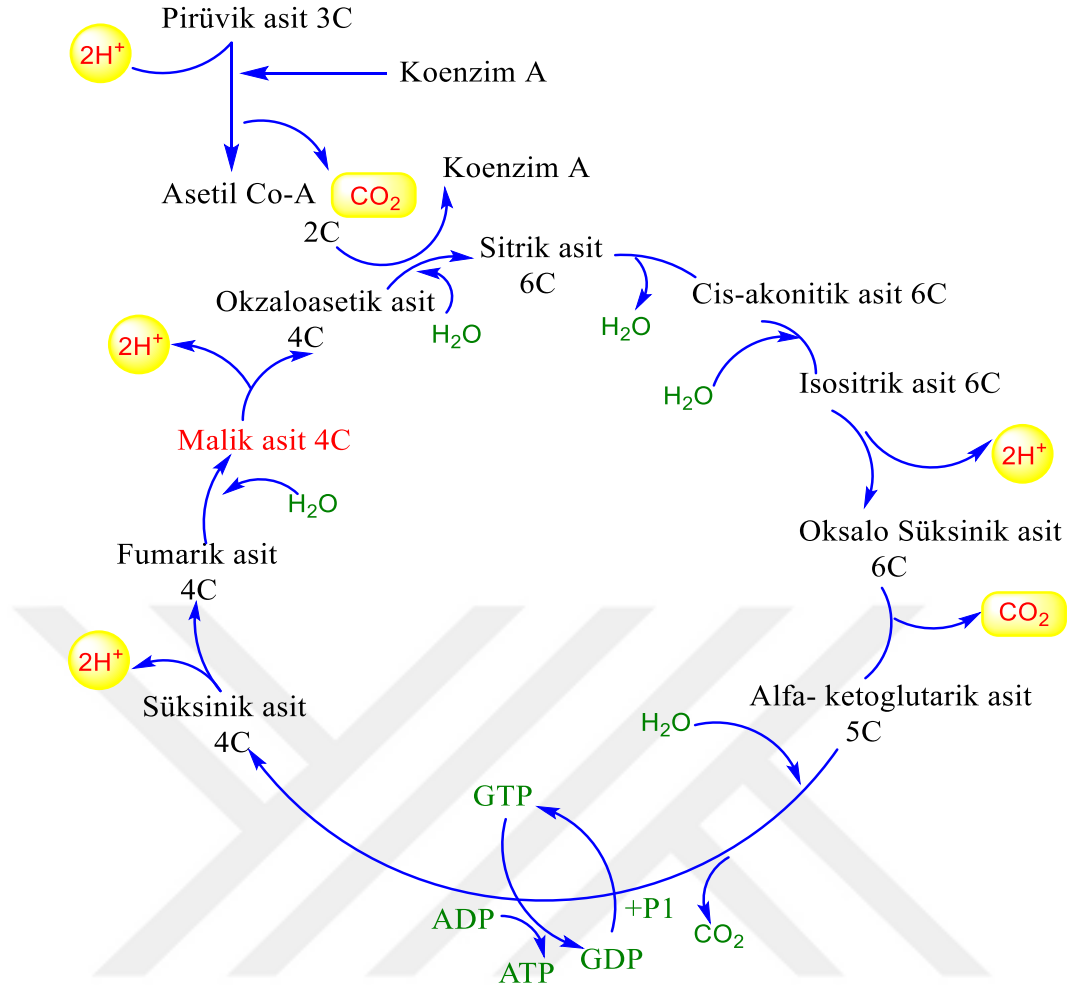
Malik asit, hücresel metabolizma için önemli rol oynar ve ATP' nin vücutta elde edilmesinde yardımcı olur. Enerji üretimi dışındaki malik asit; kas yorgunluğunun önlenmesi, bazı metallerin toksik etkilerinin azaltılması, ağız sağlığının korunması, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, sinirler, kaslar ve kalbin düzgün çalışmasını ve cildin sıkı ve düzgün olmasını sağlar. Malik asit, vücutta biriken iyi bir kenetleme maddesidir ve alüminyum veya kurşun gibi potansiyel olarak toksik metallerle bağlanma kabiliyetine sahiptir [29]. Metal toksinler inaktive edilir ve sağlığı tehdit eden faktörleri azaltır.

α -Hidroksikarboksilik asitler doğanın her yerinde bulunurlar, hem bitkilerde hem de hayvanlarda birçok biyolojik proseste önemli rol oynarlar. α -Hidroksikarboksilat ligandlarının özel metal kompleksleri, çeşitli tıbbi kullanımlara sahiptir. α -Hidroksikarboksilik asitler, metalleri koordine edebilen iki işlevsel gruba sahip organik bileşiklerdir: bir karboksilat parçası ve karboksilat grubuna bir alkol grubunun ilavesi şeklindedir.

α -Hidroksikarboksilik asitler doğada birçok yerde bulunurlar. Bitkilerde ve hayvanlarda birçok biyolojik proseste önemli rol oynarlar. α -Hidroksikarboksilik asitlerin anyonları, Krebs döngüsü (sitrata, izositrat, malat), Cori çemberi (laktat) ve fotospirasyon (glikolat) gibi temel biyokimyasal süreçlere katılmaktadırlar. Sitrik asit, kan plazmasında 0.1 mM konsantrasyonda bulunur ve hemokromatozis veya talasemi gibi hastalıklarda büyük majörlü transferrin içermeyen demir ligandları olduğu bilinmektedir [30]. Homositrat, metal bağlı bazı nitrogenazların aktif bölgesinde bulunur. Biyolojik azot fiksasyonu sırasında azotun amonyağa indirgenmesini katalize eder [31]. Şikimik asitin öncüsü olan kinik asit [32], aromatik amino asitlerin biosentezinde yer alır. Bu asitlerden bazıları veya bunların türevleri farmasötik, kozmetik, biyolojik, gıda ve genel endüstriyel kimya alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin birçok dermatolojik ve kozmetik ürün, glikolik, laktik, sitrik, hidroksibutirik veya malik asit içerir [29]. Glikolik asit ve laktik asit ayrıca ilaç iletiminde yaygın olarak kullanılan bir polimer olan poli (D, L-laktik-ko-glikolik asit) gibi biyomalzemeleri sentezlemek için kullanılır [33].

Malik asit gıda endüstrisinde, asitliği düzenleyici ve lezzet verici olarak bazen sitrik asitle bazen de sitrik asidin yerine kullanılmaktadır. Aynı zamanda malik asit tuzlu veya sirkeli cipslerin yapımında kullanılan ana tatlandırıcı içeriklerinden biridir. Sudaki çözünürlüğü yüksektir. Malik asit, gıda katkı maddesi olarak kullanıldığında, E296 numarası ile gösterilir.

Organik asitler yapılarında bulunan karboksil grubu sayısına göre sınıflandırılırlar. Buna göre organik asitler monokarboksilli, dikarboksilli ve trikarboksilli asitler olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. Trikarboksilli asitler içerisinde yer alan malik asit, trikarboksilik asit döngüsünde (TCA: sitrik asit döngüsü, krebs döngüsü) pruvattan veya fumarik asidin bir mol su ilavesi ile oluşan ara ürünüdür (Şekil 1. 5).



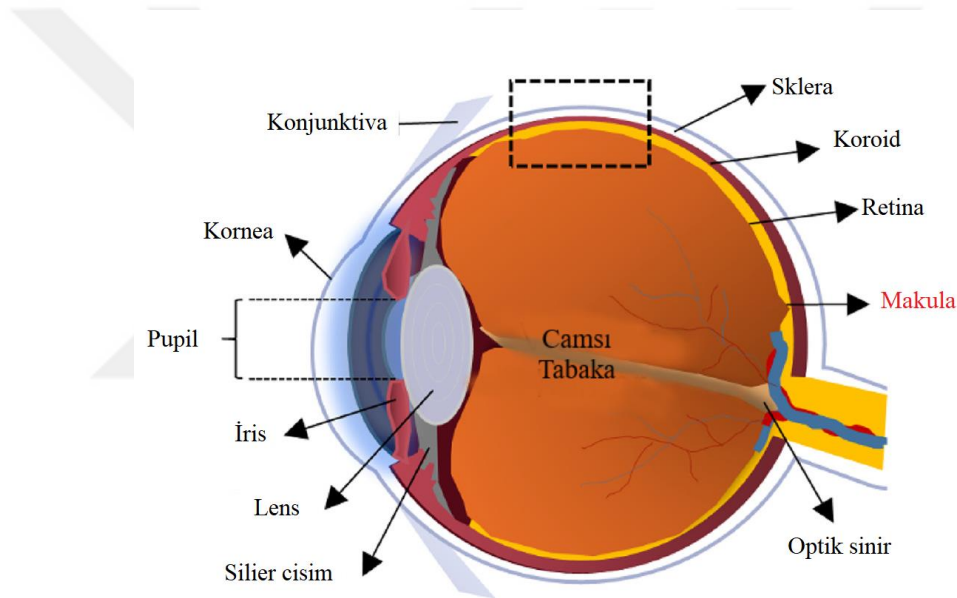
Şekil 1. 5. Krebs döngüsü ve malik asit oluşumu

Malik asit terimi ilk olarak Karl Wilhelm Scheele tarafından 1785 yılında elmadan elde edildiği için latince anlamı olan Malus (elma)'dan almıştır. Malik asit (2-hidroksibütandioik asit, 2-hidroksisüksinik asit) bir dikarboksilik asittir ve bir asimetrik karbona sahiptir ve bu nedenle iki izomer, L ve D' de ortaya çıkar [34]. Uzun yıllardır yapılan çalışmalarda hücrel metabolizmanın önemli bir parçası olan TCA çevriminde ara ürün olarak belirlenmiştir. Malik asit üretiminde dört ana metabolik yol bulunmaktadır. Bu yollardan ilki pirüvatın okzaloasetat'a karboksilasyonunu ve daha sonra, molekül başına 2 mol glikoz ile en yüksek teorik verime yol açan malat indirgemelerini içerir. İkincisi ise klasik TCA döngüsüdür. Üçüncü muhtemel yolak ise glioksilat reaksiyonudur ki burda 1 mol glikoz elde edilir. Dördüncüsü ise döngüye katılmadan direk isositratın malik asite indirgenmesidir [28, 35].

1.2. Göz Anatomisi

Göz, iki gözün stereoskopik görüş sağlarken dış dünyayı görmesini sağlar. Gözün ön yüzeyini nemli ve temiz tutan bir gözyaşı tabakası bulunur, göz içi basıncı ise göz şeklini korur. Bu şekil, gözün normal optikleri için gereklidir. Ekstraoküler kaslar görsel görüntüleri hizada tutar. Kornea ve lens, ışığı kırmakta ve gözbebeği göze giren ışığın miktarını boyutunu düzenlerken, camsı açık bir optik ortam sağlamaktadır. Retinaya düşen ışık, görsel yol boyunca serebral korteksin görsel alanlarına giden nöral impulslara dönüştürülür [36].

Göz küresi, üç doku katmanından oluşur: (1) dış koruyucu tabaka, (2) orta tabaka; kan damarları, pigment hücreleri ve kas lifleri ve (3) retina adı verilen iç, ışığa duyarlı bir tabakadan meydana gelir (Şekil 1. 6).



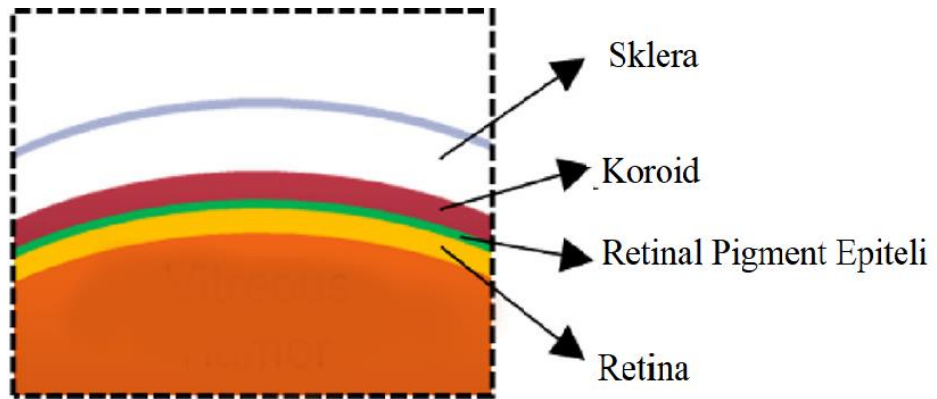
Şekil 1. 6. Gözün genel yapısı

Dış tabaka sert ve kalındır ve kolajen liflerinden yapılıdır. Ön kısım şeffaftır ve böylece ışığın göze girmesine izin verir. Bu şeffaf yapıya kornea denir ve üç katmandan oluşur. Lifli tabakanın içinde vasküler / kas tabakası bulunur. Zengin vasküler olan koroid, retinanın dış tabakalarına ve ön katmanlara ait yapılara oksijen ve besleyici maddeler sağlar. İris, gözün halka şeklindeki, kaslı, renkli kısmıdır. İrisin en iç kısmı, pupil daralmasına neden olan dairesel sfinkter kas liflerini içerir. “Sfinkter pupilla”, siliyer ganglion kaynaklı postgangliyonik parasempatik sinir lifleri tarafından sağlanır.

Retina iç tabakaları bipolar ve ganglion hücreleri ve sinir lifleri ve sinapslarından oluşur. Göze giren ışık, çubuk ve konilere ulaşmak için şeffaf retinadan geçer. Bunlar ışığa maruz kaldıklarında elektriksel dürtü üretirler. Bipolar ve ganglion hücreleri ve onların sinapsları değiştirir.

Göz küresinin en iç tabakası nöral tabaka veya retinadır. Retina, iç tabakaları bipolar ve ganglion hücreleri, sinir lifleri ve sinapslarından oluşur. Işığa karşı duyarlı olan çubuk ve koni fotoreseptörleri, ortama gelen ışık impulslarını algılar ve elektrokimyasal sinyale dönüştürür. Optik sinirin göze girdiği bölgede fotoreseptörler yoktur. Bu retinada küçük kör noktaya neden olur. Gözün arka kutbunda, optik diske medial, makula lutea (sarı nokta) görülebilir. Bu, renkli fotoreseptörlerin (konilerin) yoğun olarak bulunduğu küçük bir alan olan fovea'nın pozisyonudur. Fovea, bir nesneye sabitlendiğinde ışık ışınlarının yoğunlaştığı en büyük görme keskinliğinin noktasıdır [37].

Retina çok aktif bir metabolizmaya sahiptir. Retinal kan damarları iç katmanlara oksijen verirler. Retina dış tabakaları, koroidin kan damarlarından difüzyon yoluyla oksijen elde eder. Retinal kılcal damarlar beyin kılcal damarlarına benzerdir ve yüksek oksijen gereksinimi vardır. Bu nedenle, anoksia adı verilen herhangi bir oksijen eksikliği veya kan damarlarının hastalıkları retinaya zarar verebilir. Üç ana retinal hastalık grubu vardır: (1) vasküler retinopatiler, kan veya kan damarlarının hastalıklarından, (2) retinal ve koryoretinal dejenerasyonlar ve (3) retina dekolmanı gruplandırılır [38].



Şekil 1. 7. Retinal pigment epiteli tabakası

Retina pigment epiteli, dış kan retina bariyerini koruyan sıkı bağlantılarla bir epitel tabakasıdır (Şekil 1. 7). Bruch membranı retina pigment epiteli ve altta yatan koryokapillaris için temel membran olarak görev yapar. Preklinik farmakokinetik çalışmalar, retina pigment

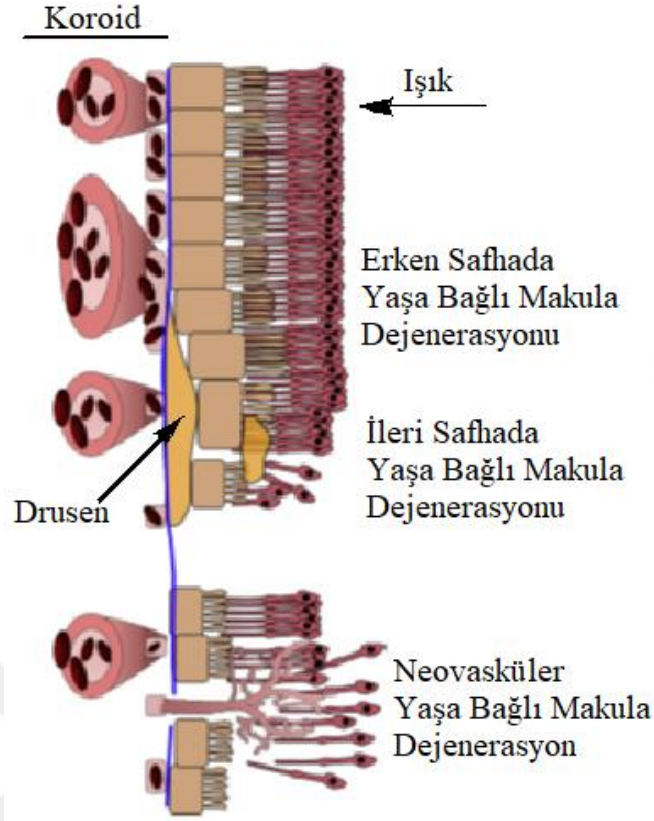
epitelinde diğer uygulama yollarına kıyasla yüksek biyoyararlanımın mümkün olduğunu göstermiştir [39].

Suprakoroidal alan, gözün arka kısmının çevresini saran sklera ve koroid arasındaki potansiyel bir boşluktur. Suprakoroidal alan, ilaç teslimi için çekici bir bölgedir, çünkü koroid, retinal pigment epitelyumu ve yüksek biyoyararlanımı olan retinayı hedef alırken, gözün başka yerlerini hasardan korunur [39]. Oküler patoloji, görme bozukluğu ve körlüğe yol açabilir ve sonuç olarak yaşam kalitesinde kayda değer kayıplar olabilir [40-43]. Özellikle, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, diyabetik retinopati, noninfeksiyöz üveit veya santral seröz koryoretinopati gibi arka segment hastalıkları, retina yapısı ve fizyolojisi bozulduğunda kalıcı görme kaybına neden olabilir [44].

Göz hastalıklarını tedavi etmek için topikal, oral, intravenöz, subkonjonktival, perioküler ve intravitreal yollar gibi farklı ilaç uygulama yolları kullanılır. Statik oküler bariyerler korneal epitelyumu, kandaki sulu bariyeri, sklerayı, retinal pigment epitelyumunu ve kan kılcal endotelial hücreleri içerir [45].

1.2.1 Makula Anatomisi

Oftalmologlar tarafından retinanın merkezini tanımlamak için Latince "macula lutea (Sarı nokta)" terimi kısaca "makula" olarak adlandırılmaktadır [46]. Makula, renk görüşü ve keskin görmeyi sağlamak için tasarlanmış merkezi retinadır. Nörosensör retina, retina pigment epiteli (RPE), Bruch membranı ve koroidden oluşur [47]. Retina pigment epiteli, fotoreseptör tabakasına bitişik olan apikal uzantıları, fotoreseptör dış segmentlerin yoğun tabakasıyla interkale edilen ve temel tabakası, dış retinayı koroidten ayıran Bruch membranı üzerinde bulunur (Şekil 1. 8) [48]. Fotoreseptörlerle iletişimde Retina pigment epiteli foto reseptörlerin sağlığını koruyan oldukça uzmanlaşmış kutuplaşmış bir hücredir. Retina pigment epiteli, fotoreseptör dış segmentlerinin günlük fagositozu (RPE, kandaki glikoz, retinol ve yağ asitleri gibi besleyicileri alır ve bu besleyicileri fotoreseptörlere gönderir.), ışık emilimi, ısı değişimi, A vitamini metabolizması, dış kan retina bariyeri ve koriokapillerisin korunması da dahil olmak üzere birçok temel fonksiyona sahiptir [49]. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunun, maküler fotoreseptörlerin bozulmasıyla görme ve yaşam kalitesini düşürmektedir.



Şekil 1. 8. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda retinanın şematik diyagramı

1.2.1 Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YMD)

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YMD), geri dönüşümü olmayan ciddi görme kaybı nedenlerinin başında gelmektedir. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, insan ömrünün artması ile birlikte gelişmiş ülkelerde görme kaybının en yaygın nedenleri arasındadır [50]. Oksidatif stres, yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve glokom da dahil olmak üzere birçok retinal hastalıklarda kritik rol oynamaktadır [51, 52].

Birçok meyve içerisinde bulunan flavonoidler antioksidan özelliği göstererek retinayı oksidatif strese karşı koruyucu etkileri bulunmaktadır [53]. Bitkilerde bulunan meyve asitleriyle yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalarda retinal ışık hasarı üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu bilinmektedir [52].

1.2.2 Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 60 yaş üstü nüfus 2020’de 1 milyar, 2050’de 2 milyar kişi olacağı tahmin edilmektedir. Nüfus artışına bağlı olarak yaşa bağlı makula dejenerasyonu 80 yaş üzeri 2000 yılında 69 milyon iken 2050 yılına kadar yaklaşık 379

milyon olması beklenmektedir. Bu demografik değişikler sonucunda yaşlanma ile ilişkili hastalıkların sayısında artış olması muhtemeldir. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu bu hastalıklar içinde en önemlisi olup Dünya çapında bu hastalıktan 20-25 milyon kişi etkilenmektedir. Önümüzdeki 30-40 yıl içerisinde yaşlanan nüfus artışı ile birlikte bu rakam üç katına çıkması tahmin edilmektedir [54, 55].

1.2.3 Yaşa bağlı makula dejenerasyonun etiyolojisi

Oksidatif stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen ara ürünlerinin hücre hasarına neden olduğu birçok hastalık sürecinde, özellikle yaşa bağlı hastalıklarda önemli rol oynar. Yaşlanan dokuların, reaktif oksijen ara ürünlerinin de önemli bir artış ve antioksidanların azalması sonucu olarak retinayı oksidatif hasara karşı daha duyarlı hale getirir [56]. Reaktif oksijen ara ürünlerinin, serbest radikaller, hidrojen peroksit ve singlet oksijeni içerir ve genellikle oksijen metabolizmasının yan ürünleri arasında yer alır. Retinanın yüksek oksijen tüketimi, çoklu doymamış yağ asitlerinin yüksek oranı ve görünür ışığa maruz kalması nedeniyle oksidatif strese karşı özellikle duyarlıdır [57]. Redüksiyon-oksidasyon (redoks) reaksiyonu sırasında reaktif oksijen türleri (ROT) in-vivo ara ürünler olarak üretilmektedir. Süperoksit anyonunun çoğu reaktif oksijen türlerinin üretilmesine ve mitokondrideki elektron taşıma zincir reaksiyonların oluşmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [58].

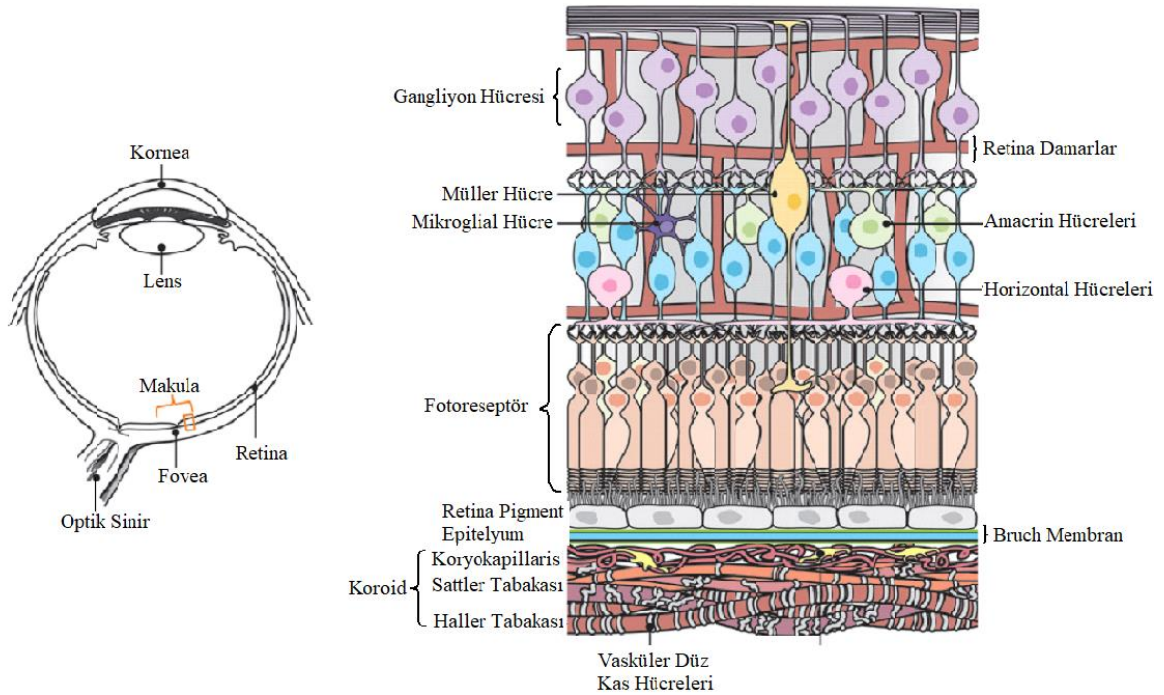
Yaşa bağlı makula dejenerasyonu ile ilgili yapılan araştırmalarda birçok çevresel faktörlerin yanısıra, yaş, sigara içme durumu, fiziksel aktivite, obezite gibi parametrelere bağlı olarak bu hastalığın görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir. İnflamasyon, oksidatif stres ve endotel fonksiyon bozukluğuna sebep olarak, yaşa bağlı makula dejenerasyonu sıklığına ve ilerlemesini etkilediği yönünde hipotezler bulunmaktadır [59].

Genetik faktörler

Yapılan genetik çalışmalarda, yaşa bağlı makula dejenerasyonu kaynağının genetik bağlantı analizlerinde çoğu kromozomda birden fazla lokusun bulunduğu bildirilmiş olup doğal olarak genetik heterojenin temelini oluşturmaktadır. Aile temelli çalışmalarda birinci dereceden akrabaların diğerlerinden 6-12 kat daha fazla yaşa bağlı makula dejenerasyonun ortaya çıkması riskinin bulunduğu gösterilmiştir [60].

Bruch kompleksinin bozulması

Bruch membranı, üstünde retina pigment epiteli ve retinaya yapısal destek sağlayan beş katmanlı bir hücre dışı matris olarak düşünülmektedir [61]. Histopatolojik özelliklere bağlı olarak yaşa bağlı makula dejenerasyonu çeşitli kategorilere ayrılabilir. Retina pigment epiteli Bruch zarı arasındaki protein ve lipit açısından zengin hücre dışı birikimlerin seviyesine göre sarı nokta hastalığı (Drusen), başlangıç veya orta düzeyde yaşa bağlı makula dejenerasyonu olarak tanımlanır [62] (Şekil 1. 9).



Şekil 1. 9. Normal göz ve retina yapısı

Mitokondriyal disfonksiyon

Retinal pigment epitelyum hücreleri, fotoreseptörler ve Müller glia, çok sayıda mitokondriye sahiptir. Retinal pigment epitelyum hücrelerinde oksidatif stres ve zararlı lipofüsin birikimi yaşa bağlı makula dejenerasyonun yaşlanma, genetik, çevresel (sigara, UV, mavi ışık vb.) ve beslenme faktörleri (diyet vb.) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [63-65].

Mitokondri, yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde ve yaşlanma sürecinde merkezi bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalara göre mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) birçok anormalliklere ve solunum enzimi komplekslerinde görülen bozukluklara, enerji üretiminde azalmaya, aşırı reaktif oksijen türleri oluşumu ve apoptoz yolağının aktivasyonunu tetiklediğini belirtmişlerdir [65, 66].

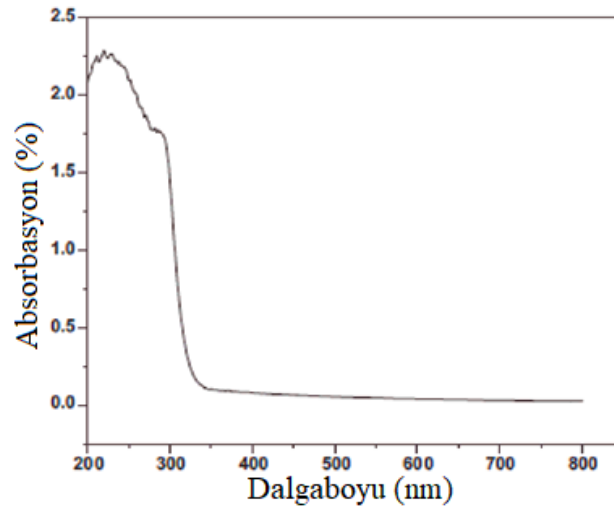
1.2.4 Yaş a bağlı makula dejenerasyonu tedavi

Beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak, özellikle de antioksidan özelliklere sahip yiyeceklerin tüketimi, genellikle bu hastalığın ilerlemesinin daha ileri safhalara gelmesini önleyebildiğini göstermiştir. Farklı antioksidan bileşikler arasında en çok araştırılanlar karotenoidler (lutein ve zeaksantin, β -karoten), vitaminler (vitamin A, E, C, D, B), mineral takviyeleri (çinko, bakır, selenyum) ve omega-3 yağlı asitlerdir. Özellikle, antioksidan besinler vücutta biriken serbest radikalleri temizleyici olarak işlev gördüğü düşünölmektedir. Makulada biriken ve retina pigment epitelinde bozulmaya neden olan ve makula dejenerasyonundan sorumlu olan okside bileşikleri parçaladığı bildirilmiştir [56].



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

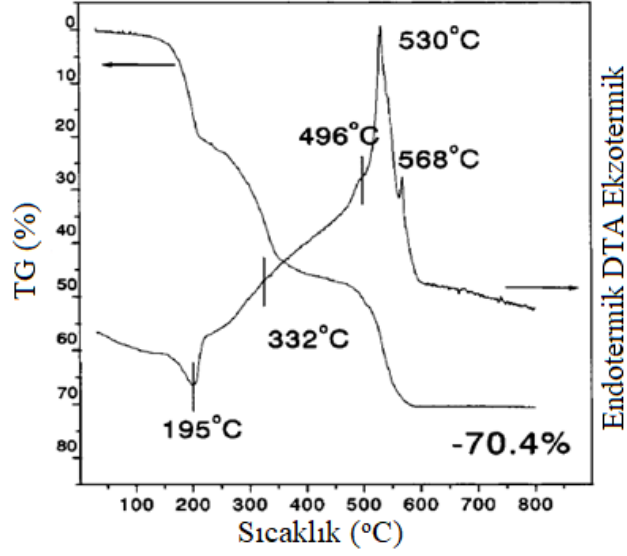
Lakshmipriya ve arkadaşları [67] tarafından yapılan çalışmada, malik asitin tek kristal yapısının oluşumu ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Tekli kristal maleik asit oda sıcaklığında yavaş buharlaştırma yöntemiyle oluşturulmuştur. Kristalin XRD, FT-IR, UV-vis-NIR, DTA ve TGA ile karakterizasyonu yapılmıştır. XRD sonuçlarına göre kristalin monoklinik yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. UV-vis-NIR spektrumuna göre 284 nm dalga boyunda iyi bir geçirgenliğe sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Şekil 2. 1). Termal analiz yöntemiyle, elde edilen kristalin 152 °C'ye kadar kararlı olduğunu belirtilmiştir.



Şekil 2. 1. Tek kristal malik asidin UV-vis-NIR spektrumu

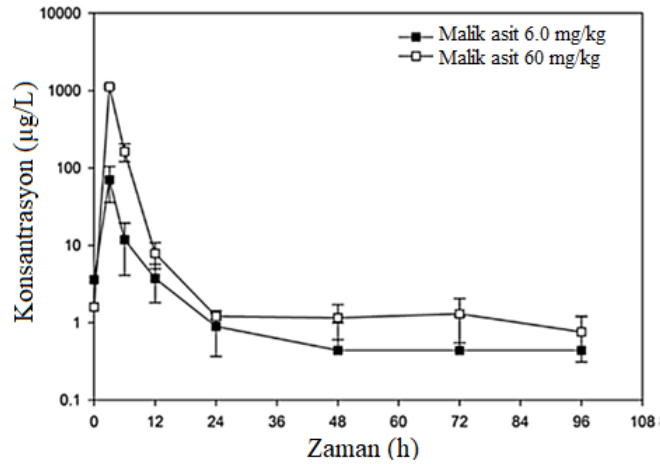
Kaemmerer ve arkadaşları, [68] tarafından yapılan çalışmada, malik asidin termodinamik yapısı açıklanmaya çalışılmıştır. Çalışmada malik asidin faz diyagramının tanımlanmasında DSC, katı fazın tanımlanmasında ise XRD ve FTIR-ATR kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre malik asidin kristalleşme davranışı ve moleküler davranışı, ikili faz sistemi ile belirlenmiştir.

Camargo ve Kakihana, [69] tarafından yapılan çalışmada, suda çözünür DL-malik asit ve lityum niobat tozlarının kompleksleri oluşturularak kimyasal sentezi yapılmıştır. Çalışmada amonyak içerisinde malik asit ile sulu niyobyum iyonunu stabilize etmek için NbCl₅'den başlamak üzere bir proses geliştirilmiştir. Amonyak klorür ile reaksiyona girerek NH₄Cl şeklinde elimine edilmiş ve Nb-MA kompleksi oluşturulmuştur. Elde edilen Nb-MA kompleksi Nb-MA dinamik termogravimetri ve farklı termal analiz yöntemi ile karakterizasyonu yapılmıştır (Şekil 2. 2).



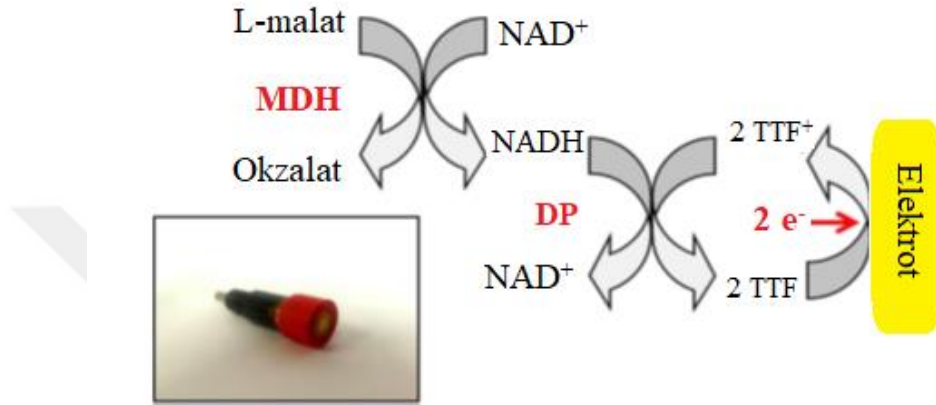
Şekil 2. 2. Nb-MA kompleksinin termogravimetri ve termal analizi

Wu ve arkadaşları, [70] tarafından yapılan çalışmada, erkek ve dişi sıçanlara oral yemle üç doz malik asit uygulanmıştır. Bu uygulamada sıçanların biyolojik sıvılarında (serum ve idrarları alınarak) maleik asidin farmakokinetiği ve biyoyararlanımı araştırılmıştır. Malik asitin uzun süreli ve düşük seviye maruziyetine göre toksisite üretip üretmediğini belirlenmiştir. Gıda güvenliği açısından temel oluşturmuştur. Dişi sıçanlarda gavaj uygulamasıyla farklı dozlar için maleik asitin serumda zamana bağlı absorpsiyonu Şekil 2. 3’de verilmiştir.



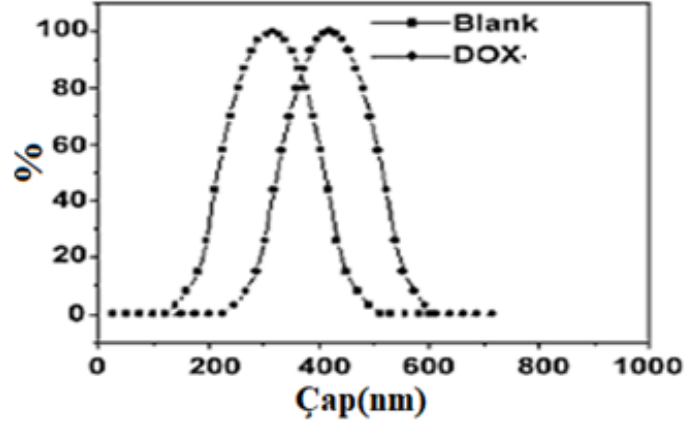
Şekil 2. 3. Dişi sıçanlarda gavaj uygulamasıyla farklı dozlar için maleik asitin serumda zamana bağlı absorpsiyonu

Vargas ve arkadaşları, [71] tarafından yapılan çalışmada, amperometrik biyosensörlerle şaraplarda L-malik asit otomatik biyoanaliz cihazı ile belirlenmiştir. Çalışmada üç farklı amperometrik detektör olarak analitik metotlar kullanılmıştır. Sonuçlara göre şarap ve meyvelerin malik asit düzeyinin belirlenmesinde basit ve hızlı bir yöntem olarak analitik biyosensörün kullanılabilceği bildirilmiştir. Şekil 2. 4’de L-malik asit biyosensörünün şematik diyagramı verilmiştir.



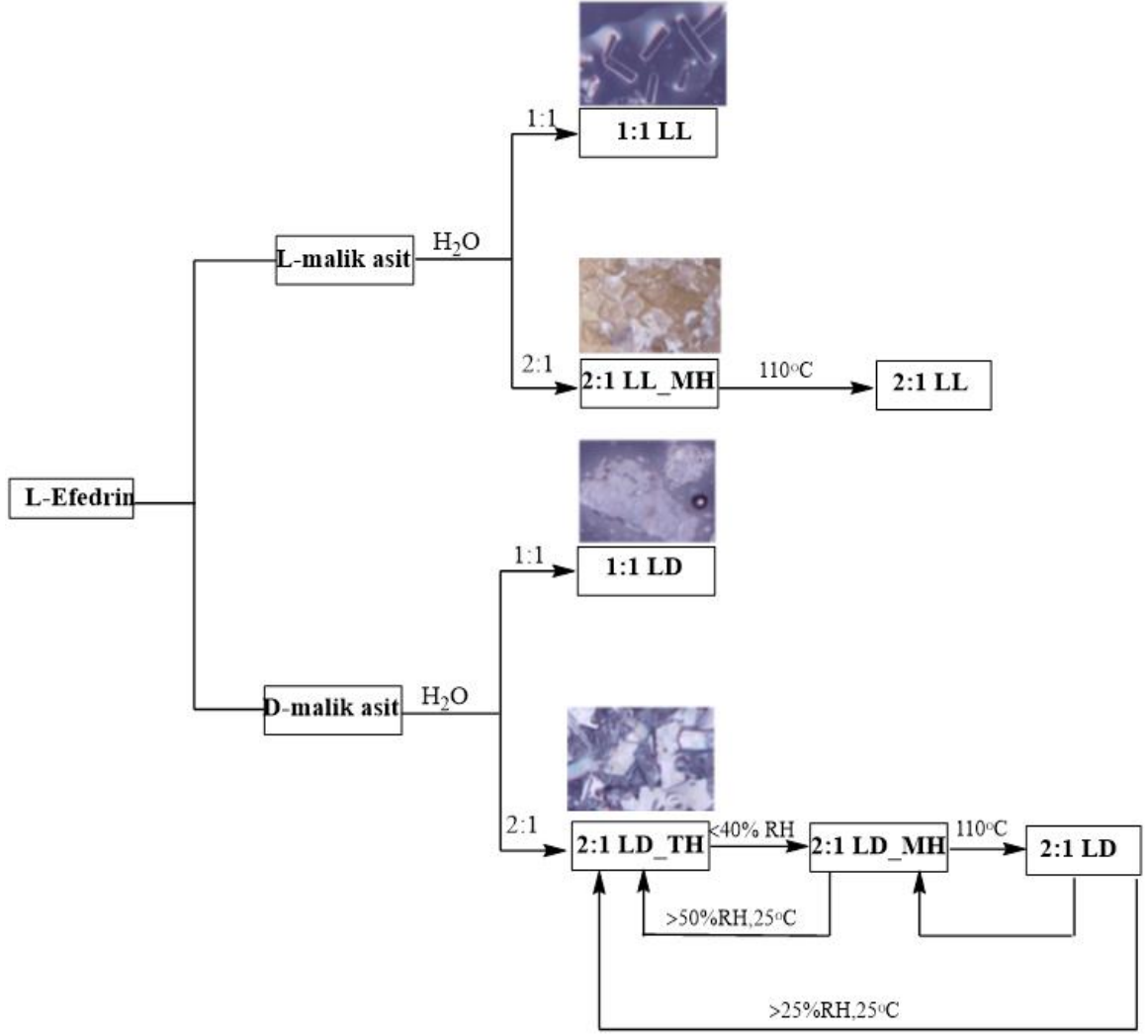
Şekil 2. 4. L-malik asit biyosensörünün şematik diyagram

Wang ve arkadaşları, [72] tarafından yapılan çalışmada, poli (L-malik asit-co-D, L-laktik asit) kopolimeri, L-malik asit ve d, L-laktik asitin doğrudan polikondensasyonu ile sentezlenmiştir. Daha sonraki aşamada polimer ile kitosan arasındaki kompleksleşmeye dayanan yeni bir polielektrolit kompleksi hazırlanmıştır. Bu kompleks, pH 3-5 sulu çözeltilerde 316-590 nm aralığında çaplara sahip nano parçacıklar oluşturulmuştur. Etkin ilaç maddesi olarak doksurubisin, fiziksel adsorpsiyon ve kompleksleştirme yoluyla nano parçacıklara yüklenmiş ve doksurubisin'in bir kısmı, kendi kendine agregasyon yoluyla ikincil parçacıklar elde edilmiştir. Asidik ortamda sürekli salınım yaparak yüksek ilaç yükleme verimi (%16.5) gözlemlenmiştir. Nano parçacıklar, kontrollü salınım için potansiyel olarak pH'ya duyarlı ilaç taşıyıcıları olarak uygulanabilir olduğu bildirilmiştir (Şekil 2. 5).



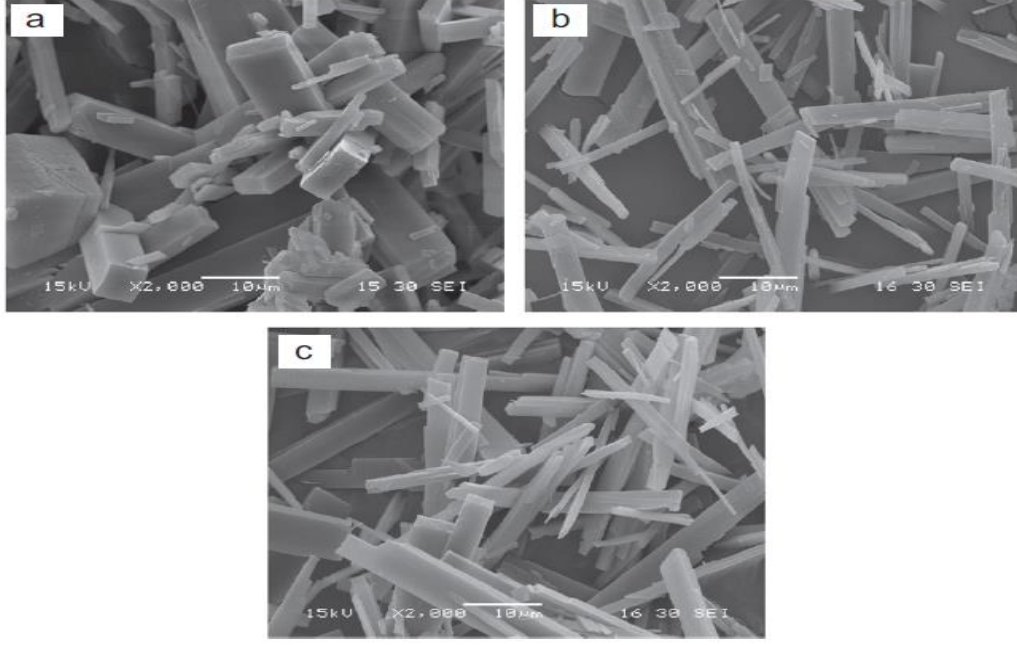
Şekil 2. 5. Kompleksin ve doksorubisin yüklü ve yüksüz nanoparçacıklarının dağılımı

Wu ve arkadaşları [73] tarafından yapılan çalışmada, L / D-malik asit ve L-efedrin'in su içinde oluşturduğu diastereomerik tuzlar için kristalleşme görüntüleri rapor edilmiştir. Şuana kadar 7 farklı formda, 1:1 ve 2:1 stokiometrik oranlarda LL tuzlarının, başarıyla kristalleştirildiği rapor edilmiştir. Kristal tuzların karakterizasyonu, diferansiyel tarama kalorimetresi, termogravimetrik, elemental analiz, infrared spektroskopi, katı hal NMR ve toz XRD ile karakterize edilmiştir. Stokiyometrisi 1:1 olan tuzlar, anhidrat oluşumunu desteklerken, 2:1 stokiyometriye sahip olanlar ise, monohidrat formlar verme eğiliminde olduğunu gözlemlemişlerdir. Susuz tuz elde etmek için iki monohidratın bir araya gelerek oluşturduğu dehidrat, ısıtma yöntemiyle kurutmuşlardır. Stokiyometrik oranı 2:1 olan LD trihidrat formu buhar absorpsiyon deneyleriyle keşfedilmiş ve sadece yüksek bağıl nemde stabil olduğu belirtilmiştir. Tuz kristalleşmesinde stokiyometri ve hidrat oluşumundaki farklılıklar, fizikokimyasal özelliklerde farklılıklar göstermiştir. Bu da çözünürlük koşulları ve çalışmanın sonucu üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (Şekil 2. 6).



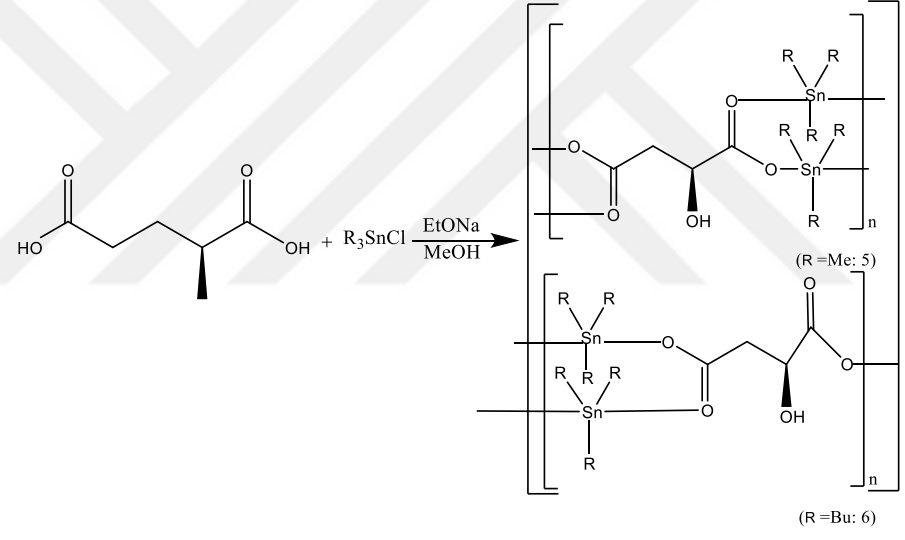
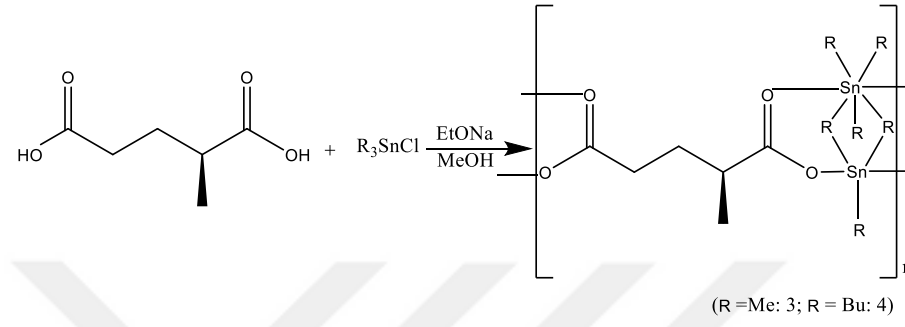
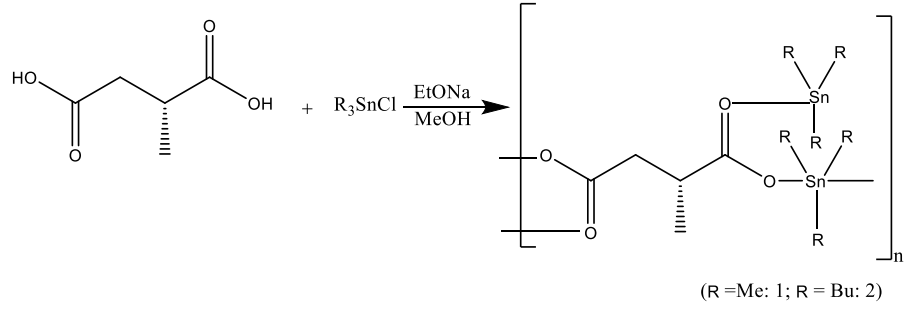
Şekil 2. 6. L-Epedrin malik asit H₂O tuz oluşumunun şematik gösterimi; (MH=monohidrat, TH=Trihidrat)

Zhang ve arkadaşları, [74] tarafından yapılan çalışmada, malik asit, çinko laktatın kristalleştirilmesinde kullanılmıştır. Çinko laktatın soğutularak kristalleşmesinde bir kristalleşme yardımcısı olarak işlev gören malik asitin etkisi, kristalizasyon sırasında araştırılmıştır. Malik asidin varlığı solüsyonun çözünürlüğünü artırır ve metastabil bölgeyi daha geniş hale getirir; aynı zamanda kristalin yerleşim bölgesini değiştirir. Ürünlerin saflığı, kristallerin miktarı ve boyutu, soğuma hızının, başlangıç sıcaklığı ve son sıcaklığın etkisinde kaldığı; ancak parçacık boyutu ve aşırı doyma seviyesine bağlı olduğu belirtilmiştir. Belirli bir safsızlık konsantrasyonunda son sıcaklığın, kararlı durumu aşırı doyma değerini tahmin etmek için bir model önermişlerdir. Bu model Kubota ve Gibbs denklemlerine dayanmaktadır (Şekil 2. 7).



Şekil 2. 7. Çinko laktat kristallerinin SEM görüntüleri: a) saf çinko laktat b) 1⁺çinko laktat c) 6⁺laktat formu

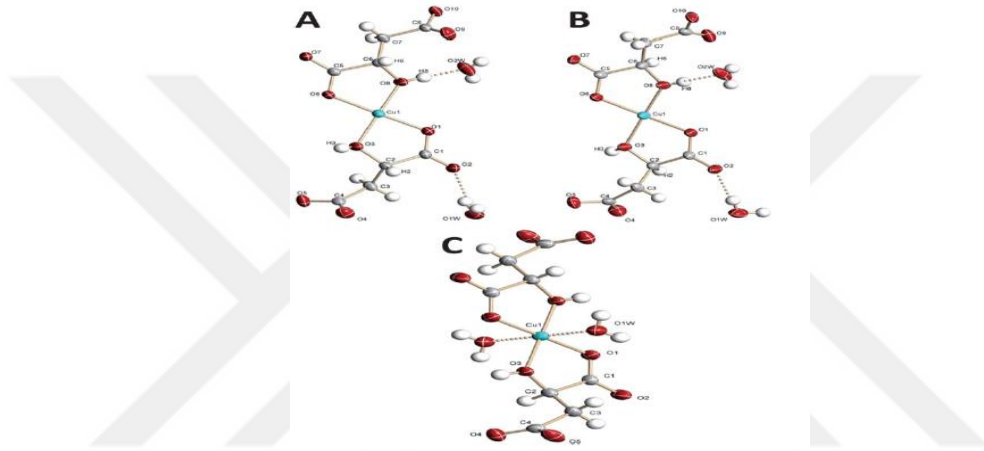
Ma ve arkadaşları, [75] tarafından yapılan çalışmada, (R)-(+)-metil süksinik asit, (S)-(+)- metil glutarik asit ve L-(-)- malik asit kullanılarak sodyum etoksitin metanollü ortamında altı yeni kiral triorganotin (IV) kompleksleri hazırlanmıştır. Bütün kompleksler element analiz, FT-IR, NMR (¹H, ¹³C, ¹¹⁹Sn) spektroskopi ve TGA ile karakterize edilmiştir. Metil glutarik asit kompleksi haricindeki tüm kompleksler X-ışını kristalografisi ile karakterize edilmiştir. Yapısal analizler yapılarak tetradentat ligandlar olarak işlev gördüğünü belirtmişlerdir. Bazı komplekslerin, deprotonlanmış asitlerin tetradentat ligandı olduğu 3D metal-organik çerçeve yapıları var olduğunu ortaya koymuşlardır. Bir başka komplekste, tek boyutta uzun bir zincir yapısını benimsediği ve moleküler içi C-H...O etkileşimleri ile bir 2D supramoleküler çerçeve oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Bunlara ek olarak, bazı komplekslerin antitümör faaliyetleri araştırılmıştır. Kiral dikarboksilik asitlerin ve organotin türevlerinin spesifik rotasyonunun ölçümleri bu çalışmada belirtilmiştir. Kompleksleşme reaksiyonları 50°C'de metanol içinde 1:2:2 mol oranında gerçekleştirilmiştir (Şekil 2. 8).



Şekil 2. 8. Kompleksleşme reaksiyonları

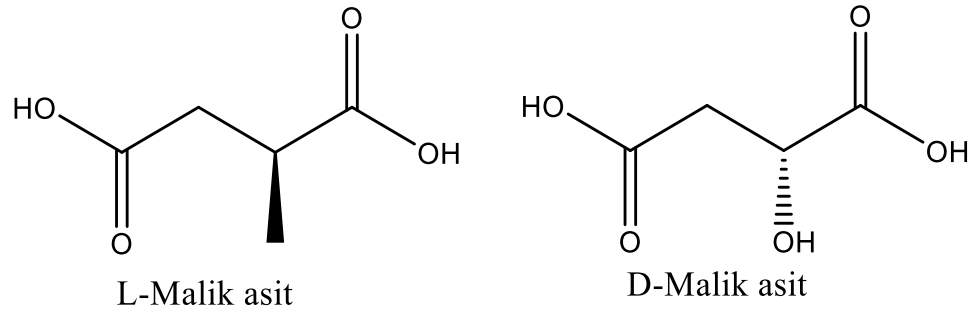
Gudavarthy ve arkadaşları, [76] tarafından yapılan çalışmada, malat iyonu ile kompleksleşen Cu(II)'nin alkalın çözeltisinden elde edilen Cu (111) ve Cu (110) tekli kristal formlarının CuO kiral filmler üzerinde anodik bir şekilde elektron depolanmaları yapılmıştır. CuO kiral filmleri Cu (111) ve Cu (110) tek kristallerinin anot olarak elektroferez yapılmıştır. Filmin kiralitesi, çözeltideki kiral başlatıcı tarafından yönlendirilmiş olmaktadır. Filmlerin konfigurasyonunu belirlemek için X-Işını kırınım miller indisleri kullanılmıştır. Cu(111) üzerinde L-malattan üretilen CuO filmleri ($\bar{1}11$) ve (311) yönelimlidir ve D-malattan sentezlenen filmler ise ($1\bar{1}\bar{1}$) ve ($\bar{3}\bar{1}\bar{1}$) yönelimlidir. D malat ile sentezlenen filmler ($\bar{1}\bar{1}0$) ve ($\bar{3}\bar{1}\bar{1}$) yönelimlere sahipken, L-malat ile sentezlenen filmler (110) ve (311)

yönelimine sahiptir. Rasemik malattan üretilen CuO filmler, Cu(111), (110) ve ($\bar{1}\bar{1}0$) bölgelerinde sadece ($\bar{1}\bar{1}1$) ve ($1\bar{1}\bar{1}$) yönelimi göstermiştir. L-, D- ve DL-bis (malat) bakır (II) dihidrat komplekslerinin tek kristalleri sentezlenmiş ve yapıları X-ışını kristallografisi ile belirlenmiştir. Bis (malato) bakır (II) dihidratın kiral komplekslerinin, $P2_1$ monoklinik grubuna ait olduğu ve rasemik kompleksin, merkezi simetrik $P2_1/c$ uzay grubuna ait olduğu bulunmuştur. Kiral kompleksler, her kompleksin karboksil grubuna komşu Cu(II) kompleksinin ekvatoryal bölgesine bağlandığı b-ekseni boyunca koordinasyon polimerleri oluşturduğu gözlenmiştir. Rasemik karışımdan üretilen kompleksde koordinasyon polimeri oluşmamıştır (Şekil 2. 9).



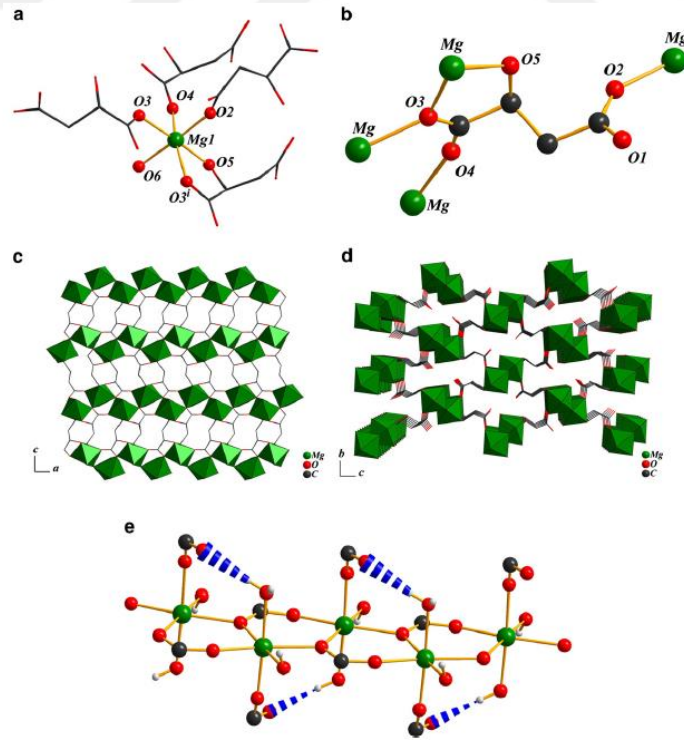
Şekil 2. 9. (A) bis (L-malat) Cu (II) dihidrat kompleksi, (B) bis (D-malat) Cu (II) dihidrat kompleksi (C) bis (DL-malat) Cu (II) dihidrat kompleksi

Aydoğan ve arkadaşları, [77] tarafından yapılan çalışmada, açık kapiler kolana sahip elektrokromatografi ile elma suyundaki kiral ligand değişimi ayırımı ve malik asit enantiyomerlerinin saptanması çalışmalarını yapmışlardır. Açık kapiler kolon şekilli sütun, 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat in-situ graflama polimerizasyonu ve bunu takiben L-Histidin (L-His) modifikasyonu ile hazırlanmıştır. L-Histidin, kiral ligand değişim seçici ve merkezi iyon olarak, bakır (II) kullanılmıştır. Açık kapiler kolana sahip elektrokromatografik karakterizasyonda, elektroosmotik akış markörü olarak tiyoüre kullanılmıştır. Malik asidin elektro kromatografik enantiyo seperasyonunu etkileyen faktörler de çalışılmıştır. Malik asidin optimum enantioseparasyonu için çalışma tampon koşulları (pH 3.0'a ayarlanmış ACN/5.0 mM CuSO₄, 20.0 mM (NH₄)₂SO₄ (%60/40) bulunmuştur. Elma suyu çözeltisindeki malik asit enantiyomerlerinin 10 ile 40 kat seyreltilerek ayrılması ve belirlenmesi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 2. 10).



Şekil 2. 10. Malik asit enantiyomerleri

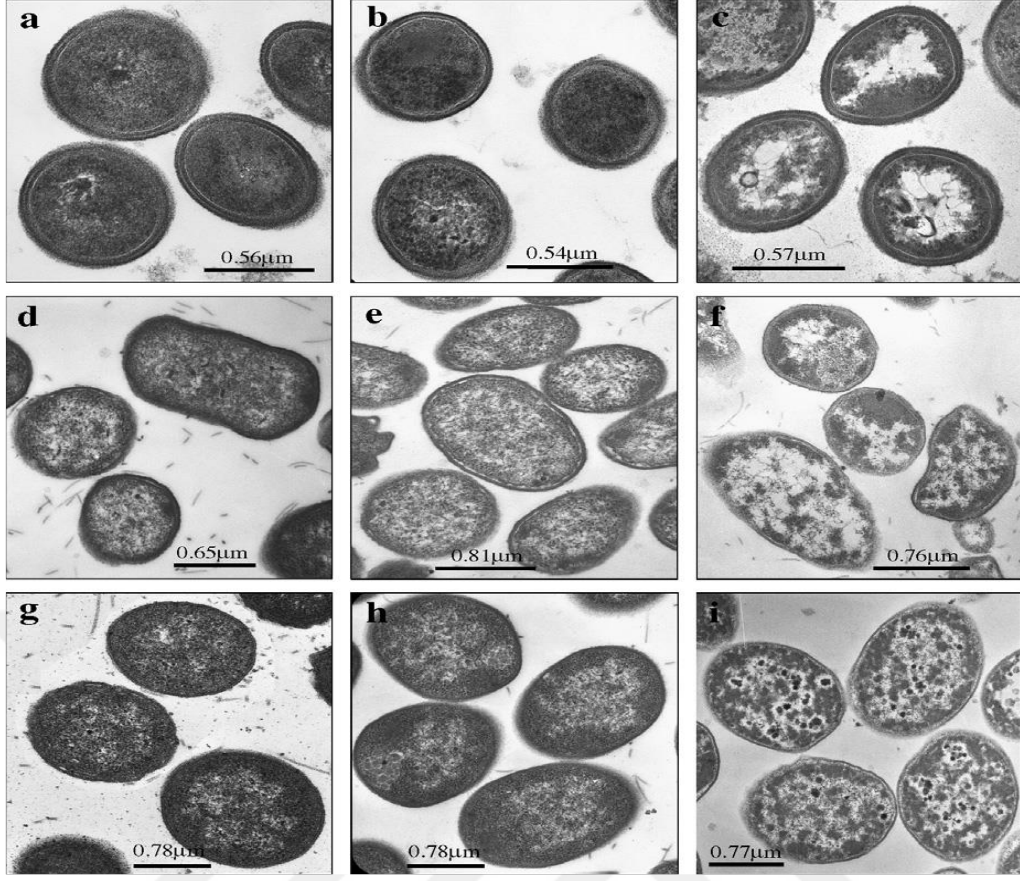
Raja ve arkadaşları [78] tarafından yapılan çalışmada, solvotermal sentez yöntemi kullanılarak (L) -malik asitin kristal yapıda iki yeni magnezyum koordinasyonlu polimer komplekslerini sentezlemişlerdir. Bu komplekslerin yapısal özellikleri, tek kristalleri elde edilerek X-ışını kırınım analizleri gerçekleştirilmiş ve çeşitli analitik ve spektroskopik teknikler ile karakterize edilmiştir. Kristal yapılar incelendiğinde, komplekslerinin üç boyutlu çerçeveler oluşturduğunu göstermişlerdir. Ligand birinci kompleks ile bi-anyonik hepta-dentat oluştururken ve ikinci kompleksle bi-anyonik penta-dentat oluşturmuştur. Ayrıca, bütün kompleksler katı hal lüminesans spektrumu incelendiğinde lüminesans karakterde olduğu görülmüştür (Şekil 2. 11).



Şekil 2. 11. Magnezyum kristal paket yapıları

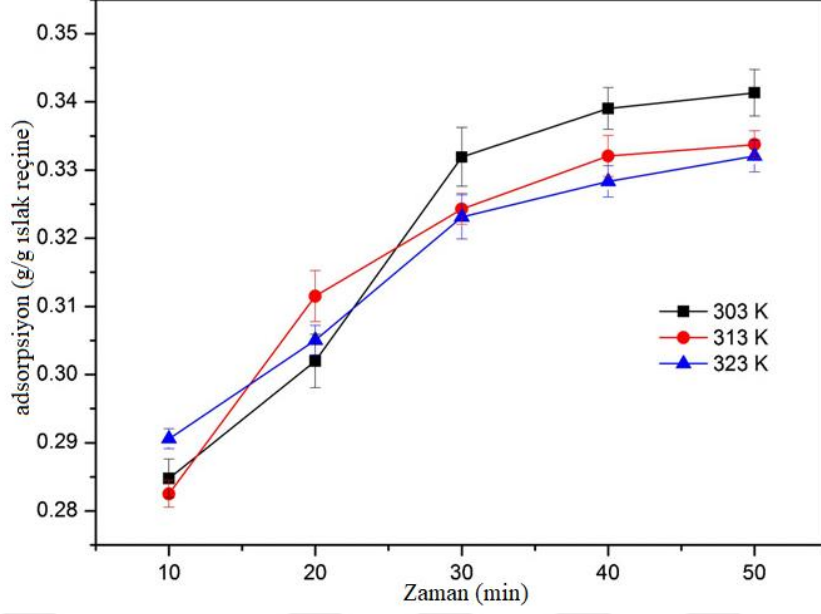
Raybaudi-Massilia ve arkadaşları, [79] tarafından yapılan çalışmada, elma, armut ve kavun suları içerisinde malik asidin *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmişlerdir. 5, 20 ve 35 °C'de depolanan elma, armut ve kavun meyve sularına aşılana *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı minimum miktarda malik asit konsantrasyon ve minimal bakterisit konsantrasyonları değerlendirilmiştir. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı malik asit konsantrasyon ve minimal bakterisitler, depolama sıcaklığı, meyve suyu özellikleri ve mikroorganizma tipinden önemli ölçüde etkilenmiştir. Malik asit, incelenen tüm meyve sularında 35 °C ve 20 °C'de 5 °C'den daha etkili olmuştur.

Escherichia coli O157:H7, *Salmonella enteritidis* ve *Listeria monocytogenes*'e göre malik aside karşı daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Elma ve armut meyvelerinde elma, armut ve kavun meyve suları, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* ve *Listeria monocytogenes*'i 5 °C'de inhibe ederken, elma ve armut meyve sularında %1.5 malik asit minimal bakterisidal, ve 5 °C'de kavun suyunda %2, bu meyve sularında *Salmonella enteritidis* ve *Listeria monocytogenes*'i azaltmak için daha yüksek olan *Escherichia coli* O157: H7'yi azaltmak için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Ek olarak, elma, armut ve kavun meyve sularına sırasıyla %2, %2.5 ve %2.5 malik asit konsantrasyonların eklenmesi, 5 °C'de 24 saatlik depolamadan sonra üç patojeni 5 günlük döngü ile inaktif hale getirmeye çalışılmıştır. Elektron mikroskopunda, malik asidin, hücre zarı içinde belirgin değişiklikler olmadan patojenlerin hücre sitoplazmasında hasar ürettiğini göstermiştir (Şekil 2. 12).



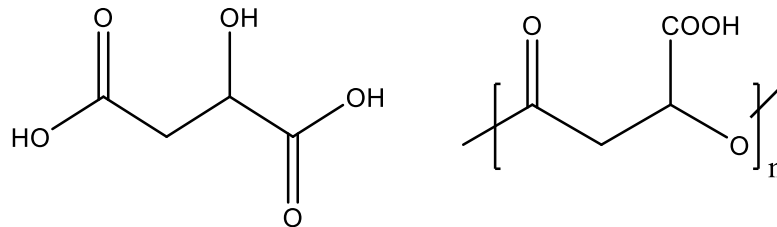
Şekil 2. 12. *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* ve *E. coli* O157: H7 hücrelerinin transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) mikrografıları saf kültür (a, d, g), kavun (b), armut (e) elma suyu (h), kavun suyu ile %0.6 malik asit (c) armut suyu ile %0.6 malik asit (f), elma suyu ile %0.8 malik asit (i)

Gao ve arkadaşları [80] tarafından yapılan çalışmada, IRA-67 ile malik asit adsorpsiyonu üzerine sıcaklık, malik asit yükleme konsantrasyonu ve reçine dozunun etkileri araştırılmıştır. Kinetik verilere göre psödo ikinci dereceden kinetik modele iyi uymaktadır. Hem denge hem de nihai adsorpsiyon, artan sıcaklık ile birlikte, 74.7 g/L malik asit ilavesiyle 303 Kelvinden 323 Kelvin'e düşmüştür. Malik asit adsorpsiyonu, Langmuir modeli ve film difüzyon işlemi Boyd tarafından 18.2-94.5 g/L malik asit yükleme konsantrasyonlarında homojen bir adsorban süreci olarak ortaya çıkmıştır. Etkin difüzyon katsayısı (D_i) değerleri sıcaklık ile artmıştır. ΔG° ve ΔH° 'ın negatif değerleri adsorpsiyon prosesinin kendiliğinden ve egzotermik olduğunu ortaya koymuştur. ΔS° negatif değeri, IRA-67 tarafından adsorbe edilmiş malik asidin, katı-sıvı arayüzü düzensiz azaldığını ortaya koymuştur (Şekil 2. 13).



Şekil 2. 13. IRA-67 ile temas süresi ve sıcaklığın malik asit adsorpsiyonu üzerine etkisi

Berényi ve arkadaşları [81] tarafından yapılan çalışmada, düşük molekül ağırlıklı poli (malik asit)'in hidratlı çok katmanlı dipalmitoil fosfatidilkolin su sistemleri üzerindeki termotropik ve yapısal etkileri diferansiyel tarama kalorimetresi, küçük açılı X-ışını saçılması ve soğutu-kırılğan transmisyon elektron mikroskobu ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. %20 dipalmitoil fosfatidilkolin konsantrasyonu ve 1-5 ağırlık yüzdeli poli malik asitin-lipid oranlı sistemleri çalışılmıştır. Poli malik asit türevleri, dipalmitoil fosfatidilkolin'in ısıl davranışını önemli ölçüde değiştirmiş ve üç karakteristik termotropik durumda (jel, dalgalı jel ve sıvı kristal fazlar) tabakalar arasındaki korelasyonda büyük bir kayba neden olduğu belirtilmiştir. Atom seviyesindeki yapısal davranış ise FTIR spektroskopisi ile ortaya çıkarmışlardır. Dipalmitoil fosfatidilkolin ve poli malik asit arasındaki moleküler etkileşimler, ölçülen kızılötesi spektrumlarının modellenmesi ile simüle edilmiş ve bunların spektral özellikleri yorumlanmıştır (Şekil 2. 14).



Şekil 2. 14. Malik asit ve poli malik asit

Jager ve arkadaşları, [82] tarafından yapılan çalışmada yaşa bağlı makula dejenerasyonu ile ilgili çalışma yapmışlardır. Çalışmada; makuladaki oksidatif stresin neden olduğu hasarı sınırlamak için uzun zamandır antioksidanların etkili olduğu varsayılmıştır. C vitamini (500 mg), E vitamini (400 IU), beta karoten (15 mg), çinko oksit (80 mg) ve bakır oksit (2 mg) kombinasyonu kullanılarak farklı aşamalarda bulunan makula dejenerasyonu hastalarında ilerleme oranını 5 yıllık bir periyot boyunca %25 düşürdüğü ve görme kaybı riskini ise %19 olarak azalttığı bildirilmiştir. Yüksek dozda vitamin E takviyesinin geniş kapsamlı meta-analizi sonucunda ölüm riskini arttırdığı vurgulanmıştır.

Mann [83] tarafından yapılan çalışmada yaşa bağlı makula dejenerasyonunda, askorbik asit (500 mg), vitamin E (400 IU), beta-karoten (15mg), çinko (80mg), bakır (2mg) kombinasyonu kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre kombine terapiyi kullanan hastalarda istatistiksel olarak insidansın düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu bildirilmiştir.

Kahraman ve ark., [84] tarafından yapılan çalışmada yeni biyomühendislikte alternatif kopolimerinin ve organobor amid ve α -hidroksi- ω -metoksi-poli(etilen oksit) ile dallanmış türevlerinin sentezi başlıklı çalışmayı yapmışlardır. Çalışmada seçilen reaksiyon şartlarında homopolimerleşmeyen maleik anhidriti ve 2-vinil-1,3-dioksolan monomerlerinin kompleks-radikal alternatif kopolimerizasyonu, sentezlenen poli(MA-alt-VDO) makromoleküllerinin 2-amino-etildifenilboronat ile amidolizi ve poli etilen oksit ile esterleşmesi yöntemleri kullanarak gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak bu kopolimerlerin HeLa hücrelerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. HeLa hücrelerine apoptotik ve nekrotik etkisi gösterebileceği belirtilmiştir.

Chew ve ark. [85] tarafından yapılan çalışmada, yaşa bağlı makula dejenerasyonuna C ve E vitamini, β -karoten ve çinko'nun uzun süreli etkileri (yaklaşık on yıl) araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre klinik araştırmanın bitiminden beş yıl sonra, yaşa bağlı göz hastalıkları çalışması için kullanılan formülasyonun yararlı etkilerinin yaşa bağlı neovasküler makula dejenerasyonu için devam ettiği ancak merkezi coğrafi atrofi için bunun geçerli olmadığı belirtilmiştir.

Chew ve ark. [86] tarafından yapılan çalışmada, yaşa bağlı maküler dejenerasyon için lutein zeaxanthin ve omega-3 yağ asitlerini farklı formülasyonlar oluşturarak kullanmışlardır. Çalışma klinik denemeler üzerine yürütülmüş olup elde edilen bulgular

istatistiksel olarak ifade edilmiştir. Çalışmada, Lutein+Zeaksantin, DHA+EPA veya her ikisinin de yaşa bağlı göz hastalığı çalışmalarında ileri safha yaşa bağlı makula dejenerasyonunda ilerleme safhasını azaltmadığı bildirilmiştir.

Knuf [28] tarafından yapılan doktora çalışmasında, *Aspergillus oryzae* fungusu kullanarak L-malik asit ürünü çalışılmıştır. Çalışmada L-malik asit veriminin diğer *Aspergillus* türleri ile kıyaslaması yapılmıştır. Ayrıca L-malik asit yolağının hücresel döngüde geçiş reaksiyonlarının belirlenmesine yönelik moleküler yöntemler araştırılmıştır.

Lin ve ark. [87] tarafından yapılan çalışmada yaşa bağlı makular dejenerasyonu tedavisinde nikotinamide kullanımını araştırmışlardır. Çalışmada nikotinamidenin anti-inflamatuvar aktivitesinin bulunduğu ve yaşa bağlı maküler dejenerasyonunda etkisinin ayrıntılı incelenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Nikotinamidin biyolojik yollarda önemli rol oynadığı hücresel proliferasyonda kansere neden olan zararlı etkilere dayanıklı olduğu belirtilmiştir.

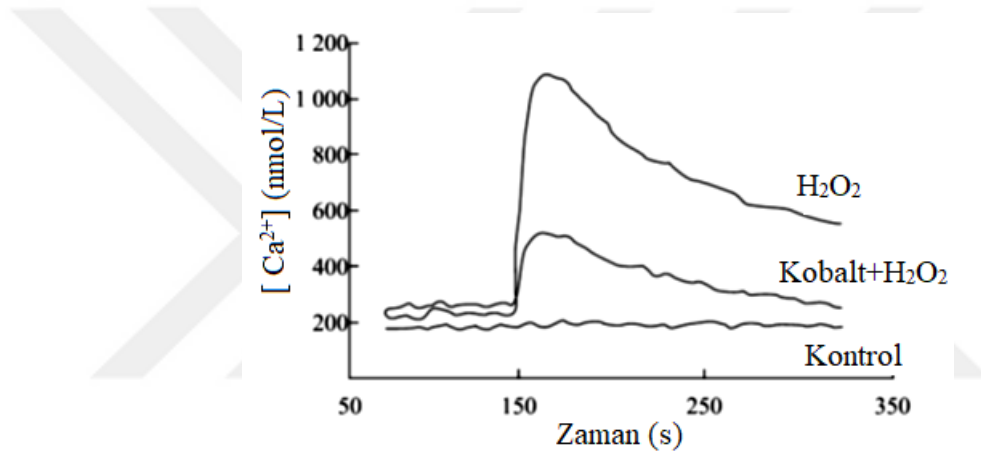
Thébault [88] tarafından yapılan çalışmada, yaşa bağlı makula dejenerasyonunun sayısız nedenleri bulunduğu yaşın ilerlemesi ile görme bozukluklarının da tetiklendiği belirtilmiştir. Çalışmada hücresel olarak tedavinin yapılması ve hastalığın önlenmesi üzerinde durulmuştur. Prolaktinlerin retinadaki antioksidan aktivitenin yollar üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Schauwvlieghe ve arkadaşları [89] tarafından yapılan çalışmada, yaşa bağlı makula dejenerasyonlu hastalarda bevacizumab ve ranibizumaba etkinliğini karşılaştırmasını yapmışlardır. Çalışma süresi olarak on iki ay seçilmiş ve demografik bilgiler ile sonuçlar istatistiki olarak analiz edilmiştir. Yaşa bağlı makula dejenerasyonun'da bevacizumab'ı tedavinin ilk tercih olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir.

Xu ve arkadaşları [90] tarafından yapılan çalışmada, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, körlüğün dünya çapındaki önemli bir nedenidir. Oksidatif stres, yaşa bağlı makula patogeneğinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmada kullanılan Quercetin güçlü antioksidatif aktivitelere sahip olduğu ancak zayıf biyo yararlanımı terapotik etki ile sınırlı kaldığı bildirilmiştir. Bu çalışma kapsamında Quercetin'in fosfo lipit kompleksini sentezleyerek karakterize etmişlerdir. Daha sonra Quercetin ve Quercetin fosfolipit etkisi incelemek için antioksidatif, apoptosis, proliferasyon aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada ARPE-19 hücreleri kullanılarak 200 µM konsantrasyonunda H₂O₂ ile indüklenen oksidatif

hasar modeli oluşturulmuştur. Yapılan çalışmada 200 μ M Quercetin fosfolipit, H_2O_2 kullanılarak ARPE-19 hücrelerinde Süperoksit dismutaz, Katalaz ve Glutasyon peroksidaz aktivitelerini önemli ölçüde arttırdığı, reaktif oksijen türlerini ve malondialdehit düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir.

Li ve arkadaşları [91] tarafından yapılan çalışmada, ARPE-19 hücrelerinin yüksek H_2O_2 uygulaması ile hücre canlılığı ve reaktif oksijen değişimi araştırılmıştır. Ayrıca çalışmada kalsiyum etkisi ve kobalt tedavisi incelenmiştir. Çalışma kapsamında 500 μ mol/L H_2O_2 kullanılarak yaklaşık %70-80 hücre ölümü gerçekleştirilmiştir. Hücre ölüm programında kalsiyum yüklenmesinden sonra regüle edilen nekrotik yol ile ARPE-19 hücre ölümünü azalttığı bildirilmiştir (Şekil 2. 15).



Şekil 2. 15. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 uygulaması ve kalsiyum etkisi

3. MATERYAL VE METOT

[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O (B) bileşimini elde etmek için öncelikle taze sumak bitkisinin meyve kısmından doğal yöntemlerle eldesi sağlanmıştır. Çalışma kapsamında hedef olarak belirlenen noktalardan biri de bileşiğe ait tek kristallerinin elde edilerek X-ray tekniği ile yapı tayinleri yapılmıştır. Bunun yanında analitik ve spektroskopik tekniklerle karakterizasyonu yapılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D., Farmakoloji Hücre Kültürü araştırma laboratuvarında Doç. Dr. Akif Hakan KURT yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışma kapsamında kullanılan başlıca kimyasallara ait kimyasal listesi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Adı	Kapalı Formülü	Firma Adı
Dimetilformamid(DMF)	C ₃ H ₇ NO	Merck
Dimetil sülfoksit (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	Merck
ARPE-19	-	Manassas VA
Tripsin	-	Merck
DMEM-F12	L-Glutamin	Biowest
Etanol Tıbbi Kullanım Amaçlı	C ₂ H ₆ O	Delta
Hidrojen Peroksit	H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich
Tripan Mavisi (% 0,5)	-	Biological Industries
Antibiyotik	Penisilin-streptomisin	Sigma-Aldrich
L-glutamin	-	Sigma-Aldrich
FBS (%10)	Cenin sığır serumu	Gibco
Nutrient buyyon	-	Merck
Müller Hinton Agar	-	Merck
Patates Dekstroza Agar	-	Merck
Sabouraud Dekstroza Broth	-	Merck

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Infrared (IR) Spektrofotometresi: Perkin Elmer 400 FT-IR, K.S.Ü, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

X-ışını Kırınımı (XRD): Bruker Apex II CCD, Merkez Laboratuvarı, K.S.Ü, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

pH Metre: WTW, İmolab, pH 7110 Jeol Neoscope, Merkez Laboratuvarı, K.S.Ü, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

Nükleer Magnetik Rezonans: ¹H-NMR(¹³C-NMR) Spektrofotometresi: İnönü Üniv. Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Merkezi, Malatya.

Erime Noktası Tayin Cihazı: Perkin Elmer, Merkez Laboratuvarı KSÜ, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

Elektrokimyasal analiz: Ivium Stat Elektrokimya Cihazı, K.S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Kahramanmaraş.

UV-VİS Spektrofotometresi: Perkin Elmer Lambda 45, K.S.Ü, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

Elementel Analiz: LECO CHNS-932, K.S.Ü, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

Kütle analizi; Agilent LC/MSD, İBTAM, İnönü Üniversitesi, Malatya.

TG/DTA Termogravimetrik analiz: Perkin Elmer, K.S.Ü, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

Fotoluminesans analizi: Perkin Elmer, LS55, K.S.Ü, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

Polarimetre analizi: Krüss, P3000, K.S.Ü, ÜSKİM, Kahramanmaraş.

Güvenlik Kabini: Laminar Flow, Nüve Mn 090, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

İnkübatör: CO₂ inkübatörü (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C), Sanyo, MCO 19AIC, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

İnkübatör: İnkübatörü, Nüve Ec 160, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Mikroskop: Floresan invert mikroskop (Axio Vert.A1 mikroskop (ZEISS), K.S.Ü, Tıp Fak. Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

ELISA okuyucu: EVE Otomatik hücre sayacı (NanoEnTek), K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Güç kaynağı: PowerPac™ Basic güç kaynağı (BIO-RAD), K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Pipet pompası: Brand Accu-jet® pro, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı Kahramanmaraş.

Pipetler: (0.5-2 µl, 0.5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) Gilson®, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Hassas Terazı: AND HR-250AZ marka (0.0001 g'a duyarlı), K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Manyetik karıştırıcı: Hangping, Variomag®, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Vorteks: Heidolph, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Manyetik karıştırıcı: Wise Shake Feedback SHO, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Derin Dondurucu: -20 °C Arçelik, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

Derin Dondurucu: -86 °C Esco, K.S.Ü, Tıp Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı Kahramanmaraş.

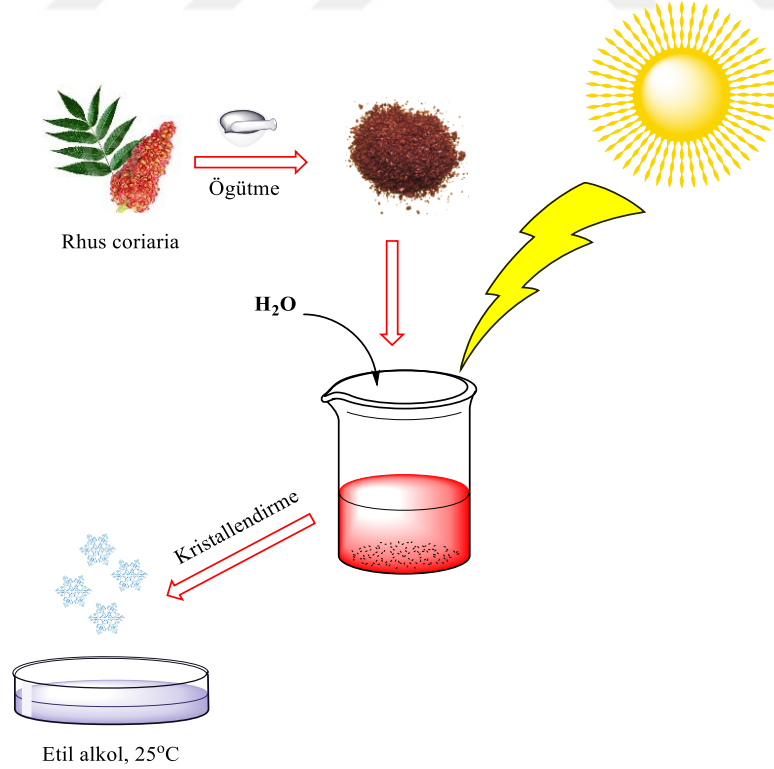
3.2. Metot

3.2.1. Malik asit kalsiyum sentez ve karakterizasyonu

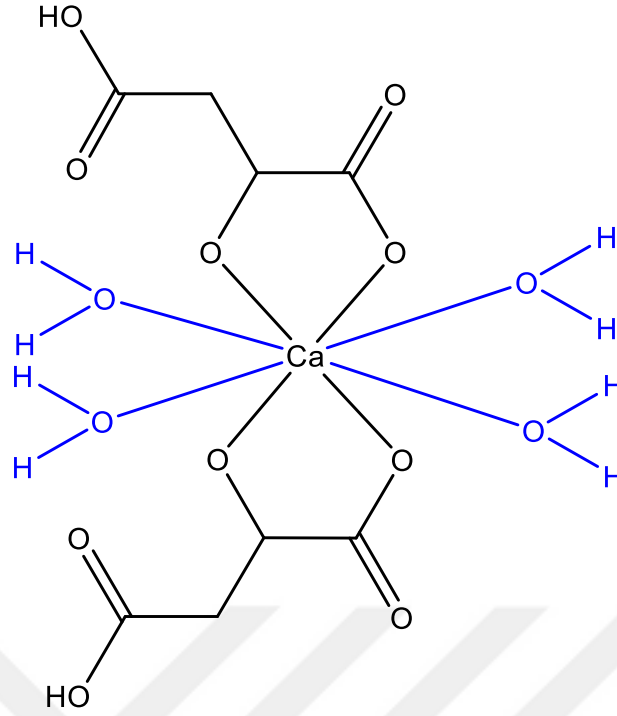
Çalışma kapsamında malik asit kalsiyumun doğal yöntemle sentezi, enstrümental karakterizasyon çalışmaları, elektrokimyasal çalışmalar ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır.

3.2.2. Malik asit kalsiyum kompleksinin doğal yöntemle sentezi

Rhus coriaria olarak bilinen sumak bitkisinin meyvesinden 100 g tartıldı. Daha sonra 500 ml su içerisinde 120 saat bekletildi. Oluşan koyu kırmızı renk çözeltide bitki artıklarından kurtulmak amacıyla filtre kağıdından süzüldü. Elde edilen süzüntü bir behere alınarak 10 gün süreyle ışık kabininde D65 ışığı altında karanlık bir odada ve oda sıcaklığında bekletildi. Her gün eşit miktarda (5 ml) su ilave edilerek yavaş buharlaştırma işlemi gerçekleştirildi. Onuncu günün sonunda daha viskoz bir hal elde edildi. Elde edilen viskoz madde 100 ml etil alkolden kristallendirilerek beyaz renkli malik asit kalsiyum kompleksine ait kristaller elde edildi (Şekil 3. 1-2).



Şekil 3. 1. Malik asit kalsiyum kompleksinin doğal yöntemle sentezi



Şekil 3. 2. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sentez tepkimesi

$[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (B): Erime noktası: 196 °C, verim: %92, renk: beyaz, molekül ağırlığı: 376.28 g/mol. Elementel analiz, bulunan (% hesaplanan): C 25.54 (24.99), H 4.29 (4.45). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm); 13.51 (s, 2H, OH), 6.80 (s, 2H, CH-O), 4.75 (s, 2H, C-H), 2.77 (t, 1H, CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm); 180.00 (C=O), 60.25 (C-O), 40.15 (CH_2). UV-Vis(λ_{max} , nm): DMF (220, 310, 400), DMSO (225, 310, 390), H_2O (210, 301, 585). FTIR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3251$ (OH gerilmesi), 3374-3218 (OH eğilimleri), 2850 (alifatik düzlem içi C-H eğilimleri), 1564 (C=O gerilimi), 1444-1404 (alifatik düzlem içi C-H eğilimleri), 450 (Ca-O eğilimleri). MS(ESI): m/z: 378.03 (% 100.0), 379.04 (% 9.4), 380.04 (% 3.3), 382.03 (% 2.2).

3.2.3. Elektrokimyasal çalışmalar

Elektrokimyasal çalışmalar için $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (B) kompleksi DMF ve Asetonitril ortamında 10^{-5} M'lık 10 ml'lik çözeltileri hazırlandı. Destek elektrolit olarak çözeltiliye tetrabutilamoniyumtetraflüorborat'ın 0.1 M'lık çözeltisinden 1.5 ml ilave edildi.

Voltamogram tekniğinden yararlanarak hazırlanan çözeltilerin kinetik parametreleri belirlenmiştir. Akış hızı sabitlenmiş azot gazı geçirilen ortamdan hazırlanan çözeltilerin voltamogramları alınmıştır. Referans elektrotlar olarak gümüş-gümüşklorür ($\text{Ag}^+ - \text{AgCl}$),

karşıt elektrod olarak platin (Pt) tel elektrod ve çalışma elektrodu olarak ise camsı karbon elektrod tercih edilmiştir. Elektrot yüzeyinde istenmeyen safsızlıklar olduğu durumda pik akımında azalma ve pik potansiyelinde kayma gözlenir. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktive edilmesi için farklı ön işlem metotları bulunmaktadır. Elektrotların temizliği Bandelin marka RK 100 model sonikatör ile yapılmıştır. Aktifleştirme ve temizleme işlemiyle elektrot transferini kısmi olarak değiştiren adsorplanmış maddelerin yüzeyden uzaklaştırılması ve elektron yüzeyinin mikro yapısı değiştirilerek reaksiyonun tersinirliği artırılır. Bu işlemde elektrot yüzeyi P4000'lik Buehler temizleme kağıdı kullanılarak parlak ve düzgün hale gelmesi sağlanır. Özel olarak hazırlanan temizleme kağıtları üzerine 1 µm'lik alumina tozu eklenir ve elektrot, dairesel hareketler ile temizlenir. Bu işlem aynı şekilde 0.3 µm ve 0.05 µm'lik alumina tozları ile tekrar edilir. Hazırlanan çözeltilerin farklı potansiyel (100, 150, 200, 250 ve 500 mV/s) tarama hızlarındaki siklik voltamogramları (CV) alınmıştır.

Camsı karbon (BAS MF-2012)

Ag⁺-AgCl (BAS MF-2052)

Platin tel (BAS MW-1032)

3.2.4. X-ışını yapılarının aydınlatılması

X-ışını kristalografisi için veri toplama ve hücre arıtımı Bruker APEX2 CCD difraktometre kullanılarak tamamlandı ve Bruker SAINT kullanılarak veri indirgeme yapıldı. Yapıları çözmek ve aydınlatmak için SHELXTL kullanıldı [92].

3.2.5. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Çalışmada kullanılan bakteri suşları nutrient buyyon' a aşılansarak 37 °C'de 24 saat, maya suşları sabouraud dekstroz broth'a aşılansarak 30 °C'de 24 saat süre ile aktivasyonu sağlamak için inkübe edilmiştir. Daha sonra deney tüplerinde sterilize edilen ve 45-50 °C'ye kadar soğutulan müeller hinton agar, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri suşlarının 24 saatlik (Mc Farland OD: 0.5, 6.0x10⁸ bakteri/ml), patates dekstroz agar besiyerine de maya suşları ile 24 saatlik buyyondaki kültür ile (1.5x10⁶ maya/ml) [93] aşılansmıştır.

Homojen karışım (Vortex tüp karıştırıcısı ile) sağlandıktan sonra 9.0 cm çapındaki steril petri kutularına yaklaşık 15'er ml dağıtılmış ve besiyerinin petri kutusu içinde

dağılması sağlanmıştır. Malik asit kalsiyum kompleksinden antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesi için 1.5 ve 3.0 mg olacak şekilde 11 mm çapındaki steril boş disklerle emdirilmiştir. Katılaştıran besiyeri üzerine $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4 °C' de 2 saat bekletildikten sonra, bakteri aşılama petri kutuları 37 °C' de 24 saat, maya aşılama petri kutuları ise 27 °C' de 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir [94]. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir [95]. Çalışma 3 paralel halinde yürütülmüş ve ortalama değerler alınmıştır.

Mikroorganizmalar

Çalışmada bakteri suşları olarak *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG22, *Staphylococcus aureus* 6538, *Klebsiella pneumoniae* FMC 3, *Escherichia coli* DM ve *Pseudomonas aeruginosa* 9027 kullanıldı. Maya suşları olarak ise *Candida albicans* Klinik izolat, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* Wet 136 ve *Candida utilis* NRRL-Y-900 suşları kullanıldı. Çalışmada toplam 6 bakteri suşu ve 4 maya suşu kullanıldı.

3.2.6. Hücre kültürü uygulamaları

3.2.6.1. ARPE-19 hücre hatları

Retina Pigment Epitel (ARPE-19) hücreleri Amerikan tipi kültürü koleksiyonundan (ATCC) (Manassas, VA, ABD) alınmıştır. ARPE-19 hücrelerinin *in vitro* ortamda steril koşullarda hücre kültürü teknikleri kullanılarak pasajlanmıştır. Bu hücrelerin besiyeri olarak kullanılan %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ile takviye edilmiş Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) ortamında, %1 L-glutamin ve %1 penisilin ve besi yeri 37 °C' de %5 CO₂ nemlendirilmiş bir atmosferde inkübasyonu edildi [96,97]. Hücrelerin kontrolleri her gün inverted mikroskopta gözlemlendi ve hücreler yaklaşık % 70-80 konfluent olduklarında yeni pasajlar yapıldı. Besiyeri her 2-3 günde bir değiştirildi [98].

Dondurulmuş ARPE-19 hücre hatlarının çözülmesi için krioviyal tüpler içerisinde %5 DMSO (dimetil sülfoksit) ile dondurulmuş olan ARPE-19 hücre hatları, -80 °C' lik derin dondurucu cihazından alınarak 37 °C' de çözüldü. 4 °C' nin üzerindeki DMSO hücrelere toksik etki gösterdiğinden dolayı 37 °C' de hücreleri çözdürürken hızlı bir şekilde çalışıldı. Falcon tüplere yaklaşık 15 ml yeni besiyeri ilave edilerek 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj

edildi. Santrifüj sonrası falkon tüplerin içerisinde bulunan süpernatant kısım aspire edildi ve hücre pelletleri üzerine tekrar (~15 ml) besiyeri eklenerek ikinci kez santrifüj yapıldı.

Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek uzaklaştırıldı ve çöken ARPE-19 hücrelerinin üzerine sırası ile, DMEM/F12 besiyerlerinden 1 ml eklenerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Ardından hücrelerin üzerine 9 ml besiyeri daha ilave edildi ve 10 ml'lik hücre süspansiyonu 75 cm²'lik flasklara aktarıldı. Flasklar, 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

3.2.6.2. ARPE-19 hücre hatlarının hücre canlılığı analizi

Hücrelerin canlılıklarının ve sayılarının belirlenmesinde, membran bütünlüğünü ölçmeye dayalı test olan %0.5'lik tripan mavisi boyası testi kullanıldı. Canlı hücreler mitokondri organelinde enerji üretimi yapabildiklerinden dolayı hücre membranından giren boya maddesini aktif taşımayla hücre dışına çıkartarak, renksiz görülür ve ölü hücreler mitokondri organelinde metabolik enerji ihtiyacını yerine getirememekte hücre membranından geçen boya maddesini absorblar, aktif taşıma için enerji ihtiyaçlarını karşılayamadıklarından hücre dışına çıkartamaz ve mavi renkte görülür.

ARPE-19 hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl %0.5 tripan mavisi boyası ilave edilerek iyice karışması sağlandı. ARPE-19 hücre hattında hücre canlılığı tespit edilmiştir. Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10 µl örnek alındı, distile su ile temizlenen Neubauer hemositometresinin lamındaki sayım odacığına konuldu.

Işık mikroskopunda 20X oküler kullanılarak dört karede hücre sayımı gerçekleştirildi. Tripan mavisi boyasını içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı metabolize edip parlak görünen hücreler ise canlı olarak değerlendirildi.

Hücreler sayıldıktan sonra 1 ml besiyerindeki toplam canlı hücre sayısı;

$$\text{Hücre}_{\text{ml}} = \text{Aritmetik Ortalama}_{\text{canlı hücre}} \times \text{Dilüsyon Katsayısı} \times 10^4$$

formülüne göre hesaplandı.

Sitotoksik aktiviteyi değerlendirmek için Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) testi yöntemi kullanıldı. Bu çalışmada, sitotoksin üreten suşların ARPE-19 üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek için kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır ve hayatta kalan hücrelerin yüzdesini belirlenebilmek için kullanılır. MTT testi, MTT'nin sarı tuzunu suda çözünmeyen mor formazan kristaline dönüştürmek için mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesinden yararlanılmaktadır. Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülür ve üretilen renk ELISA okuyucusu kullanılarak belirtilen dalga boyunda ölçülür (Şekil 3. 3) [99].

Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır [99,100].

MTT analizi yöntemi 96'lık plak kuyucuklarında bulunan 100 µl medyum ve hücre karışımı üzerine, hazırlanmış tiazolil mavi tetrazolium bromid solüsyonundan 25 µl ilave edildi. Bu solüsyon ilavesini takiben 96'lık plak inkübatöre alınarak 4 saat bekletildi. Dört saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum bir pipet ile alınarak MTT çözücü solüsyonundan 100 µl ilave edildi ve 20 dk daha inkübatörde bekletildi. Canlı kalan hücrelerin yüzdesi, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı ve belirlendi [99]. İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikropalak okuyucu spektrofotometre ile 570 nm absorbans değerinde ölçümler kaydedildi.

$$\text{Canlı hücrelerin yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Süpernatant hücrelerin ortalama optik absorpsiyonu}}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama optik absorpsiyonu}} \times 100$$

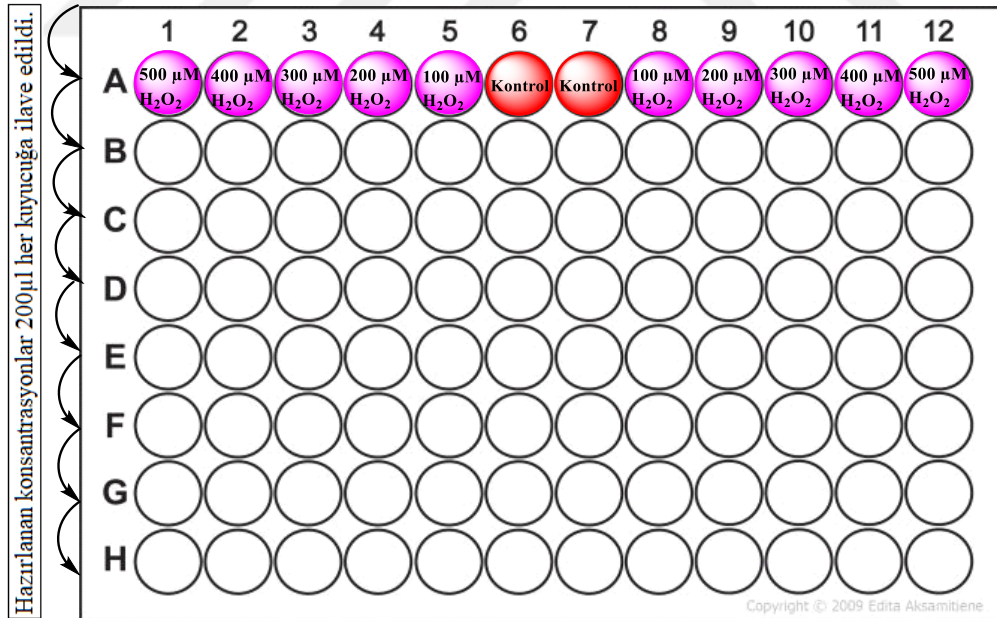
Bu amaçla hücreler 96-kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde DMEM/F12 besiyeri ortamında ekilmiş ve 20 saat sonra $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve H_2O_2 uygulamaları yapılmıştır. Deney süresinin dolmasıyla hücrelere MTT çözültisi eklenip 4 saat inkübe edilecek ve 4 saatlik süre sonunda 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri mikropalaka okuyucu ile saptanmıştır.



Şekil 3. 3. ELISA okuyucu cihazı

3.2.6.3. ARPE-19 hücre hatlarında H₂O₂ ile hasar modelinin oluşturulması

ARPE-19 hücre hattı üzerinde hidrojen peroksit oksidatif stres kaynağı olarak uygulanmıştır. Çalışmada 100-500 μ M aralığında H₂O₂ çözeltisine maruz bırakılmıştır. 103 μ l H₂O₂ üzerine tamamlanan 10 ml DMEM/F12 çözücüsü eklenerek 10⁻¹ M hidrojen peroksit çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stoktan seyreltilerek 100, 200, 300, 400, 500 μ l oranlarında hazırlanan H₂O₂ ile 20 saat inkübasyona bırakılan ARPE-19 hücrelerinde sitotoksosite oranlarını belirlemek üzere hazır hale getirilmiştir (Şekil 3. 4) [98].

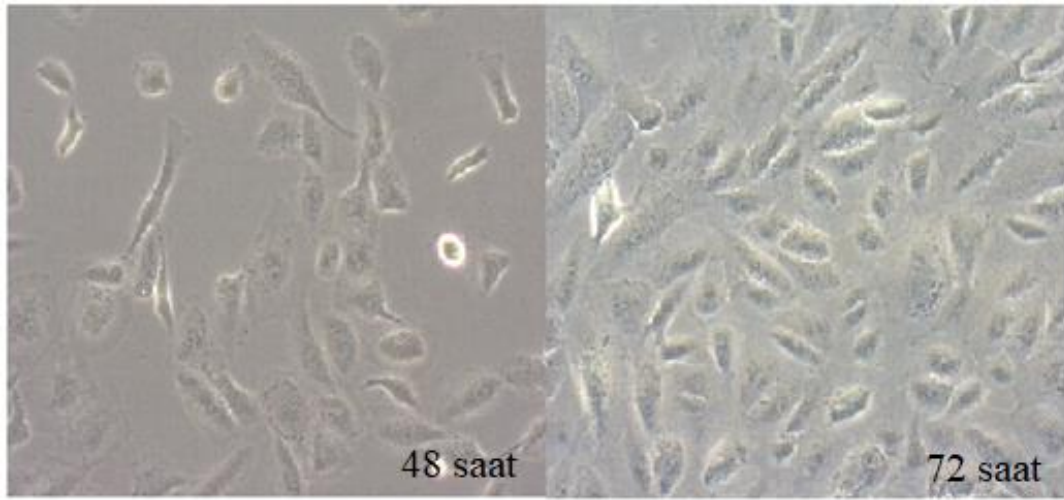


Şekil 3. 4. H₂O₂ uygulaması için mikropilaka yerleşimi

3.2.6.4. Deney protokolü

Malik asit kalsiyum kompleksinin oluşturulan hidrojen peroksit hasarına karşı etkisinin incelenebilmesi için üç farklı deney protokolü ve farklı konsantrasyonlarda malik asit kalsiyum kompleksi uygulaması yapılmıştır.

ARPE-19 hücre ekimi 96'lık platelere her kuyucuğa yaklaşık 10.000/100 µl gelecek şekilde üç plate hücre ekimi yapıldı. ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre hattı oluşturuldu (Şekil 3. 5).



Şekil 3. 5. ARPE 19 hücre hatlarının invert mikroskop ile görünümü

$[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinden farklı konsantrasyonlarda hazırlanması yapılmıştır. Bunun için 37 mg tartılan malik asit kalsiyum kompleksi 1000 µl DMEM'de çözülmüştür. Oluşturulan 10^{-1} M'lık çözelti seyreltilerek (1000, 10, 0.1, 0.001 ve 0.00001 µM) farklı konsantrasyonlarda malik asit kalsiyum çözeltisi hazırlanmıştır.

H_2O_2 ile $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinden farklı konsantrasyonlarda hazırlanması yapılmıştır. Malik asit kalsiyum 10^{-1} M'lık çözeltisinden 130 µl alınarak üzerine 13 ml 400 µM H_2O_2 çözeltisinden ilave edildi ve DMEM/F12 çözüsü ile tamamlanarak 10^{-3} M'lık hidrojen peroksitli malik asit kalsiyum çözelti hazırlanmış oldu. Ana stok çözelti seyreltilerek farklı (1000, 10, 0.1, 0.001 ve 0.00001 µM) konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

1. Deney Protokolü: Tek başına $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin uygulanması

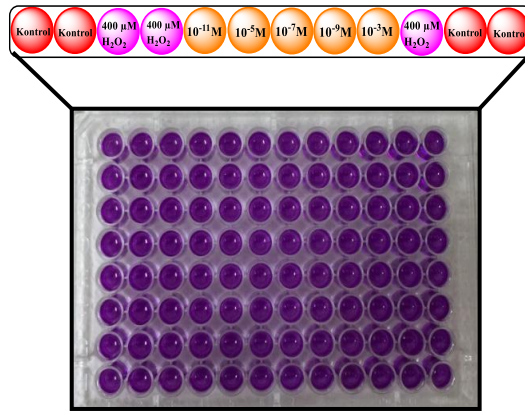
ARPE-19 hücre ekimi 96'lık platalere uygun hücre hattı oluşturuldu ilk uygulamada besiyerleri değişimi yapılarak 4 saat süre ile %5 CO_2 ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C' de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki besiyeri aspire edilerek yerine sadece malik asit kalsiyum çözeltisinden (1000, 10, 0.1, 0.001 ve 0.00001 μM) konsantrasyonlarda 100 μl 20 saat süre ile inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı ölçümü için 570 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir.

2. Deney Protokolü: $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Önce Uygulanması

Malik asit kalsiyum kompleksinin önce uygulaması için 96'lık plate ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre hattı oluşturuldu. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan malik asit kalsiyum çözeltisi (1000, 10, 0.1, 0.001 ve 0.00001 μM) farklı konsantrasyonlarında 100 μl Şekil 3. 6 gösterildiği gibi uygulanarak 4 saat süre ile %5 CO_2 ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır.

4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine hidrojen peroksitli malik asit kalsiyum çözeltisinden (1000, 10, 0.1, 0.001 ve 0.00001 μM) konsantrasyonlarda 100 μl 20 saat süre ile inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı ölçümü için 570 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3. 2).



Şekil 3. 6. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin mikropilaka yerleşimi

3. Deney Protokolü: $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksi ile H_2O_2 birlikte uygulaması

ARPE-19 hücre ekimi 96'lık plakelere uygun hücre hattı oluşturuldu ilk uygulamada besiyeri değişimi yapılarak 4 saat süre ile %5 CO_2 ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C' de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksit ile birlikte farklı (1000, 10, 0.1, 0.001 ve 0.00001 μM) konsantrasyonlarda 100 μl 20 saat süre ile inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı ölçümü için 570 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. İstatistiksel analizler

Verilerin değerlendirmesinde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılan değişkenlerin grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (Anova) uygulandı. (Post-hoc) çoklu karşılaştırma testlerinden Dunnett, Tukey HSD ve Tamhane T2 testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,001$ olarak kabul edildi. Tanımlayıcı istatistikler Mean \pm SD ile ifade edildi. Veriler IBM SPSS versiyon 22 paket programında değerlendirildi.

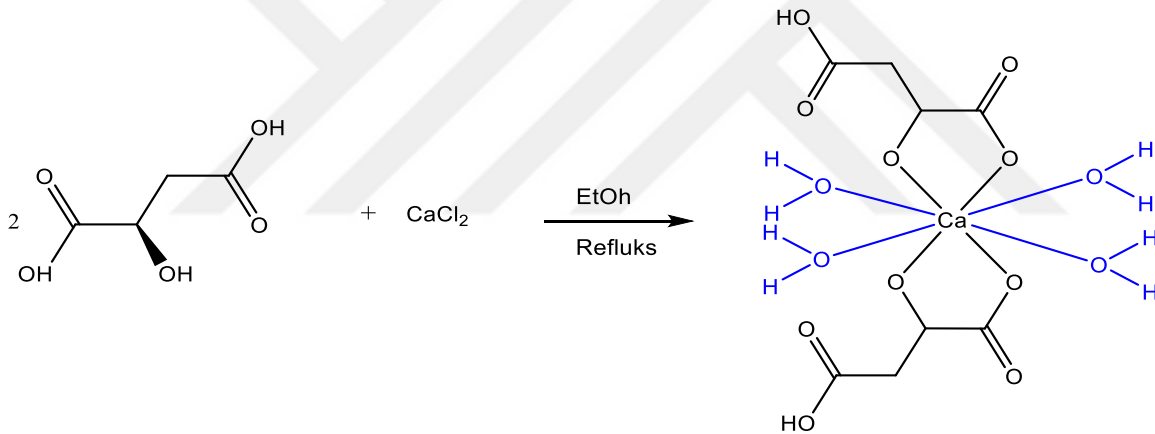
Çizelge 3. 2. Malik asit kalsiyum kompleksi dört saat öncesi uygulaması

[Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O dört saat öncesi uygulaması					
Hücre	İlk Uygulama	İnkübasyon Süre	İkinci Uygulama	İnkübasyon Süre	MTT Solüsyonu Uygulama ve Okuma
ARPE-19	Kontrol	4 saat	Kontrol	20 saat	
	Kontrol		Kontrol		
	400 µM H ₂ O ₂		400 µM H ₂ O ₂		
	400 µM H ₂ O ₂		400 µM H ₂ O ₂		
	0.00001 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O		0.00001 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O+(400 µM H ₂ O ₂)		
	0.001 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O		0.001 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O+(400 µM H ₂ O ₂)		
	0.1 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O		0.1 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O+(400 µM H ₂ O ₂)		
	10 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O		10 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O+(400 µM H ₂ O ₂)		
	1000 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O		1000 µM [Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]·2H ₂ O+(400 µM H ₂ O ₂)		
	400 µM H ₂ O ₂		400 µM H ₂ O ₂		
	Kontrol		Kontrol		
	Kontrol		Kontrol		

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ Kompleksinin Sumak Ekşiden Doğal Yöntemle Ekstraksiyonu

Tez kapsamında yapılan bu çalışmada, Kahramanmaraş yöresine ait sumak bitkisi (*Rhus coriaria*) doğal yöntemlerle saflaştırılarak yapısındaki malik asit kalsiyum kompleksi $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kristallendirilmiştir (Şekil 4. 1). İlk olarak kurutulmadan taze olarak elde edilen sumak bitkisinin meyvesinden 100 gr tartıldı. Daha sonra 500 ml su içerisinde 120 saat bekletildi. Oluşan koyu kırmızı renk çözeltide bitki artıklarından kurtulmak amacıyla filitre kağıdından süzüldü. Elde edilen süzöntü bir behere alınarak 10 gün süreyle ışık kabininde D65 ışığı altında karanlık bir odada ve oda sıcaklığında bekletildi. Her gün eşit miktarda (5 ml) su ilave edilerek yavaş buharlaştırma işlemi gerçekleştirildi. Onuncu günün sonunda daha viskoz bir hal elde edildi. Elde edilen viskoz madde 100 ml etil alkolden kristallendirilerek beyaz renkli kristaller elde edildi.



Şekil 4. 1. $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ teklif edilen sentez tepkimesi

Elde edilen beyaz renkte malik asit kalsiyum kompleksi oda sıcaklığında bozunmadan uzun süre saklanabilecek kadar kararlıdır. Bilinen bazı polar çözücülerde ($CHCl_3$, CH_2Cl_2 , EtOH, MeOH, Aseton) çözünmezken, bazılarında (DMF, DMSO) çözünmekte; apolar çözücülerde (n-hekzan ve n-heptan) çözünmezken suda hafif ısıtıldığında çözünmektedir. Elde edilen kompleksin analitiksel ve spektroskopik yöntemlerle karakterizasyonu yapılarak tek kristalleri elde edilmiştir. Kompleksin elektrokimyasal, fotoluminesans ve termal özellikleri de incelenmiştir [101].

Bu çalışma da malik asitin L-D gösteriminin hesaplanmasında yapıldı. Bunu için bir polarimetre kullanıldı. Malik asitin kalsiyum kompleksinin derişik çözeltisi su kullanılarak

hazırlandı. Polarimetrede numune kabına koyularak polaritesi ölçülen maddeler için üç ihtimal vardır. Bunlar;

1-Polarize ışığın yönünü hiç döndürmemesi, ki bu maddenin optikçe aktif olmadığını (Eğer meso değil ise) gösterir.

2-Polarize ışığı sağa çevirmesi “ dextrarotatory” (+) sağa çeviren.

3- Işığı sola çevirmesi “Levorotatory” (-) sola çeviren.

Herhangi bir ölçüm anında ışığı sağa yada sola çevirdiğinin bilinmesi de zordur. Eğer ışık + 10° sağa gözükyor ise bu gerçekten + 10° sağ mı, yoksa - 350° sol mu diye bir karışıklık ortaya çıkar ki bu durum, ancak konsantrasyona bağlı bir durum olduğu için, konsantrasyonu değiştirilerek anlaşılabilir.

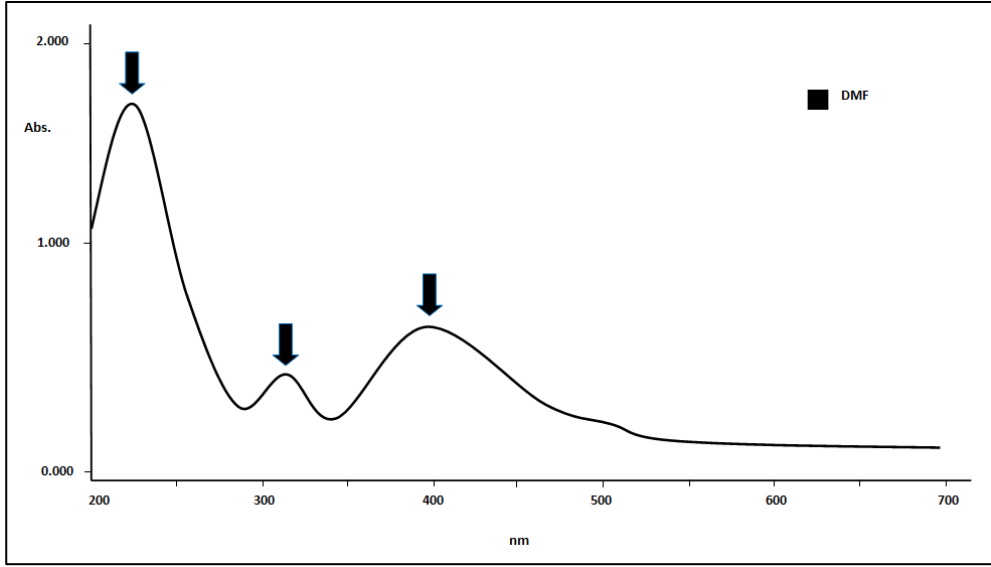
$$\text{Spesifik Döndürme Açısı} = [\alpha]\lambda t = \frac{I}{l \cdot c}$$

Formülde, I: desimetre olarak numune kabının uzunluğu
α; spesifik döndürme açısı
c; g/ml olarak konsantrasyon
t; çözeltinin °C olarak sıcaklığı
l: ışığın dalga boyu (Sodyum lambası için bu değer 589.3 nm)

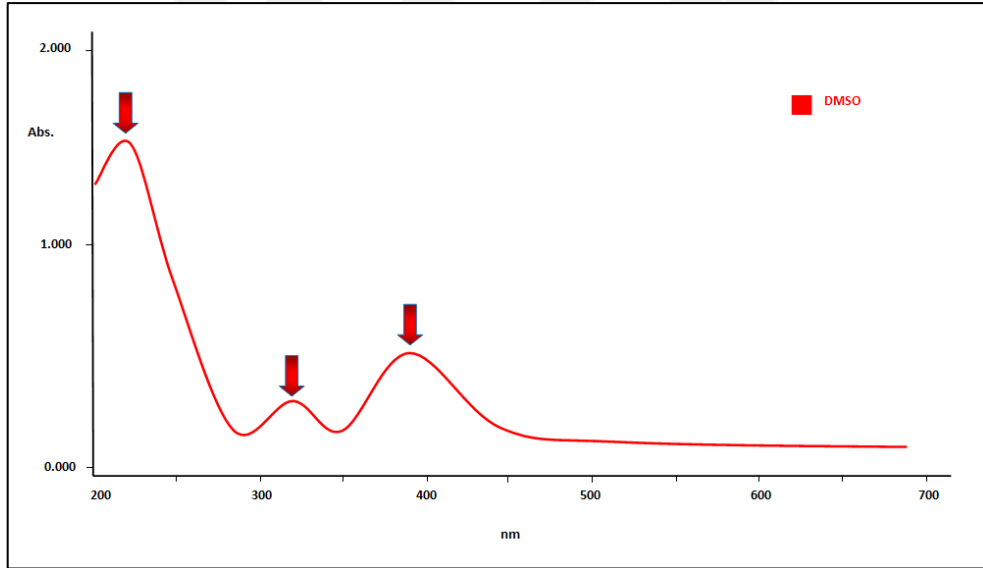
Polarimetre sonucu ölçtüğümüz değer; +0.152'dir. Buda malik asitin bize D-malik asit olduğunu gösterir.

4.2. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O Kompleksinin Uv-vis. Spektrum Bulguları

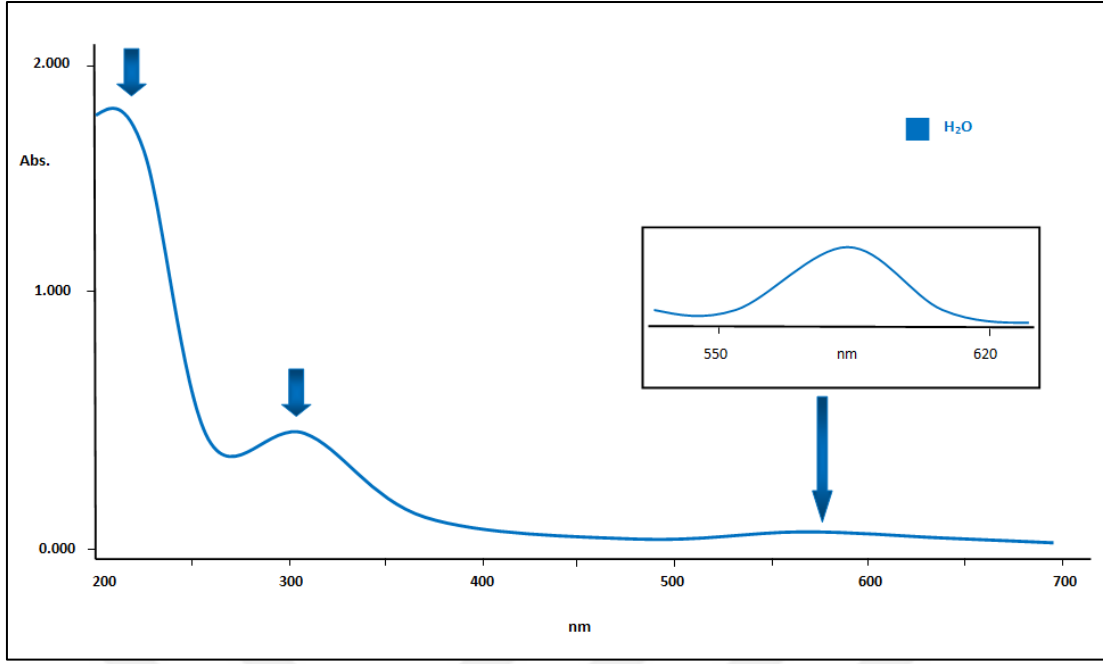
Bu çalışmada [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinin UV-Görünür bölge spektrumları, DMF, DMSO ve H₂O içerisinde, 1x10⁻⁵ M konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltilerde 200-700 nm aralığında incelenmiştir. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinin DMF, DMSO ve H₂O çözücüsündeki Uv-Görünür bölge spektrumları Şekil 4. 2-5'te verilmiştir.



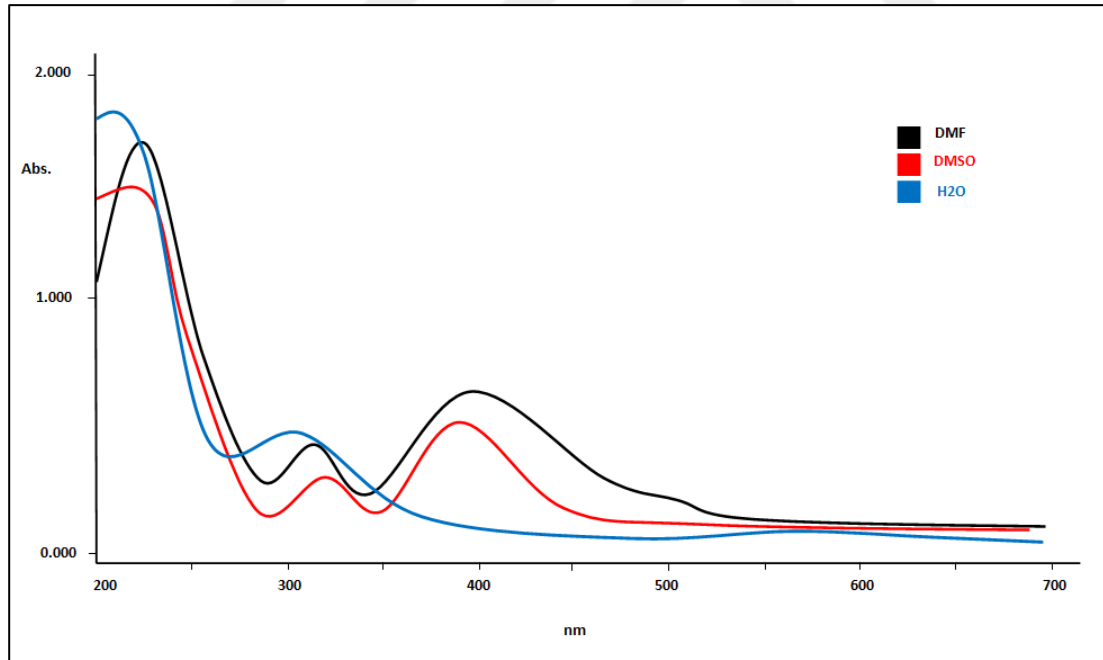
Şekil 4. 2. $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksinin DMF çözücüsündeki Uv-Görünür bölge spektrumları



Şekil 4. 3. $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksinin DMSO çözücüsündeki Uv-Görünür bölge spektrumları



Şekil 4. 4. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin H_2O çözücüsündeki Uv-Görünür bölge spektrumları



Şekil 4. 5. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksi Uv-Görünür bölge spektrumları

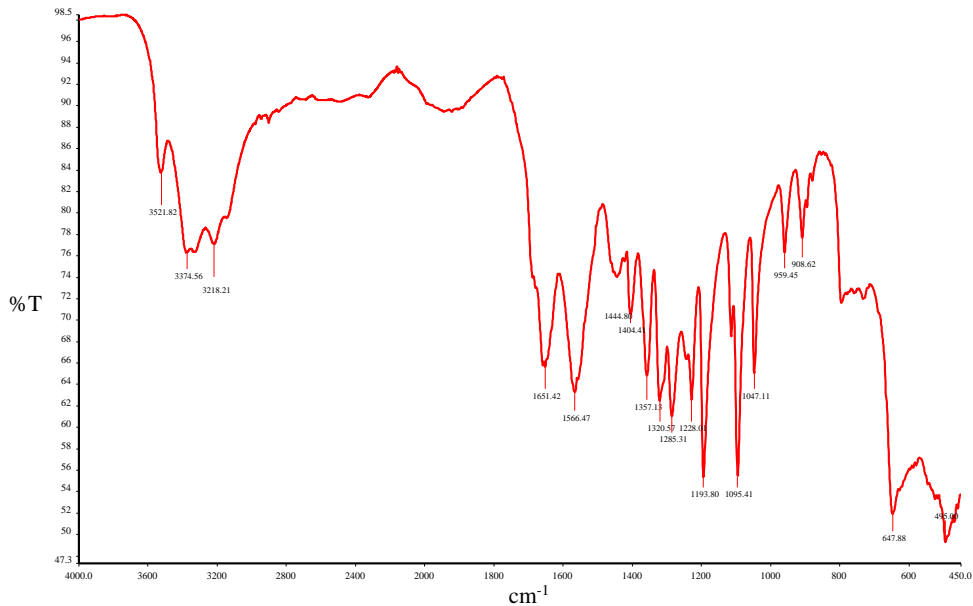
[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂·2H₂O kompleksinin UV-Görünür bölge spektrumlarına bakıldığında üç farklı bölgede omuz verdiği görülmektedir. Bunlar sırasıyla; 259-210 nm’de π - π^* geçişlerini, 300-350 nm’de n- π^* geçişlerini ve 350-500 nm aralığında ise L→M veya M→L (MLCT) yük transfer geçişlerinden kaynaklanan geçişleri göstermektedir (Çizelge 4. 1).

Çizelge 4. 1. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂·2H₂O kompleksinin dalga boyu (λ) geçiş değerleri

Bileşikler	Çözücüler	$\lambda_{max}(nm)$	Geçişler
[Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄] ₂ ·2H ₂ O	DMF	220, 310, 400	π - π^* , n- π^*
	DMSO	225, 310, 390	π - π^* , n- π^*
	Distile H ₂ O	210, 301	π - π^* , n- π^*

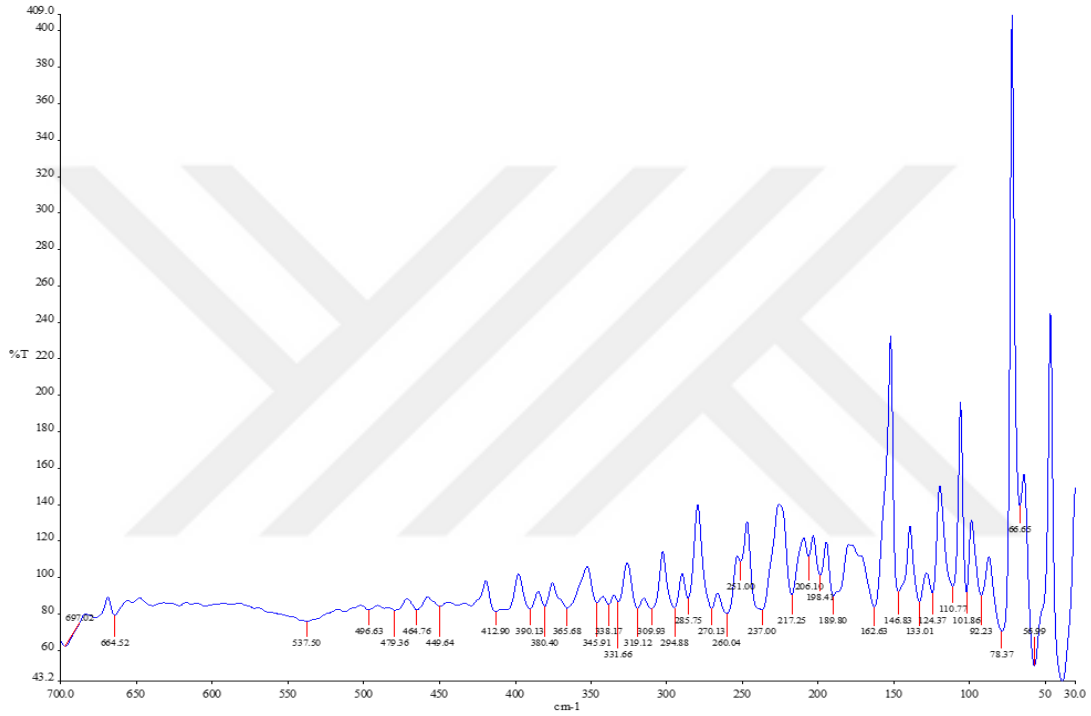
4.3. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂·2H₂O Kompleksi FT-IR Spektrumlarının Bulguları

[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂·2H₂O kompleksinin FT-IR spektrumları MIR (orta infrared) bölgesinde KBr tekniği kullanılarak alınmıştır. Yine aynı kompleksin FIR (Uzak infrared) bölgesinde ki spektrumu ise KBr tekniği kullanılarak alınmıştır. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂·2H₂O kompleksinin infrared spektrumu Şekil 4. 6’da ve spektral bilgiler ise metod bölümünde verilmiştir.



Şekil 4. 6. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂·2H₂O kompleksinin MIR ve FIR spektrumu

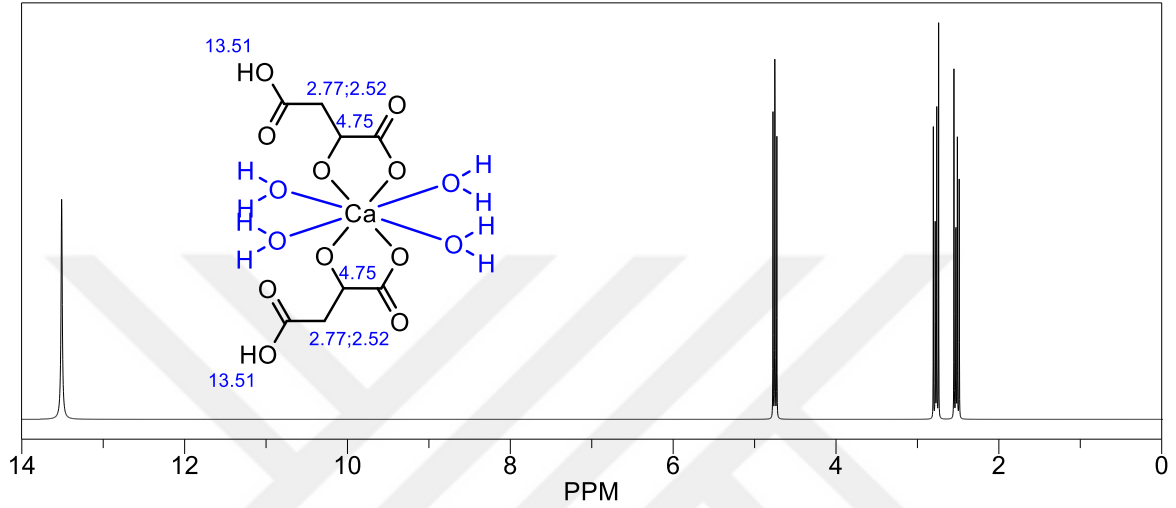
Spektrumdan da görüldüğü gibi 3374-3218 cm^{-1} aralığında gözlenen yayvan band $\nu(\text{OH})$ gruplarından kaynaklanmaktadır. 3251 cm^{-1} 'deki orta şiddetdeki band hidrat suyuna ait $\nu(\text{OH})$, 2850 cm^{-1} 'deki orta şiddetdeki titreşim bandları alifatik $\nu(\text{C-H})$ gruplarından kaynaklanmaktadır. 1574 cm^{-1} dalga boyunda $\nu(\text{C=O}$ gerilimi), 1444-1404 cm^{-1} 'de ν (alifatik düzlem içi C-H eğilimleri), 450 cm^{-1} 'de $\nu(\text{Ca-O}$ eğilimleri) [101] gruplarının varlığını göstermektedir (Şekil 4. 7).



Şekil 4. 7. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin FIR infrared spektrumu

4.4. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O Kompleksi ¹H-NMR ve ¹³C-NMR Spektrumlarının Bulguları

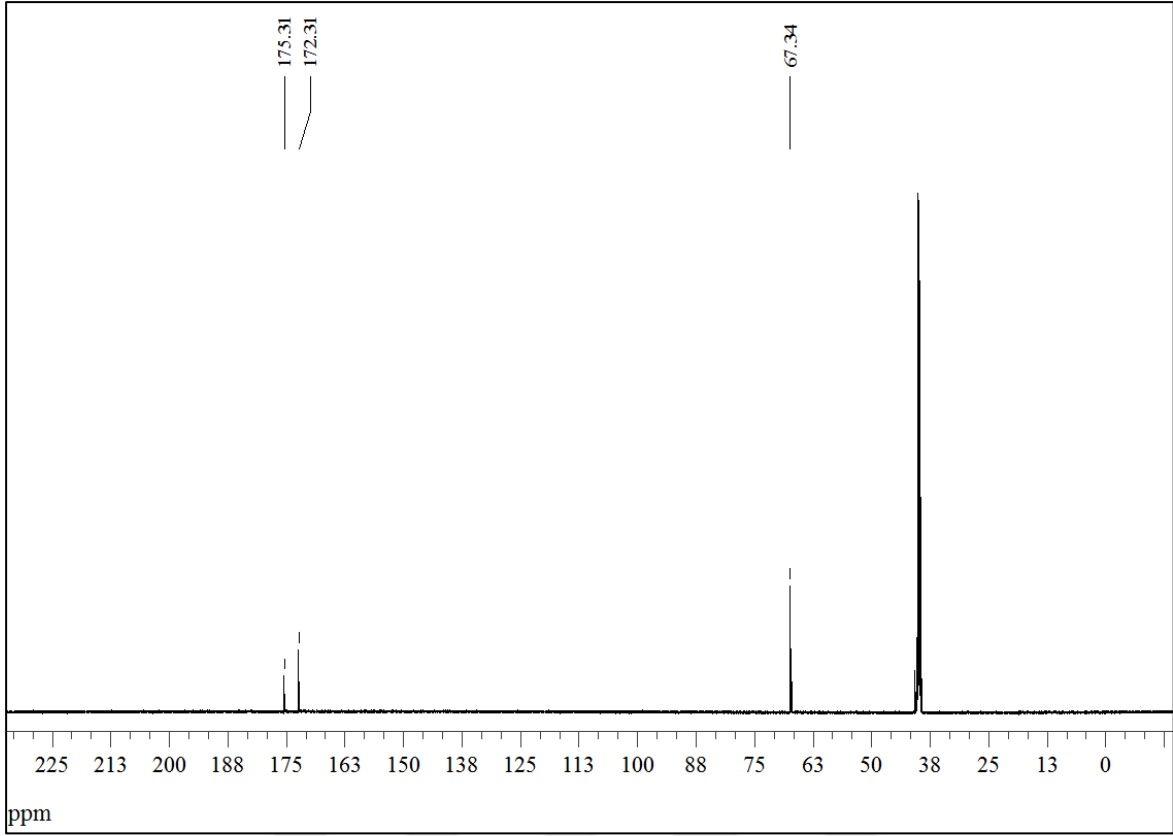
[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinin ¹H-NMR spektrumları DDMSO çözücü ortamında alındı. Elde edilen [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları Şekil 4. 8 ve Şekil 4. 9’da, 2D-HETCOR, COSY ve TOCSY spektrumları ise Şekil 4.10-12’de ve spektral sonuçları metod bölümünde verilmiştir.



Şekil 4. 8. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinin ¹H-NMR spektrumu

[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksine ait ¹H-NMR spektrumundan da görüldüğü gibi 13.51 ppm’de gözlenen sinyal hidroksil grubunun protonuna aittir. 4.75 ppm’de görülen multipletler oksijen atomuna bağlı alifatik hidrojen (Al-H)’lerden kaynaklanmaktadır. 2.77 ppm’de gözlenen sinyal CH-O grubuna ait singletler, 2.52 ppm’de görülen singlet –Hidrojen atomlarından kaynaklanmaktadır.

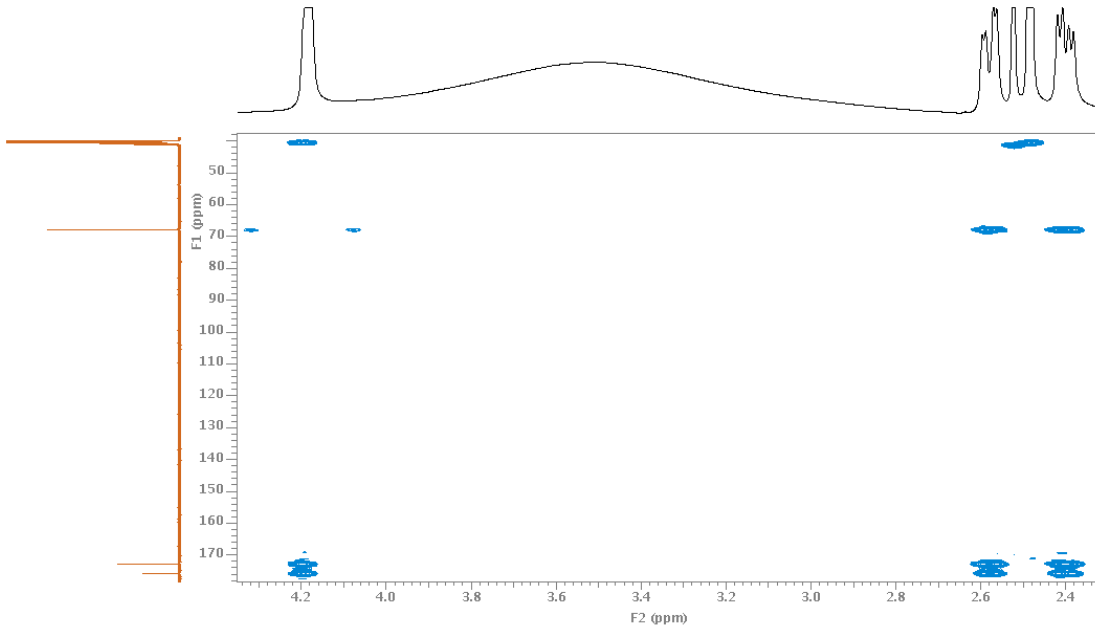
[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksine ait ¹³C-NMR spektrumlarından da görüldüğü gibi karbonil grubuna ait karbon atomunun sinyali 172.81-172.31 ppm’de gözlenirken, alifatik karbonlara ait sinyallerin ise 60.250-40.15 ppm aralığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4. 9).



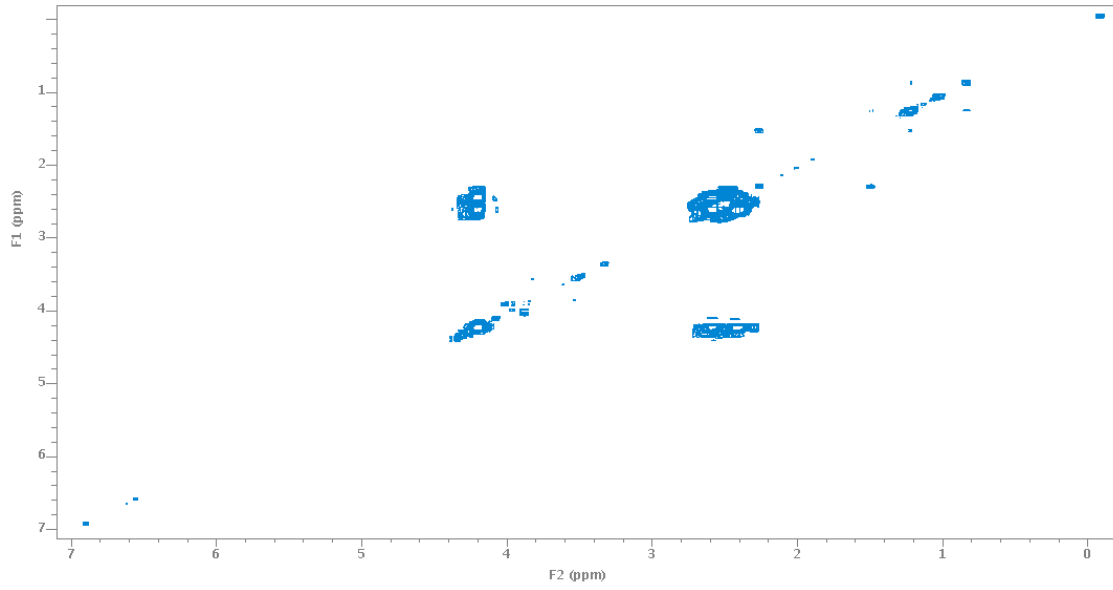
Şekil 4. 9. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin ^{13}C -NMR spektrumu

$[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin 2D-HETCOR spektrumu alifatik zincir üzerindeki (hidroksil, karbonil) C-H gruplarının tek bağ proton karbon etkileşimleri görülmektedir. Serbest OH grupları için karbon-proton etkileşimi görülmemektedir. COSY ve TOCSY spektrumları bileşik üzerindeki komşu proton-proton etkileşmelerini göstermektedir. Hidroksil grubu –O-H protonlarının komşu alifatik –CH protonlarıyla olan etkileşimleri bu spektrumlarda mevcuttur. Yine bu bileşiğe ait 2D-HMBC spektrumu ile ileri bağ karbon-proton etkileşimleri görülmektedir.

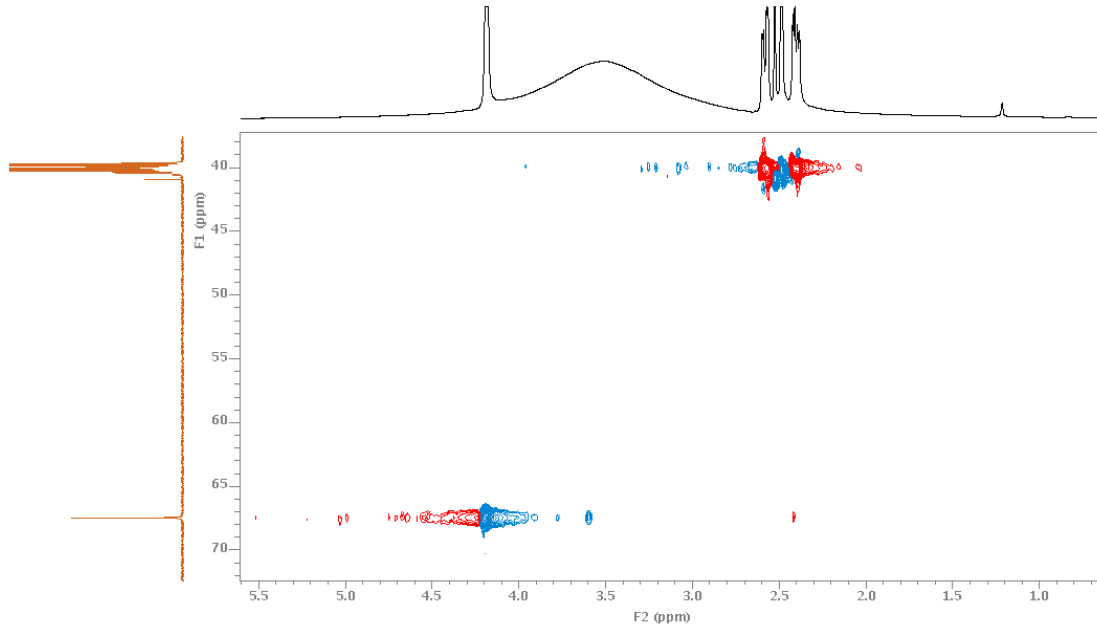
$[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin COSY spektrumu H2, H3 ve H4 protonlarının visinal olduğunu göstermektedir. H2 protonu hem H3 hem de H4 protonu ile etkileşmektedir. Bununla beraber, H2 ve H2 protonları, sırasıyla, 4.24 ve 4.14 ppm’de dublet olarak gözlenmektedir. HETCOR spektrumu kullanılarak, karbon atomları C1 (δ : 60.25), C2 (δ : 46.43), C3 (δ : 46.13), C4 (δ : 40.15) belirlenmiştir.



Şekil 4. 10. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin COSY, HMBC, TOCSY ve HETCOR spektrumu



Şekil 4. 11. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksi COSY, HMBC, TOCSY ve HETCOR spektrumu

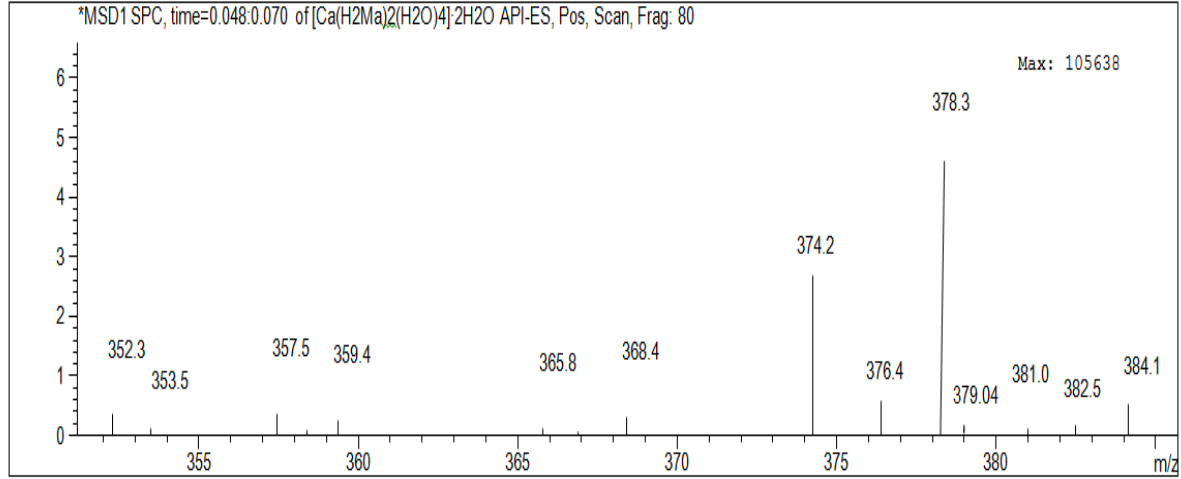


Şekil 4. 12. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksi COSY, HMBC, TOCSY ve HETCOR spektrumu

4.5. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Kütle Spektrum Bulguları

Tez kapsamında sumak bitkisinden ekstrakte edilen orjinal kompleksin $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ESI kütle spektrumları incelenmiştir.

Elde edilen kompleksin kütle spektrumları incelendiğinde, $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin DMF çözücü ortamında alınan ESI kütle spektrumu Şekil 4. 13’de verilmiştir. Bileşiğin kütle spektrumunda m/e 378.03 (%100)’de gözlenen pik molekül iyon pikini $[\text{M}]^+$ aittir. m/e 379.04 (%9.4)’de gözlenen ana pik fragmentasyon pikine $[\text{M}+1]^+$ aittir. m/e 380.04 (%3.3)’de gözlenen pik bileşiğe ait $[\text{M}+\text{Ca}]^+$ iyonundan ileri gelmektedir. Bileşiğin kütle spektrumunda m/e 382.03 (%2.2) gözlenen pik $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{Ca}]^+$ iyonuna aittir. Daha düşük m/e değerlerine sahip fragmentasyon pikleri m/e 357 (%0.9) ve m/e 352 (% 0.9) gözlenmiştir.



Şekil 4. 13. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂H₂O kompleksine ait kütle spektrumu

4.6. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂H₂O Kompleksinin Elektrokimyasal Bulguları

Malik asit kalsiyum kompleksinin elektrokimyasal çalışmaları için, Dönüşümlü Voltametri (DV) ölçümleri yapıldı. Çift tarama usulüne göre; hem anodik yönde hemde katodik yönde yapılan çalışmalarda, IVIUMSTAT, BAS 100 W elektrokimyasal analizörü kullanılmıştır. Tüm ölçümlerde çalışma elektrodu olarak camsı karbon disk elektrot (GCDE) kullanılmıştır. Yardımcı elektrot olarak platin tel elektrot ve karşılaştırma (referans) elektrodu olarak da Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın hassasiyeti için ve tekrar edilebilir elektrot yüzeyi oluşturabilmek sebebiyle camsı karbon disk çalışma elektroduna ön işlem uygulandı. Bunun için firma tarafından özel yapılmış yumuşak bir parlatma malzemesi üzerine çok az miktarda alüminyum oksit (Al₂O₃) tozu ilave edilerek, saf suyla ıslatılarak elektrot yüzeyi dairesel hareketlerle parlatılmıştır. En iyi tekrar edilebilirliği sağlamak için tüm bu ön işlemler üç kez tekrar edilerek yapılmıştır. Ön işlemten sonra temizlenen elektrot saf suyla yıkandıktan sonra temiz ve yumuşak bir bez ile kurularak galvanik hücreye konmuştur. Üçlü elektrotlardan diğer ikisi olan yardımcı elektrot (platin tel) ile Ag/AgCl referans elektrot ise her ölçümde kurularak galvanik hücreye konulmuştur. Yapılan tüm deneylerde IVIUMSTAT, BAS 100 W elektrokimyasal analizöre ait özel olarak üretilmiş olan deney hücresi kullanılmıştır. Bu sistem 2000 mVs⁻¹ hıza kadar olan gerilim tarama hızlarını yapabilmektedir [92].

Yapılan elektrokimyasal çalışmalarda iletkenliği artırmak amacıyla destek elektroliti olarak 0.1 M tetrabütülamonyumtetrafloroborat (TBATFB) tamponu kullanılmıştır. Çözelti içerisindeki serbest oksijeni uzaklaştırmak için 2 bar azot gazı analiz süresi boyunca geçirilmiştir. Elektrokimyasal özellikler dimetilformamid (DMF), dimetilsülfoksit (DMSO)

ortamında incelenmiştir. Malik asit kalsiyum kompleksinin elektrokimyasal özellikleri iki farklı konsantrasyon (1×10^{-3} ve 1×10^{-4} M) ve beş farklı (100, 250, 500, 750 ve 1000 mV/s) tarama hızı aralığında yapılmıştır. Her bir madde için voltametrik ölçümler, üç kez tekrarlanmış ve ortalamaları kullanılmıştır.

Dönüşümlü bir olayda elektrot reaksiyonunda transfer durumu pik potansiyeli arasındaki farktan tayin edilebilir [102].

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,0591}{n}$$

E_{pa} : Anodik pik potansiyeli

E_{pc} : Katodik pik potansiyeli

n : Transfer olan elektron

Bir elektron transfer işleminde $\Delta E_p:0.059$ V'u gösterir. Yavaş tarama hızında anodik ve katodik pik potansiyelleri için pik ayrımı 60-70 mV civarındadır. Bu da transfer olan elektron sayısının 1 olduğunu göstermektedir. Daha yüksek tarama hızlarında pik ayrımı büyümektedir. Bir elektrokimyasal işlemde anodik pik akımının (I_{pa}) katodik pik akımına (I_{pc}) oranı 1 ise bu olaya dönüşümlü voltametri olarak denir ($I_{pa}/I_{pc}=1$). Bu oran 1'den farklıysa ($I_{pa}/I_{pc} \neq 1$) dönüşümsüz voltametri olarak tanımlanır. Anodik pik akımının katodik pik akımına oranı 0.5 olduğu durumlarda ($I_{pa}/I_{pc}=0.5$) yarı-dönüşümlü voltametri ifadesi kullanılmaktadır. Bu üç durumda da ± 0.3 V sapma oranları kabul edilebilir ifade edilmektedir [102].

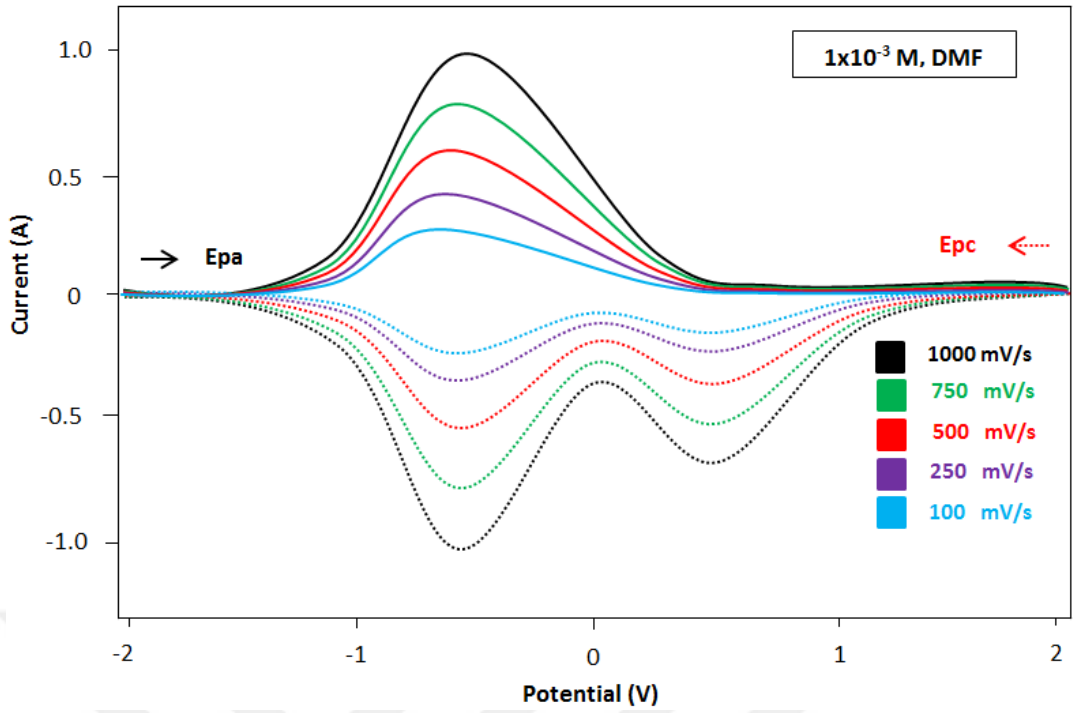
İlk olarak ekstrate edilen malik asit kalsiyum kompleksi iki farklı konsantrasyon ve beş farklı tarama hızlarında incelenmiştir. Bütün bileşiklere ait anodik potansiyel pik verileri (E_{pa}) ve katodik potansiyel pik verileri (E_{pc}) Çizelge 4. 2'de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. Malik asit kalsiyum kompleksine ait elektrokimyasal datalar

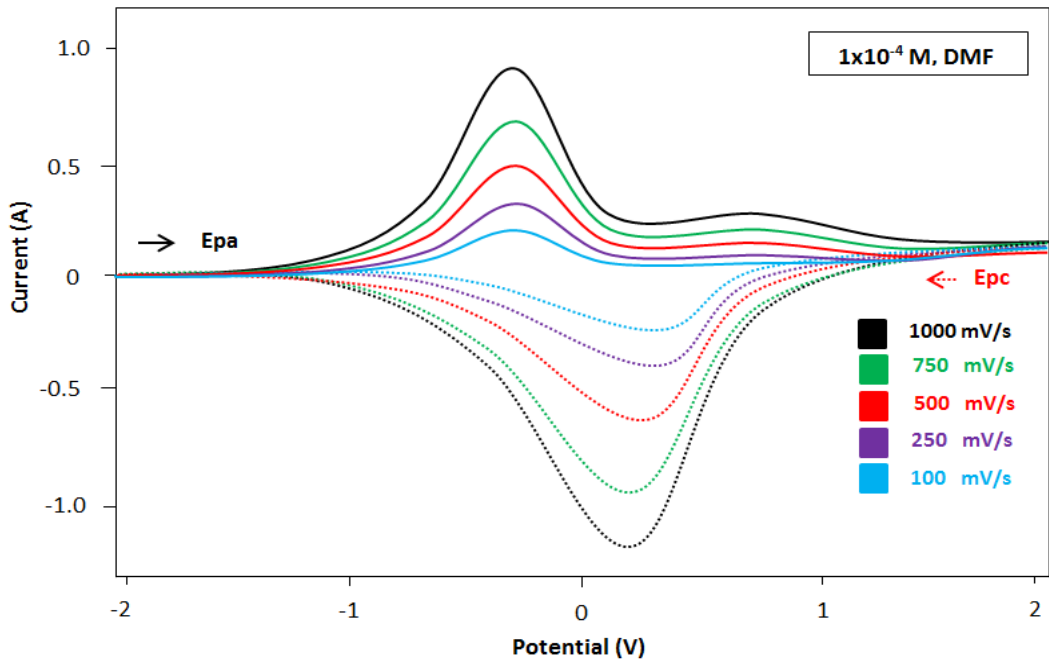
Bileşik	Çözücü	Konsantrasyon (M)	Tarama Hızı (mV/s)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	E_{pa}/E_c	$E_{1/2}$ (V)	ΔE_p (V)
[Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]:2H ₂ O	DMF	1x10 ⁻³	100	-0.62	0.33, -0.71	0.87	-	0.09
			250	-0.65	0.34, -0.72	0.90	-	0.07
			500	-0.68	0.35, -0.73	0.93	-	0.05
			750	-0.71	0.36, -0.74	0.95	-	0.03
			1000	-0.74	0.37, -0.75	0.98	-	0.01
		1x10 ⁻⁴	100	-0.21, 0.69	0.30	2.30	-	0.39
			250	-0.22, 0.68	0.28	2.42	-	0.40
			500	-0.23, 0.67	0.25	2.48	-	0.42
			750	-0.24, 0.66	0.23	2.86	-	0.43
			1000	-0.25, 0.65	0.20	3.25	-	0.40
	DMSO	1x10 ⁻³	100	-0.60	-0.44, -0.60	1.00	0.60	0.16
			250	-0.61	-0.45, -0.61	1.00	0.61	0.16
			500	-0.62	-0.46, -0.62	1.00	0.62	0.16
			750	-0.63	-0.47, -0.63	1.00	0.64	0.16
			1000	-0.64	-0.48, -0.64	1.00	0.64	0.16
		1x10 ⁻⁴	100	-0.71, 0.29	0.20	1.45	-	0.09
			250	-0.72, 0.28	0.19	1.47	-	0.09
			500	-0.73, 0.27	0.18	1.50	-	0.09
			750	-0.74, 0.26	0.17	1.52	-	0.09
			1000	-0.75, 0.25	0.16	1.56	-	0.09

DestekElektrolit: Tetrabutüylamonyumtetraflorborat (Bu₄NBF₄) (0.1 M); Konsantrasyon (M): 1 x 10⁻³ve 1x10⁻⁴ M. ReferansElektrot: Ag⁺/AgCl (0.03 M AgNO₃); E_{pa} ve E_{pc} anodic ve katodik pik potansiyeli.

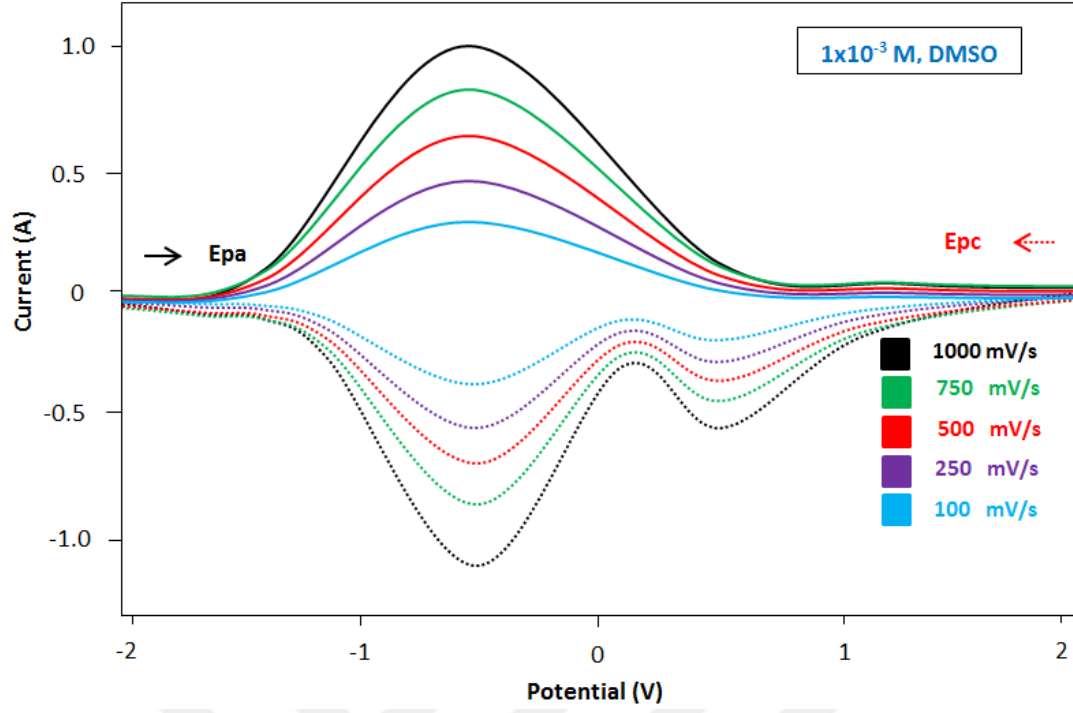
$$E_{1/2} = 0.5 \times (E_{pa} + E_{pc}), \Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$$



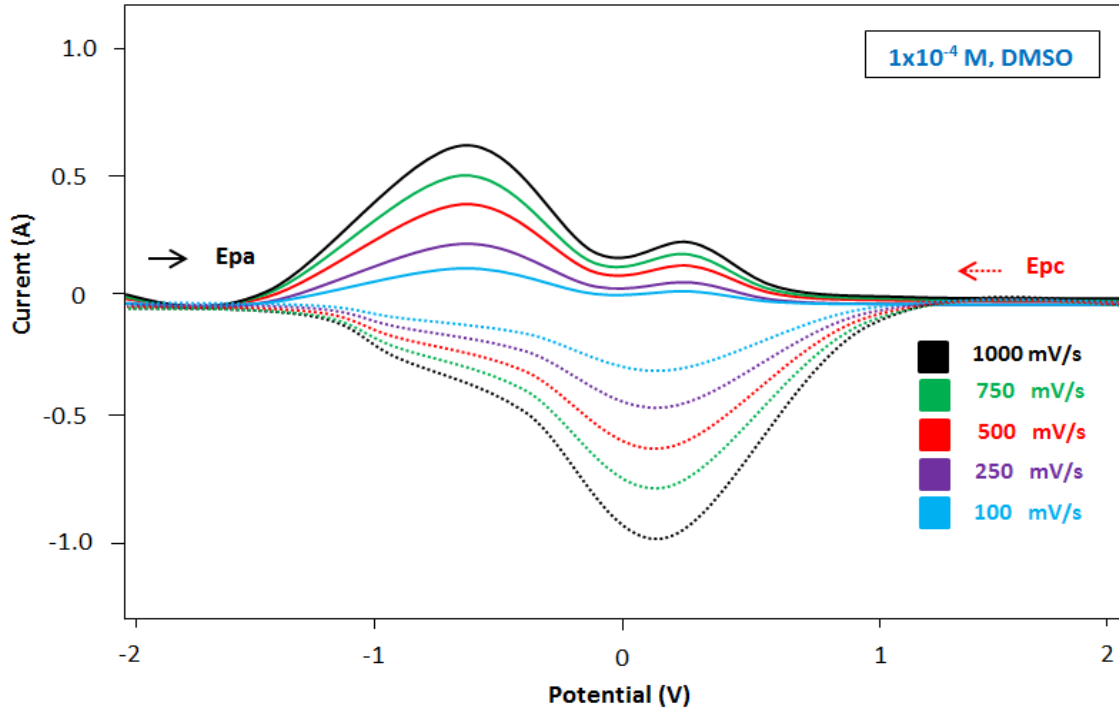
Şekil 4. 14. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1 \times 10^{-3} \text{M}$, DMF ortamında siklik voltammogramı



Şekil 4. 15. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1 \times 10^{-4} \text{M}$, DMF ortamında siklik voltammogramı



Şekil 4. 16. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1 \times 10^{-3} \text{M}$, DMSO ortamında siklik voltammogramı

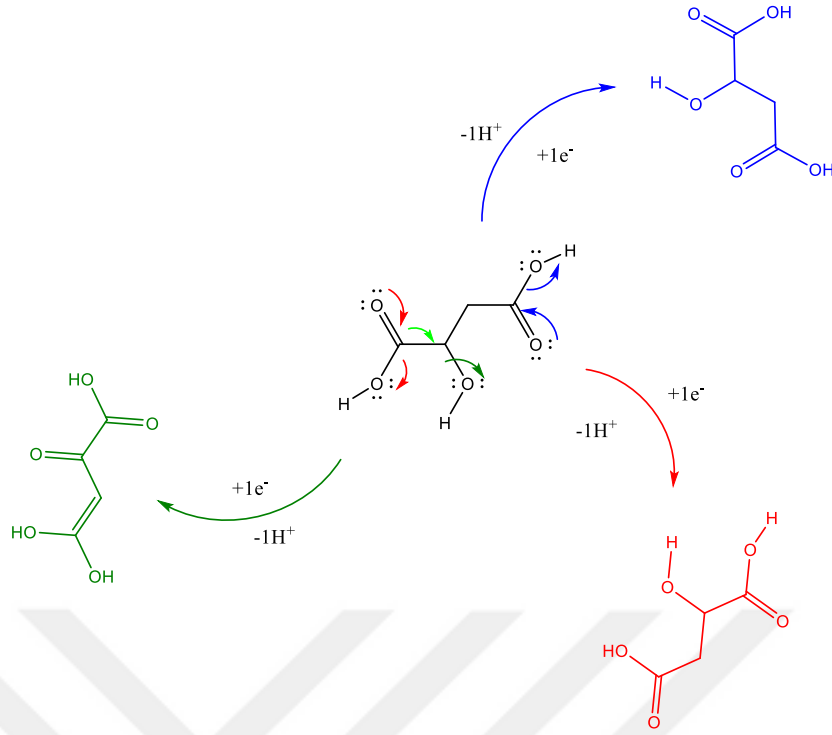


Şekil 4. 17. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1 \times 10^{-4} \text{M}$, DMSO ortamında siklik voltammogramı

Dönüşümlü voltammogramlara bakıldığında 1×10^{-3} M konsantrasyon da ölçülen anodik (I_{pa}) ve katodik pik akım (I_{pc}) şiddetleri daha büyük değerlere sahipken 1×10^{-4} M konsantrasyonda ölçülen değerler daha küçüktür. $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ bileşiğine ait voltammogram 100-1000 mVs^{-1} tarama hızı aralığında incelendiğinde katodik pik potansiyelleri, 1×10^{-3} M olanlarda (E_{pc}) -0.75-0.48 V aralığında iki adet ve anodik pik potansiyelleri (E_{pa}) ise -0.74-0.69 V arasında birer adet gözlenmiştir. 1×10^{-4} M olanlarda ise birer adet katodik pik potansiyeli (E_{pc}) 0.16-0.30 V ve iki adet anodik pik potansiyeli (E_{pa}) -0.75-0.69 V gözlenmiştir. Tarama hızı arttıkça negatif bölgede gözlenen indirgenme ve yükseltgenme pik potansiyelleri daha negatif bölgeye kaymaktadır.

$[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksinin 1×10^{-3} M, DMF ortamında alınan voltammogramlardan 100-1000 mV/s tarama hızlarında dönüşümsüz voltametri ($I_{pa}/I_{pc} \neq 1$) göstermektedir. 1×10^{-4} M, DMF ortamında alınan voltammogramlarda, bütün tarama hızlarında dönüşümsüz voltametri gözlenmiştir. Bu olay verilen voltammogramlarda açıkça görülmektedir. $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksinin 1×10^{-3} M, DMF ortamındaki siklik voltammogramı Şekil 4. 14'da, 1×10^{-4} M, DMF ortamındaki siklik voltammogramı Şekil 4. 15'de verilmiştir.

$[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksinin 1×10^{-3} M, DMSO ortamındaki siklik voltammogramı Şekil 4. 16'de, 1×10^{-4} M, DMSO ortamındaki siklik voltammogramı Şekil 4. 17'de verilmiştir. $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksinin 1×10^{-3} M, DMSO ortamında alınan voltammogramlardan 100-1000 mV/s tarama hızlarında dönüşümlü voltametri ($I_{pa}/I_{pc} = 1$) göstermektedir. 1×10^{-4} M, DMSO ortamında alınan voltammogramlarda, bütün tarama hızlarında dönüşümsüz voltametri gözlenmiştir. Bu olay verilen voltammogramlarda açıkça görülmektedir. Bileşiğe ait redoks işlemi Şekil 4. 18'da gösterilmektedir.



Şekil 4. 18. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksine ait redoks işlemi

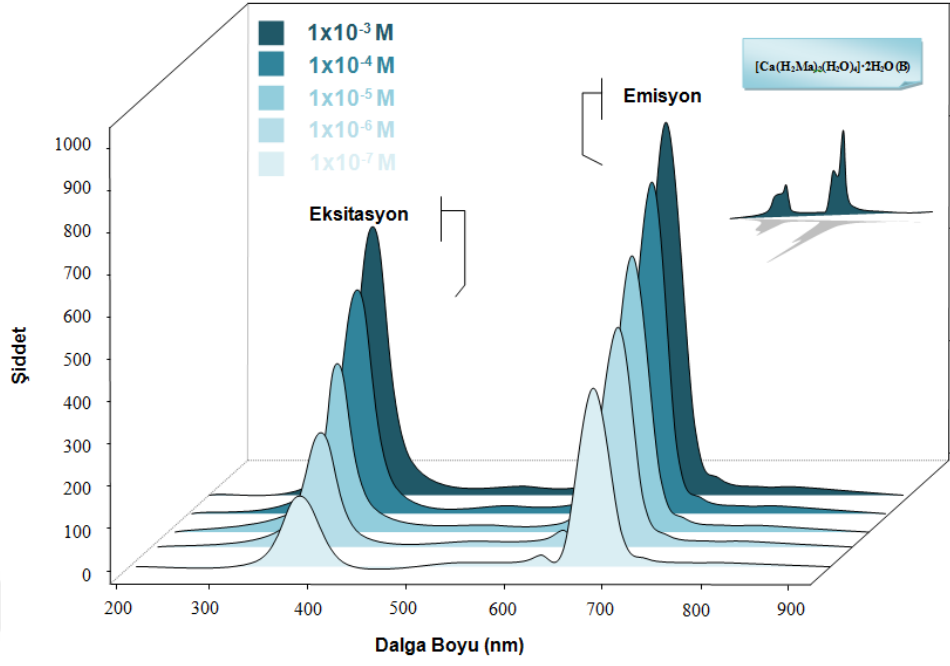
4.7. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Kompleksinin Fotoluminesans Özellikleri

Fotoluminesans spektroskopisi, yarı iletkenlerdeki optik etkileşimlerin incelenmesinde ve malzeme özellikleri hakkında bilgi edinmek için oluşturmuş spektroskopik bir tekniktir [103]. Materyalin optik veya mor ötesi ışık ile uyarılması sonucu meydana gelen ışımadır. Malzemenin ışık ile etkileşmesiyle yayılan fotoluminesans, gelen ışık demeti sayesinde oluşan elektron-boşluk çiftlerinin yeniden birleşmesi ile meydana gelir. Floresan uyarma ve emisyon özellikleri, genellikle oda sıcaklığında incelenmiştir.

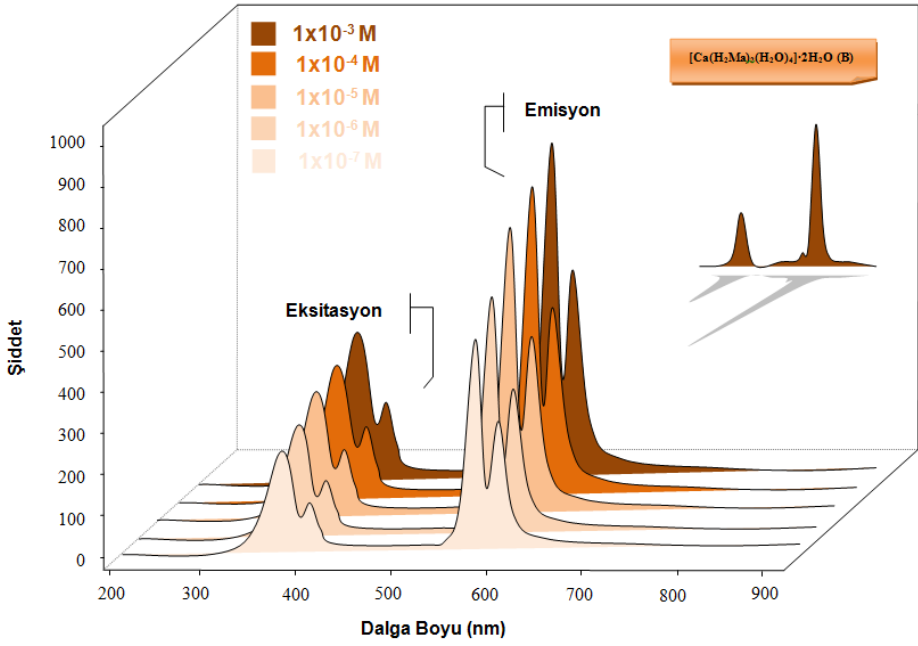
Ekstraksiyonunu gerçekleştirdiğimiz $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleks iki adet beşli metal şelatıdır (Çizelge 4. 3). $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin fotoluminesans özellikleri DMF, DMSO ve H_2O ortamında farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak (1×10^{-3} - 1×10^{-7} M) incelendi (Şekil 4. 19-21).

Çizelge 4. 3. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin fotoluminesans datalar

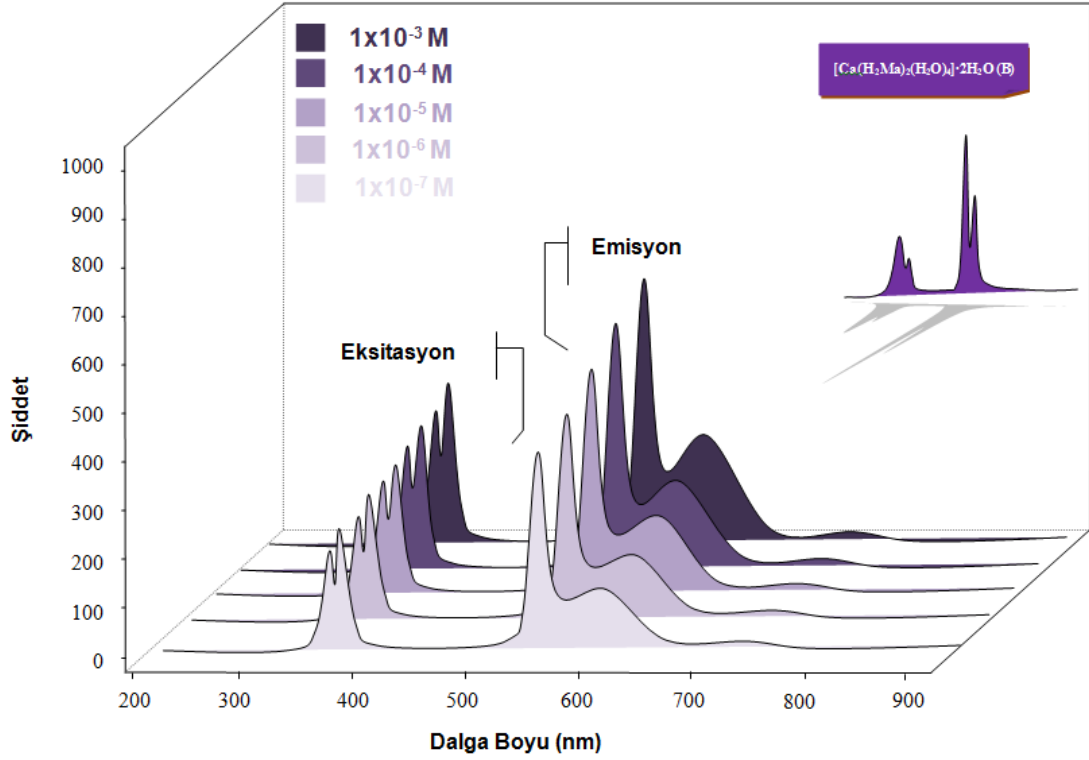
Bileşik	Çözücü	Konsantrasyon (M)	Eksitasyon (nm) (Şiddet)	Emisyon (nm) (Şiddet)	λ (ϵ)
$[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DMF	1×10^{-3}	480 (800)	775 (1000)	220 (0.68×10^4),
		1×10^{-4}	465 (675)	755 (905)	310 (0.16×10^4),
		1×10^{-5}	440 (480)	735 (705)	400 (0.16×10^4)
		1×10^{-6}	415 (310)	715 (565)	
		1×10^{-7}	395 (190)	695 (410)	
	DMSO	1×10^{-3}	460 (545), 500 (360)	670 (1000), 695 (695)	225 (0.98×10^4),
		1×10^{-4}	440 (450), 480 (300)	650 (895), 680 (610)	310 (0.37×10^4),
		1×10^{-5}	420 (350), 465 (250)	625 (795), 660 (500)	390 (0.16×10^4)
		1×10^{-6}	395 (300), 445 (170)	605 (620), 640 (400)	
		1×10^{-7}	380 (250), 430 (120)	580 (515), 620 (300)	
	H ₂ O	1×10^{-3}	490 (500), 500 (550)	660 (800), 728 (475)	210 (0.25×10^4),
		1×10^{-4}	480 (420), 490 (500)	640 (700), 692 (355)	301 (0.57×10^4),
		1×10^{-5}	450 (355), 460 (420)	620 (600), 675 (297)	585 (0.16×10^4)
		1×10^{-6}	410 (280), 420 (350)	590 (500), 650 (205)	
		1×10^{-7}	375 (200), 385 (285)	580 (400), 635 (120)	



Şekil 4. 19. DMF ortamında ve 1×10^{-3} - 1×10^{-7} M aralığında fotoluminesans ölçümleri



Şekil 4. 20. DMSO ortamında ve 1×10^{-3} - 1×10^{-7} M aralığında fotoluminesans ölçümleri



Şekil 4. 21. H₂O ortamında ve 1x10⁻³-1x10⁻⁷ M aralığında fotoluminesans ölçümleri

[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinin fotoluminesans özellikleri incelendiğinde DMF ortamında birer adet uyarılma ve yayılma bandı verdiği görülmüştür. DMSO ve H₂O ortamlarında ise ikişer adet uyarılma ve emisyon bandı verdiği gözlenmiştir. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinde DMF ortamında 1x10⁻⁷ M konsantrasyonda uyarılma dalga boyu 395 nm iken 1x10⁻³ M'da 480(800) nm'ye, daha büyük dalga boyuna (Hipsokromik etki) kaymıştır. Aynı şekilde yayılma bandı da 1x10⁻⁷ M'da 695(410) nm iken 1x10⁻³ M'da 775(1000) nm'ye kaymıştır.

[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinde DMSO ortamında 1x10⁻⁷ M konsantrasyonda iki adet uyarılma dalga boyu 380-430 nm iken 1x10⁻³ M'da 460-500 nm'ye, daha büyük dalga boyuna (Hipsokromik etki) kayma gözlenmiştir. Aynı şekilde iki adet yayılma bandı da 1x10⁻⁷ M'da 580-620 nm iken 1x10⁻³ M'da 670-695 nm'ye kaymıştır.

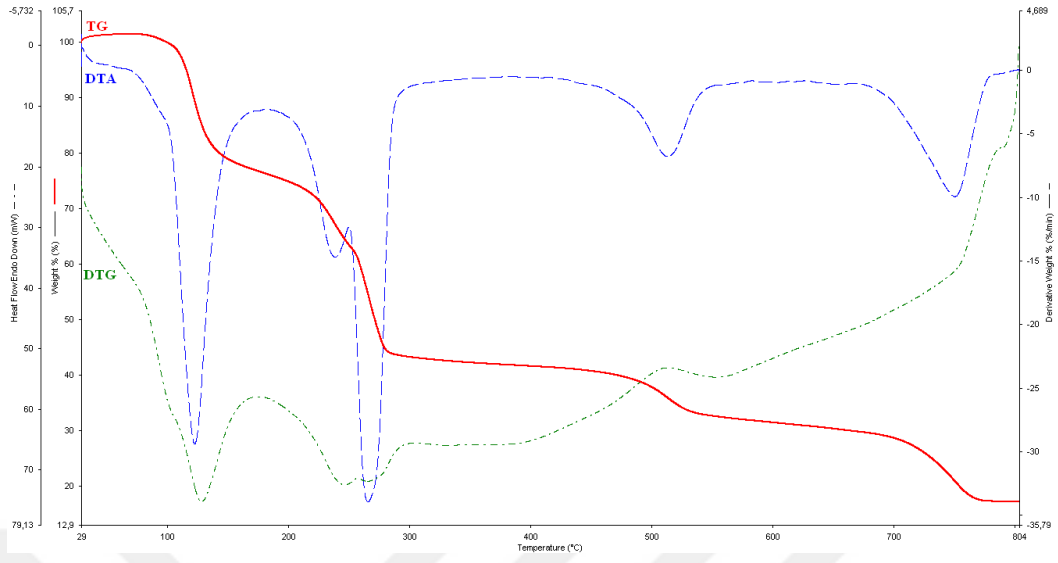
[Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinde H₂O ortamında 1x10⁻⁷ M konsantrasyonda iki adet uyarılma dalga boyu 375-385 nm iken 1x10⁻³ M'da 490-500 nm'ye, daha büyük dalga boyuna (Hipsokromik etki) kayma gözlenmiştir. Aynı şekilde iki adet yayılma bandı da 1x10⁻⁷ M'da 580-635 nm iken 1x10⁻³ M'da 660-728 nm'ye kaymıştır.

4.8. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O Kompleksinin Termal Özelliklerinin İncelenmesi

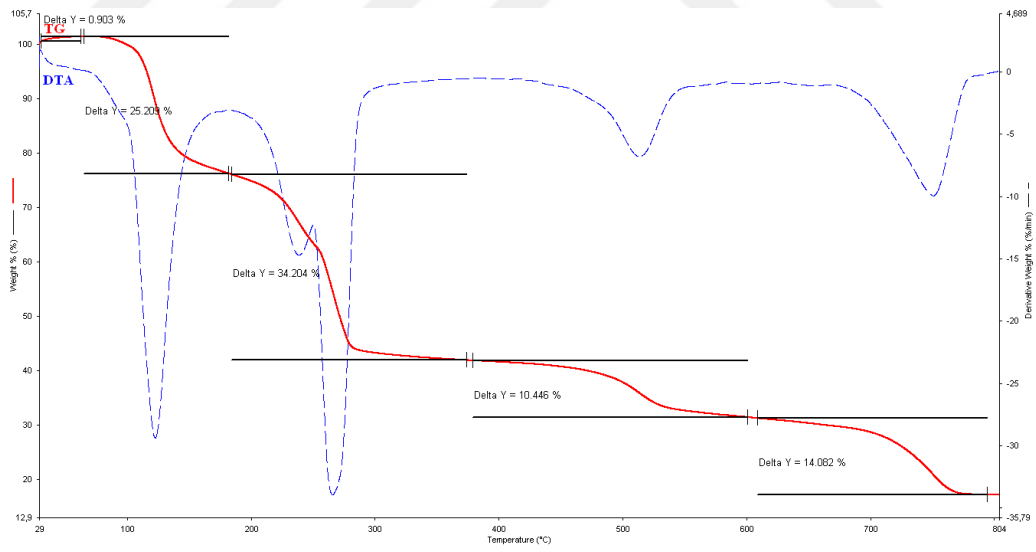
Malik asit kalsiyum kompleksinin termal özellikleri N₂ atmosferinde 30-800 °C sıcaklık aralığında incelenmiştir. Metal kompleks hidrate veya koordine H₂O molekülleri, içermektedir. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksine ait DTA ve TGA eğrileri Şekil 4. 22 ve Şekil 4. 23'de verilmiştir. Termogravimetrik analizde sıcaklığa bağlı olarak kütle kaybı incelenmiş olduğundan kompleks dört farklı basamakta kütle kaybına uğramıştır. Birinci basamakta, 50-150 °C sıcaklık aralığında, hidrate olmuş H₂O moleküllerinin uzaklaşması sonucu şiddetli endotermik bir kütle kaybı gözlenmektedir. İkinci basamakta; 200-300 °C sıcaklık aralığında, kalsiyum metaline koordine olmuş H₂O moleküllerinin uzaklaşmasını gösteren bir kütle kaybı mevcuttur. Üçüncü basamakta, 450-550 °C sıcaklık aralığında malik asit üzerinde bulunan hidroksil (-OH) ve karbonil (-C=O) süstitüe grupların uzaklaşmasına atfedilebilecek kütle kayıpları gözlenmiştir. Son basamakta ise 650-750 °C sıcaklık aralığında, komplekslerdeki ligandın organik kısmının bozulmasından ileri gelen kütle kaybı ve metal oksit oluşumunu gösteren kütle kayıpları gözlenmiştir. Komplekslerin DTA eğrilerine bakıldığında kütle kayıplarına karşılık şiddetli endotermik pikler gözlenmiştir. Kütle kayıpları yüzde (%) cinsinden Çizelge 4. 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. 4. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksine ait kütle kayıpları

Madde Adı	Kütle Kayıpları (%)°C			
	Hidrate H ₂ O	Koordine H ₂ O	-OH -C=O	Organik Kısım ve Metal Oksit
[Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄].2H ₂ O	(25.209) 117	(34.204) 260	(10.446) 510	(14.082) 760



Şekil 4. 22. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksine ait termal eğri



Şekil 4. 23. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksine ait termal eğri

4.9. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂H₂O Kompleksinin X-ışını Bulguları

Kırınım deneyi için 0.61 x 0.51 x 0.10 mm³ boyutlarında tek kristal seçilmiştir. X-ışını kırınım verileri, Mo-K α radyasyonu kullanılarak bir BrukerApexII CCD difraktometre üzerinde çevre sıcaklığında (296 K) toplanmıştır ($\gamma = 0.71073$ Å). Yapı doğrudan yöntemlerle çözüldü ve tüm yansımaları kullanarak F2 üzerinde aydınlatıldı [101]. Hidrojen olmayan tüm atomlar, anizotropik atomik yer değiştirme parametreleri kullanılarak aydınlatılmış ve bir sürme modeli kullanılarak hesaplanmış konumlara hidrojen atomları eklenmiştir. Oksijen atomuna (O1) bağlı hidrojen atomları, fark haritalarından yerleştirilmiş ve taşıyıcı atom üzerinde çalışan sıcaklık faktörleri ile yapı aydınlatılmıştır. Kristal verilerin detayları Çizelge 4. 5'de gösterilmiştir. Kompleks için bağ uzunlukları ve açıları Çizelge 4. 6'de sunulmuştur. Hidrojen bağ parametreleri Çizelge 4. 7'te listelenmiştir.

Çizelge 4. 5. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]₂H₂O kompleksinin kristalografik veriler

Kompleks	[Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄] ₂ H ₂ O
Basit Formül	C ₈ H ₂₂ CaO ₁₆
Formül Ağırlığı	414.33
Kristal sistem	<i>Orthorhombic</i>
Uzay Grup	<i>P2₁2₁2₁</i>
Birim Hücresi a (Å)	7.0310 (15)
b (Å)	14.969 (3)
c (Å)	15.646 (3)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Hücre Hacmi (Å³)	1646.7 (5)
Z	4
Abs. coeff. (mm⁻¹)	0.47
Refl. collected	7921
Ind. Refl. [R_{int}]	3178 [0.051]
R1, wR2 [I > 2σ (I)]	0.0352, 0.0775
R1, wR2 (all data)	0.0445, 0.0812
CCDC

Çizelge 4. 6. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin bağ uzunlukları ve açıları

Ca1—O12	2.389 (2)	C2—C3	1.522 (4)
Ca1—O17	2.405 (2)	C3—C4	1.502 (4)
Ca1—O11	2.406 (3)	O4—C4	1.288 (4)
Ca1—O1	2.411 (3)	C4—O5	1.215 (4)
Ca1—O6	2.413 (2)	C5—O7	1.225 (4)
Ca1—O8	2.431 (2)	C5—O6	1.258 (4)
Ca1—O3	2.516 (2)	C5—C6	1.529 (4)
Ca1—O13	2.590 (3)	C6—O8	1.417 (4)
C1—O2	1.240 (5)	C6—C7	1.513 (4)
C1—O1	1.248 (4)	C7—C8	1.510 (4)
C1—C2	1.534 (4)	C8—O9	1.205 (5)
C2—O3	1.408 (5)	C8—O10	1.303 (4)
O12—Ca1—O17	116.89 (9)	O8—Ca1—O13	88.52 (10)
O12—Ca1—O11	78.37 (9)	O3—Ca1—O13	144.28 (8)
O17—Ca1—O11	147.01 (10)	O2—C1—O1	124.8 (3)
O12—Ca1—O1	76.85 (8)	O2—C1—C2	117.2 (3)
O17—Ca1—O1	77.23 (9)	O1—C1—C2	117.9 (3)
O11—Ca1—O1	78.50 (10)	C1—O1—Ca1	124.54 (18)
O12—Ca1—O6	84.34 (7)	O3—C2—C3	110.1 (3)
O17—Ca1—O6	132.22 (10)	O3—C2—C1	110.5 (3)
O11—Ca1—O6	75.36 (10)	C3—C2—C1	107.9 (2)
O1—Ca1—O6	150.34 (9)	C2—O3—Ca1	119.70 (15)
O12—Ca1—O8	146.54 (9)	C4—C3—C2	111.8 (2)
O17—Ca1—O8	83.59 (8)	O5—C4—O4	123.9 (3)
O11—Ca1—O8	98.84 (10)	O5—C4—C3	122.1 (3)
O1—Ca1—O8	135.82 (8)	O4—C4—C3	113.9 (3)
O6—Ca1—O8	63.01 (7)	O7—C5—O6	124.9 (3)
O12—Ca1—O3	136.82 (10)	O7—C5—C6	119.2 (3)
O17—Ca1—O3	73.46 (9)	O6—C5—C6	115.8 (2)
O11—Ca1—O3	76.05 (9)	C5—O6—Ca1	127.31 (16)
O1—Ca1—O3	64.38 (7)	O8—C6—C7	111.6 (3)
O6—Ca1—O3	121.11 (7)	O8—C6—C5	107.5 (3)
O8—Ca1—O3	72.14 (9)	C7—C6—C5	112.3 (2)
O12—Ca1—O13	73.39 (9)	C8—C7—C6	112.9 (3)
O17—Ca1—O13	74.79 (8)	C6—O8—Ca1	124.36 (15)
O11—Ca1—O13	137.90 (8)	O9—C8—O10	123.7 (3)
O1—Ca1—O13	123.03 (8)	O9—C8—C7	124.1 (3)
O6—Ca1—O13	71.40 (9)	O10—C8—C7	112.2 (3)

Eşdeğer atomlar için simetri işlemleri; A-x+1,-y+2,-z

Çizelge 4. 7. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksi hidrojen bağı geometrisi (Å, °)

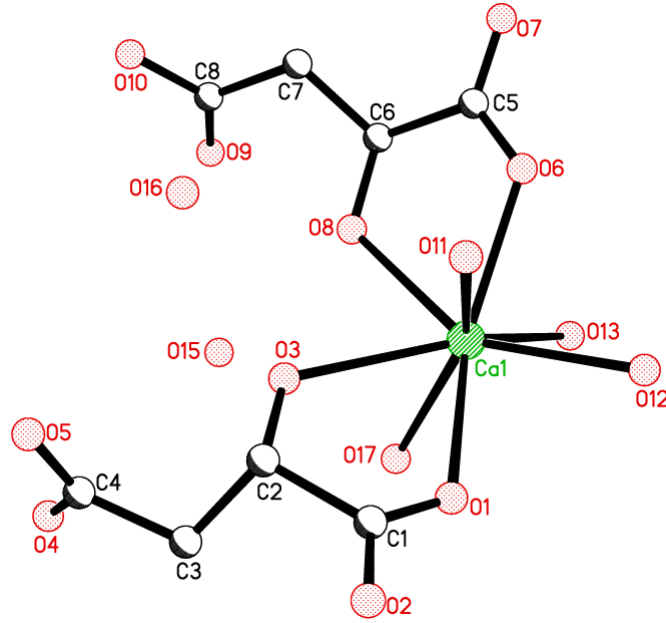
$D\text{---}H\cdots A$	$D\text{---}H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D\text{---}H\cdots A$
O4—H4···O6 ⁱ	1.02	1.50	2.521 (3)	175
O10—H10A···O1 ⁱ	0.95	1.65	2.595 (3)	169
O11—H11A···O7 ⁱⁱ	0.80	1.95	2.739 (3)	167
O11—H11B···O13 ⁱⁱⁱ	0.76	2.28	3.018 (5)	165
O12—H12A···O16 ^{iv}	0.77	2.17	2.914 (3)	162
O12—H12B···O15 ^{iv}	0.81	2.00	2.805 (4)	169
O13—H13A···O2 ^v	0.80	2.60	3.058 (3)	118
O13—H13A···O9 ^{vi}	0.80	2.41	3.120 (3)	148
O13—H13B···O5 ^{iv}	0.79	2.00	2.786 (3)	177
O15—H15A···O5 ^v	0.79	1.99	2.772 (5)	170
O16—H16A···O7 ⁱⁱ	0.83	2.16	2.919 (3)	153
O16—H16B···O9 ⁱⁱⁱ	0.75	2.06	2.802 (4)	175
O17—H17A···O2 ^{vii}	0.81	2.01	2.793 (3)	164
O17—H17B···O2 ^v	0.83	1.86	2.677 (4)	168
O3—H3···O16	0.75	1.97	2.720 (3)	175
O8—H8A···O9	0.75	2.62	3.081 (3)	121
O8—H8A···O15	0.75	2.03	2.732 (3)	157
O15—H15B···O17	0.82	2.29	2.967 (3)	141

Symmetry codes: (i) $-x+1/2, -y+2, z-1/2$; (ii) $x-1/2, -y+5/2, -z+2$; (iii) $x-1, y, z$; (iv) $-x+1/2, -y+2, z+1/2$; (v) $x+1, y, z$; (vi) $-x+3/2, -y+2, z+1/2$; (vii) $x+1/2, -y+3/2, -z+2$.

4.8.1. $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kompleksinin moleküler yapısı

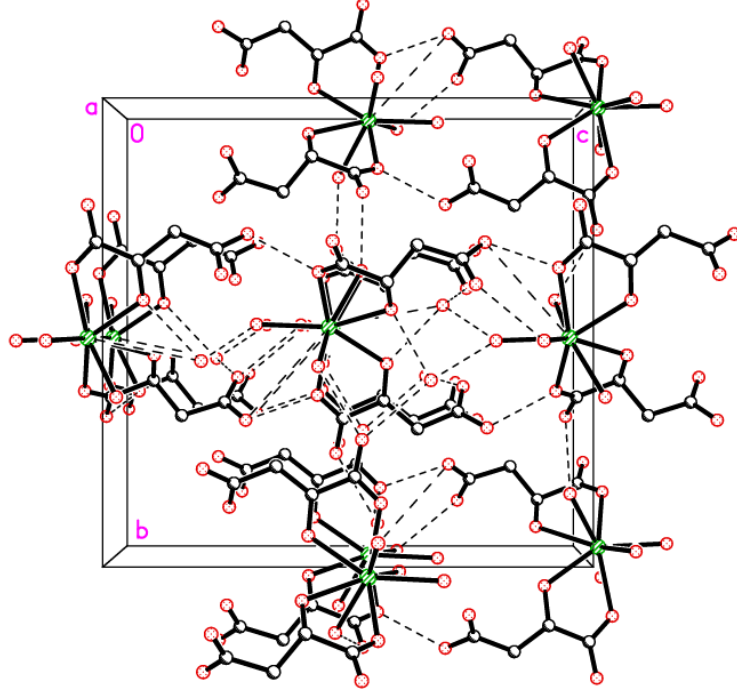
X-ışını için gerekli kalitesindeki kristaller, sumak ekstraktının su içinde yavaş buharlaştırılmasıyla elde edildi. Kompleks olarak kristalize $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{Ma})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bulundu. Malik asit kalsiyum kompleksinin yapısı ortorombik kristal sisteminde çözüldü, P212121 uzay grubu birim hücre parametreleri $a = 7.0310 (15)$, $b = 14.969 (3)$, $c = 15.646 (3)$ Å, $V = 1646.7 (5)$ Å³ ve $Z = 4$ (R son değeri 0.0352 olan). Molekül, kristalografik olarak simetri uygulanmadığını gösterir ve asimetrik birim iki malik asit anyonu (H_2Ma^-), bir Ca (II) iyonu ve altı su molekülü (bunlardan dördü Ca(II) merkezine koordine edilir) içerir. Atom numaralandırması ile kompleksin yapısının asimetrik birimi, Şekil 4. 24'de gösterilmektedir. Tüm bağ uzunlukları ve açıları, normal aralıklar içerisinde. Monomerik komplekste, Ca(II) iyonu, dört atomun iki malik asit anyonunun ve dört su molekülünün hidroksil ve karboksil oksijen atomlarından geldiği O atomları tarafından oktahedral yapı

kazanması sağlanır. Ca-O mesafeleri 2.405 (2) ve 2.590 (3) Å arasındadır. Kalsiyum kompleksinin yapısı, bir Ca (II) iyonunun bir hidroksil oksijen atomu ile bir D- ve bir L-maleat iyonuna bağlandığı kesikli moleküller içerir. Hidroksil oksijen ve koordine edilmemiş karboksil grubu protonlarını korurken, koordine edilmiş karboksil grubu, mono anyonik maleat (H₂Ma⁻) ile sonuçlanan deprotonlanmış ve bu anyonların ikisi Ca(II) iyonu ile dengelenmiştir. Monomerik kalsiyum kompleks molekülleri, bir 3D hidrojen bağı ağına neden olan birkaç hidrojen bağı ile bağlanır. Yapının paket diyagramı Şekil 4. 25 ve Şekil 4. 26'te verilmiştir.

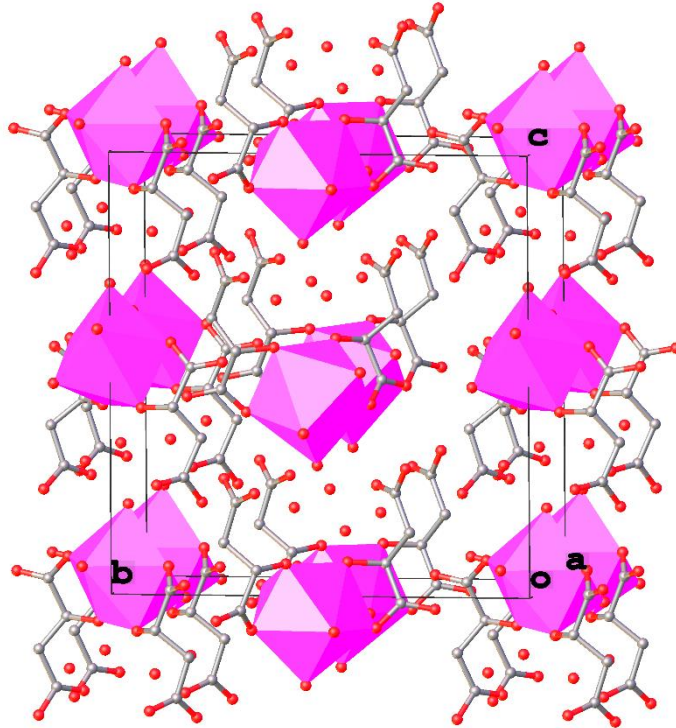


Şekil 4. 24. Atom numaralandırması ile [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄].2H₂O kompleksinin asimetric birimi (Hidrojen atomları açıklık için ihmal edilmiştir.)

Raja ve meslektaşları [101] tarafından L-kalsiyum malik asit kompleksinin kristal yapısı bildirilmiştir. L-maleatın bu sentetik kalsiyum kompleksinin, burada rapor edilen monomerik kompleksle aynı uzay grubunda kristalleştiği ancak farklı birim hücre parametreleriyle olduğu bulunmuştur. Rapor edilen yapıda, iki karboksilik asit ucu deprotonlanmıştır ve L-maleat anyonları, bir 3D koordinasyon bağı ağı ile sonuçlanan kalsiyum iyonları ile koordinasyon bağları ile bağlanmıştır. Bununla birlikte, burada bildirilen kompleks monomeriktir ve moleküller 3D hidrojen bağı ağı ile bağlanmıştır.



Şekil 4. 25. Hidrojen bağı etkileşimlerini gösteren $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksinin paket diyagramı (Hidrojen atomları daha net görünmesi için gösterilmemiştir.)



Şekil 4. 26. 3D hidrojen bağı ağında çoklu hidrojen koordinasyonu

4.10. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]-2H₂O Kompleksinin Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Çalışmada [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]-2H₂O kompleksinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için gram negatif ve pozitif bakteri suşları ile maya suşları kullanıldı. Kontrol gruplarına karşı etkisiz olduğu test edildi. Çalışmada standart olarak tetrasiklin (30 mg) kullanıldı. Standart antibiyotiğin etkisi en fazla maya suşlarında gözlemlendi. Yine aynı şekilde maya suşlarında 3 mg [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]-2H₂O kompleksinin etki ettiği belirlendi. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerin birbirine yakın sonuçlar verdiği belirlendi. Elde edilen bulgular içerisinde en fazla zonu *Candida albicans* klinik izolatına (28 mm) etki ettiği belirlendi. Aynı zamanda çalışmada kullanılan 1.5 mg konsantrasyon uygulamasında *C. albicans* izolatı haricinde diğer suşlarda hiç etki gözlemlenmedi (Çizelge 4. 8).

Çizelge 4. 8. [Ca(H₂Ma)₂(H₂O)₄]-2H₂O kompleksinin antimikrobiyal aktivitesi

Mikroorganizmalar	[Ca(H ₂ Ma) ₂ (H ₂ O) ₄]-2H ₂ O		Kontrol		Standart Tetrasiklin (30 mg)
	1.5 mg	3 mg	DMF	Boş Disk	
Gram pozitif bakteri					
<i>B.megaterium</i> DSM 32	0	17 mm	0	0	26 mm
<i>B.subtilis</i> IMG22	0	16 mm	0	0	25 mm
<i>S.aureus</i> 6538	0	18 mm	0	0	23 mm
Gram negatif bakteri					
<i>K.pneumoniae</i> FMC 3	0	18 mm	0	0	23 mm
<i>E.coli</i> DM	0	19 mm	0	0	21 mm
<i>P.aeruginosa</i> 9027	0	16 mm	0	0	25 mm
Mayalar					
<i>C.albicans</i> klinik izolat	28 mm	28 mm	0	0	35 mm
<i>Y.lipolytica</i>	0	14 mm	0	0	37 mm
<i>S.cerevisiae</i> Wet136	0	0	0	0	35 mm
<i>C. utilis</i> NRRL-Y-900	0	0	0	0	36 mm

Çalışmamızda ise malik asit kalsiyum kompleksinin 3 mg uygulamasında *S. aureus* suşuna karşı 18 mm zon ve *E. coli* bakteri suşuna karşı ise 19 mm zon elde edilmiştir. Ahmadian-Attari ve ark. [104] tarafından yapılan çalışmada, sumak bitkisinin farklı çözücüler ile ekstraksiyonu ile elde edilen özütlerin *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Çalışmada, metanol ile elde edilen özütlerin *S. aureus* suşuna karşı 19 mm zon ve *E. coli* bakteri suşuna karşı ise 8 mm zon elde edilmiştir.

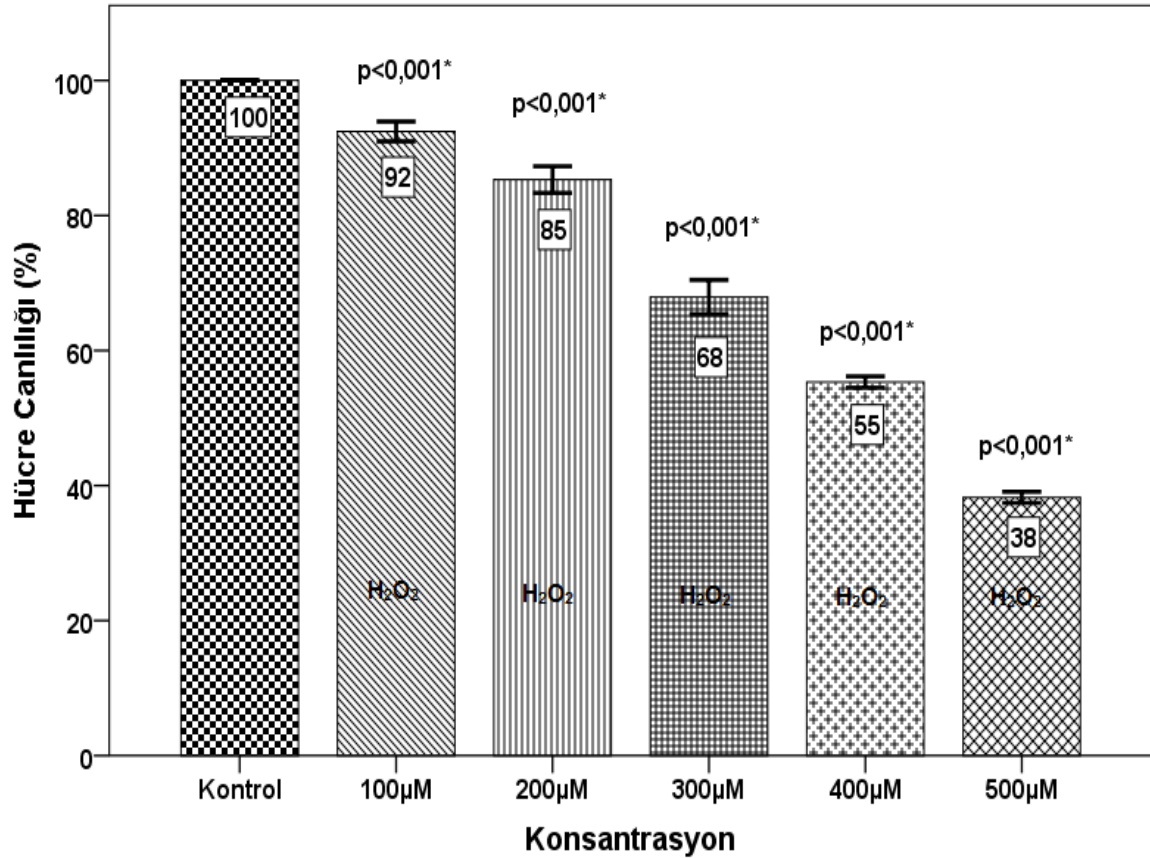
Çalışmamız ile uyumlu olup *S. aureus* suşunda elde edilen zonlar birbirine yakındır. Lakin *E. coli* suşuna çalışmamızda daha fazla zon gösterdiği belirlendi. Bunun en önemli sebebinin çalışmamızda elde ettiğimiz doğal ürün malik asit kalsiyum kompleksinin uygulanmış olmasıdır.

Shamsuzzoha ve ark. [105] tarafından yapılan çalışmada malik asit Cu(II) ve Cd(II) metal komplekslerinin antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Malik asit Cu(II) ve Cd(II) metal komplekslerinin 10 bakteri ve 5 fungus suşlarına karşı etkisi incelenmiştir. Kullanılan tüm suşlara karşı zon gösterdiği bildirilmiştir. *B. subtilis* suşuna karşı yapılan çalışmamızda 3 mg doz uygulamasında 16 mm zon belirlenirken 100 µg malik asit Cu(II) kompleksi uygulamasında 22 mm zon ve 100 µg malik asit Cd(II) kompleksi uygulamasında ise 30 mm zon belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda *Klebsiella* türü için 3 mg malik asit kalsiyum uygulamasında 18 mm zon belirlenirken 100 µg malik asit Cu(II) kompleksi uygulamasında 30 mm zon ve 100 µg malik asit Cd(II) kompleksi uygulamasında ise 20 mm zon bildirilmiştir [105].

4.11. ARPE-19 Hücre Kültürüne Uygulanan Konsantrasyonlara Ait Bulguları

Hidrojen peroksit ARPE-19 hücresinde konsantrasyon (100-500 μM) bağımlı olarak hücre ölümünü artırdı. Hücre canlılığını %30-50 arasında azaltan konsantrasyonun 400 μM H_2O_2 olduğu bulundu ve bundan sonraki deneylerde bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi.

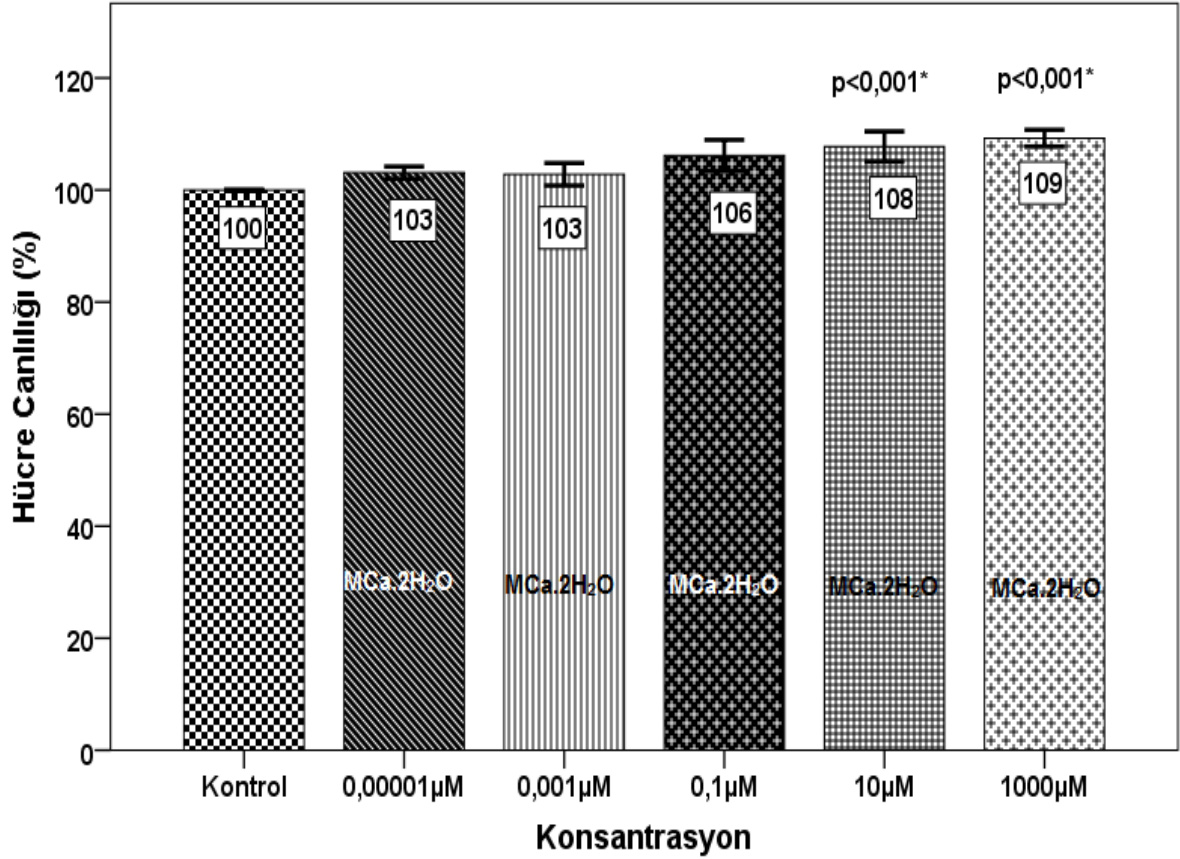
ARPE-19 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda (100-500 μM) uygulanması bulguları istatistiksel olarak incelendiğinde kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001^*$). Ayrıca 400 μM uygulamasında hücre canlılığı %55 olarak belirlenmiştir (Şekil 4. 27).



Şekil 4. 27. ARPE-19 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda (100-500 μM) uygulanması
*Kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; One way Anova;
Post-Hoc: Dunnett test; Tukey HSD test; Tamhane T2 test; $\alpha: 0.05$

Sonraki deneylerde ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi tek başına, malik asit kalsiyum hidrojen peroksitten dört saat önce ve malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksitle birlikte uygulamaları yapılmıştır.

ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi tek başına uygulandı ve 20 saat sonra deney sonuçları elde edildi. ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksinin tek başına uygulaması incelendiğinde, 10 μM ve 1000 μM konsantrasyonlarında kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulduk ($p < 0.001^*$). Ayrıca 10 μM uygulamasında hücre canlılığı oranı %108 ve 1000 μM uygulamasında hücre canlılık oranı %109 olarak belirlenmiştir (Şekil 4. 28).

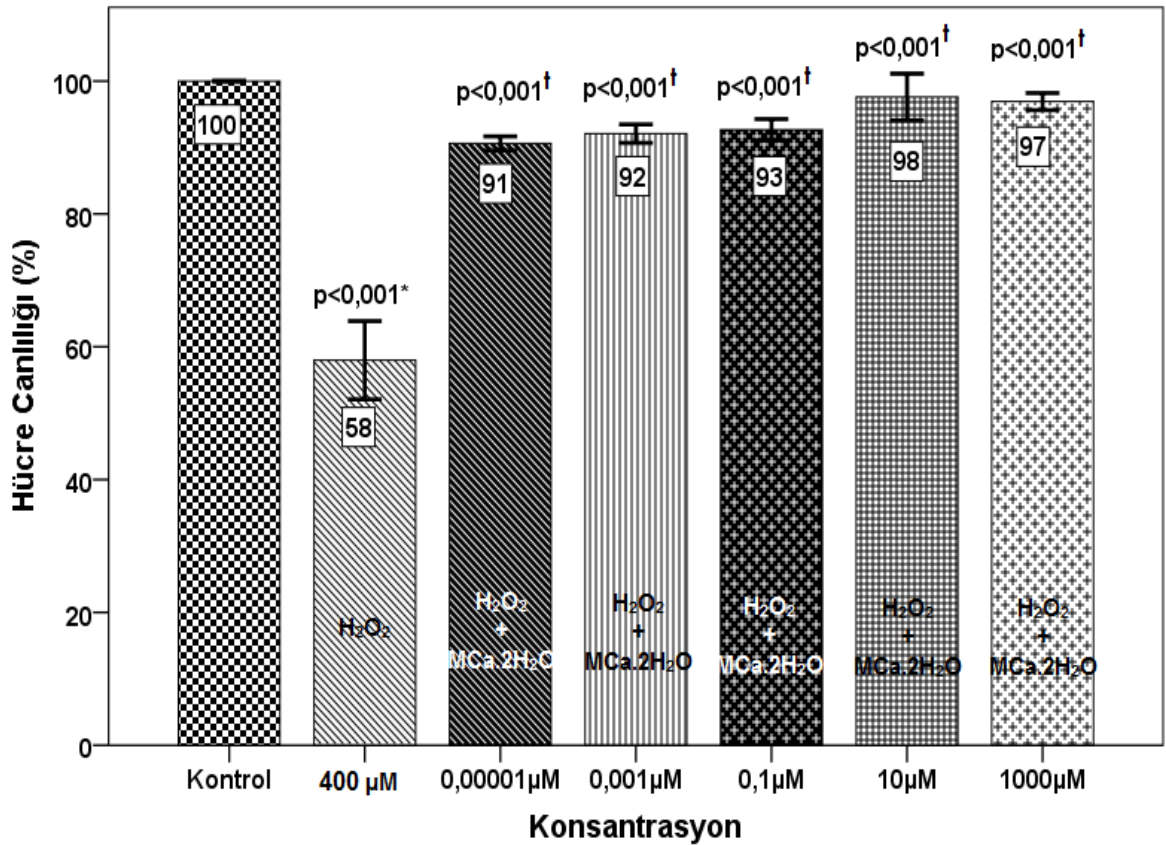


*MCA.2H₂O: Malik asit kalsiyum kompleksi

Şekil 4. 28. ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksinin tek başına uygulaması
*Kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; One way Anova;
Post-Hoc: Dunnett test; Tukey HSD test; Tamhane T2 test; $\alpha: 0.05$

ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksitten dört saat önce uygulandı daha sonra malik asit kalsiyum kompleksi ve hidrojen peroksitle beraber uygulayarak ve 20 saat sonra deney sonuçları elde edildi. ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksitten dört saat önce uygulaması bulguları istatistiksel olarak incelendi.

Hidrojen peroksitin kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($57,97 \pm 16,67$). H_2O_2 grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirledik ($p < 0,001^{\dagger}$) (Şekil 4. 29). Hücre canlılığı yüzdesi en fazla $10 \mu M$ uygulamada %98 olarak belirlendi.

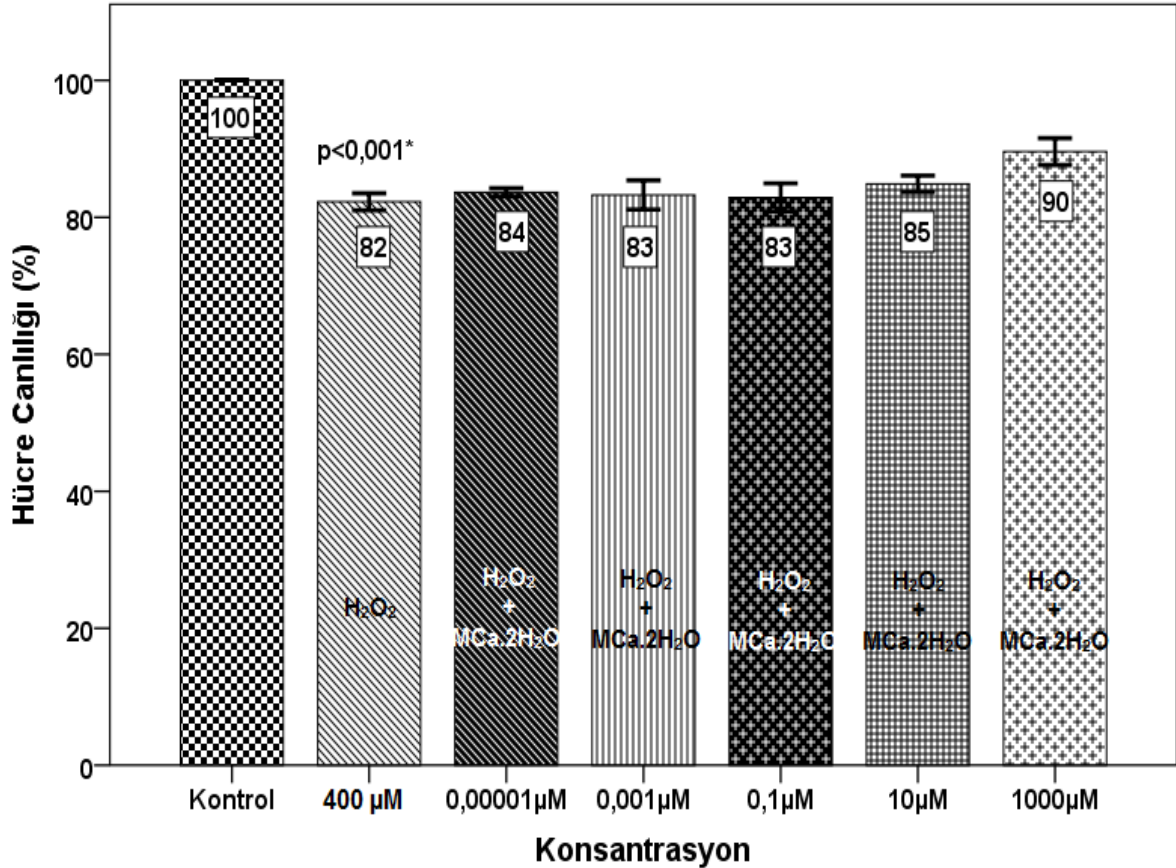


*MCa.2H₂O: Malik asit kalsiyum kompleksi

Şekil 4. 29. ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksitten dört saat önce uygulaması *Kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; H_2O_2 grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; One way Anova; Post-Hoc: Dunnett test; Tukey HSD test; Tamhane T2 test; $\alpha:0.05$

ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksit ile birlikte uygulandı ve 20 saat sonra deney sonuçları elde edildi.

Bulgularımıza göre malik asit kalsiyumun birlikte uygulaması H_2O_2 'in oluşturduğu hücre hasarına karşı istatistiksel olarak koruyucu etki göstermedi. Hücre canlılığı yüzdesi 89.60 ± 5.54 olarak belirlendi. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4. 30).



*MCa.2H₂O: Malik asit kalsiyum kompleksi

Şekil 4. 30. ARPE-19 hücrelerinde malik asit kalsiyum kompleksi hidrojen peroksit ile birlikte uygulaması *Kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; One way Anova; Post-Hoc: Dunnett test; Tukey HSD test; Tamhane T2 test; α : 0.05

Li ve arkadaşları [91] tarafından ARPE-19 hücrelerinin H_2O_2 uygulaması ile hücre canlılığı ve reaktif oksijen değişimi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında 100-700 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 konsantrasyonları kullanılmıştır. H_2O_2 kullanılarak yaklaşık %70-80 canlılık 500 $\mu\text{mol/L}$ gerçekleştirildiğini bildirmiştir. Ayaz ve Dinç [106] tarafından ARPE-19 hücrelerinde 200, 600 ve 800 μM konsantrasyonlarını H_2O_2 uygulamasını 18 saat süre ile

gözlemleyerek hücre canlılığı ve reaktif oksijen değişimi araştırılmıştır. Dinç ve arkadaşları [98] tarafından ARPE-19 hücrelerinde 100-1000 μM konsantrasyonlarını H_2O_2 uygulamasını 16 saat süre uygulamışlardır. Yapılan çalışmada 600 μM H_2O_2 uygulamasında %51 oranında hücre ölümü gözlemlenmiştir. H_2O_2 , retina pigment epitel hücrelerinde iyi uyarlanmış bir oksidatif stres modelidir [107]. ARPE-19 hücrelerinde eksojen kökenli hidrojen peroksit ile farklı konsantrasyonlarda uygulayarak oksidatif stres derecesi belirlendi. Konsantrasyon bağımlı olarak hücre ölümünü artırdığını gözlemlendi. Hücre canlılığını %30-50 arasında azalttığını yapılan analizlere göre bulundu.

Oksidatif stres birçok hastalığın başlaması ve ilerlemesiyle ilişkili hücre hasarında önemli rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türleri, yaşlanma, hipertansiyon, ateroskleroz, kanser, iskemi, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi patolojik süreçlerde önemli bir rol oynar[108, 109].

Reaktif oksijen metabolitleri, esas olarak hidrojen peroksit üretilmesini ve H_2O_2 'nin hedef hücre içindeki hidroksil radikaline indirgenir. Böylece endotel hücrelerde toksik radikal oluşumuna yol açan biyokimyasal olaylara katılır. Nötrofil ürünlerine ek olarak, tümör nekroz faktörü-alfa ve interlökin-1 dahil olmak üzere enflamatuvar bölgelerdeki endotel hücrelerin zarar görmesine neden olduğu belirtilmektedir [110]. H_2O_2 , NF- κB inflamatuvar sinyal yolunu tetikleyerek endotel hücre hasarına neden olur [111]. Hidrojen peroksit zarlar arasında dağılsa da, eksojen olarak eklenen hidrojen peroksidin, endojen olarak üretilen hidrojen peroksitten daha fazla bir sinyal yanıtı vermede daha az etkili olduğu gösterilmiştir [112]. Belirli bir biyolojik yanıtı başlatmak için gerekli olan eksojen hidrojen peroksit konsantrasyonunda hücreler arasında önemli değişiklikler vardır. Örneğin, memeli hücrelerinin apoptotik hücre ölümüne neden olmak için gerekli olan hidrojen peroksit konsantrasyonu, hücre tipine bağlı olarak 20 kat kadar değişebilir [113, 114].

Antioksidanlar ile düşük seviyelerde hidrojen peroksite tepki olarak indüklenebilir, Reaktif oksijen türlerindeki seviyelerini düşürürler ve dolayısıyla hücreyi DNA hasarından korurlar [115]. Ticari olarak kullanılan nar sularında yapılan bir çalışmada majör asitler olarak sitrik asit ve malik asitlerin antioksidan kapasitesi ve fenolik içerikleri yönünden incelenmiştir. Çalışmada antioksidan aktivite değerlerinin malik asit içeriği ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [116].

Yin ve arkadaşları [117] tarafından suda çözünebilir stiren malik asit kopolimeri kapsülleyici içeren misel hazırlamışlardır. Çalışmada farelerde iltihaplı kolit modellerinde etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak tedaviden sonra kolit semptomlarında iyileşmeler olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda tedavi edilen farelerde monosit kemotaktik protein- 1, tümör nekrosis faktör-a ve interlökin-6 dahil olmak üzere inflamatuvar sitokinlerin regülasyonunu önemli ölçüde bastırmıştır. Gastrointestinal hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, sumak ekşisinden doğal olarak elde edilen malik asit kalsiyum kompleksinin yapısal karakterizasyonunu yapıldı ve malik asit kalsiyum kompleksinin retinal pigment epitelyum hücrelerinde oksidatif strese bağlı retinal hasar üzerindeki koruyucu etkilerini araştırıldı. Elde ettiğimiz bulgulara göre malik asit uygulamasının H₂O₂'in oluşturduğu hasara karşı koruyucu etkisi bulunduğunu belirlendi.

5. SONUÇ

Çalışma sonucunda, sumak ekşisinden doğal olarak elde edilen malik asit kalsiyum kompleksinin yapısal karakterizasyonu ve retina hücresinde hidrojen peroksit ile oluşturulan hücre hasarında koruyucu rolünün araştırılması yapılmıştır. Çalışmada elde edilen bulgular dahilinde $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksinin sentez ve karakterizasyonu ilk defa yapılmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan malik asit doğal olarak sentezlenmiştir.

Elektrokimyasal özellikler incelendiğinde iki farklı çözücü ve iki farklı konsantrasyonun malik asitin kalsiyum kompleksi üzerinde farklı etkileri olduğu belirlenmiştir. Özellikle düşük konsantrasyonlarda çözücü cinsi farketmeksizin dönüşsüz voltametri özelliği göstermiştir. Sadece DMSO çözücüsü ile yapılan yüksek konsantrasyonlu çalışmada dönüşümlü voltametri özelliği göstermiştir. Buda çözücünden kaynaklı bir etkinin olduğunu gösterir. Fotoluminesans çalışmalarında değişik çözücü sistemleri ve farklı konsantrasyonların malik asitin kalsiyum kompleksi üzerinde yaptığı etkiyi incelemek adına önemlidir. Doğal formda ve iki adet beşil şelat halkasına sahip kompleksin güçlü emisyon değerleri verdiği görülmektedir. Çözücü sistemlerinin bu etkileri daha yüksek dalga boylarına kaydırması belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız $[Ca(H_2Ma)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ kompleksi yeni sentezlenmiştir bu nedenle daha önce hiçbir çalışmada kullanılmamıştır. Kullandığımız bileşiğin ARPE-19 hücrelerini nasıl etkilediği hakkında yolaklar bilinmemekle birlikte malik asit kompleksleri üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır.

- Sumak ekşisinden doğal olarak elde edilen malik asit kalsiyum kompleksinin yapısal karakterizasyonu yapılmıştır.
- Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda etkili olabileceği konsantrasyon belirlenmiştir.
- Oksidatif stresin inhibisyonu, retina dejenerasyonunu tedavi etmek için etkili bir yaklaşımı temsil eder. Doğal ürünlerden güçlü antioksidanların belirlenerek tanımlanmasının sağlanması yarar sağlayacaktır.
- Yaşa bağlı makula dejenerasyonunu önlemede yeni farmasotik ilaçların geliştirilmesine kaynak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., HPLC-DAD-ESI-MS/MS Screening of Bioactive Components From *Rhus coriaria* L. (Sumac) Fruits. *Food Chemistry*, 166, 179–191 (2015).
- [2] Gielen, M., Tiekink, E. R. T., Metal-Based Diagnostic Agents. *John Wiley Sons Ltd* (2005).
- [3] Jones, C., Thornback, J., Medicinal Applications of Coordination Chemistry. *Platinum Metals Review* (Vol. 52) (2007).
- [4] Menelaou, M., Konstantopai, A., Lalioti, N., Raptopoulou, C. P., Psycharis, V., Terzis, A., Salifoglou, A., Hydrothermal Synthesis and Characterization of 2D M(II)-quininate (M = Co, Zn) Metal-Organic Lattice Assemblies: Solid-State Solution Structure Correlation in M(I)-Hydroxycarboxylate Systems. *Inorganic Chemistry*, 49 (24), 11449–11462 (2010).
- [5] Matzapetakis, M., Raptopoulou, C. P., Tsohos, a., Papaefthymiou, V., Moon, N., Salifoglou, A., Synthesis, Spectroscopic and Structural Characterization of the First Mononuclear, Water Soluble Iron–Citrate Complex, $(\text{NH}_4)_5 \text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Journal of the American Chemical Society*, 120 (10), 13266–13267 (1998).
- [6] Carballo, R., Covelo, B., García-Martínez, E., Vázquez-López, E. M., Benzilate of Diaquabis (Ethylenediamine) Copper (II) Dihydrate and Benzilate Of Aquabenzylatobis (Ethylenediamine) Copper (II). *Applied Organometallic Chemistry*, 19 (3), 394–395 (2005).
- [7] Carballo, R., Castineiras, A., Balboa, S., Covelo, B., Niclos, J., Solid State Coordination Chemistry of Copper (II)/ α -hydroxycarboxylato/2, 2'-bipyridine systems. *Polyhedron*, 21 (27), 2811-2818 (2002).
- [8] Bott, R. C., Sagatys, D. S., Smith, G., Byriel, K. A., Kennard, C. H. L., Univalent Metal Ion -Hydroxy and Interactions: Part 9. Preparation and Crystal Structures of Lithium Hydrogen (+)-Tartrate Monohydrate, Potassium (+)-Tartrate Hemihydrate and Thallium(I) (+)-Tartrate. *Polyhedron*, 13 (22), 3135–3141 (1994).
- [9] Carballo, R., Covelo, B., García-Martínez, E., Vázquez-López, E. M., Castiñeiras, A., Niclós, J., The Interaction of 2-Methylactic Acid (H_2ml) with Divalent Metal Cations. The Structures of $[\text{M}(\text{HmL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, M = Mn(II), Zn(II). *Polyhedron*, 22 (8), 1051–1057 (2003).
- [10] Prout, K., Mtetwa, V. S. B., Rossotti, F. J. C., Structure and Stability of Carboxylate Complexes. XIX. The Structures of diamminebis(glycolato)copper(II), tetraamminebis(ethoxyacetato)copper(II), bis(glycolato)bis(pyridine)copper(II) and bis(ethoxyacetato)bis(pyridine)copper(II). *Acta Crystallographica Section B*, 49 (1), 73–79 (1993).

- [11] Hao, H. Q., Liu, W.-T., Tan, W., Lin, Z. J., Tong, M.-L., Spontaneous Resolution of Chiral Metal Mandelates by Stereochemical Control. *CrystEngComm*, 11 (6), 967 (2009).
- [12] Liu, J.-Q., Wang, Y.-Y., Ma, L.-F., Zhang, W.-H., Zeng, X.-R., Shi, Q.-Z., Peng, S.-M., Solvothermal Syntheses and Structural Characterization of a Series Metal-Hydroxycarboxylate Coordination Polymers. *Inorganica Chimica Acta*, 361, 2327–2334 (2008).
- [13] Carballo, R., Covelo, B., Fernández-Hermida, N., Lago, A. B., Vázquez-López, E. M., Structural Evidence For Metalloaromaticity in a New Molecular Complex with The Divergent Ligand 4, 4'-dipyridyldisulfide. *Journal of Molecular Structure*, 936 (1), 87-91 (2009).
- [14] Manna, S.C., Zangrando, E., Ribas, J., Chaudhuri, N.R., Self-Assembled 1D Water Cluster in a Supramolecular Architecture of Co II(tartrate) (phenanthroline/bipyridine): *An Assessment of Magnetic Property*. *European Journal of Inorganic Chemistry*, (29), 4592–4595 (2007).
- [15] Lu, J., Yu, J. H., Chen, X. Y., Cheng, P., Zhang, X., Xu, J. Q., Novel Self-Assembled Chain of Water Molecules in a Metal-Organic Framework Structure of Co(II) With Tartrate Acid. *Inorganic Chemistry*, 44 (17), 5978–5980 (2005).
- [16] Bermejo, E., Carballo, R., Castiñeiras, A., Lago, A. B., Coordination of α -Hydroxycarboxylic Acids with First-row Transition Ions. *Coordination Chemistry Reviews*, 257 (19–20), 2639–2651 (2013).
- [17] Gahan, L. R., Harrowfield, J. M., Herlt, A. J., Lindoy, L. F., Whimp, P. O., Sargeson, A. M., Metal Ion Promoted Hydration of Pendant Alkenes and its Possible Relationship to Aconitase. *Journal of the American Chemical Society*, 107 (22), 6231–6242 (1985).
- [18] Mentasti, E., Equilibria and Kinetics of The Complex Formation Between Iron (III) and A Hydroxycarboxylic Acids. *Inorganic Chemistry*, 18 (6), 1512–1515 (1979).
- [19] Beghidja, A., Rabu, P., Rogez, G., Welter, R., Synthesis, Structure and Magnetic Properties of Chiral and Nonchiral Transition-Metal Malates. *Chemistry a European Journal*, 12 (29), 7627–7638 (2006).
- [20] Maryadele, J. O., Ann, S., Patricia, E. H., In The Merck Index, Merck and Company Incorporated, Whitehouse Station, NJ, USA (2001).
- [21] Giorno, L., Drioli, E., Carvoli, G., Cassano, A., Donato, L., Study of an Enzyme Membrane Reactor with Immobilized Fumarase for Production of L-malic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 72 (1), 77-84 (2001).
- [22] Bélafi-Bakó, K., Nemestóthy, N., Gubicza, L.. A Study on Applications of Membrane Techniques in Bioconversion of Fumaric Acid to L-Malic Acid. *Desalination*, 162, 301-306 (2004).

- [23] Chi, Z., Wang, Z. P., Wang, G. Y., Khan, I., Chi, Z. M., Microbial Biosynthesis and Secretion of L-Malic Acid and its Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (1), 99-107 (2016).
- [24] Dakin, H. D., The Formation of L-Malic Acid as a Product of Alcoholic Fermentation by Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 61 (1), 139-145 (1924).
- [25] Chibata, I., Tosa, T., Yamamoto, K., Takata, I., [41] Production of L-Malic Acid by Immobilized Microbial Cells. *In Methods in Enzymology* 136, 455-463 (1987).
- [26] Peleg, Y., Rokem, J. S., Goldberg, I., Pines, O., Inducible Overexpression of the FUM1 Gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Localization of Fumarase and Efficient Fumaric Acid Bioconversion to L-malic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (9), 2777-2783 (1990).
- [27] Bressler, E., Pines, O., Goldberg, I., and Braun, S., Conversion of Fumaric Acid to L-Malic Acid by Sol-Gel Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a Supported Liquid Membrane Bioreactor, *Biotechnology Progress*, 18, 445-450 (2002).
- [28] Knuf, C., Malic Acid Production by *Aspergillus oryzae*. *Chalmers University of Technology*, ISBN 978-91-7385-984-4 (2014).
- [29] Smith, W. P., Comparative Effectiveness of Alpha-Hydroxy Acids on Skin Properties. *International Journal of Cosmetic Science*, 18 (2), 75–83 (1996).
- [30] Dorn, H. C., High-Performance Liquid Chromatography Nuclear Magnetic Resonance. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–15 (2000).
- [31] Tracey, A. S., Applications of 51V NMR Spectroscopy to Studies of the Complexation of Vanadium(V) by α -Hydroxycarboxylic Acids. *Coordination Chemistry Reviews*, 237 (1–2), 113–121 (2003).
- [32] Turner II, B., Clark, W., Kates, R. W., Richards, J., Methews, J., Meyer, W., *Book Reviews*, 18 (3), 401 (1993).
- [33] Makadia, H. K., Siegel, S. J., Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3 (3), 1377–1397 (2011).
- [34] Goldberg, I., Rokem, J. S., Pines, O., Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81 (10), 1601-1611 (2006).
- [35] Meek, J. S., The Determination of a Mechanism of Isomerization of Maleic Acid to Fumaric Acid. *Journal of Chemical Education*, 52 (8), 541 (1975).
- [36] Patil, B. B., Dowd, T. C., Physiological Functions of The Eye. *Current Anaesthesia and Critical Care*, 11 (6), 293-298 (2000).
- [37] Presland, A., Price, J., Ocular Anatomy and Physiology Relevant to Anaesthesia. *Anaesthesia Intensive Care Medicine*, 15 (1), 20-25 (2014).
- [38] Sandford-Smith J., *Eye Diseases in Hot Climates* Chapter; Diseases of the Retina, *ELBS Edition of Second Edition*, 144–154 (1990).

- [39] Chianga B., Jungc J., Prausnitz M., The Suprachoroidal Space as a Route of Administration to the Posterior Segment of the Eye. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2018).
- [40] Chia, E. M., Wang, J. J., Rochtchina, E., Smith, W., Cumming, R. R., Mitchell, P., Impact of Bilateral Visual Impairment on Health-Related Quality of Life: The Blue Mountains Eye Study. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 45 (1), 71-76 (2004).
- [41] Rein, D. B., Zhang, P., Wirth, K. E., Lee, P. P., Hoerger, T. J., McCall, N., Saaddine, J.. The Economic Burden of Major Adult Visual Disorders in the United States. *Archives of Ophthalmology*, 124 (12), 1754-1760 (2006).
- [42] Kempen, G. I., Ballemans, J., Ranchor, A. V., van Rens, G. H., Zijlstra, G. R., The Impact of Low Vision on Activities of Daily Living, Symptoms of Depression, Feelings of Anxiety and Social Support in Community-Living Older Adults Seeking Vision Rehabilitation Services. *Quality of Life Research*, 21 (8), 1405-1411 (2012).
- [43] Klein, R., Klein, B. E., The Prevalence of Age-Related Eye Diseases and Visual Impairment in Aging: Current Estimates. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 54 (14), ORSF5-ORSF13 (2013).
- [44] Bhutto, I., Lutty, G., Understanding Age-Related Macular Degeneration (AMD): Relationships Between the Photoreceptor/Retinal Pigment Epithelium/Bruch's Membrane/Choriocapillaris Complex. *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (4), 295-317 (2012).
- [45] Cholkar, K., Dasari, S. R., Pal, D., Mitra, A. K., Eye: Anatomy, Physiology and Barriers to Drug Delivery. In *Ocular Transporters and Receptors* pp. 1-36 (2013).
- [47] Handa, J. T., Cano, M., Wang, L., Datta, S., Liu, T., Lipids, Oxidized Lipids, Oxidation-Specific Epitopes, and Age-related Macular Degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862 (4), 430-440 (2017).
- [48] Gelfand, B. D., Ambati, J., A Revised Hemodynamic Theory of Age-Related Macular Degeneration. *Trends in Molecular Medicine*, 22 (8), 656-670 (2016).
- [49] Strauss, O., The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*, 85 (3), 845-881 (2005).
- [50] Eisenbarth, W., MacKeben, M., Poggel, D. A., Strasburger, H., Characteristics Of Dynamic Processing in The Visual Field of Patients with Age-Related Maculopathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246 (1), 27-37 (2008).
- [51] Jang, H., Srichayet, P., Park, W. J., Heo, H. J., Kim, D. O., Tongchitpakdee, S., Lee, C. Y., *Phyllanthus emblica* L.(Indian Gooseberry) Extracts Protect Against Retinal Degeneration in A Mouse Model of Amyloid Beta-Induced Alzheimer's Disease. *Journal of Functional Foods*, 37, 330-338 (2017).

- [52] Wang, Y., Kim, H. J., Sparrow, J. R., Quercetin and Cyanidin-3-Glucoside Protect Against Photooxidation and Photodegradation of A2E in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Experimental Eye Research*, 160, 45–55 (2017).
- [53] Kalt, W., Hanneken, A., Milbury, P., Tremblay, F., Recent Research on Polyphenolics in Vision and Eye Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4001–4007 (2010).
- [54] Chopdar, A., Chakravarthy, U., Verma, D., Age Related Macular Degeneration. *BMJ: British Medical Journal*, 326 (7387), 485 (2003).
- [55] Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C. Y., Wong, T. Y., Global Prevalence of Age-Related Macular Degeneration and Disease Burden Projection for 2020 and 2040: a Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet Global Health*, 2 (2), e106-e116 (2014).
- [56] Cascella, R., Strafella, C., Caputo, V., Errichiello, V., Zampatti, S., Milano, F., Cusumano, A., Towards the Application of Precision Medicine in Age-Related Macular Degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 63, 132-146 (2017).
- [57] Beatty, S., Koh, H. H., Phil, M., Henson, D., Boulton, M., The Role of Oxidative Stress in The Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 45(2), 115-134 (2000).
- [58] Kim, Y. W., Byzova, T. V., Oxidative Stress in Angiogenesis and Vascular Disease. *Blood*, 123 (5), 625-631 (2014).
- [59] Klein, R., Myers, C. E., Cruickshanks, K. J., Gangnon, R. E., Danforth, L. G., Sivakumaran, T. A., Klein, B. E., Markers of Inflammation, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction and The 20-Year Cumulative Incidence of Early Age-Related Macular Degeneration: The Beaver Dam Eye Study. *JAMA Ophthalmology*, 132 (4), 446-455 (2014).
- [60] Gorin, M. B., Genetic Insights into Age-Related Macular Degeneration: Controversies Addressing Risk, Causality and Therapeutics. *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (4), 467-486 (2012).
- [61] Mettu, P. S., Wielgus, A. R., Ong, S. S., Cousins, S. W., Retinal Pigment Epithelium Response to Oxidant Injury in The Pathogenesis of Early Age-Related Macular Degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (4), 376-398 (2012).
- [62] Van Lookeren Campagne, M., LeCouter, J., Yaspan, B. L., Ye, W., Mechanisms of Age-Related Macular Degeneration and Therapeutic Opportunities. *The Journal of Pathology*, 232 (2), 151-164 (2014).
- [63] Blasiak, J., Glowacki, S., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., Mitochondrial and Nuclear DNA Damage and Repair in Age-Related Macular Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (2), 2996-3010 (2013).

- [64] Skytt, D. M., Toft-Kehler, A. K., Brændstrup, C. T., Cejvanovic, S., Gurubaran, I. S., Bergersen, L. H., Kolko, M., Glia-Neuron Interactions in The Retina can be Studied in Cocultures of Muller Cells and Retinal Ganglion Cells. *BioMed Research International*, 1087647, 10 (2016).
- [65] Lefevere, E., Toft-Kehler, A. K., Vohra, R., Kolko, M., Moons, L., Van Hove, I., Mitochondrial Dysfunction Underlying Outer Retinal Diseases. *Mitochondrion* 36, 66-76 (2017).
- [66] Feher, J., Kovacs, I., Artico, M., Cavallotti, C., Papale, A., Gabrieli, C. B., Mitochondrial Alterations of Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration. *Neurobiology of Aging*, 27 (7), 983-993 (2006).
- [67] Lakshmipriya, M., Vizhi, R. E., Babu, D. R., Growth and Characterization of Maleic Acid Single Crystal. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 126 (23), 4259-4262 (2015).
- [68] Kaemmerer, H., Lorenz, H., Black, S. N., Seidel-Morgenstern, A., Study of System Thermodynamics and The Feasibility of Chiral Resolution of The Polymorphic System of Malic Acid Enantiomers And its Partial Solid Solutions. *Crystal Growth and Design*, 9 (4), 1851-1862 (2009).
- [69] Camargo, E. R., Kakihana, M., Chemical Synthesis of Lithium Niobate Powders (Linbo₃) Prepared From Water-Soluble DL-Malic Acid Complexes. *Chemistry of materials*, 13 (5), 1905-1909 (2001).
- [70] Wu, C., Chen, H. C., Luo, Y. S., Chiang, S. Y., Wu, K. Y., Pharmacokinetics and Bioavailability of Oral Single-Dose Maleic Acid in Biofluids of Sprague-Dawley rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 31 (6), 451-457 (2016).
- [71] Vargas, E., Ruiz, M. A., Ferrero, F. J., Campuzano, S., Montiel, V. R. V., Reviejo, A. J., Pingarrón, J. M., Automatic Bionalyzer Using an Integrated Amperometric Biosensor for the Determination of L-Malic Acid in Wines. *Talanta*, 158, 6-13 (2016).
- [72] Wang, J., Ni, C., Zhang, Y., Zhang, M., Li, W., Yao, B., Zhang, L., Preparation and pH Controlled Release of Polyelectrolyte Complex of Poly (L-malic acid-co-D, L-lactic acid) and Chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115, 275-279 (2014).
- [73] Wu, H., West, A. R., Vickers, M., Apperley, D. C., Jones, A. G., Synthesis, Crystallization and Characterization of Diastereomeric Salts Formed by Ephedrine and Malic Acid in Water. *Chemical Engineering Science*, 77, 47-56 (2012).
- [74] Zhang, X. Y., Févotte, G., Zhong, L., Qian, G., Zhou, X. G., Yuan, W. K., Crystallization of Zinc Lactate in Presence of Malic Acid. *Journal of Crystal Growth*, 312 (19), 2747-2755 (2010).

- [75] Ma, C. L., Zhang, S. L., Zhang, R. F., Chiral Self-Assembly of Triorganotin Complexes: Syntheses, Characterization, Crystal Structures and Antitumor Activity of Organotin (IV) Complexes Containing (R)-(+)-Methylsuccinic Acid,(S)-(+)-Methylglutaric Acid and L-(-)-Malic Acid Ligands. *Polyhedron*, 31 (1), 478-485 (2012).
- [76] Gudavarthy, R. V., Burla, N., Kulp, E. A., Limmer, S. J., Sinn, E., Switzer, J. A., Epitaxial Electrodeposition of Chiral CuO Films From Copper (II) Complexes of Malic Acid on Cu (111) and Cu (110) Single Crystals. *Journal of Materials Chemistry*, 21 (17), 6209-6216 (2011).
- [77] Aydoğan, C., Karakoç, V., Denizli, A., Chiral Ligand-Exchange Separation and Determination of Malic Acid Enantiomers in Apple Juice By Open-Tubular Capillary Electrochromatography. *Food chemistry*, 187, 130-134 (2015).
- [78] Raja, D. S., Luo, J. H., Chang, T. G., Lo, S. H., Wu, C. Y., Lin, C. H., Solvothermal Synthesis, Crystal Structures and Properties of Two New Magnesium Coordination Polymers of (L)-Malic Acid. *Inorganic Chemistry Communications*, 32, 22-27 (2013a).
- [79] Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O., Antimicrobial Activity of Malic Acid Against *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in Apple, Pear and Melon Juices. *Food Control*, 20 (2), 105-112 (2009).
- [80] Gao, Q., Pan, C., Liu, F., Lu, F., Wang, D., Zhang, J., Zhu, Y., Adsorption Characteristics of Malic Acid From Aqueous Solutions by Weakly Basic Ion-Exchange Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1251, 148-153 (2012).
- [81] Berényi, S., Mihály, J., Kristyán, S., Nagy, L. N., Telegdi, J., Bóta, A., Thermotropic and Structural Effects of Poly (Malic Acid) on Fully Hydrated Multilamellar DPPC–Water Systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828 (2), 661-669 (2013).
- [82] Jager, R. D., Mieler, W. F., Miller, J. W., Age-Related Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, 358 (24), 2606-2617 (2008).
- [83] Mann, E., Age-Related Macular Degeneration. *The Pharmaceutical Journal*, 288 (7698), 383-386 (2012).
- [84] Kahraman, G., Türk, M., Rzayev, Z. M., Söylemez, E. A., Oğuztüzün, S. Biyomühendislik Fonksiyonel Kopolimerleri. XX. Yeni Antikanser Aktif Poli (maleik anhidrid-alt-2-vinil-1, 3-dioxolan) ve Organoboron Amid-Ester Dallanmış Türevleri. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 40 (2), 183–194 (2012).
- [85] Chew, E. Y., Clemons, T. E., Agrón, E., Sperduto, R. D., San Giovanni, J. P., Kurinij, N., Age-Related Eye Disease Study Research Group. Long-term effects of vitamins C and E, β -carotene, and zinc on age-related macular degeneration: AREDS report no. 35. *Ophthalmology*, 120 (8), 1604-1611 (2013a).

- [86] Chew, E. Y., Clemons, T. E., SanGiovanni, J. P., Danis, R., Ferris, F. L., Elman, M., Fish, G., Lutein+ Zeaxanthin and Omega-3 Fatty Acids for Age-Related Macular Degeneration: The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Randomized Clinical Trial. *JAMA-Journal of the American Medical Association*, 309 (19), 2005-2015 (2013b).
- [87] Lin Y, Zipfel PF, Skerka C., Nicotinamide as a Treatment Option of Age-Related Macular Degeneration. *J Stem Cell Ther Transplant.*; 1: 063-065 (2017).
- [88] Thébault, S., Potential Mechanisms Behind the Antioxidant Actions of Prolactin in The Retina. *Experimental Eye Research*, 160, 56-61 (2017).
- [89] Schauwvlieghe, A. M. E., Dijkman, G., Hooymans, J. M., Verbraak, F. D., Hoyng, C. B., Dijkgraaf, M. G. W., Schlingemann, R. O., Comparing the Effectiveness of Bevacizumab to Ranibizumab in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration. The Bramd Study. *Plos one*, 11 (5), e0153052 (2016).
- [90] Xu, X. R., Yu, H. T., Yang, Y., Hang, L., Yang, X. W., Ding, S. H., Quercetin Phospholipid Complex Significantly Protects Against Oxidative Injury in ARPE-19 Cells Associated with Activation of Nrf2 Pathway. *European Journal of Pharmacology*, 770, 1-8 (2016).
- [91] Li, G. Y., Fan, B., Zheng, Y. C., Calcium Overload is A Critical Step in Programmed Necrosis of ARPE-19 Cells Induced by High-Concentration H₂O₂. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23 (5), 371 (2010).
- [92] Ceyhan, G., Tümer, M., Köse, M., McKee, V., Novel Polymeric Potassium Complex: Its Synthesis, Structural Characterization, Photoluminescence and Electrochemical Properties. *Journal of Luminescence*, 132 (3), 850-857 (2012a).
- [93] Anonim. NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, The 9th International Supplement; M100-S9. *Villanova, PA* (1999).
- [94] Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M., Microbiological Methods. Butterworths Co. (Publishers) Ltd. London, 450s (1989).
- [95] Bradshaw, L.J., Laboratory Microbiology. Saunders College Publishing, Printed In The United States of America. New York, 436s (1992).
- [96] Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B., Schallmoser, K.. Human Platelet Lysate: Replacing Fetal Bovine Serum As a Gold Standard for Human Cell Propagation. *Biomaterials*, 76, 371-387 (2016).
- [97] Pamies, D., Bal-Price, A., Simeonov, A., Tagle, D., Allen, D., Gerhold, D., Stacey, G., Good Cell Culture Practice For Stem Cells and Stem-Cell-Derived Models. *Alternatives to Animal Experimentation: ALTEX*, 34 (1), 95-132 (2017).
- [98] Dinç, E., Ayaz, L., Kurt, A. H., Protective Effect of Combined Caffeic Acid Phenethyl Ester and Bevacizumab Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Human RPE Cells. *Current Eye Research*, 42 (12), 1659-1666 (2017).

- [99] Soltan-Dallal, M. M., Validi, M., Douraghi, M., Fallah-Mehrabadi, J., Lormohammadi, L., Evaluation the Cytotoxic Effect of Cytotoxin-Producing *Klebsiella Oxytoca* Isolates on the HEp-2 Cell Line by MTT Assay. *Microbial Pathogenesis*, 113, 416-420 (2017).
- [100] Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, Lyu PC, Wu CL, Lu YC, Lin ST, Lin CW, Lai CH, Chang HT, Chou HC, Chan HL., Trypsininduced Proteome Alteration During Cell Subculture in Mammalian Cells. *Journal of Biomedical Science*, 17: 36 (2010).
- [101] Raja, D. S., Luo, J. H., Chang, T. G., Lo, S. H., Wu, C. Y., Lin, C. H., Synthesis, Crystal Structure, and Luminescence Properties of a New Calcium (II) Coordination Polymer Based on L-Malic Acid. *Journal of Chemistry*, Vol. 2013, Article ID 980243, 7 pages (2013b).
- [102] Ceyhan, G., Tümer, M., Köse, M., McKee, V., Akar, S., Structural Characterization, Luminescence and Electrochemical Properties of The Schiff Base Ligands. *Journal of Luminescence*, 132 (11), 2917-2928 (2012b).
- [103] Zhang, B., Ye, X., Hou, W., Zhao, Y., Xie, Y., Biomolecule-Assisted Synthesis and Electrochemical Hydrogen Storage of Bi₂S₃ Flowerlike Patterns with Well-Aligned Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (18), 8978-8985 (2006).
- [104] Ahmadian-Attari M. M., Amini, M., Farsam, H., Gholamreza, A., Amin G., Fazeli, M. R., Esfahani, H.R.M., Jamalifar, H., Bairami, A., Isolation of Major Active Antibacterial Compounds of Sumac Fruit (*Rhus coriaria* L.). *International Journal of Enteric Pathogens*, 4 (4), 1-37101 (2016).
- [105] Shamsuzzoha, M., Hassanujjaman, M., Islam, M. A., Chowdhury, A. K. M. M. B., Alam, M. A., Islam, M. S., Antimicrobial Studies of Mixed Ligand Transition Metal Complexes of Cu (II) and Cd (II) with Maleic Acid and Heterocyclic Bases. *Universal Journal of Applied Science*, 3 (3), 31-34 (2015).
- [106] Ayaz, L., Dinç, E., Evaluation of Microrna Responses in ARPE-19 Cells Against The Oxidative Stress. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 1-6 (2017).
- [107] Hytti, M., Piippo, N., Salminen, A., Honkakoski, P., Kaarniranta, K., Kauppinen, A., Quercetin Alleviates 4-Hydroxynonenal-Induced Cytotoxicity and Inflammation in ARPE-19 Cells. *Experimental Eye Research*, 132, 208-215 (2015).
- [108] Droge, W., Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82 (1), 47-95 (2002).
- [109] Veal, E. A., Day, A. M., Morgan, B. A., Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell*, 26 (1), 1-14 (2007).
- [110] Varani, J., Ward, P. A., Mechanisms of Endothelial Cell Injury in Acute Inflammation. *Shock (Augusta, Ga.)*, 2 (5), 311-319 (1994).

- [111] De Oliveira, S., López-Muñoz, A., Candel, S., Pelegrín, P., Calado, Â., Mulero, V., ATP Modulates Acute Inflammation In Vivo Through Dual Oxidase 1-Derived H₂O₂ Production and NF-κB Activation. *The Journal of Immunology*, 192 (12), 5710-5719 (2014).
- [112] Choi, M. H., Lee, I. K., Kim, G. W., Kim, B. U., Han, Y. H., Yu, D. Y., Bae, Y. S., Regulation of PDGF Signalling and Vascular Remodelling by Peroxiredoxin II. *Nature*, 435 (7040), 347 (2005).
- [113] Chen, Q., Espey, M. G., Krishna, M. C., Mitchell, J. B., Corpe, C. P., Buettner, G. R., Levine, M., Pharmacologic Ascorbic Acid Concentrations Selectively Kill Cancer Cells: Action as a Pro-Drug to Deliver Hydrogen Peroxide to Tissues. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (38), 13604-13609 (2005).
- [114] Choi, S. E., Min, S. H., Shin, H. C., Kim, H. E., Jung, M. W., Kang, Y., Involvement of Calcium-Mediated Apoptotic Signals in H₂O₂-Induced MIN6N8a Cell Death. *European Journal of Pharmacology*, 547 (1-3), 1-9 (2006).
- [115] Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., Chumakov, P. M., The Antioxidant Function of the p53 Tumor Suppressor. *Nature Medicine*, 11 (12), 1306 (2005).
- [116] Tezcan, F., Gültekin-Özgüven, M., Diken, T., Özçelik, B., Erim, F. B., Antioxidant Activity and Total Phenolic, Organic Acid and Sugar Content in Commercial Pomegranate Juices. *Food Chemistry*, 115 (3), 873-877 (2009).
- [117] Yin, H., Fang, J., Liao, L., Nakamura, H., Maeda, H., Styrene-Maleic Acid Copolymer-Encapsulated CORM2, a Water-Soluble Carbon Monoxide (CO) Donor with a Constant CO-Releasing Property, Exhibits Therapeutic Potential for Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Controlled Release*, 187, 14-21 (2014).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Bilge ALLI
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 09.08.1987, Gaziantep
Medeni hali : Bekar
Telefon :
e-posta : allibilge@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ /Biyomühendislik ve Bilimleri Bölümü	2018
Lisans	KSÜ/ Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Bayraktar Lisesi	2003

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
-----	-----	-------

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Ceyhan G., Allı B., Uras E., Kurt A.H., (2017) *Effect of Apoptosis of Calcium Malic Acid Complex*, The 7Th Annual Meeting of The MEACR-Gaziantep 21st and 22nd of December page 40-41.

Hobiler

Kitap okuma, yurtdışı gezileri