

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI



RETİNA PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİNDE (ARPE-19)
OKSİDATİF STRES KAYNAKLI HÜCRE HASARINDA
BEYAZ DUT (MORUS ALBA) FİTOÖSTROJENİ
OXYRESVERATROLÜN TEDAVİ VE KORUYUCU
ETKİLERİNDEKİ ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİNİN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ
CANSU KARA ÖZTABAĞ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Akif Hakan KURT

BOLU, HAZİRAN - 2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

Cansu KARA ÖZTABAĞ tarafından hazırlanan “**Retina Pigment Epitel Hücrelerinde (ARPE-19) Oksidatif Stres Kaynaklı Hücre Hasarında Beyaz Dut (Morus Alba) Fitoöstrojeni Oxyresveratrolün Tedavi ve Koruyucu Etkilerindeki Östrojen Reseptörlerinin Rolünün Araştırılması**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Disiplinlerarası Sinir Bilimleri Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 08/06/2022

Jüri Üyeleri

Danışman

Doç. Dr. Akif Hakan KURT

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

İmza

.....

Üye

Prof. Dr. Erol AYAZ

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye

Doç. Dr. Abdulgani KAYMAZ

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ali SUNGUR

Düzce Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN

Düzce Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 30/05/2022 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %15 olarak tespit edilmiştir.

.....
CANSU KARA ÖZTABAĞ

ÖZET

RETİNA PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİNDE (ARPE-19) OKSİDATİF STRES KAYNAKLI HÜCRE HASARINDA BEYAZ DUT (MORUS ALBA) FİTOÖSTROJENİ OXYRESVERATROLÜN TEDAVİ VE KORUYUCU ETKİLERİNDEKİ ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİNİN ROLÜNÜN

ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Cansu KARA ÖZTABAĞ

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DİSİPLİNLERARASI SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. AKİF HAKAN KURT)

BOLU, HAZİRAN - 2022

XV + 112

Yaşlılık döneminde insanlar birçok kronik dejeneratif hastalıkla karşılaşabilmektedir. Bunlardan birisi de yaşa bağlı olarak gelişen maküler dejenerasyondur. Maküler dejenerasyon başta olmak üzere retina hastalıklarının gelişiminde fazla miktarda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda bir fitoöstrojen olan oxyresveratrolün hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynaklı oksidatif hasarda koruyucu ve tedavi edici etkileri, ayrıca bu etkilerde östrojen reseptörlerinin rolü hücre kültürü ortamında araştırılmıştır. ARPE-19 hücre serisinde H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasarda, oxyresveratrolün koruyucu ve tedavi edici etkileri ve bu etkilerde östrojen reseptörlerinin rolünü hücre canlılık tespit kiti ile; koruyucu ve tedavi edici etkilerinin moleküler mekanizmasını ise; hücre ölüm tespiti, kaspaz-3 ve TAS\TOS kitleri ile belirledik. Oxyresveratrol oksidatif hasara karşı apoptotik hücre ölümünü azaltarak koruyucu ve tedavi edici etkinlik gösterdi. Oxyresveratrolün oluşturduğu nöroprotektif etki düşük düzeyde de olsa östrojen reseptör α/β ve GPER1 bağımlı görünmektedir. Sonuç olarak oxyresveratrolün yaşa bağlı makula dejenerasyonun önlenmesinde ve tedavisinde deney hayvan çalışmaları sonrasında alternatif bir tedavi olabileceğini düşünmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELER: ARPE-19, Fitoöstrojen, Oxyresveratrol, Oksidatif Stres, Östrojen Reseptörleri.

ABSTRACT

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF ESTROGEN RECEPTORS IN THE
TREATMENT AND
PROTECTIVE EFFECTS OF WHITE MULBERRY (MORUS ALBA)
PHYTOESTROGEN
OXYRESVERATROL IN OXIDATIVE STRESS-INDUCED CELL
DAMAGE IN RETINAL
PIGMENT EPITHELIAL CELLS (ARPE-19)**

PHD THESIS

Cansu KARA OZTABAG

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

INTERDISCIPLINARY NEUROSCIENCE

(SUPERVISOR: DOÇ. DR. AKİF HAKAN KURT

BOLU, JUNE 2022

XV + 112

In old age, people may encounter many chronic degenerative diseases. One of them is age related macular degeneration. Reactive oxygen species (ROS), which are formed in large amounts, play an important role in the development of retinal diseases, especially macular degeneration. In our study, the protective and therapeutic effects of oxyresveratrol, a phytoestrogen, in hydrogen peroxide (H₂O₂) induced oxidative damage, and the role of estrogen receptors in these effects were investigated in cell culture medium. We determined the protective and therapeutic effect of oxyresveratrol in oxidative damage induced by H₂O₂ in ARPE-19 cell line, and the role of estrogen receptors in these effects; using cell viability detection kit. And we used cell death detection, caspase-3 and TASCOS kits to find out the molecular mechanism of its protective and therapeutic effects. The neuroprotective appears to be dependent on estrogen receptor $\alpha\beta$ and GPER1, albeit at a low level. As a result, we think that oxyresveratrol may be an alternative treatment in the prevention and treatment of age-related macular degeneration, after experimental animal studies.

KEYWORDS: ARPE-19, Phytoestrogen, Oxyresveratrol, Oxidative Stress, Estrogen Receptors.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	xi
FOTOĞRAF LİSTESİ	xii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
TEŞEKKÜR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Göz ve Görmenin Fizyolojisi.....	5
2.1.1 Sklera	5
2.1.2 Koroid Tabaka (Damar Tabaka).....	5
2.1.3 Retina.....	6
Retinanın Anatomisi ve Fizyolojisi	6
2.1.4 Retina Pigment Epiteli (RPE).....	12
2.1.5 Retina Hastalıkları	15
2.2 Maküler Dejenerasyon.....	15
2.2.1 YBMD Teşhis Yöntemleri	19
2.2.2 YBMD Tedavisi	20
2.2.3 Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu ve Apoptoz.....	21
2.3 Apoptoz.....	21
2.3.1 Apoptoz Morfolojisi	22
2.3.1 Apoptozun Moleküler Düzenleyicileri	22
2.3.2 Apoptoz Mekanizması.....	23
2.3.3 Apoptozis Belirleme Yöntemleri.....	26
2.3.4 Apoptoz ve Oksidatif Stres.....	26
2.4 Oksidatif Stres	27
2.4.1 H ₂ O ₂ ve Nörodejenerasyon.....	28
2.4.2 Serbest Oksijen Türlerinin Retina Üzerine Etkileri.....	29
2.4.3 Oksidatif Stres Modelleri	29
2.4.4 Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyon ve Oksidatif Stres.....	32
2.5 Antioksidanlar.....	33
2.6 Östrojen.....	34
2.6.1 Östrogen Reseptörleri	34

2.7 Fitoöstrojenler.....	36
2.7.1 Fitoöstrojenlerin Yapıları ve Sınıflandırılmaları	37
2.8 Oxyresveratrol	38
2.8.1 Oxyresveratrolün Antioksidan/Anti-Inflamatuar Aktivitesi.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	42
3.2 Hücre Kültürü Uygulamaları	43
3.2.1 Retina Pigment Epitel (ARPE-19) Hücre Serisi.....	43
ARPE-19 Hücre Hattında Hidrojen Peroksit İle Hasar Modelinin Oluşturulması.....	46
3.2.2 İnhibitör Uygulanması.....	51
3.2.3 Hücre Proliferasyon Canlılık Testi II (XTT).....	53
3.3 Biyokimyasal Analizler	54
3.3.1 Hücre Ölüm Tepiti.....	54
3.3.2 Kaspaz-3	58
3.3.3 Total Antioxidant Seviye.....	59
3.3.4 Total Oksidan Seviye	62
3.3.5 Total Protein Ölçümü	64
3.4 İstatistiksel Analiz	66
4. BULGULAR	67
4.1 Hücre Kültürü Uygulamaları	67
4.1.1 ARPE-19 Hücre Hattında H ₂ O ₂ İle Hasar Modelinin Oluşturulması.....	67
5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
7. KAYNAKLAR.....	99

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Retinanın katmanları (46).....	7
Şekil 2.2. İnsan gözünün ve retinanın organizasyonu (55).....	12
Şekil 2.3. Retinanın katmanları ve retina pigment epitel (58).....	13
Şekil 2.4. Toplam gözün ve makulanın üç farklı durumdaki enine kesit şeması (A) normal makula; (B) subretinal kanamalı eksüdatif YBMD'de makula; (C) kuru YBMD'de makulada drusen birikimi.....	18
Şekil 2.5. Retina ve koroid (A) normal retinanın şeması; (B) ıslak tip YBMD belirtisi olarak yeni kan damarı oluşumu ve kanama; (C) kuru tip YBMD'nin erken bir özelliği olarak bruch zarı ve RPE tabakası arasında drusen birikimi. (77).....	18
Şekil 2.6. Sağlam RPE tabakası ile retina ve koroid (A) normal retinanın şeması; (B) kuru tip YBMD sırasında RPE tabakası ve Bruch zarı arasında drusen varlığı ve VEGF üretiminin indüklenmesi; (C) koroidde VEGF tarafından anormal yeni kan damarlarının oluşumu, bruch membranı ve RPE tabakasının bütünlüğünün bozulması, subretinal kanamaya, sıvı birikmesine ve son olarak YBMD'nin ileri formunda görme bozukluğuna yol açar. (77).....	19
Şekil 2.8. Kaspaz Mekanizması (86)	23
Şekil 2.9. Apoptozun mitokondriyal yolağı (86)	25
Şekil 2.10. Apoptozun ekstrense ve intrinsek yolları (101)	26
Şekil 2.11. Retinadaki oksidatif stres oluşum mekanizmaları (138).	33
Şekil 2.12. ER transkripsiyon aktivasyonunun iki mekanizması (162).	36
Şekil 2.13. Oxyresveratrolün yapısı ve önerilen biyosentezi (179).	39
Şekil 3.1. ARPE-19 Hücre hattında hidrojen peroksit ile hasar modelinin oluşturulması.	47
Şekil 3.2. ARPE-19 Hücrelerinde oxyresveratrolün etkisinin değerlendirilmesi.	48
Şekil 3.3. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrolün etkisinin değerlendirilmesi.	49
Şekil 3.4. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası oxyresveratrolün etkisinin değerlendirilmesi.	50
Şekil 3.5. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sırasında oxyresveratrolün etkisinin değerlendirilmesi.	51
Şekil 3.5. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında ICI ve G15 östrojen reseptör inhibitörlerinin etkisinin değerlendirilmesi.	52
Şekil 3.6. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında ICI ve G15 östrojen reseptör inhibitörlerinin etkisinin değerlendirilmesi.	53
Şekil 3.7. XTT 'in formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu.	54
Şekil 3.8. Hücre ölüm tespiti kiti çalışma prensibi.	57
Şekil 3.9. Standart hazırlama (Protein tayini).	65
Şekil 4.1. ARPE-19 hücrelerinde hidrojen peroksitin hücre canlılığı üzerine etkisi.	67
Şekil 4.2. ARPE-19 hücrelerinde oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisi.	68

Şekil 4.3. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisi.	70
Şekil 4.4. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisi.	72
Şekil 4.5. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisi.	74
Şekil 4.6. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.....	76
Şekil 4.7. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.....	78
Şekil 4.8. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.	80
Şekil 4.9. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.	82
Şekil 8.10. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.	84
Şekil 4.11. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.	86
Şekil 4.12. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında hücre ölümünün değerlendirilmesi.	88
Şekil 4.13. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi.	90
Şekil 4.14. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında total oksidan seviyelerinin değerlendirilmesi.	91

TABLO LİSTESİ

Tablo 3. 1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.	42
Tablo 3. 2. Kullanılan sarf malzeme ve kullanım amaçları.	43
Tablo 3.3. Standart hazırlama (TAS).	60
Tablo 3.4. Standart hazırlama (TOS).	63
Tablo 4.1. ARPE-19 H ₂ O ₂ ile oluşturulan hasar modelinde istatistiksel sonuçlar.	67
Tablo 4.2. ARPE-19 oxyresveratrolün etkisinin istatistiksel sonuçları.	68
Tablo 4.3. Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	69
Tablo 4.4. Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	71
Tablo 4.5. Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	73
Tablo 4.6. Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	75
Tablo 4.7. Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	77
Tablo 4.8. Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	79
Tablo 4.9. Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	81
Tablo 4.10. Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	83
Tablo 4.11. Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.	85
Tablo 4.12. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında hücre ölümünün istatistiksel değerlendirilmesi.	87
Tablo 4.13. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında kaspaz-3 aktivitesinin istatistiksel değerlendirilmesi.	89
Tablo 4.14. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında total oksidan seviyelerinin istatistiksel değerlendirilmesi.	90
Tablo 4.15. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında total antioksidan seviyelerinin istatistiksel değerlendirilmesi.	91

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 3.1: ARPE-19 Hücre hattı invert mikroskop görüntüsü.....	44
Fotoğraf 3.2. EVE otomatik hücre sayacı ile hücre sayımı.	46
Fotoğraf 4.2. Hücre ölüm tespiti kiti renk değişimi.....	57
Fotoğraf 4.3. Kaspaz 3 kiti renk değişimi.....	59
Fotoğraf 4.4. TAS kiti renk değişimi.	62
Fotoğraf 4.5. TOS kiti renk değişimi.	64
Fotoğraf 4.5. Protein tayini renk değişimi.	66



KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

17β Estradiol	: Estradiol
3-NP	: 3-Nitropropionik Asit
AH	: Alzheimer Hastalığı
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
anti-VEGF	: Anti-Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
APAF1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
AREDS	: Age-Related Eye Disease Study Research Group
Aβ	: Amiloid Beta
KRB	: Kan Retina Bariyerini
COX- 2	: Siklo Oksijenaz - 2
DR	: Diyabetik Retinopati
DR4/5	: Ölüm Reseptörü 4/5
E1	: Östrone
E2	: Estradiol
E3	: Östriol
ER	: Östrojen Reseptör
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
FADD	: Fas İlişkili Ölüm Domaini
FasR	: Fas Reseptör
FDT	: Fotodinamik Terapi
FOXO3a	: Forkhead Box O3
GM - CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
GPER1	: G protein ile ilişkili östrojen reseptörü-1
GPR30	: G protein ile ilişkili östrojen reseptörü-1
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HEF	: İnsan Embriyonik Fibroblast
HH	: Huntington Hastalığı
HLEC	: İnsan Lens Epitel Hücresi
HO-1	: Heme Oksijenaz-1
IPL	: İç Pleksiform Tabaka
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

KNV	: Koroidal Neovasküler Membran
MCF7	: Meme Kanseri Hücre Hattı
MnSOD	: Manganez Süperoksit Dismutazı
MOMP	: Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliğini
MPTP	: N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
NF-κB	: Nükleer Faktörü Kappa B
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid Türevi 2
O₂	: Singlet Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
OH	: Hidroksil
OKT	: Optik Koherens Tomografi
OKTA	: Optik Koherens Tomografi Anjiyografi
OXY	: Oxyresveratrol
PED	: Pigment Epitel Dekolmanı
PH	: Parkinson Hastalığı
RGH	: Retina Ganglion Hücresi
ROS	: Reaktif Oksijen Türü
RP	: Retinitis Pigmentoza
RPE	: Retina Pigment Epiteli
RVO	: Retinal Ven Tıkanıklığı
TNFR1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
TRADD	: TNF Reseptör İlişkili Ölüm Domaini
XIAP	: X'e Bağlı Apoptoz İnhibitörü
YBMD	: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan, ekibinde çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, doktora eğitimim boyunca ve tezimin tüm aşamalarında her türlü bilgi, destek ve tecrübelerini hoşgörü ve sabırla paylaşan tez danışmanım değerli hocam, Doç. Dr Akif Hakan KURT'a;

Tezimin biyokimyasal analizlerinde özveri ve sabırla destek olan değerli hocam Prof. Dr. Lokman AYZAZ'a, istatistiksel analiz sürecinde hoşgörü ve sabırla destek olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ali SUNGUR'a

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Disiplinlerarası Sinir Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erol AYZAZ'a

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, akademik süreçte kendimi geliştirmeme imkan sağlayan, değerli hocam, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İdris TÜREL'e

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan, her zaman destek olan değerli hocam Doç. Dr. Ayhan ÇETİNKAYA'ya;

Disiplinlerarası Sinir Bilimleri Anabilim Dalında beraber çalıştığımız tüm ekip arkadaşlarıma;

Mutlu bir hayat sürmemde büyük payı olan birbirinden kıymetli teyzelerim, halalarım, amcalarım, yengem, kuzenlerim ve tüm aileme;

Tez dönemim boyunca büyük bir özveri ve fedakarlıkla destek olan kayınvalidem Birsen ÖZTABAĞ ve Rahmi ÖZTABAĞ'ya;

Attığım her adımda sevgi ve hoşgörüyle yanımda olan en büyük destekçilerim, canım babam Ethem KARA, canım annem Yasemin KARA ve canım kardeşim Çağla Nur KARA'ya;

Her zaman sonsuz sevgi ve desteğini hissettiğim, kıymetli eşim Emircan ÖZTABAĞ ve hayatıma girdiği günden beri güzellikler getiren, mutluluk sebebim, en büyük motivasyon kaynağım, doktora eğitimim ve tez dönemimde en büyük fedakarlığı gösteren, canım kızım Defne ÖZTABAĞ'ya

Sonsuz teşekkürlerimle...

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin teminini sağlayan Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje numarası: 2020.08.36.1477)'ne teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Antioksidanlar ve prooksidanlar arasındaki dengenin bozulup hücrelerin oksijen veya azot türlerinden zarar gördüğü duruma oksidatif stres denir (1). Normal olarak vücudumuz bu radikalleri kontrol altında tutar, ancak bazen denge bozulur ve çok sayıda radikal oluşur. Böyle bir durumda, serbest radikaller sağlıklı hücreleri, okside eder ve bozar (2,3). Başlıca serbest radikaller; süperoksit radikaller, peroksinitritler ve hidrojen peroksitlerdir (4,5). Oksidatif stresin tehlikesi, reaktif oksijen türlerinin hücresel moleküllere zarar vermesiyle kendisini göstermektedir. Proteinlere, lipidlere ve RNA'lara verilen zarar nispeten geri dönüştürülebilir, ancak DNA'nın zarar görmesi geri dönüşü mümkün olmayacak problemlere yol açabilir. DNA'da meydana gelen zararlar genetik bütünlüğün bozulmasıyla, hücrenin işlevini bozabilir, hücreyi öldürebilir ve bir onkojenik dönüşüme sebep olabilir (6,7). Oksidatif stres, yaşlanma, ateroskleroz, kanser, iskemi reperfüzyon, inflamasyon, romatoid artrit, karaciğer hastalıkları, Amyotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığı (AH) ve Huntington hastalığı (HH) dahil olmak üzere çoklu nörodejeneratif bozuklukların da gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar (8). Oksidatif stres ve nörodejenerasyon yaşa bağlı maküler dejenerasyon (YBMD), glokom, diyabetik retinopati (DR) ve retinal ven tıkanıklığı (RVT) dahil olmak üzere retina hastalıklarında da rol oynamaktadır (9). Retina beyne açılan bir penceredir (10). Merkezi sinir sisteminin bir parçası olan retina, biyoenerjetik (ATP üretimi), ışık algısı ve görsel işleme için büyük miktarda glikoz ve oksijen tüketir (11). Retina ayrıca sıkı kan retinal bariyerlerine (KRB) sahiptir ve nöroretini dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinden ve plazma bileşenlerinden korur (12). Retina pigment epiteli (RPE), fenestre koriocapillaris'i nöroretinadan ayırır, çubuk ve koni fotoreseptörlerinden oluşan retina dış segmentlerine glikoz, oksijen ve besinleri taşıma işlevini yerine getirir (13,14). Nörosensör retina ve RPE, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) dahil olmak üzere çok çeşitli antioksidan enzimler içerir. RPE disfonksiyonunun bozulması yaşa bağlı maküler dejenerasyon (YBMD) ile ilişkilirken, RPE ve fotoreseptördeki gen mutasyonu retinitis pigmentosa (RP) dahil fotoreseptör dejenerasyonuna ve körlüğe neden olur (15-18).

YBMD, dünya çapında yaklaşık 200 milyon insanı etkileyen, görme kaybı ile karakterize kronik bir hastalıktır. YBMD, tüm körlük vakalarının yaklaşık %9'unu oluşturmaktadır (19). Daha da önemlisi, YBMD prevalansı son yıllarda önemli ölçüde artış göstermektedir. 2040 yılında 288 milyona ulaşacağı öngörülmesine karşın kesin bir tedavisi de bulunmamaktadır. Erken tanı ile hastalığın seyrinin yavaşlatılması ve semptomların şiddetinin azaltılarak yaşam kalitesinin arttırılması hedeflenmektedir. Ancak başarılı tedavilerde bile, YBMD semptomları sıklıkla geri dönmektedir. Son yıllarda majör duyarlılık genlerinin tanımlanması, hastalık patogenezinde kompleman aracılı inflamasyonun ve oksidatif stresin rolünün anlaşılması ile yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için altta yatan mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Bu hasarların önlenmesi ve serbest radikallerin temizlenmesi için çeşitli fitoöstrojenlerin ve antioksidanların etkin olacağı düşünülmektedir (19,20). *Morus alba*, Moraceae ailesinden olup geleneksel Asya tıbbı bitkileri arasında yer almaktadır (21-23). Beyaz dut olarak da bilinen *Morus albanın*, kök kabuğundan, yapraklarından ve meyvelerinden elde edilen ekstraktlar, geleneksel Asya tıbbında, çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Taze yapraklar kanamaları durdurmak için, meyveleri baş dönmesi, kulak çınlaması, diyabet, uykusuzluk, böbrek iltihabı, hipertansiyon, romatoid artrit, sinir zayıflığı, saçların erken beyazlaması tedavilerinde, gövdesi romatizma ağrıları, spazm tedavisinde, kök kabukları astım, akciğer iltihabı, öksürük, bronşit,  dem, hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır (24). Tüm bu özelliklerinin yanı sıra yüksek miktarda fenol ve flavonoid içerdiği için güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve antikanser, antienflamatuar, kardiyoprotektif ve anti-aterojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (25). *Morus Alba L.*'nin kök kısmında tanımlanan farmasötik olarak aktif kimyasal bileşikler arasında flavonoidler, furanlar, kumarinler, terpenler, steroller, şekerler, uçucu yağlar ve stilbenler bulunur. Flavonoidlerin ve stilbenlerin kimyasal yapıları, östrojen benzeri aktiviteye sahip fitoöstrojenler olarak bilinen aktif bileşiklerdir (26,27). Fitoöstrojenler bitki kökenli  strojenlerdir. Endojen olarak üretilen memeli  strojenlerine yapısal ve fonksiyonel benzerlikleri olan doğal östrojen reseptör (ER) modülatörleridir (28). Fitoöstrojenler organizmada bulunan doğal östrojenlerle yarışa girer, reseptörlere bağlanarak östrojenik, antiöstrojenik, antioksidant, antiproliferatif, antianjiogenetik, antienflamatuar etkinlik gösterirler (29). Fitoöstrojenler hücreler üzerinde östrojenik etkilerini klasik steroid hormon

reseptörü yapısında, ER α ve ER β ve membran ilişkili G protein ile ilişkili östrojen reseptörü-1 (GPER1, GPR30) aracılığıyla gerçekleştirmektedir. İzoflavonoidler, stilbenler, lignanlar ve kumestanlar, ER'ler için etkileyici afinitesi ve seçiciliği olan fitoöstrojenlerdir (30,31). Oxyresveratrol (OXY), Morus Alba'nın (beyaz dut) kökünde bulunan bir bileşik olan Mulberroside A'nın hidrolitik aktivasyonu ile sentezlenen bir stilben ve fitoöstrojendir. Antioksidasyon, antienflamatuar, nöroprotektif, anti-viral, serbest radikal temizleme faaliyetleri ve tirozinaz inhibitör aktiviteleri bulunmaktadır (32-35). Hu ve Ark. yaptığı çalışma ile oxyresveratrolün, insan mercek epitel hücre (HLEC)'lerini hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif stres ve apoptoza karşı protein kinaz B / Hem oksijenaz-1(Akt / HO-1) yolunu aktive ederek koruduğu bildirilmiştir (36). Yapılan bir çalışmada, mulberrosid A ve oxyresveratrolün, sıçan karaciğer mikrozomlarında FeSO₄ / H₂O₂ ile indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir (37). Wu ve Ark. yaptıkları çalışmada oxyresveratrolün de içinde bulunduğu 9 ekstrakte edilen bileşiğin akut etanol uygulamasının neden olduğu fare serebellumunda ve serebral kortekste oluşan DNA hasarını azalttığını gösterilmişlerdir (38). Ayrıca Wang ve Ark. yaptıkları çalışmada oxyresveratrol'ün sıçan omurilik yaralanmasındaki hasarı ortadan kaldırdığı ve inflamasyon ve oksidatif stresi granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM - CSF), indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklo - oksijenaz - 2 (COX- 2) ve nükleer faktör eritroid türevi 2 (Nrf2) sinyal yolu aracılığıyla ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir (39). Meme kanseri hücre hattı (MCF7)'nda yapılan çalışmada nükleer faktör kappa B (NF- κ B) yolu boyunca anti-enflamatuar bir etki uygulanarak oxyresveratrolün zayıf östrojen reseptör agonisti ve bir nükleer faktörü kappa B modülatörü olduğu ve östrojenik işleviyle bir anti-enflamatuar etki gösterdiği bildirilmiştir (40). Bununla birlikte, östrojen benzeri aktivitesi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bir fitoöstrojen olan oxyresveratrolün, antioksidan, antienflamatuar ve nöroprotektif etkileri bilinmesine karşın, güncel çalışmalar arasında retina pigment epiteli hücrelerinde oxyresveratrolün oksidatif stres önleme ve tedavi edici etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda oxyresveratrolün hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif hasarda koruyucu ve tedavi edici etkilerinin yanı sıra bu etkilerde klasik östrojen reseptör blokörü ICI 182780'in ve G-proteini ile ilişkili östrojen reseptörü 1 (GPER1) inhibitörü G-15'in

rolünü de hücre kültürü ortamında araştırdık. ARPE-19 hücrelerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oksidatif stres oluşturuldu. Oksidatif stres öncesinde ve sonrasında Oxyresveratrol 7 farklı dozda uygulandı. XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid tuzu) hücre proliferasyon canlılık testi II ile hücre canlılığındaki değişime (hücre sayısındaki artış veya azalmaya) bakılarak koruyucu ve tedavi edici etkilerinin yanı sıra östrojen reseptörlerinin rolü de araştırıldı. Oxyresveratrolün koruyucu ve tedavi edici etkisini moleküler düzeyde anlamak amacıyla Kaspaz 3, total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS) parametreleri ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Göz ve Görmenin Fizyolojisi

İnsan vücudunun en karmaşık organlarından biri olan göz, göz küresi ile yardımcı yapılardan oluşur. İnsan gözü sklera ve kornea, koroid tabaka ve retina olmak üzere üç katmandan meydana gelmektedir (41). Dış bölge kornea ve skleradan oluşur. Kornea ışığı kırarak merceğe ve retinaya iletir, ayrıca gözü enfeksiyonlara ve yapısal hasara karşı korur. Sklera, gözü iç ve dış etkenlerden koruyan bir bağ doku tabakası oluşturur. Kornea ve sklera limbusta birbirine bağlıdır. Skleranın görünen kısmı, konjonktiva adı verilen şeffaf bir mukoza zarı ile kaplıdır. Gözün orta tabakası iris, siliyer cisim ve koroidden oluşur. İris, gözbebeğinin boyutunu ve dolayısıyla retinaya ulaşan ışık miktarını kontrol eder; siliyer cisim merceğin gücünü ve şeklini kontrol eder. Koroid, dış retina katmanlarına oksijen ve besin sağlayan vasküler bir katmandır. Gözün iç tabakası ise, ışığı yakalayan ve işleyen nöronların karmaşık, katmanlı bir yapısı olan retinadır (41).

2.1.1 Sklera

Göz küresinin öndeki renkli kısımları (iris ve gözbebeği) hariç, diğer kısımlarını örten göz yüzeyinin altıda beşini oluşturan tabakadır. Göz akı da denir. Gözün diğer kısımlarını korur. Skleranın devamında, gözün ön ucunu kaplayan şeffaf tabaka kornea bulunur. Işığın göze girmesine izin vererek, ışığın kırılmasına ve ışığın odaklanmasına sağlar. Kornea uyarılırsa göz kırpma refleksi ve gözyaşı bezlerinin salgısı artar (42).

2.1.2 Koroid Tabaka (Damar Tabaka)

Koroid, retina ve sklera arasındaki yoğun kan damarlı ve pigmentli stroma ağıdır. Koroid'in ana işlevleri, dış retinaya oksijen ve besin temini, ışık absorpsiyonu, termoregülasyon ve göz içi basıncının modülasyonudur. Bununla birlikte, son çalışmalar, emetropizasyon ve göz büyümesinin düzenlenmesi ve oküler odak ayarlamasında da koroidin rolüne işaret etmektedir. Gözdeki toplam kan akışının %85'ini oluşturan koroid dolaşımı, nispeten düşük oksijen içeriğine sahip yüksek akışlı bir sistemdir. Çoğu türde, iç (retinal) taraftan başlayarak histolojik olarak beş katmana ayrılabilir: bruch zarı, koroikapillaris, haller tabakası, sattler tabakası ve suprachoroidea, birinci tabaka hariç tümü büyük ölçüde vasküler olmakla birlikte, kuşlarda, suprakoroid, lenf damarlarına benzeyen endotel kaplı

geniş boşluklar (lakuna) içerir. Koroid ayrıca melanositler, fibroblastlar, vasküler olmayan düz kas hücreleri ve immünokompetan hücreler dahil olmak üzere çeşitli vasküler olmayan yerleşik hücreler içerir, kollajen ve elastanlar tarafından desteklenir (43).

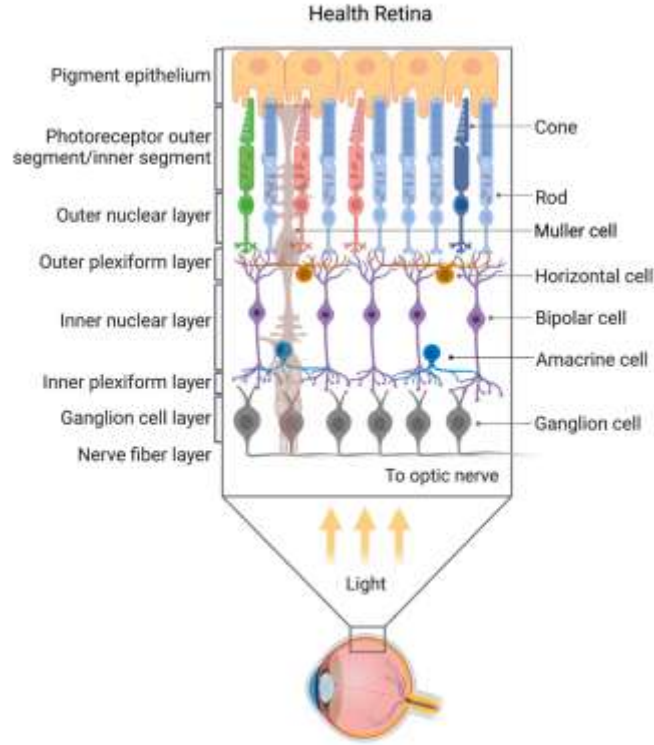
2.1.3 Retina

Retinanın Anatomisi ve Fizyolojisi

Retina bulbus oculi'nin ışığı üç boyutlu görüntülere çeviren görsel işlemde sorumlu, duyarlı fotoreseptörleri içeren en içteki tabakasıdır (44). Göz küresinin arka kısmında yer alan retina, beynin görülebilen tek uzantısıdır (45). Diencephalon'un bir uzantısı olan optik vezikülden gelişir, embriyogenesizin dördüncü haftasında başlayan ve yaşamın ilk yılına kadar devam eden uzun ve karmaşık bir süreçtir (45). Ana bileşenlerini nöral retina ile retina pigment epiteli oluşturur (45).

Retina'nın ışık alan kısmı olan nöral retina discus nervi optici'den (papilla) ön tarafta corpus ciliare'lere komşu olan ora serrata bölgesine kadar uzanır ve pars optica retina adını alır. Ora serrata'nın arkasında kalan bölüm ışığa duyarsız olduğu için bu bölüme kör bölüm denir. Ora serrata arka ve ön vasküler sistemlerin ayrılma noktasıdır ve limbus'a nasalda 6 mm, temporalde 7 mm uzakta bulunur. Retina tabakası ora serrata'ya testere dişine benzer girintiler yaptığı için bu ismi almıştır. Nöral retina tabakasında bulunan ganglion hücrelerinin aksonları n. opticus'u ve merkezi görme yollarının başlangıcını oluşturur.

Retina pigment epiteli n. opticus'dan pupilla'ya kadar uzanır. Retina corpus ciliare'nin iç yüzeyi ve iris'in arka yüzünde tek katlı epitel olarak devam eder. Retina pigment epiteli birbiriyle sıkı bağlantılar yapan, plazma ve iyon geçişini engelleyen küboid hücrelerden oluşur. Nöral retina'nın beslenmesi için gerekli iyonları ve glukozu sağlar ve içerdiği siyah melanin pigmenti göz küresindeki ışık yansımalarını önleyerek retinal fotoreseptörleri ışığın zararlı etkilerinden korur. Pigment tabakasına gömülü olan fotoreseptörlerin (koni ve çubuk) kullanması için büyük miktarda A vitamini bulundurur ve ayrıca fagositozla ortamı korur (41).



Şekil 2.1. Retinanın katmanları (46)

Nöral Retina'daki Hücre Tipleri ve İşlevleri

Histolojik olarak retina 10 tabakadan oluşur. Bunlar dıştan içe doğru;

1. Stratum Pigmentosum: Retina pigment epiteli
2. Stratum Nervosum: Koni ve çubuk hücrelerinin dış ve iç segmentlerinin yer aldığı tabaka
3. Stratum Limitans Externum: Koni ve çubuk hücrelerinin gövdeleriyle segmentleri sınırındaki ağimsı yapı
4. Stratum Nucleare Externum: Koni ve çubuk hücrelerinin çekirdek ve gövdelerinin yer aldığı tabaka -1. nöron tabakası
5. Stratum plexiforme externum: Koni ve çubukların bipolar ve horizontal hücrelerle sinaps yaptıkları tabaka
6. Stratum Nucleare Internum: Bipolar -2. nöron tabakası, horizontal ve amakrin hücre gövde ve çekirdeklerinin yer aldığı tabaka
7. Stratum Plexiforme Internum: Bipolar, amakrin ve ganglion hücrelerinin sinaptik iletişim kurduğu tabaka
8. Stratum Ganglionicum: Multipolar ganglion hücreleri -3. nöron tabakası

9. Stratum Neurofibrarum: Ganglion hücrelerinin aksonlarının bulunduğu tabaka

10. Stratum Limitans Internum; olarak adlandırılır.

Bu katmanlar, retinayı vitreal gövdeden fotoreseptörleri ise hücre gövdesinden ayırır (47).

Retina'nın katmanlarında gelen ışığı üç boyutlu görüntülere çeviren aksiyon potansiyellerine iletmeye yardımcı olan 5 farklı nöron ve nöron alt tipi bulunmaktadır. Retinaya gelen ışığı algılayan en iç tabakadaki fotoreseptör hücreleri koni ve çubuk hücreleridir(1. nöron). Uyarı fotoreseptörler tarafından sinaptik olarak (glutaminerjik) bipolar hücrelere (2. nöron), onlardan da tekrar sinaptik yolla retina ganglion hücrelerine (3. nöron) iletir. Retina'da horizontal ve amakrin olmak üzere iki ana tip inhibitör internöron bulunur. Ganglion hücrelerinin reseptif alanlarını bu internöronlar ayarlar (47).

a) Koni ve Çubuklar

Gözde, ışığın elektrik sinyallere dönüştüğü yere fotoreseptör denir. Fotoreseptör tabaka koni ve çubukları içerir (48). İnsan retinasında yaklaşık 120 milyon çubuk ve 7 milyon civarı ise koni vardır. Çubuklarda sadece rodopsin denen pigment bulunur ve alaca karanlıkta görmeyi sağlarlar. Konilerde ise üç farklı pigment bulunur, taşıdıkları pigmente göre kırmızı, yeşil ve mavi olmak üzere 3'e ayrılır. Koniler, ışık şiddeti yüksek olunca uyarılırlar, renkli ve keskin görmeden sorumludurlar. Yani, basiller gece, koniler ise gündüz görmeyle ilgilidir. Retinanın fovea denen bölgesinde koniler çok yoğundur. Ayrıca, bu bölgedeki fotoreseptörler ışığı doğrudan alırlar. En keskin görüntüyü ise foveanın merkezi olan foveola kısmı sağlar. Görme sinirinin retinadan çıktığı yerde fotoreseptör bulunmaz. Onun için buraya kör nokta veya optik disk denir (49).

b) Bipolar Hücreler

Bu hücreler çubuk ve koni hücrelerden elektriksel bilgiyi alır ve diğer retina hücrelerine iletirler. On üç farklı tipi vardır, girdi aldıkları hücreye bağlı olarak çubuk bipolar hücrelere ve koni bipolar hücrelere bölünürler. Bipolar hücreler, polarite, kontrast, gelen görsel uyarıların geçici profili ve kromatik kompozisyon gibi temel görme bloklarını sağlayan diğer fotoreseptörlerle devreler oluştururlar. Çubuklar skotopik görüşte uzmanlaşırken, koniler, ince ayrıntıları, hareketleri ve renkleri ayırt edebilen fotopik görüş için bilgi sağlar. Bipolar hücreler, retinanın iç pleksiform tabakasındaki (IPL) çubuklar ve koniler ile sinaptik bir bağlantı

oluşturarak retinanın iç ve dış katmanlarını birbirine bağlar. IPL, farklı bipolar hücrelerin IPL içinde beş farklı katmanda tabakalaştığı, farklı temel görsel bilgi biçimlerini belirli RGH'ler ve amakrin hücre gruplarına taşıdığı santral bir işleve sahiptir. Bipolar hücreler, RGH'ler, amakrin ve yatay hücreler ile farklı ilişkiler oluşturur. Amakrin hücreleri, IPL'deki bipolar hücre terminallerini sinaps öncesi inhibe eder. Yatay hücreler, bipolar hücrelere GABAerjik inhibitör girdiler verir. Bu nedenle, bipolar hücreler çubuklardan ve konilerden glutamaterjik girdiler ve yatay hücrelerden GABAerjik girdiler alır, bipolar hücreler, RGH'lere ve amakrin hücrelere glutamaterjik uyarı girdisi sağlar. Bu paralel bilgi işleme biçimi, önceden işlenmiş uyarıcı girdilerin görmenin temel yapı taşları haline gelmesine izin verir (50).

c) Retina Ganglion Hücreleri

Retina ganglion hücreleri (RGH), retinanın iç kısmında bulunurlar ve retinanın ana çıkış nöronudur. Beyne bilgi ileten ve bipolar hücrelerden elektriksel bilgiyi alan, şekilleri, kontrastı ve rengi belirlemek için işleyen bir optik sinir oluşturacak şekilde uzanır. Periferden makülaya doğru gangliyon tabaka sayısı artar, foveaya doğru azalır ve foveada tamamen kaybolur. Gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir, dendritleri bipolar hücrelerle aksonları ve amakrin hücreler ile sinaps yapar (49). Işığa duyarlı olan ve sirkadiyen ritmin fizyolojik süreçlerinde işlev gören hem görüntü oluşturan hem de oluşturmayan bilgilerin iletilmesine yardımcı olan üçüncü bir fotoreseptör sınıfıdır (50).

d) Horizontal Hücreler

Horizontal hücreler çubuk ve konilerin terminal genişlemelerinin yakınlarında yer alan multipolar hücrelerdir, bir adet uzun ve çok sayıda kısa uzantıları retina yüzeyine paralel uzanır (49). Horizontal hücreler, bipolar hücreler ve fotoreseptörler arasındaki bilgi transferini modüle etmede rol oynar. Gözlerin hem parlak hem de düşük ışık koşullarına uyum sağlamasına yardımcı olarak görme keskinliğini artırır (50).

e) Amakrin Hücreler

Amakrin hücreler iç retinada bulunur. Bipolar hücreler arasında veya bipolar hücreler ile ganglion hücreleri arasında bağlantı kurarlar. İnhibitör nörotransmitter GABA veya glisin serbest bırakan ara nöronlardır. Çok çeşitli morfolojik tipleri vardır, bu sayede retina içinde çeşitli iş ve işlevleri yerine getirirler. Amakrin hücreler arasında büyük bir çeşitlilik vardır. 42'den fazla

amakrin hücrenin eşlik ettiği 20 farklı ganglion hücresi keşfedilmiştir (50,51). Bu çeşitlilik, amakrin hücrelerinin çalıştığı geniş alan, orta alan ve dar alan olmak üzere farklı bilgi paylaşım spektrumlarını oluşturur. Geniş alanlı amakrin hücreleri, yatay bilgi entegrasyonuna yardımcı olarak retinanın tek bir katmanı boyunca yatay olarak iletişim kurarken, dar alanlı amakrin hücreleri ise retinanın daha fazla katmanına dikey olarak nüfuz ederek dikey bilgi entegrasyonuna izin verir. Amakrin hücre çıktısının tabakalaşması ya sinaptik öncesi ya da sinaptik sonrası olmaktadır. Amakrin hücrelerinin sadece inhibitör nörotransmitterleri serbest bırakmasına rağmen hem inhibitör hem de uyarıcı olmasına izin veren bağlantıları bulunmaktadır. Sinaptik öncesi amakrin hücreleri, bipolar hücre terminallerini inhibe eder ve sinaptik sonrası RGH dendritlerini inhibe eder. Buna ek olarak, son zamanlarda, amakrin hücrelerinin, bazı çeşitlerin dopamin salgılaması parakrin bir işlevi olduğunu da göstermektedir (50,51).

Retinanın yapısı. Çubuk, koni ve özünde ışığa duyarlı gangliyon hücresi, ışık uyarılarını biyolojik süreçleri uyarabilen sinyallere dönüştürebilen üç farklı türde fotoreseptör hücresidir. Çubuklarda ve konilerde oluşan sinyaller, aşağı akım bipolar hücrelere ve daha sonra retina ganglion hücrelerine iletilir. (RGH'ler). RGH'ler daha sonra bilgileri optik sinir yoluyla belirli görme ile ilgili beyin bölgelerine aktarır (46).

Retina topografik olarak santral (makula) ve periferik (ekvator ve ora serrata) retinadan meydana gelir.

Periferik Retina

Yakın, orta, uzak ve uç perifer olmak üzere birbirinden ayrılır. Ekvator, yakın periferde 1,5 mm genişliğinde perifovea ile ora serrata arasında yeralan alandır. Uzak perifer ekvator ile ora serrata arasında kalan alandır. Ora serrata ise uç perifer olarak adlandırılır. Arka ve ön vasküler sistemlerin ayrılma noktasıdır ve lumbas'a nazalda 6 mm, temporalde 7 mm uzaklıkta bulunur. Retina tabakası ora serrataya 20-30 adet testere dişine benzer girintiler yaptığı için bu ismi almıştır. Ora serratada fotoreseptör bulunmaz (52).

Santral Retina (Makula)

Makula, retinanın tam merkezinde 5,5 mm çapında iki veya daha fazla gangliyon hücre tabakası içeren ve temporal damar ağları arasında yerleşmiş ksantofil pigmentli kısımdır. Umbo, foveola, fovea, parafovea ve perifovea alanlarından oluşur. Oksijenlenmiş karotenoidler, özellikle lütein ve zeoksantin,

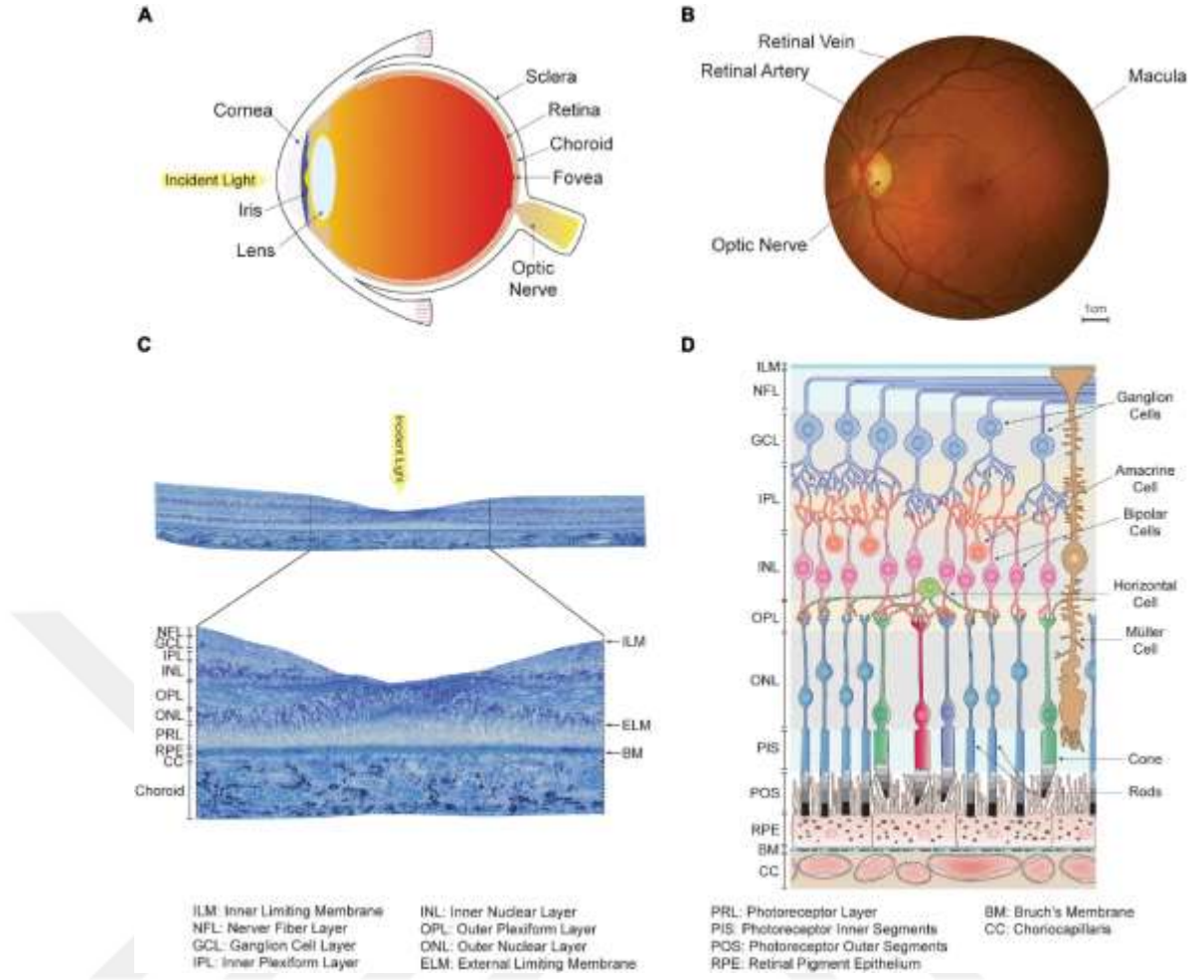
merkezi makula içinde birikir ve sarı rengi oluşturur (53). Bu görünümünden dolayı santral retina, makula lutea ya da sarı nokta olarak da adlandırılmaktadır. Makula'nın ana işlevi keskin, net ve düz bir görüş sağlamaktır. Merkezi görmemizin tamamından ve renkli görmemizin çoğundan sorumludur. Merkezi görmeden sorumlu olduğu için makula dejenerasyonu gibi makulayı içeren hastalıklar merkezi görme kaybına neden olur.

Fovea, makulanın merkezinde bulunan, gözün en önemli kısımlarından biridir. Çok sayıda koni hücresi içermesi sebebiyle görme keskinliğinin en iyi olduğu bölgedir (52).

Parafovea, fovea kenarını çevreleyen, 500 μm kalınlığındadır. Nükleer tabaka, ganglion hücreleri tabakası ve sinir lifleri tabakası çok kalındır. 4-6 tabaka ganglion ve 7-11 tabaka bipolar hücre içerir (52).

Umbo, makulanın tam santraline verilen isimdir. Umboda başlıca fotoreseptörler konilerdir. Konilerin en yüksek konsantrasyona sahip bölgesi olması sebebiyle retinanın en keskin görmeyi sağlayan bölümüdür. Oftalmoskopik olarak fovea reflexinden sorumludur (52).

Perifovea, parafovea'yı çevreleyen, 1500 μm çaplı bir bölgedir. Ganglion hücreleri bu bölgede periferik retinadaki benzeri olarak tek tabakaya iner (52).

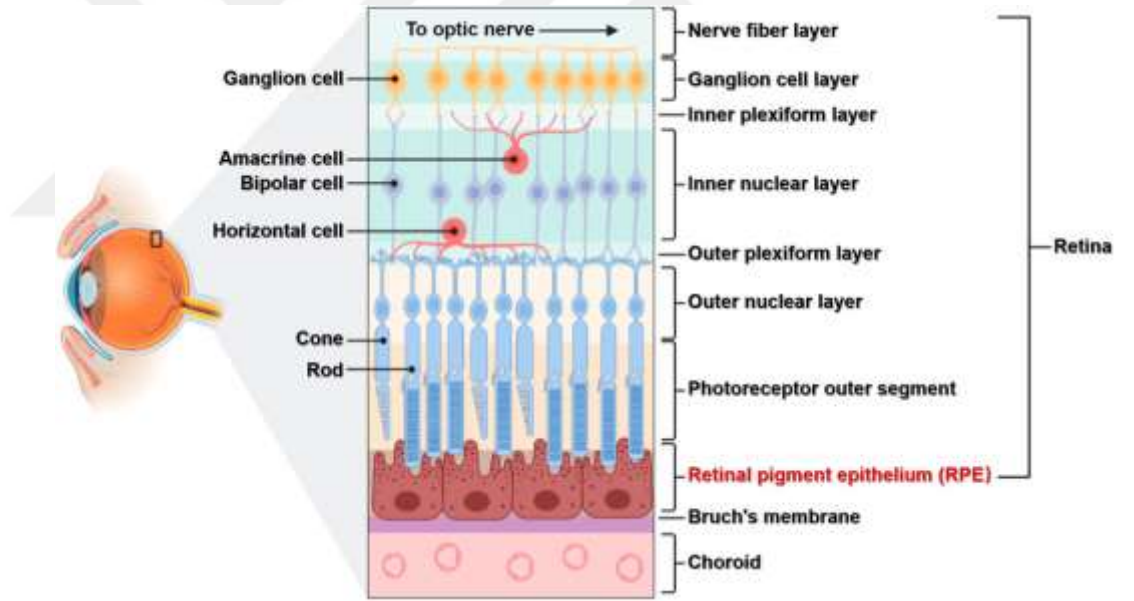


Şekil 2.2. İnsan gözünün ve retinanın organizasyonu (55)

2.1.4 Retina Pigment Epiteli (RPE)

Retina pigment epiteli (RPE), bruch membranı ile nörosensöryal retina arasında bulunan nöral ektodermden gelişmiş tek katlı hegzagonal şekilli hücre tabakasından oluşur. Optik sinir başından başlar ora serrataya uzanır, burdan da silyer cisim pigment epiteline kadar devam eder. Zaman içerisinde bazı dokularda RPE yoğunluğu değişebilir. Yaşlanma ile RPE hücrelerinin apoptotik oranı artar, özellikle makula bölgesinde apoptotik hücrelerde ciddi artış görülür. Periferde de yaşla birlikte RPE hücrelerinin sayısı azalır, daha kısa ve geniş şekil alırlar (60 μm çapında), foveada ise yaşa bağlı bir değişiklik gözlenmez burada RPE hücrelerinin sayısı yoğundur, ince uzun yapıda (14-16 μm genişliğinde, 10-14 μm çapında) ve geniş melanin içeren melanosomlara sahiplerdir. Nörosensöryal retina ve RPE, subretinal boşluk olarak adlandırılan potansiyel bir boşluk ile birbirinden ayrılır. Her bir RPE hücresinin apikal kısmındaki villöz çıkıntılar, fotoreseptör hücrelerinin dış kısımlarına sarılır. Yaklaşık olarak beş milyon melanin pigment hücresi bazal

laminaya sıkıca tutunmuştur (54,55). Bu laminadan kaynaklanan mikrofibriller, RPE'nin yüzey alanını 30 kat genişletir, böylelikle fotoreseptör hücreleri ile fonksiyonel ilişki sağlanması kolaylaşır. Her RPE hücresi yaklaşık 45 fotoreseptör hücresiyle temastadır. Fotoreseptörlerin yoğunluğu retinanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermesine karşın, her bir RPE hücresine karşılık gelen fotoreseptör sayısı sabit kalır. Her RPE hücresi üstteki fotoreseptör tabakasının hem seçici bir bariyeri hem de vejetatif bir düzenleyicisi olarak işlev görür (56). RPE, dış kan-retina bariyerini (KRB) oluşturur. İç KRB esas olarak endotelial hücrelerden oluşur. Komşu RPE hücreleri ve komşu endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, KRB'yi geçen sıvıların ve çözünen maddelerin sıkı kontrolünde ve ayrıca toksik moleküllerin ve plazma bileşenlerinin retinaya girmesini önlemede önemlidir. Bu nedenle, bu sızdırmazlık işlevi retinanın bütünlüğü için gereklidir (57).



Şekil 2.3. Retinanın katmanları ve retina pigment epiteli (58).

RPE kritik öneme sahip birçok görevde rol oynamaktadır;

- Kan- retina bariyeri
- Fotoreseptör dış segment fagositozu
- Transepitelyal transport
- Büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı
- Görsel siklus ve Vitamin A metabolizması

- f. İmmün fonksiyon
- g. Oksidatif strese karşı koruma

RPE, üstteki fotoreseptör tabakasının hem seçici bir bariyeri hem de vejetatif bir düzenleyicisi olarak işlev görmektedir. Böylelikle korunmasında önemli bir rol oynayan tek bir post-mitotik hücre tabakasıdır. Spesifik proteinlerin ekspresyonu ve aktivitesi ile besinlerin ve atık ürünlerin retinaya taşınmasını düzenler (59). Dış kan retina bariyeri rolündeki RPE, lateral plazma membran bariyer bağlantıları ve apikal ve/veya bazal plazma membranları içindeki özel taşıma proteinleri yoluyla iyonların, sıvıların ve metabolitlerin transepitelyal taşınmasını düzenler. Bu proteinlerin asimetrik dağılımı ve düzenlenmesini sağlar. Özellikle, RPE çeşitli iyonların (örn. Cl^- , K^+ , Na^+ , HCO_3^-) retinaya ve retinadan geçişini düzenler. Bu, hücre zarlarının polarizasyonunda hiperpolarizasyonunda, sıvı taşınmasında ve pH'ın düzenlenmesinde önemlidir (60,61). Taurin, alanin, glutamin ve lösin dahil olmak üzere bir dizi amino asit, RPE boyunca aktif olarak emilir, Glikoz, hem apikal hem de bazolateral RPE membranlarında bulunan GLUT1 glikoz taşıyıcısı aracılığıyla pasif olarak taşınır (62). Gazlar, koroidden fotoreseptörlere hareket eden yüksek oksijen seviyeleri ile hücre tabakası boyunca serbestçe yayılır.

Fotoreseptör dış segmentlerinin harcanan uçlarını sindirerek ve parçalayarak dış segment yenilenmesine katkıda bulunur, 70 yıllık bir yaşam süreci içinde tek bir RPE hücresi yaklaşık 3 milyar disk sindirir ve degrade eder. Dış retinayı aşırı yüksek (63,64). RPE'nin yüksek metabolik aktivitesi ile birlikte sürekli olarak görünür ışığa ve yüksek lokal oksijen gerilimlerine maruz kalması, proteinlere, DNA'ya ve lipidlere zarar verme potansiyeli olan reaktif oksijen türlerinin oluşumu için ideal bir ortam sağlar. Ayrıca, fotoreseptör dış bölümlerinin fagositozu, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu içerir. Oksidatif hasarı sınırlamak için retina/RPE üç ayrı savunma hattı geliştirmiştir. RPE, reaktif oksijen türlerini hücrel makromoleküllere zarar vermeden önce nötralize eden hem enzimik (örn. süperoksit dismutaz ve katalaz) hem de enzimik olmayan (örn. glutatyon, askorbat, a-tokoferol, karotenoidler, melanin) antioksidanlar içerir. Bu kontrollere rağmen oksidatif hasar kaçınılmazdır (65,66).

RPE'nin yaşlanması sırasında, hücre kaybı, pleomorfik değişiklikler ve intakt melanin granüllerinin kaybı, ve hücre içi lipofusin birikiminden kaynaklanan metabolik değişikliklerin meydana geldiği gösterilmektedir. Bu pigmentin son

derece fototoksik olduğu ve hücre ölümüne yol açan çeşitli oksidatif değışikliklerle bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Yaşa bağı makula dejenerasyonunun etiyolojisi karmaşık ve henüz çözülmemiş olsa da, RPE'deki hızlandırılmış yaşlanma benzeri değışikliklerin bu durumun gelişiminde rol oynaması muhtemeldir (56).

2.1.5 Retina Hastalıkları

Retina Dekolmanı

Retina dekolmanı (detaşmanı) nöral retina ve retina pigment epiteli arasındaki bağlantının bozulması ve bu iki tabakanın birbirinden ayrılmasıdır. Sıklıkla corpus vitreum'un retina'da oluşan bir delikten bu iki tabaka arasına girmesi ile bazen de çarpma veya düşme ile oluşan kanama sonucu ortaya çıkar. Gözde görme yönünde ışık çakması ve siyah lekelere sebep olur. Kanama olursa hasta siyah nokta yağmuru görebilir. Görme alanında gölge, retina'nın etkilenen kısımlarına bağı olarak, görme bozukluğu veya çarpık görüntü oluşabilir. Hemen tedavi edilmezse etkilenen göz kör olabilir. Küçük dekolmanlar için retina'yı bulunduğu ortamda birleştirmek gerekir; daha komplike retina dekolmanlarında corpus vitreum'un alınması gerekebilir (67).

Albinism

Albinism deri, saç ve /veya gözlerde melanin pigment miktarının azaldığı kalıtsal bir hastalıktır. Melanin gözün iris, retina, optik sinir ve göz kaslarının normal gelişiminde görev aldığı için, albinism gözlerde fotofobi (ışığa aşırı hassasiyet), strabismus (şaşılık), nistagmus (istemsiz hızlı göz hareketleri), görme kusuru, körlük ve astigmatisme neden olabilir. Albinism de ayrıca optik sinir bozukluğu da görülür. Normalde aksonları ipsilateral corpus geniculatum lateraleye giden temporal retinal ganglion hücrelerinin çoğunluğu kontralateral corpus geniculatum lateraleye gider ve böylece sağ ve sol temporal görme alanlarında çakışma oluşur (68).

Retinitis Pigmentosa

Pek çok farklı genetik mutasyona bağı, kalıtsal bir hastalık olan retinitis pigmentosa da pigment epitel hücreleri dökülerek periferik retina da çubuk hücrelerinin dejenerasyonuna yol açar, dolayısıyla periferik görme alanı gittikçe daralarak tünel görüntüsü halini alır (69).

2.2 Maküler Dejenerasyon

Maküler dejenerasyon genellikle yaşla, bazen genetik nedenlerle veya sigara kullanımına bağı olarak ortaya çıkan retina'nın makula bölgesinin

dejenerasyonudur. Görme alanının merkezi kısmında görme kaybı ya da bulanık görme sonucu kişi yüz tanıma, araba kullanma, okuma gibi günlük aktivitelerde zorlanır. Genellikle tam körlüğe yol açmaz. Görme kaybının tedavisi yoktur, ancak antioksidan tedaviler, sigaranın bırakılması, iyi beslenme ve egzersiz hastalığın ilerlemesini yavaşlatır (70).

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD), fotoreseptör RPE kompleksinin nörodejenerasyonunun neden olduğu görme kaybı ile karakterize kronik bir hastalıktır. Dünya çapında yaklaşık 200 milyon insanı etkiler, katarakt ve glokomdan sonra üçüncü sırada yer alan körlük nedenidir. YBMD, sanayileşmiş ülkelerde 65 yaş üstü kişilerde geri dönüşü olmayan görme kaybının en önemli nedenidir (19). Hastalık, tüm körlük vakalarının yaklaşık %9'unu oluşturmaktadır (20). Daha da önemlisi, YBMD prevalansı son yıllarda önemli ölçüde artış göstermektedir. 2040 yılında 288 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (19).

Yaş, YBMD gelişimi için ana risk faktörüdür; ancak sigara kullanımı, güneş ışığına maruz kalma, artmış vücut kitle indeksi, alkol tüketimi, hipertansiyon, hiperlipidemi, geçirilmiş katarakt cerrahisi, iris pigmentasyonu, lipid profil bozukluğu genetik faktörler ve oksidatif stres başlıca risk faktörleridir (71).

YBMD patogenezinin temelindeki mekanizmalar yeterince tanımlanamamıştır. Ancak, oksidatif stresin RPE hücrelerinin işlev bozukluğuna neden olduğu ve ekstraselüler debris birikimi ve drusen oluşumuna yol açtığı. Bunun sonucunda da bruch membranından besin geçişinin etkilenerek RPE'de atrofi meydana geldiği ve koroid tabakasında da koroidal neovasküler membranın (KNV) oluştuğu tahmin edilmektedir (71). Buna ek olarak YBMD patogenezinde inflamatuvar süreçlerin de rol aldığı düşünülmektedir. Sonuç olarak oksidatif hasar, lipofuksin birikimi, kronik inflamasyon ve apoptozis ile ilişkili kompleman sistemindeki mutasyonlar YBMD patogenezinde rol oynayan biyolojik yollarlardır (72).

YBMD, erken, orta ve geç aşamalara bölünmüştür. Geç YBMD, sırayla iki türe ayrılır: kuru tip (atrofik) YBMD ve ıslak tip (neovasküler, eksüdatif) YBMD. Hastaların %90'ında kuru tip, %10'unda ise yaş tip YBMD görülür (73).

Kuru Tip Atrofik YBMD

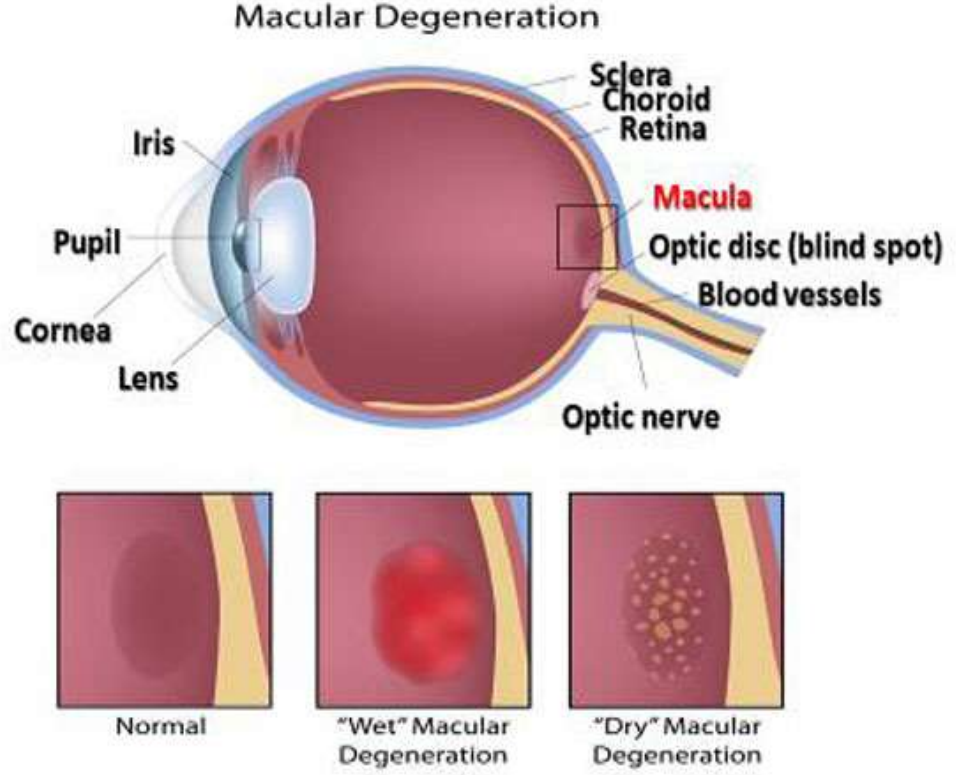
Kuru tip maküler dejenerasyon semptomları genellikle yavaş ve ağrısız gelişir. Düz çizgilerin yamuk görünmesi, bir veya iki gözde merkezi görüşte azalma, renkli görmede azalma, görüş alanında bulanık bir nokta görme kuru tip

YBMD'nin semptomları arasında yer alır. Maküler drusen varlığı, hastalığın kuru formunun ilk belirtisi olabilir ve hastalar sıklıkla asemptomatik olabilir. Drusenin boyutu ve sayısı, hastalığın ilerleme riskine katkıda bulunur. Küçük drusen çapı 63 µm'dan küçük, orta drusen 63 ila 124 µm ve büyük drusen ≥ 125 µm olarak sınıflandırılır. Kuru tip YBMD için bir tedavi yoktur, ancak ilerlememesi için önlemler alınabilmektedir. Ve sadece 1 gözde geç kuru tip YBMD varsa diğer gözün korunması sağlanabilir (74).

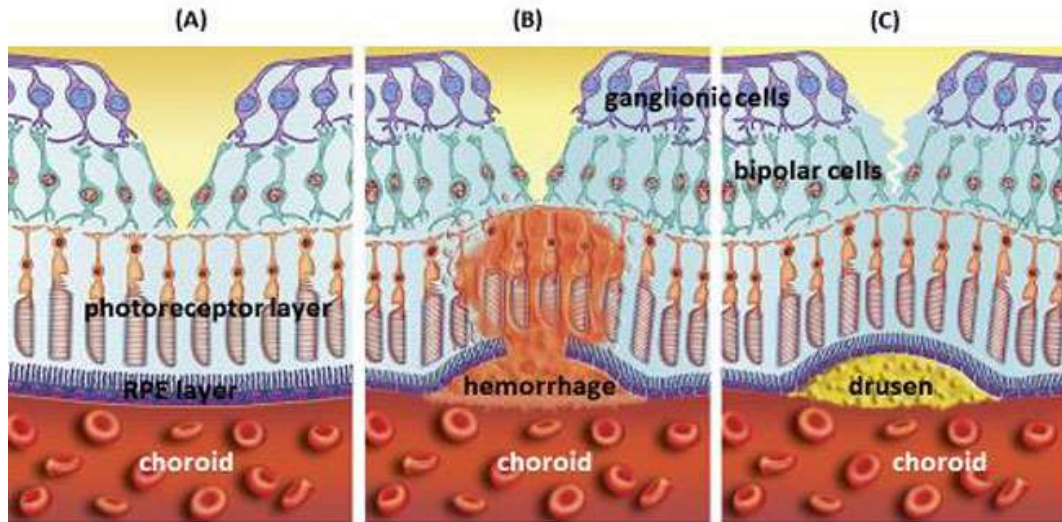
Kuru tip YBMD, retina altında büyüyen ve sızıntı yapan kan damarları ile karakterize olan ıslak tip (neovasküler) makula dejenerasyonuna ilerleyebilir. Genellikle akut veya giderek kötüleşebilen pigment epitel dekolmanı (PED), RPE yırtığı, diskiform skar ve vitreus hemorajisi gibi komplikasyonların daha hızlı gelişmesine yol açar. Bu semptomlar, ciddi distorsiyon, retina kanaması ve sıvı birikimi nedeniyle büyük bir merkezi skotom veya kör noktayı içerir. Hastalığın tanı ve takibinde hastaların her bir gözü bağımsız olarak test etmeleri gerekmektedir. Bozulma veya kuru tipden ıslak tip YBMD'ye ilerlemeyi gösterebilecek bir skotom varlığı gözlediğinde ilerlemeyi önleyici tedavilere başvurmaları gerekmektedir (75).

Islak Tip Neovasküler YBMD

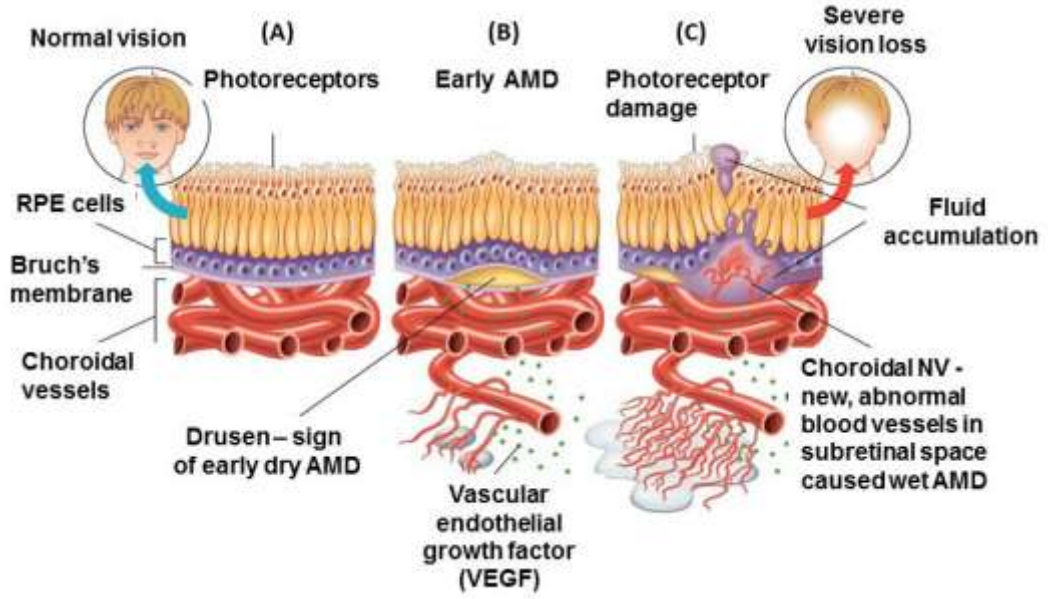
Islak tip YBMD, YBMD'nin neden olduğu akut körlüğün %90'ını oluşturur. Makulanın altında gelişen anormal kan damarlarının büyümesi ile karakterizedir. Kötü şekilde biçimlendirilmiş bu damarlar doku içinde istenmeyen sıvı sızıntısına neden olarak uygun olmayan vasküler bütünlüğe yol açar (73,76). Islak tip YBMD'nin ana tedavisi göz içine uygulanan anti-vasküler endotelial büyüme faktörü (anti-VEGF) enjeksiyonundan oluşmaktadır. Anti-VEGF ajanları, hastalık süreciyle mücadele etmek ve sızdıran anormal kan damarlarının zararlı etkilerini azaltmak için kullanılır. Birçok hastada görmeyi etkin şekilde stabilize ettiği ve görme keskinliğini artırdığı bilinmektedir. Ancak uygulanan göz içi enjeksiyon tedavilerinin, retina dekolmanı, yapısal göz hasarı, göz enfeksiyonu, katarakt gelişiminin hızlanması ve şiddetli görme kaybının da dahil olduğu komplikasyon riskleri mevcuttur. Bu nedenle yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (76).



Şekil 2.4. Toplam gözün ve makulanın üç farklı durumdaki enine kesit şeması (A) normal makula; (B) subretinal kanamalı eksüdatif YBMD'de makula; (C) kuru YBMD'de makulada drusen birikimi (77).



Şekil 2.5. Retina ve koroid (A) normal retinanın şeması; (B) ıslak tip YBMD belirtisi olarak yeni kan damarı oluşumu ve kanama; (C) kuru tip YBMD'nin erken bir özelliği olarak bruch zarı ve RPE tabakası arasında drusen birikimi (77).



Şekil 2.6. Sağlam RPE tabakası ile retina ve koroid (A) normal retinanın şeması; (B) kuru tip YBMD sırasında RPE tabakası ve Bruch zarı arasında drusen varlığı ve VEGF üretiminin indüklenmesi; (C) koroidde VEGF tarafından anormal yeni kan damarlarının oluşumu, bruch membranı ve RPE tabakasının bütünlüğünün bozulması, subretinal kanamaya, sıvı birikmesine ve son olarak YBMD'nin ileri formunda görme bozukluğuna yol açar. (77).

2.2.1 YBMD Teşhis Yöntemleri

YBMD erken evrelerinde nadiren semptomlara neden olduğundan, düzenli göz muayeneleri, hastalığı tespit etmek ve tedaviye en etkili şekilde başlamak için çok önemlidir. Bir göz muayenesi sırasında, retina ve makuladaki değişiklikler kontrol edilir (78).

Görsel alan testi: Bir Amsler ızgarası, ortasında büyük bir nokta bulunan düz çizgilerden oluşan dama tahtası benzeri bir ızgara kullanır. Izgara üzerinde bulanık, dalgalı veya kesik görünen çizgiler veya bölümler YBMD'ye işaret etmektedir (78).

Göz arkası muayenesi: Göz damlaları ile göz bebekleri genişletir ve özel lensler yardımıyla retina altında oluşan drusen, sarı birikintilerin neden olduğu benekli bir görünüm kontrol edilir. Makula dejenerasyonu olan kişilerde sıklıkla çok sayıda drusen bulunur.

Florescein anjiyografi: Koldan iv olarak sarı renkli bir boya enjekte edilir. Boya, gözdeki kan damarlarına gider ve onları vurgular. Boya kan damarlarında dolaşırken özel bir kamera ile görüntülenir. Görüntüler, ıslak tip makula

dejenerasyonunun bir işareti olan retina değişiklikleri veya anormal kan damarlarının olup olmadığını gösterir. (78)

Optik koherens tomografi (OKT): Bu noninvaziv görüntüleme testi, retina ve makula dahil olmak üzere gözün arka kısmının ayrıntılı görüntülerini alır. Retina inceltme, kalınlaşma veya şişme alanlarını tanımlar (78).

Optik koherens tomografi anjiyografi (OKTA): Bu tanı aracı, lazer ışığı yansımaları (floresin boyası yerine) ve OKT tarama cihazını kullanır. Sadece birkaç dakika sürer ve gözden geçen kan akışının 3 boyutlu görüntülerini üretir (78).

2.2.2 YBMD Tedavisi

YBMD'nin kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, erken tanı ile hastalığın seyrinin yavaşlatılması ve semptomların şiddetinin azaltılarak yaşam kalitesinin artırılması hedeflenmektedir. Ancak başarılı tedavilerde bile, YBMD semptomları sıklıkla geri dönmektedir. Son yıllarda majör duyarlılık genlerinin tanımlanması, hastalık patogeneğinde kompleman aracılı inflamasyonun ve oksidatif stresin rolünün anlaşılması ile yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmesi için altta yatan mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyonunun tedavisinde FDA onaylı tek tedavi şekli olan, formülasyonunda, C, E vitaminleri, lutein, çinko, bakır, zeaksantin ve beta karoten bulunan besin takviyesi önerilmektedir (79). AREDS ağır tip YBMD'ü geliştirme riski yüksek olan bireylerde ilerlemeyi yavaşlatmaktadır. Islak tip YBMD'nin ana tedavisinde anti-vasküler endotelial büyüme faktörü (anti-VEGF) enjekte edilmektedir. Gözdeki yüksek VEGF seviyesi, ıslak tip YBMD'deki hasarın çoğuna neden olan anormal kan damarlarının oluşumuyla bağlantılıdır. Anti-VEGF ajanları, hastalık süreciyle mücadele etmek ve sızdıran anormal kan damarlarının zararlı etkilerini azaltmak için kullanılır. Ayrıca birçok hastada görmeyi etkin bir şekilde stabilize ettiği, hatta görme keskinliğini artırdığı bilinmektedir (80).

Fotodinamik terapi (FDT), lazer fotokoagülasyon tedavisi de YBMD de kullanılan tedaviler arasında yerini almaktadır. Fotodinamik terapi sırasında, gözdeki anormal kan damarlarını yok etmek için enjekte edilebilir ışığa duyarlı ilaç ve lazer kombinasyonu kullanılır. Lazer fotokoagülasyon tedavisinde ise, sızıntıları gidermek amacıyla argon laseri kullanılarak yüksek enerjili ışın uygulanır. Islak tip YBMD'nin tedavisinde lazer fotokoagülasyon tedavisi bugün için ancak foveadan oldukça uzak, sınırları belirgin neovasküler lezyonlarda seyrek olarak kullanılmaktadır. Islak tip YBMD tedavileri, göz enfeksiyonu, retina dekolmanı,

yapısal göz hasarı, daha hızlı katarakt başlangıcı ve şiddetli görme kaybı da dahil olmak üzere komplikasyon riskleri taşımaktadır. Bu nedenle yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (81).

2.2.3 Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu ve Apoptoz

Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda drusenin oluşumu ile ilgili olarak çeşitli varsayımlar öne sürülmüştür. Burns ve Feeney bazı drusenlerin apoptoz yolu ile bruch membranı üzerine dökülmüş olan RPE parçalarından oluştuğunu ileri sürmüşlerdir (82,83). Yaşa bağlı makula dejenerasyonunun erken dönemlerinde RPE'de metabolize olmayan materyalin birikimi ile bu hücrelerde apoptoz meydana gelmektedir. Apoptotik RPE hücrelerinin parçaları bruch membranında birikmekte ve sert drusenleri oluşturmaktadır (84). YBMD sonucu gelişen koroidal neovasküler membranlar incelendiğinde vaskülarizasyonu fazla olan membranlarda RPE hücreleri ve endotel hücrelerinde fazla miktarda apoptoz görülürken fibrotik membranlarda daha az apoptoz izlenmiştir. Apoptoz ile RPE hücrelerinin kaybı ortamdaki anjiyojenik faktörlerin azalmasına neden olmakta ve membranlar fibrotik bir yapı kazanmaktadır (85).

2.3 Apoptoz

Apoptoz, 1842 yılında ilk olarak karada ve suda yaşayan organizmaların hücrelerinin sağlıklı gelişimleri sırasında gerçekleşen hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Apoptoz, çok hücreli organizmalarda sağlıklı dokuların gelişimi ve devamlılığı için kritik öneme sahiptir. Ölmeye programlanmış olan hücrelerin, genetik kontrol mekanizmaları aracılığıyla, kendi sitoplazmik proteinlerini ve DNA'larını parçalayacak enzimleri aktive eden hücre ölüm sürecidir. Programlı hücre ölümü olup pek çok patolojik ve fizyolojik süreçte rol alır. Apoptozda morfolojik olarak membran bütünlüğü korunur, hücre büzülür ve komşu hücrelerle olan bağlantısını keser. Hücre apoptotik cisimcikler oluşturarak parçalanır ve fagositoza uğrar (86).

Apoptoz, embriyonik gelişimden itibaren doku homeostazisindeki görevini, organların düzenlenmesi, hasarlı ve yaşlı hücrelerin eliminasyonu hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol ederek sağlamaktadır (87-89). Apoptotik yollardaki defektler ve meydana gelen mutasyonlar, diyabet ve parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açarken, apoptozun azalması ise tümör gelişiminde rol oynamaktadır (90).

Apoptozis fizyolojik veya patolojik nedenlere bağı gelişim göstermektedir. Fizyolojik nedenlerin başında embriyogenezde hücrelerin programlı ölümü gelir. Hormona bağı doku involüsyonu, çoğalma gösteren hücre gruplarında hücre sayısının devamlılığının sağlanması, self-reaktif lenfositlerin olgunlaştıktan sonra ya da önce elimine edilmesi, sitotoksik T hücreleri tarafından indüklenen hücre ölümü, akut inflamatuvar yanıtta nötrofiller veya immün yanıtta görev alan konak hücrelerin ölümü apoptozun fizyolojik nedenleri arasında yer alır (91). Patolojik nedenlere bağı apoptozun başında ise radyasyon, hafif derecede hipoksi, sitotoksik kanser ilaçları ve ısı gibi etkenler ile oluşan DNA hasarı gelir. Santral sinir sistemi ve diğr organlarda katlanmış proteinlerin birikimi, HIV enfeksiyonu gibi bazı enfeksiyonlara bağı hücre ölümü ve tümöre bağı hücre ölümü apoptozun patolojik nedenleri arasında yer alır HIV (91).

2.3.1 Apoptoz Morfolojisi

Apoptoz sırasında bir hücre genel modeli takip eden değışikliklere uğrar. ilk olarak hücre mikrovillusları içeren yüzey oluşumlarını kaybederek kendisini komşu hücrelerden izole eder. Daha sonra hücre büzüşerek boyutlarını küçültür. Bu aşamada sitoplazması ve çekirdeğı yoğunlaşır ve hacmini önemli ölçüde azaltarak sıkı paketlenmeler gösterir. Daha sonra sitoplazmik kabarcıklar ve apoptotik cisimler oluşmaya başlar, plazma zarı, hücre sitoplazmasının bir kısmını çevreleyen apoptotik cisimler oluşturur. Son olarak bu cisimler fagositlerin lizozomal enzimleri tarafından sindirilir (92).

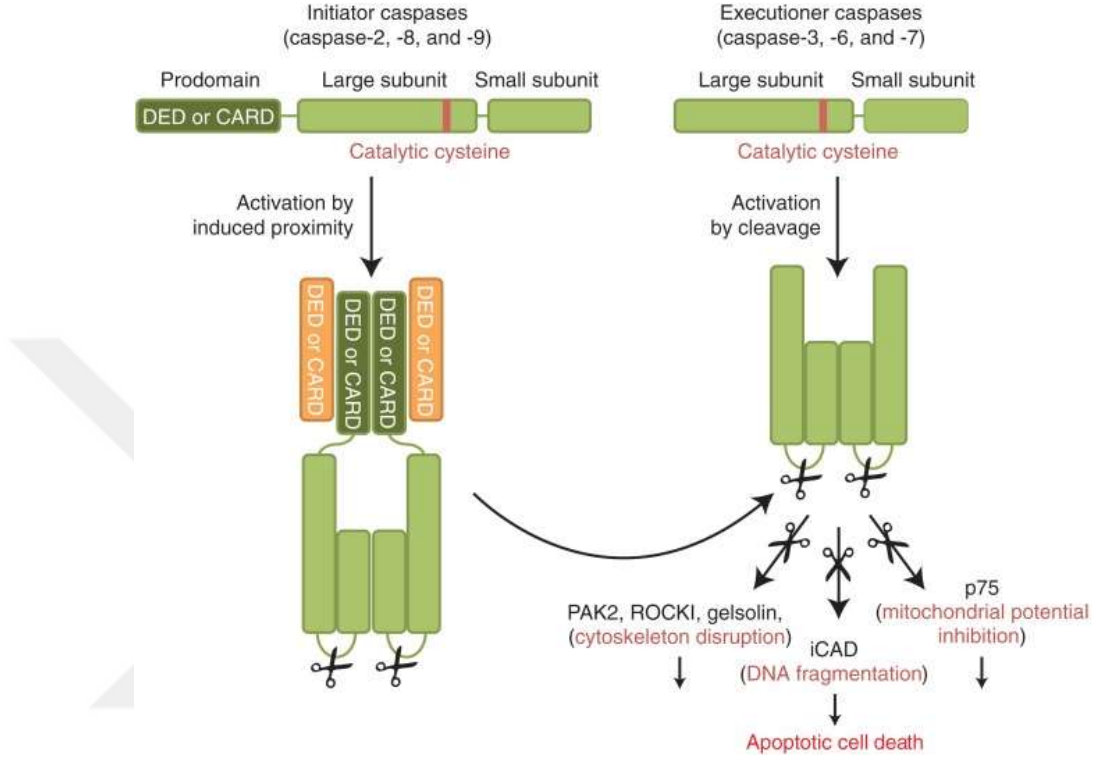
2.3.1 Apoptozun Moleküler Düzenleyicileri

Apoptozun her basamağında birçok protein birlikte görev yapmaktadır. En etkili proteinler, kaspazlar olmak üzere, Bcl-2 ailesi, p53 ve TNF ailesi apoptozun moleküler düzenlenmesine katkıda bulunurlar (93).

Kaspazlar

Kaspazlar; apoptoz 1-3'ün başlatılması ve yürütülmesi için gerekli olan, evrimsel olarak korunmuş, aspartat spesifik sistein proteazlarının geniş bir ailesidir. Çoğu apoptozda rol alan 14 farklı kaspaz türü bulunmaktadır. Üç fonksiyonel gruba ayrılır: başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10), uygulayıcı kaspazlar (kaspaz 3, 6 ve 7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1, 4, 5). Başlatıcı kaspazlar apoptoz sinyalini başlatırken, uygulayıcı kaspazlar apoptoza yol açan kütle proteolizini gerçekleştirir. İnflamatuvar kaspazlar apoptozda işlev görmezler, daha çok inflamatuvar sitokin sinyalleşmesinde ve piroptoz gibi diğr hücre ölümü tiplerinde rol oynarlar (93,94).

Başlangıçta inaktif olarak sentezlenen kaspazlar pro-kaspazlar, granzim B'ye, ölüm reseptörlerine ve apoptozom uyaranlarına cevap olarak hızla bölünür ve aktive olur. Kaspazlar daha sonra aşağı akış kaspazları, plazma membran proteinleri, nükleer proteinler ve mitokondriyal proteinler dahil olmak üzere bir dizi substratı parçalar ve sonuçta hücre ölümüne yol açarlar (93).



Şekil 2.8. Kaspaz Mekanizması (86)

2.3.2 Apoptoz Mekanizması

Apoptoz hücre içi kaspazlar ile yönlendirilen, ölüm reseptörleri aracılı ekstresek ve mitokondri ilişkili intrinsek yolak olmak üzere iki farklı mekanizma üzerinden tetiklenmektedir. Her iki mekanizmanın temelinde de hücre içinde inaktif olarak bulunan kaspazların aktiflenerek apoptotik sinyallerin oluşması bulunur (95).

Ekstresek (Dış Ölüm Reseptör) Yolak

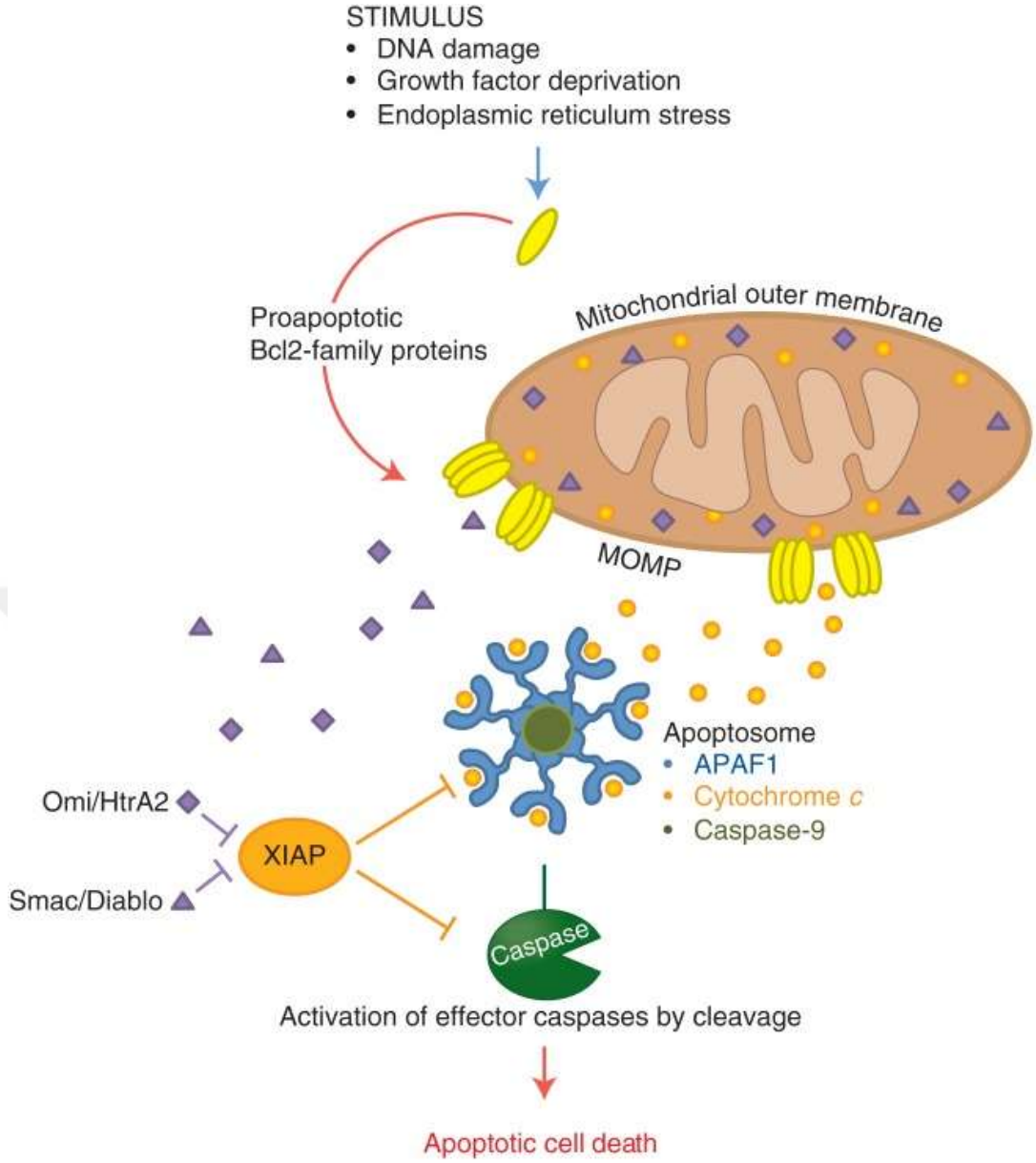
Hücre membranının yüzeyinde bulunan kaspaz aktivasyonunu sağlayan ölüm reseptörleri (FasR, Fas reseptör; TNFR1, Tümör nekroz faktör reseptörü-1; DR4/5, ölüm reseptörü 4/5) ölüm ligandlarına (FasL, Fas ligand; TNF α , tümör nekrozis faktör alfa; TRAIL, tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptoz-indükleyici ligand) bağlanır bunu birkaç ölüm reseptörü ile gerçekleştirir (96). Ölüm reseptörleri, ligand-reseptör etkileşimi sonucu, FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) ve TRADD (TNF reseptör ilişkili ölüm domaini) aktive olur. Başlatıcı kaspazlardan pro-kaspaz

8 ve 10'u aktif form olan kaspaz 8 ve 10'a dönüştürür. Aktiflenen başlatıcı kaspazlar pro-kaspaz 3'ü kaspaz-3'e dönüştürür ve hücre apoptoza sürüklenir (97).

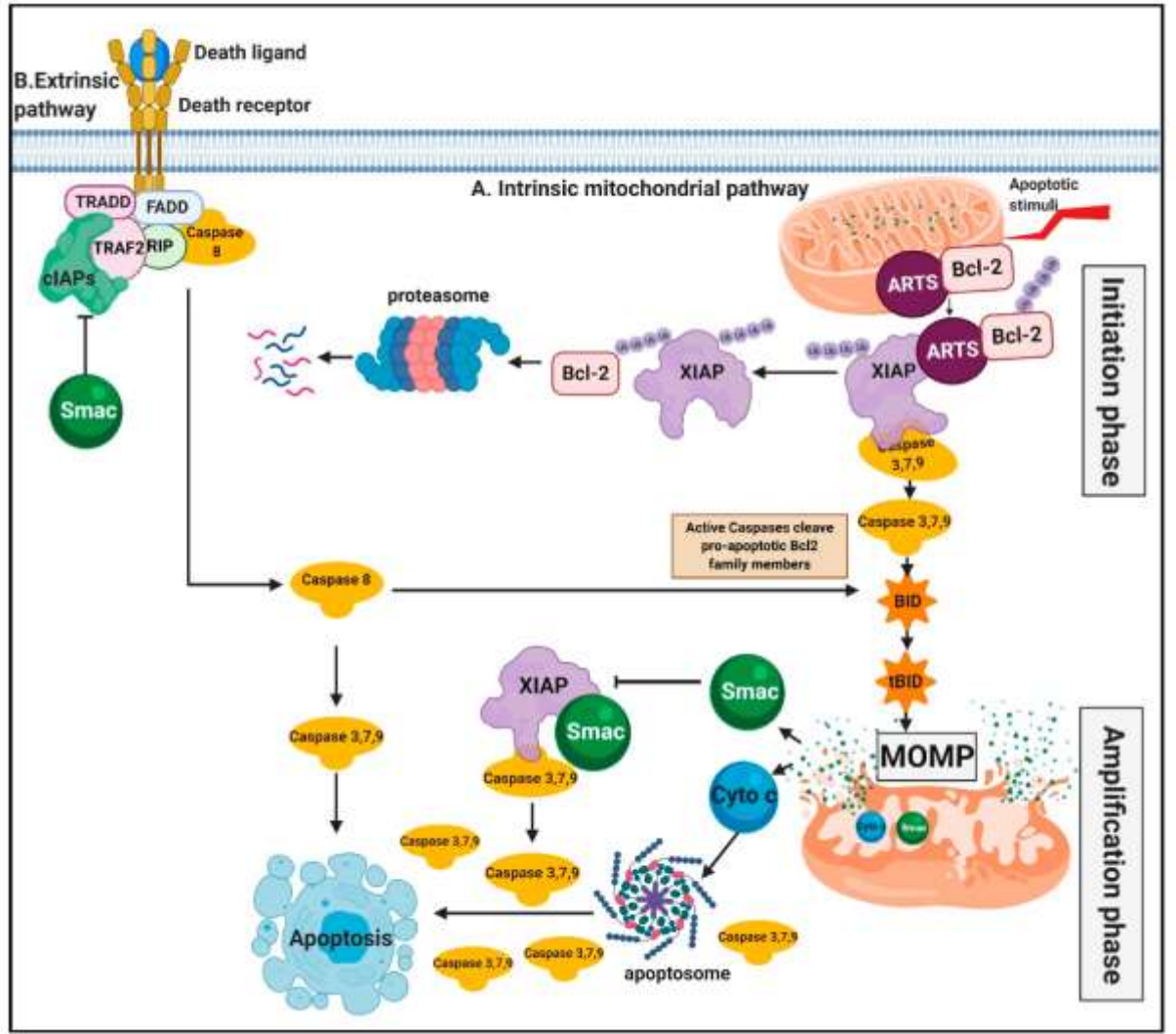
İntrensek (Mitokondrial) Yolak

Apoptozun mitokondriyal yolu, omurgalılarda en yaygın apoptoz mekanizmasıdır. DNA hasarı, hipoksi, Ca^{+2} sitosolik aşırı yüksek konsantrasyonları, büyüme faktörü yoksunluğu, endoplazmik retikulum stresi, serbest radikaller, radyasyon, viral enfeksiyonlar ve oksidatif stres iç mitokondriyal yolun başlaması için tetikleyicilerdir (90,98).

Mitokondriyal apoptotik yolda, hücrel streslere yanıt olarak, Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyeleri, mitokondriyal dış membran geçirgenliğini (MOMP) indükleyerek, normalde mitokondriyal zar boşluğunda (sitokrom c, Smac ve dahil) tutulan proapoptotik faktörlerin sitozol içine salınmasına izin verir. Sitozolde, sitokrom c APAF1'e bağlanır, onun oligomerizasyonunu tetikler ve daha sonra kaspaz aktivasyonunu başlatır. Katalitik olarak aktif kaspaz-9, ölüm kaspazları-3 ve 7'yi parçalar ve etkinleştirir. Sitozolde salındıktan sonra, Smac ve Omi kaspaz inhibitörü X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP)'ye bağlanır ve onu inhibe eder. Bunu yaparken, kaspaz-9, 3 ve 7'nin XIAP inhibisyonunu hafifletir ve apoptozom tarafından genel kaspaz aktivasyonunu güçlendirir. Farklı yollar olarak görülmelerine ve bağımsız olarak hareket edebilmelerine rağmen bu iki yol pek çok düzeyde birbiriyle iletişime geçebilmektedir. Yapılan pek çok çalışmada kaspaz-8'in TNF ölüm reseptör yolunda, kaspaz-9'un da mitokondriyal yolda apikal kaspaz olduğunu kanıtlanmaktadır (99,100).



Şekil 2.9. Apoptozun mitokondriyal yolağı (86)



Şekil 2.10. Apoptozun ekstrense ve intrensek yolları (101)

2.3.3 Apoptozis Belirleme Yöntemleri

Apoptoz sırasında hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Bu değişimle immünohistokimyasal (TUNEL), biyokimyasal, immünojenik ve moleküler yöntemler ile saptanır (agoroz jel elektroforezi), (ELISA, Kaspaz-3) (102).

2.3.4 Apoptoz ve Oksidatif Stres

Apoptoz birçok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır. Son çalışmalar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve ortaya çıkan oksidatif stresin apoptozda önemli rollere sahip olduğunu göstermiştir. ROS'un düzenlediği mekanizmalar tipik olarak reseptör aktivasyonunu, Bcl-2 ailesi proteinlerini, kaspaz aktivasyonunu, ve mitokondriyal disfonksiyonu içerir. Mitojenle aktive olan protein kinazlar, protein kinaz-B/C, I-B kinaz inhibitörü ve bunlara karşılık gelen fosfatazlar dahil olmak üzere çeşitli protein kinaz aktivitelerine bağlı olarak apoptotik programı modüle

ederler. O₂, nitrik oksit ve türevleri, fotodinamik terapi, endotoksin kaynaklı iltihaplanma, ultraviyole-A, iyonlaştırıcı radyasyonlar, sigara dumanı, yüksek oksijen tedavisi veya iskemi/reperfüzyon sonucu akciğerde ve diğer organlarda üretilen ROS, doku hasarı ile ilişkili hücre ölüm yollarını uyarabilir. Apoptozun üç fonksiyonel aşamasının tümü düzenleyici kontrollerin etkisi altındadır. Bu nedenle, oksidatif stres ve apoptozun yakından bağlantılı fizyolojik fenomenler olduğunu ve AIDS, otoimmünite, kanser, diyabet, alzheimer, parkinson, kalp ve beyin iskemisi gibi bazı kronik hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadığını destekler (103).

2.4 Oksidatif Stres

Oksidatif stres, serbest radikallerin oluşumu ile bunların ortadan kaldırılmasından sorumlu endojen antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik sonucunda ortaya çıkar. Bu serbest radikaller, DNA, lipidler, proteinler ve nükleik asitlerin, oksijen veya azot türlerinden zarar görmesine neden olur. Yaşlanmanın altında yatan kesin hücresel mekanizmalar hala belirsizdir, ancak oksidatif hasarın, organların, dokuların ve hücrelerin işlev kaybına neden olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres, amyotrofik lateral skleroz (ALS), parkinson hastalığı (PH), alzheimer hastalığı (AH) ve huntington hastalığı (HH) dahil olmak üzere çoklu nörodejeneratif bozuklukların gelişiminde ve ilerlemesinde katkı sağlamaktadır (104,105). Bunun yanı sıra yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD), glokom, diyabetik retinopati (DR) ve retinal ven tıkanıklığı (RVO) gibi retina hastalıklarının gelişmesinde ve hızlanmasında da kritik öneme sahiptir. Fazla miktarda reaktif oksijen türü (ROS), retina pigment epitelinde (RPE), endotel hücrelerinde ve retina ganglion hücrelerinde (RGH'ler) fonksiyonel ve morfolojik bozukluklara yol açabilir (9).

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

ROS; dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren atom veya moleküllerdir. Elektronlar, yörüngesinde çiftler halinde bulunduğunda bileşikler kimyasal açıdan daha kararlıdır. Serbest radikaller sahip olduğu eksik elektronlardan dolayı kararsız haldedirler ve diğer moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girerek yapılarını bozabilirler. ROS, çeşitli enzimatik ve oksidasyon reaksiyonlarının süreçleri sırasında üretilir. Mitokondriyal solunum zinciri, ROS üretiminin ana kaynağıdır (106). Mitokondri iç zarında elektronlar taşınır ve oksijen suya dönüştürülür. Hipoksik koşullar altında, bu işlem gerçekleştirilmez, bu da süperoksit anyonlarının üretiminin artmasına neden olur (107,108). Bununla birlikte, elektron taşıma

sistemi (ETS) tamamen verimli değildir, en uygun koşullar altında bile bazal düzeyde elektron sızıntısı gerçekleşmektedir. İstenmeyen elektron sızıntısının moleküler oksijenle reaksiyonu, hücrel ROS üretimini büyük ölçüde arttırmaktadır (109)

Oksijen (O_2), yaşamsal fonksiyonların kaynağıdır, aynı zamanda başlıca serbest radikal kaynağıdır. O_2 farklı faktörlerin etkisi altındayken veya yüksek konsantrasyonlarda, süperoksit (O_2^-) radikali, singlet oksijen (O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH) radikali gibi ROS oluşumuna sebep olmaktadır (110).

Süperoksit radikali: Toksik etkisi olmayan O_2 aerobik hücre metabolizması sonucunda 1 elektron almış halidir. H_2O_2 kaynağıdır, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi yardımı ile H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürülür (5).

Hidroksil Radikali: Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarının ürünü olan hidroksil radikali en toksik reaktiftir. Nükleik asitler, amino asitler, fosfolipidler, organik asitler, şekerler ve lipoproteinlerin de içinde olduğu çok sayıda madde ile reaksiyon oluşturmalarına karşın özelleşmiş bir antioksidanları yoktur. Lipoproteinlere etki ederek hücre membranlarında hasar oluşturur aynı zamanda protein oksidasyonuna neden olarak hücre içi normal süreçleri bozabilir (111, 112).

Hidrojen Peroksit: Süperoksidin SOD enzimi aracılığıyla veya spontan olarak üretilen uzun ömürlü bir moleküldür. Eşlenmemiş elektron içermediği için serbest radikal sayılmamaktadır. Ancak, süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve hasar verici serbest radikal olan hidroksil radikali oluşumuna neden olduğu için reaktif oksijen türü sayılmaktadır (113). Süperoksitin aksine, hücre membranıyla korunan yapılara kolaylıkla erişim sağlayabilmektedir, bu sayede süperoksitin ulaşamadığı yerlerde hidroksil radikalini oluşturmaktadır, Buna ek olarak Fe^{+2} iyonları ile girdiği reaksiyonlar sonucunda da hidroksil radikali üretimine neden olabilmektedir (113).

2.4.1 H_2O_2 ve Nörodejenerasyon

Oksidatif stres, nörodejenerasyon patolojileri dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların ayırt edici özelliğidir. H_2O_2 genellikle nörodejeneratif bozukluklarda redoksle düzenlenen olayların merkezi oyuncusu olarak kabul edilir (114). ROS ve hastalık arasında doğrudan bir bağlantı vardır. Süperoksit anyon radikallerini H_2O_2 ve oksijene dönüştürerek redoks homeostazında rol oynayan bir enzim olan SOD ile ilişkili patoloji tarafından sağlanır. SOD1'deki mutasyonların ALS'ye neden olduğu, motor nöronlardaki SOD1 agregasyonu, oksidatif stresin oluşabileceği

mitokondrideki serbest sisteinlerinin oksidasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (114). Ayrıca, down sendromunda kodlayan genin üçüncü bir kopyasına bağlı olarak SOD1'in aşırı aktivitesi, nöronal ölümü teşvik etmek için yeterli toksik seviyelere ulaşabilen H₂O₂ birikimi ile sonuçlanır. AH'de oksidatif stresi içeren çok sayıda kanıt vardır. Özellikle, peroksiredoksin seviyeleri AH'de değişir ve lipid peroksidasyonu, beyin amiloid beta (A β) plak yükü ile pozitif korelasyon halindedir bu durum, ROS'un AH patogeneze bir katkısı olduğunu düşündürür (115). Ayrıca, huntington hastalığında oksidatif hasar, düşük moleküler ağırlıklı antioksidan metabolizmasını ve azaltılmış askorbat alımını tehlikeye atar ve serbest radikallerin üretimini yükseltir. Aynı zamanda parkinson hastalığı ve ROS patlamasının nörodejenerasyona eşlik ettiği prion patolojisinde redoks dengesizliğini düşündürmektedir (116).

Antioksidan uygulamasıyla ROS'un temizlenmesi, nörodejenerasyon dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için geçerli bir terapötik strateji oluşturmaktadır (116).

2.4.2 Serbest Oksijen Türlerinin Retina Üzerine Etkileri

Retina ve retina pigment epitel kronik oksidatif strese maruz kalır. Işığa maruz kalma, yüksek oksijen tüketimini, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu ve fotoreseptör dış segmentlerinin fagositozunu indükler, bu da günlük olarak yüksek seviyelerde serbest radikallerin üretilmesine neden olur. Artan oksidatif stres ve ilerleyici dejenerasyon, YBMD, diyabetik retinopati ve glokom ile ilişkilidir (9). Fotoreseptörlerin dış segment disklerinin yaklaşık %10'luk kısmı her gün yenilenmektedir. Fotoreseptör dış segment disk membranları, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksidasyona uğrarlar ve yapıları bozulur. Bu etkilenme merkezi retinada, özellikle makulada ve ışık maruziyetinin artmasının bir sonucu olarak daha fazladır (72,73). Lutein ve zeaksantin maküler pigmentleri, retinayı serbest oksijen türlerine karşı korumaktadır. Lutein ve zeaksantin, reaktif singlet oksijen molekülünü etkisizleştirir ve mavi ışığı, optik bir filtre gibi davranarak engeller (73,74).

2.4.3 Oksidatif Stres Modelleri

Oksidatif stresinin modellenmesine yönelik en yaygın yaklaşımlar, birincil nöral hücre kültürlerinin, beyin dokusu eksplantlarının, nöral hücre hatlarının hiper veya hipoksi, enerji kaynaklarının eksikliği (glikoz) gibi pro-oksidatif koşullara maruz bırakılması ve harici prooksidanların eklenmesi aracılığıyla oluşturulması (117-

119). Farklı deneysel modeller arasında, hücre veya doku kültürleri, nöral hücrelerin oksidatif durumundaki değişiklikleri doğrudan ölçmek için benzersiz bir olanak sağlar ve doku/hücre kültürünü, oksidatif stresin patolojik bir sürece dahil edilmesiyle ilgili olarak tercih edilen model haline getirir (118,120).

Hücre kültüründe oksidatif stresin etkilerini incelemek için farklı hücre tipleri kullanılmaktadır. Farklı hücre türlerinin prooksidatif ajanlara tabi tutulması, farklı beyin hücrelerinin belirli hastalıkların patogeneğinde yer alan oksidatif hasarlara duyarlılığındaki olası farklılıkların araştırılmasına izin verir. Oksijen ve glikoz yoksunluğu aracılığıyla, oligodendrositler de oluşturulan oksidatif stres modeli ile oksijen ve glikoz yoksunluğunun nöronlarda mitokondriyal disfonksiyonu indüklediğini göstermektedir (121,122).

Kültürlenmiş nöron hücrelerinde amiloid beta peptitleri kaynaklı toksisitenin, doğrudan oksidatif strese bağlı etkileşimlerden kaynaklandığı gösterilmiştir (123). Bu nedenle, hücre kültürü modellerinin kullanımı, alzheimer hastalığı gibi nörolojik bozukluklarla ilişkili mekanizmalar hakkındaki hipotezlerin denenmesine imkan sağlar.

Beta amiloidin toksisitesi, nöronal hücre hatları kullanılarak A β 'nın neden olduğu nörodejenerasyon mekanizmalarının anlaşılmasına ortam sağlamaktadır. Farklı A β peptitlerine maruz bırakılan birincil nöronal kültürler, nöral hücre dizileri ve organotipik beyin kültürleri üzerine yapılan çalışmalar, alzheimer hastalığında oksidatif stresin gelişiminde A β 'nın olası rolünü destekleyen veriler sağlamıştır (124,125). Beta peptitlerin artan ROS üretimine, lipidlere ve proteinlere, oksidatif hasara, antioksidan savunma değişikliklerine ve oksidatif strese bağlı gen ekspresyonu değişikliklerine neden olma yeteneği, birçok araştırma da kanıtlanmıştır.

Prion hastalıkları, proteaza dirençli amiloid benzeri lifler oluşturan ve beyinde nöronal hücre ölümüne neden olan prion proteininin kendi kendine kümelenen izoformunun üretimi ile karakterize edilir. Oksidatif hasar belirteçlerinin artan seviyeleri bu nörodejeneratif bozukluklarda oksidatif stresin rol oynadığını düşündürmüştür. PrP'nin 106-126 amino asidine karşılık gelen sentetik peptidin toksisitesi, farklı gruplar tarafından prionların nörotoksitesini taklit etmek için kullanılır. Bu peptid ile nöronal ve astroglial hücre hatlarında tetiklenen oksidatif stres Prion hastalığının patogeneğini modellemek için imkan sağlamaktadır (126).

Huntington hastalarından ölüm sonrası beyin dokusunda mitokondriyal kompleks II'nin azalmış aktivitesi tespit edilmiştir. Hastaların korteks ve striatal doku örneklerinde izoprostanlar ve 3-nitropropionik asit (3-NP) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin artan seviyeleri tespit edilmiştir. Bu nedenle 3-NP kompleks II huntington ile ilişkili oksidatif stresin modellenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kültürlerde 3-NP ile indüklenen nörotoksisite çalışmaları, oksidatif hasarın nöronal hücre ölümü mekanizmasında yer aldığını ve HH ile ilişkili oksidatif stresin ayırt edici özelliklerini açıklayabileceğini göstermiştir (127,128).

Parkinson hastalığında oksidatif hasarın biyolojik belirteçleri öncelikle nigrostriatal sistemde bulunur. Dopaminerjik nöronların kaybı beyindeki oksidatif stresin olası bir nedeni olarak dopamin metabolizmasındaki bozulmaları işaret eder. 6-hidroksidopaminin (6-OHDA) toksisitesi ile oluşturulan oksidatif stres ile PH modellemesine imkan sağlamaktadır (129, 130). Buna ek olarak N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), parkinsonizm etkeni olarak tanımlanmıştır (131). Hücre kültürü ve hayvan modellerinde, MPTP nörotoksitesi ile oksidatif stres oluşturularak PH modellemesi yapılmasına imkan sağlanmıştır (130). Buna ek olarak, deneysel PH modeli oluşturmak ve hastalığın mekanizmasını araştırmak amacıyla kullanılan rotenon, organik bir pestisiddir. İnsan nöroblastoma hücre serisi olan SH-SY5Y hücrelerinde rotenon toksisitesi ile oluşturulan oksidatif hasar ile rotenonun SH-SY5Y hücrelerinde nörotoksik etkilerinin olduğunu ve in vitro PH modeli oluşturmak amacıyla kullanılabileceğini gösterilmiştir (132).

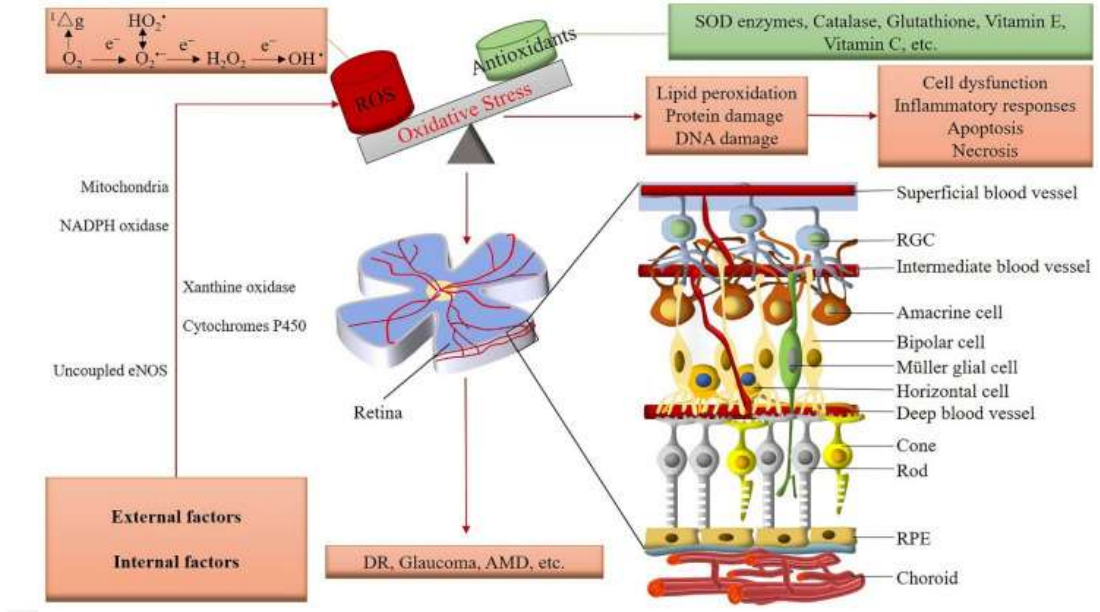
H₂O₂ ile indüklenen oksidatif stres apoptozun tetiklenmesinde kritik öneme sahiptir. Bu durum apoptoz ile sonuçlanan hastalıkların modellenmesinde H₂O₂ kullanımına imkan sağlamaktadır. Propolisin yapısında bulunan Pinosembrin ve Pinostrobinin YBMD da koruyucu etkilerinin araştırılması amacı ile yapılan çalışmada, ARPE-19 hücre hattında H₂O₂ kaynaklı oksidatif stres oluşturularak YBMD modellemesi yapılmasına olanak sunmuştur (133). AH tedavisinde kullanılan donapezilin kuersetin ile kombinasyonunun koruyucu ve tedavi edici etkilerini araştırılmasında glioblastoma (U-118 MG) hücre hattında H₂O₂ toksisitesi aracılığıyla oluşturulan oksidatif hasar AH modellemesi yapılmasına imkan sağlanmıştır (134).

2.4.4 Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyon ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, retina hastalıklarının gelişmesinde ve hızlanmasında önemli rollere sahiptir. ROS, vasküler reaktivite ve nöron fonksiyonu dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik eylemi düzenleyen önemli hücre içi sinyal molekülleridir. Bununla birlikte, aşırı ROS oluşumu, vasküler endotelial disfonksiyon, nöron dejenerasyonu ve retinadaki iltihaplanma ile ilişkilendirilmiştir. ROS, hücrel molekülleri doğrudan değiştirebilir ve işlevlerini bozabilir, retina pigment epitelinde, endotel hücrelerinde ve retina ganglion hücrelerinde, fonksiyonel ve morfolojik bozukluklara yol açabilir (135,136).

YBMD, makula bölgesindeki RPE hücrelerinin ve fotoreseptörlerin kaybı ile karakterize, merkezi görmede bozulmaya neden olan ve bireylerin günlük yaşamdaki temel aktivitelere katılma yetilerinden yoksun bırakan nörodejeneratif bir hastalıktır (137). YBMD'nin patogenezinin bruch membranı ile nöroretina arasındaki RPE'de başladığı varsayılmaktadır. RPE hücreleri, yüksek metabolik hız nedeniyle ROS üretmeye eğilimlidir. Ayrıca, bu hücreler demir iyonlarının birikmesi, güneş ışınları ve sigara dumanının bir sonucu olarak ROS'a maruz kalırlar (135).

Yaşlanma, RPE'de yaşa bağlı fizyolojik değişikliklere yol açan ana faktördür (135). RPE'nin metabolik ve otofaji işlevi, RPE'de yüksek metabolik talebi belirler. RPE'nin yüksek metabolik aktivitesi nedeniyle mitokondri ile zenginleştirilmiş bir dokudur. Sonuç olarak, RPE, YBMD'de retinada ROS'un önemli bir kaynağıdır ve YBMD'nin ilerlemesinde yapısal değişikliklere ve hasara yol açar (135).



Şekil 2.11. Retinadaki oksidatif stres oluşum mekanizmaları (138).

2.5 Antioksidanlar

Serbest radikallerin oluşmasını engelleyerek veya mevcut radikallerle savaşarak, oluşturabilecekleri hücre ve doku hasarını engelleyen maddelere antioksidan maddeler denir. Antioksidanlar bu korumayı serbest radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek ve otooksidasyon ve/veya peroksidasyonun ilerlemesini önleyerek gerçekleştirirler. Endojen ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere gruplara ayrılırlar. Endojen antioksidanlar kendi içerisinde enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak ayrılırken; ekzojen antioksidanlar ise vitamin ve ilaç olarak yararlanılanlar olarak gruplandırılırlar. Endojen antioksidanlardan, süperoksit dismutaz, O_2^- radikalinin, H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü katalizlemektedir. Oluşan H_2O_2 , katalaz veya glutatyon peroksidaz yardımı ile ortamdan uzaklaştırılır. Katalaz, H_2O_2 'in, H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü katalizlerken, glutatyon peroksidaz H_2O_2 'in indirgenmesinde rol oynamaktadır. Nonenzimatik antioksidanlar ise glutatyon, bilirubin, albümin, ürik asit, melatonin, koenzim Q10, transferrin, selenyum, gibi örnekler verilebilir (139). Ekzojen antioksidanların vitamin olarak kullanılanlarına, Beta-karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C), α -tokoferol (Vitamin E) ve folik asit (Vitamin B9) örnek verilebilir (140). İzoflavonlar, flavonoidlerin bir alt sınıfıdır, bitkilerde doğal olarak bulunan başlıca fitoöstrojenlerdir. Soya fasulyesi en zengin izoflavon kaynağı olmasının yanı sıra, nohut, bakla, antep fıstığı, yer fıstığı, ayçiçeği çekirdeği, ceviz gibi kuruyemişler ve

birçok meyvede de izoflavon bulunur (141). İzoflavonlar antioksidan ve östrojenik özellikler sergiler. İzoflavon içeren gıdaların tüketimi vücudun antioksidan seviyesini artırabilir ve hücrel sağlığın desteklenmesine yardımcı olarak oksidatif stresi azaltma özelliklerine sahiptir (142,143).

2.6 Östrojen

Östrojen, kadın üreme organları ile ilişkili bir steroid hormondur. Temel olarak kadın cinsel özelliklerinin gelişiminden sorumludur. Bu nedenle üreme yaşındaki kadınlarda düzeyleri çok yüksektir. Daha düşük düzeylerde erkeklerde de bulunmaktadır. Doğal olarak oluşan östrojenler, estradiol (17β estradiol) (E2), östrone (E1), ve östriol (E3) olmak üzere üç tiptir (144).

İnsanlarda en yaygın olarak bulunan östrojen, 17β -östradiol olmasına rağmen östron ve östrolde düşük düzeylerde sentezlenmektedir (145). Östrojenler diğer steroid hormonlara oranla çok daha etkin bileşiklerdir, ufak miktarlarda da etki oluşturabilirler. Normal serumda 1-Nm konsantrasyonda bulunan östrojenin lokal üretimi ve/veya dokuda birikimi sonucu plazma konsantrasyonu 10-20 katına çıkabilmektedir. Östrojenler, esas olarak yumurtalıklarda üretilir. Buna ek olarak memenin yağ dokusundaki mezenkimal hücreler, kondrositler, vasküler endotelyum, aort düz kas hücreleri ve beyin birçok kısmında östrojen üretilir (146). Östrojenler insan fizyolojisinde birçok role sahip olmasının yanı sıra sayısız hastalığın patogeneğinde yer almaktadır. Östrojenlerin, dişi üreme sistemindeki işlevlerine ek olarak, kardiyovasküler sistem, merkezi sinir sistemi, kemik yoğunluğunu, kolesterol mobilizasyonunu, endometriyal hücre büyümesini, farklılaşmasını ve elektrolit dengesini düzenleme işlevi gördüğü gösterilmiştir (144). Östrojen fizyolojik ve patolojik yollarla olan ilişkisini, östrojen reseptör'leri (ER) aracılığıyla gerçekleştirmektedir (147).

2.6.1 Östrojen Reseptörleri

Steroid hormonlar hücreler üzerinde etkilerini oluşturabilmek için reseptörlere ihtiyaç duyarlar. Klasik östrojen reseptörleri 20. yüzyılın sonlarına doğru tanımlanmaya başlamıştır. Östrojen reseptörünün tüm östrojen etkilerine aracılık eden üç alt tipi vardır; klasik steroid hormon reseptörü yapısında, $ER\alpha$ ve $ER\beta$ ligand bağımlı nükleer transkripsiyon faktörleri ailesindedir ve membran ilişkili G protein ile ilişkili östrojen reseptörü-1 (GPER1, GPR30 olarak da bilinir) olmak üzere bilinen 3 reseptörü vardır. Her reseptörün ekspresyonu bulunduğu doku tipine göre farklılık göstermektedir (146,148).

ER α ve ER β

Östrojenler, fizyolojik fonksiyonlarının büyük kısmını nükleer steroid reseptörü; ER α ve ER β aracılığıyla göstermektedir (149). Bu iki reseptör ilk olarak 1986 ve 1996 yıllarında tanımlanmış ve klonlanmışlardır (150).

ER α 6. kromozomun uzun kolunda yer alır (6q25.1) ve 595 aminoasitten oluşan gen bölgesinden sentezlenir (151,152). ER α ; öncelikli olarak kadın cinsiyet organlarında eksprese edilir; meme, rahim ve yumurtalıklar gibi. Genellikle kadın üreme fonksiyonlarında görevli olmakla birlikte, iskelet sistemi yapısında da önemli işlevlere sahiptir (151-153).

ER β 14. kromozomun kısa kolunda (14q22-24) yer alan ve 530 aminoasitten meydana gelen gen bölgesinden kodlanır (151). Farklı doku ve hücre tiplerinde eksprese edilir. ER β ürogenital sistem, immün sistem ve santral sinir sisteminde görev alır ve genellikle hücre proliferasyonunu kontrol eder. ER α ile birlikte kalpte koruyucu etkilere sahiptir. Meme bezleri ve uterusu ER α 'nın aksine hücre proliferasyonunu durdurabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (151-154).

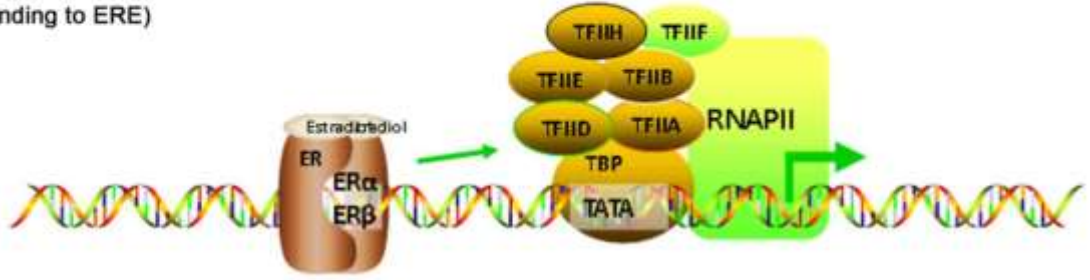
GPER1 (GPR30)

Östrojen reseptörlerinin varlığı ilk defa 1966 yılında gösterilmesine karşın GPER1 ilk olarak 1990'larda tanımlanmıştır (155). GPER1 ailesi insan genomundaki en büyük (yaklaşık 800-1000 reseptörlük) sinyal molekül grubudur. GPR30, endoplazmik retikulumda veya hücre membranında bulunan, 7 adet transmembran domain içerir, hızlıdır ve genomik olmayan, sitoplazmik etki gösterir. GPER1, adenilat siklazın aktivasyonu, hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu, çekirdek içinde fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat sentezini destekleyen siklik AMP seviyelerinin artmasıyla sonuçlanan birçok aşağı akış sinyal yolunu aktive eder (156-158).

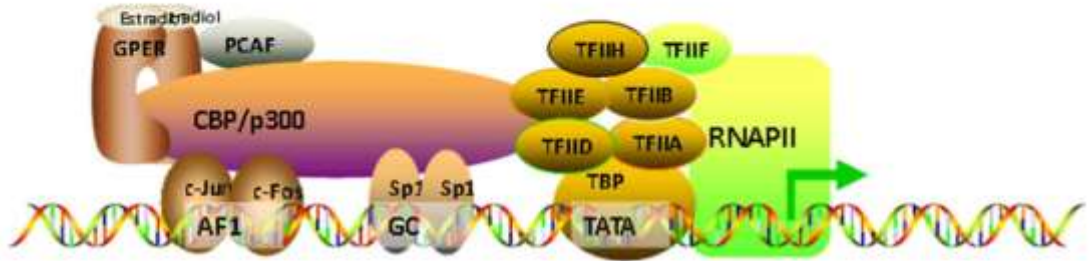
GPER1 plasenta, akciğer, karaciğer, prostat ve over dokularında bulunmaktadır (159). GPER1'in fizyolojik (üreme, endokrin vb.) ve patolojik (kanser) birçok görevde rol aldığı bilinmektedir. Meme, tiroid, endometrium, ve akciğer kanserlerinde ekspresyonun arttığı ve EGFR üzerinden neoplazi gelişimine katkı sağladığına dair çalışmalar mevcuttur. Bunun yanı sıra kemik ve sinir sistemi gelişimi, metabolizma ve öğrenme dahil olmak üzere bir çok biyolojik süreçte rol almaktadır (160,161).

Two mechanisms of ER transcriptional activation

Direct (binding to ERE)



Indirect (binding to other TF's)



Şekil 2.12. ER transkripsiyon aktivasyonunun iki mekanizması (162).

2.7 Fitoöstrojenler

Fitoöstrojenler bitki kökenli östrojenlerdir, endojen olarak üretilen memeli östrojenleri ile yapısal ve fonksiyonel benzerlikleri olan doğal östrojen reseptör modülatörleridir. Yapısal olarak 17- β -estradiol'e benzerler, ikincil metabolitlerden türetilen steroidal olmayan bileşiklerdir (163). Organizmada bulunan doğal östrojenlerle yarışa girerler, reseptörlere bağlanarak östrojenik, antiöstrojenik, antioksidant, antiproliferatif, antianjiyogenetik, antinflamatuar etkinlik gösterirler (164).

Fitoöstrojenlerin östrojenik etkileri ilk olarak izoflavon bakımından zengin bir yonca türü olan *Trifolium subterraneum* ile beslenen koyunların üreme güçlüğü yaşamaları sonucu farkedilmiştir (165). İlerleyen süreçte, üreme, kemiğin yeniden şekillenmesi, deri, kardiyovasküler, sinir sistemi, bağışıklık sistemleri ve metabolizma ile ilgili çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol aldığı bildirilmiştir (166).

Östrojenik etki mekanizmalarının karmaşık bir yapıya sahip olduğu, ER α , ER β ve GPER1 için agonist, antagonist aktiviteye sahip olabileceği bildirilmiştir. Östrojenlerin kemiğin oluşum ve mineralizasyon işlevlerini düzenleyerek kemik

yoğunluğunun korunmasında önemli bir rol oynadığı gibi; fitoöstrojenlerin de kemikte östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik etki gösterdiği ve bu mekanizmanın menopozda oluşan kemik yıkımını azalttığı bildirilmiştir (167).

2.7.1 Fitoöstrojenlerin Yapıları ve Sınıflandırılmaları

Fitoöstrojenler, östrojen gibi davranabilen ancak steroid yapıda olmayan bitkisel kaynaklı östrojen modülatörleridir. Fenol halkaları aracılığıyla estradiol yapısal benzerlik gösterirler, bu moleküller östrojen reseptörünü bağlayabilir, aktive edebilir ve östrojenik etkileri teşvik edebilirler. Büyük ölçüde bağırsaklarda, bakteriyel enzimler tarafından biyotransformasyona uğrarlar, dokularda birikmezler ve diğer endokrin bozuculara göre daha kolay metabolize olabilirler (168,169). Fitoöstrojenler yapılarına ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılırlar. İzoflavonoidler, stilbenler, lignanlar ve kumestanlar, ER'ler için etkileyici afinitesi ve seçiciliği olan fitoöstrojenlerdir (170).

Fitoöstrojenler, özellikle baklagiller, havuç ve patates gibi kök sebzeler, tohumlar, fındık gibi sert kabuklu yemişler, üzüksü meyveler ve ayrıca şifalı bitkilerde bulunurlar. Bir bitki, birden fazla tür fitoöstrojen içerebileceği gibi, farklı türden bitkiler farklı fitoöstrojenleri içerebilmektedir (171).

İzoflavonlar, flavonoidlerin bir alt sınıfıdır, bitkilerde doğal olarak bulunan başlıca fitoöstrojenlerdir. Soya fasulyesi en zengin izoflavon kaynağı olmasının yanı sıra, nohut, bakla, antep fıstığı, yer fıstığı, ayçiçeği çekirdeği, ceviz gibi kuruyemişler ve birçok meyvede de bulunur (141). İzoflavonlar antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiosteoporotik ve östrojenik özellikler sergiler. İzoflavon içeren gıdaların tüketimi vücudun antioksidan seviyesini artırabilir ve hücrel sağlığın desteklenmesine yardımcı olarak oksidatif stres, obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalık gibi kronik hastalıklarla ilişkili iltihabı azaltabilmektedir (142,143).

Lignanlar, bitkilerde bulunan fitoöstrojenler olarak tanımlanan kimyasal bileşiklerdir. Bitki lignanları, fenilalaninden türetilen polifenollerdir ve enterodiol, enterolakton gibi memeli lignanlarını oluşturmak üzere bağırsak bakterileri tarafından metabolize edilirler. Lignanlar, başta keten tohumu olmakla birlikte, tahıllar, sert kabuklu yemişler (susam, ayçiçeği, kaju), sebzeler (kıvırcık lahana, brokoli, sarımsak), meyveler (kayısı, çilek, şeftali), zeytinyağı, bira, çay, kahve ve şarap gibi içecekler de dahil olmak üzere birçok gıdada bulunur. Lignan metabolitleri, antioksidanlar ve serbest radikal süpürücüler olarak işlev görür, buna

ek olarak, antikanser, antihipertansif, antiviral ve östrojenik olmak üzere bir dizi biyolojik aktivite ile ilişkilendirilirler (172,173).

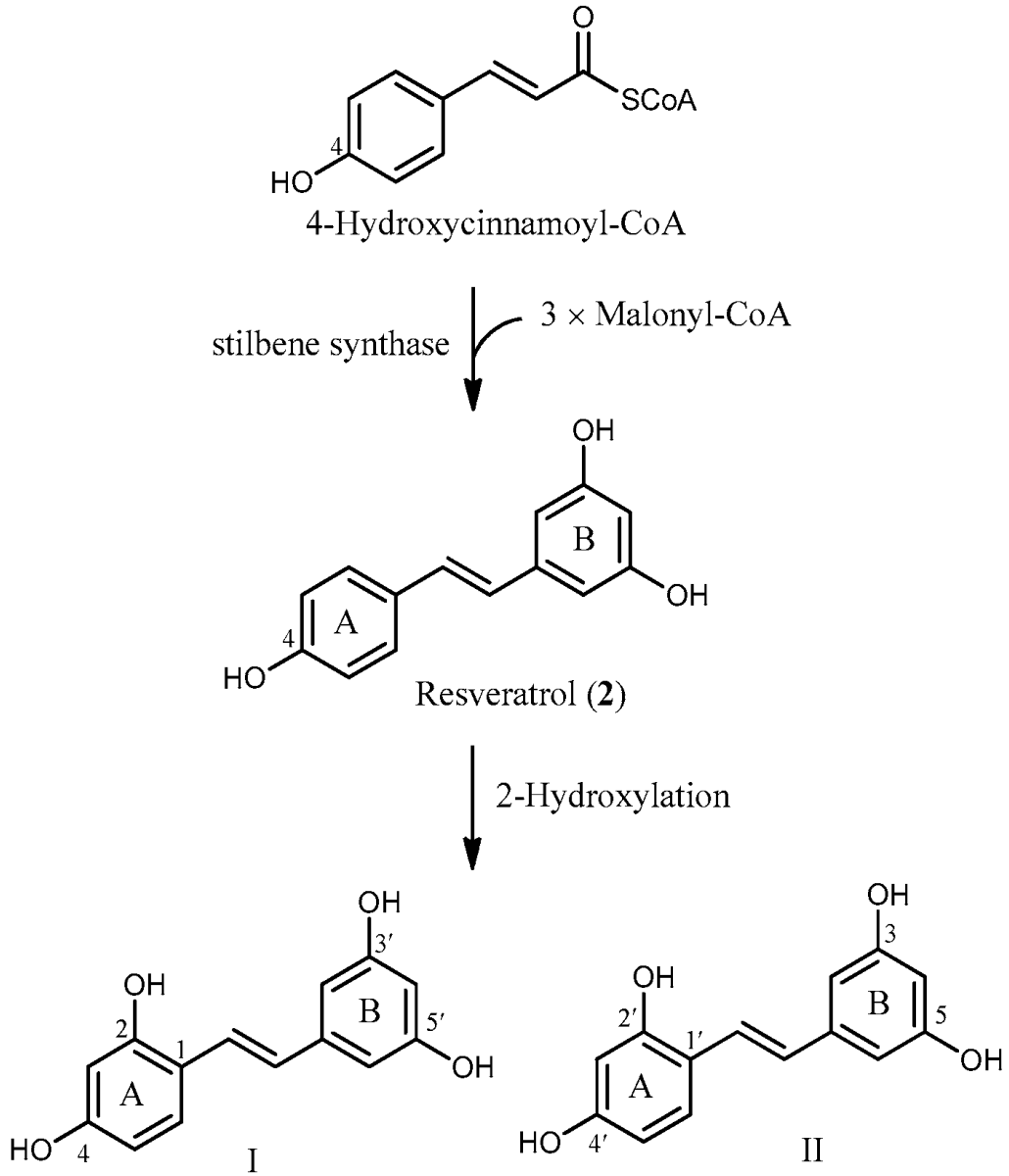
Kumestanlar, insan diyetinde izoflavonlardan daha az yaygındır (174). Fitoöstrojenik aktiviteye sahip ana kumestanlar, kumestrol ve 4-metoksikumestrol'dür. Baklagillerde, özellikle yonca, soya filizi ve maş fasulyesi filizi (*Vigna radiata* L. Fabaceae) gibi bitkilerde bulunurlar. Antimiyotoksik, hepatoprotektif, antiinflamatuvar, antifibrotik, antihemorajik, antiproteolitik, östrojenik, nöroprotektif, antimikrobiyal, antelmintik, antifungal, immünomodülatör ve antioksidatif özellikler sergilerler (175).

Stilbenler, bir etanol veya etilen molekülü ile birleştirilmiş iki benzen halkası içerirler, doğal olarak oluşan fitoaleksinlerdir ve fenilpropanoid yolu ile sentezlenirler. Stilbenler, trans stereoizomerler olarak bulunan çok çeşitli bitki kaynaklarından elde edilebilirler. Yer fıstığı (*Arachis hypogaea*), üzüm asması (*Vitis vinifera*), çam türleri (*Pinus* türleri) ve dutlarda bulunurlar (*Morus* türleri). Antioksidan özellik başta olmak üzere, antiinflamatuvar, vazoprotektif, antikanser antimikrobiyal gibi önemli biyolojik özelliklere sahiptir (176).

2.8 Oxyresveratrol

Oxyresveratrol (2,3',4,5'-tetrahidroksistilben), kimyasal yapıya sahip $C_{14}H_{12}O_4$; moleküler ağırlığı 244.24 g/mol olan doğal bir stilbendir. Oxyresveratrol hem serbest hem de glikozidik formlarda meydana gelir ve dört OH grubuna sahiptir. Şimdiye kadar tanımlanan tek doğal di-glukosidik oxyresveratrol çoğunlukla mulberrosid A olarak bilinen oxyresveratrol 3',4-diglukozittir (177).

Oxyresveratrol (OXY), *Morus Alba*'nın (beyaz dut) kökünde bulunan bir bileşik olan Mulberrosid A'nın hidrolitik aktivasyonu ile sentezlenen bir stilben ve fitoöstrojendir. Antioksidasyon, antiinflamatuvar, nöroprotektif, anti-viral, serbest radikal temizleme faaliyetleri ve tirozinaz inhibitör aktiviteleri bulunmaktadır (32,33,35,177,178). Bununla birlikte, östrojen benzeri aktivitesi tam olarak aydınlatılamamıştır.



Şekil 2.13. Oxyresveratrolün yapısı ve önerilen biyosentezi (179).

2.8.1 Oxyresveratrolün Antioksidan/Anti-Inflamatuar Aktivitesi

Birçok çalışma, antioksidan ve anti-inflamatuar aktivite ile oxyresveratrolün nöroprotektif etkileri arasındaki bağlantıları araştırmayı amaçlamıştır. Hu ve Ark. yaptığı çalışma ile oxyresveratrolün, insan mercek epitel hücrelerini (HLEC) hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif stres ve apoptoza karşı protein kinaz B / Hem oksijenaz-1(Akt / HO-1) yolunu aktive ederek koruduğunu göstermişlerdir (36). Yapılan bir çalışmada, mulberrosid A ve oxyresveratrolün, sıçan karaciğer mikrozomlarında $\text{FeSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ ile indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir (32). Wu ve Ark. yaptığı çalışmada oxyresveratrolün de içinde bulunduğu 9 ekstrakte edilen bileşiğin akut etanol

uygulamasının neden olduğu fare serebellumunda ve serebral kortekste oluşan DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir (180). Ayrıca Wang ve Ark. yaptıkları çalışmada oxyresveratrolün sıçan omurilik yaralanmasındaki hasarı iyileştirdiği inflamasyon ve oksidatif stresi granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM - CSF), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklo - oksijenaz - 2 (COX- 2) ve nükleer faktör eritroid türevi 2 (Nrf2) sinyal yolu aracılığıyla ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (181). Meme kanseri hücre hattı (MCF7)'nda yapılan çalışmada nükleer faktörü kappa B (NF-κB) yolu boyunca anti-enflamatuar bir etki uygulanarak oxyresveratrolün zayıf östrojen reseptör agonisti ve bir nükleer faktörü kappa B modülatörü olduğu ve östrojenik işleviyle bir anti-enflamatuar etki gösterdiği bildirilmiştir (182).

Oxyresveratrolün hem ROS oluşumunu hem de hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki artışı baskılayarak N-metil-D-aspartat (NMDA) ile indüklene toksisiteden kültürlenmiş sıçan kortikal nöronlarını koruduğu bulunmuştur (183). Murin N9 mikrogliyal hücreleri ve birincil karışık glial kültürlerin kullanıldığı bir çalışmada, oxyresveratrol, güçlü NO süpürme aktivitesi gösterdi, ancak iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) aktivitesini ve iNOS proteininin ekspresyonunu inhibe edemedi (184). Serum yoksunluğu ile indüklene oksidatif stres altında kültürlenmiş P19 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, oxyresveratrol nöronal hücre ölümünü önledi ve nörit büyümesini iyileştirdi (185). Lipopolisakkarit (LPS) ile tedavi edilen murin BV-2 mikrogliyal hücrelerinde oxyresveratrol, NO, TNF-α, iNOS, IL-1β ve IL-6'nın (ERK1/2, JNK ve p38) ve NF-κB sinyal yolları salınımını bastırdı (186). Oxyresveratrol, PC12 hücrelerinde H_2O_2 ile indüklene hasara karşı doza bağlı bir şekilde koruyucu aktivite gösterdi (187).

UV-A ile ışınlanmış insan birincil epidermal keratinositleri ile yapılan bir çalışmada, oxyresveratrol, ROS ve nitrotirozin oluşumunu ve siklobütan pirimidin seviyelerindeki artışı baskılayarak hücre hasarını önledi (188). Oxyresveratrol, insan lens epitel hücrelerini (HLEC'ler) H_2O_2 ile indüklene oksidatif stresten korudu ve Akt ve heme oksijenaz-1 (HO-1) yollarının aktivasyonu yoluyla apoptozu inhibe etti (188). FOXO3a (Forkhead box O3), DNA onarımı ve ROS'un detoksifikasyonu gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda önemli olduğu bilinen bir transkripsiyon faktörüdür. Oxyresveratrolün, FOXO3a'nın aktivasyonu yoluyla Manganez süperoksit dismutazı (MnSOD) yukarı regüle ederek insan embriyonik fibroblast (HEF) hücrelerinde ROS seviyesini bastırdığı gösterilmiştir (189).

Sonuç olarak, oxyresveratrolün antioksidan ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ancak, oxyresveratrolün oksidatif stresi nleme ve tedavi edici etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu projede, retina pigment epitel hücrelerinde (ARPE-19) oksidatif stres kaynaklı hücre hasarında morus alba stilbeni oxyresveratrolün tedavi ve koruyucu etkilerindeki östrojen reseptörlerinin rolü araştırılmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında kullanılan başlıca cihazlar ve sarf malzeme ilgili tablolarda listelenmiştir (Tablo 3. 1 ve Tablo 3 2).

Tablo 3. 1.Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Adı/Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Güvenlik Kabini (Biosafety Cabinet Class II Güvenlik Kabini)	Hücre kültürü çalışmalarında steril ortamın sağlanması
Etüv (MMM Medcenter Einrichtungen Gmbh Ecocell)	Gereken tüm malzemelerin istenen sıcaklığa getirilmesi
İnkübatör (Thermo Scientific Heracell 150i Co ₂)	Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin inkübasyonu için kullanıldı
Floresan Invert Mikroskop (Axio Vert.A1 Mikroskop (ZEISS))	Hücrelerin kontrolü için kullanıldı
Plak Okuyucu (Thermo Scientific Multiskan FC)	96 kuyulu plakların absorbanlarının okunması, MTT sonuçlarının değerlendirilmesi
Mikro Plak Yıkayıcı (Thermo Scientific Wellwash)	Biyokimyasal analizlerin çalışılmasında kullanıldı
EVE Otomatik Hücre Sayacı(Nanoentek),	Hücre sayımı
Santrifüj (Hettich Universal 320r)	Çöktürmenin gerekli olduğu tüm denemelerde
Olympus CX31 Upright Mikroskop	Hücrelerin kontrolü için kullanıldı
Olympus CX41 Upright Mikroskop	Hücrelerin kontrolü için kullanıldı
Pipet Pompası (Brand Accu-Jet® Pro)	Çözelti hazırlanması
Pipetler (0,5-2 MI, 0,5-100 MI, 50-200 MI, 200-1000 MI, 1-5 MI Gilson)	Çözeltilerin hazırlanması
Hassas Terazı (AND HR-250AZ Marka (0,0001 G'a Duyarlı))	Çözeltilerin hazırlanması için gerekli tartımın alınması
Vorteks (Velp Scientifica Classic Vortex Mixer)	Çözeltilerin homojen karışımlarının hazırlanması

Manyetik Isıtıcı Karıştırıcı (Velp Scientifica)	Çözünme işlemini hızlandırmak
Buzdolabı (±4°C Arçelik)	Kimyasalların ve örneklerin saklanması
Derin Dondurucu (-20°C Arçelik)	Hücrelerin kısa süre saklanması
Derin Dondurucu (-80°C New Brunswick Scientific)	Hücrelerin uzun süre saklanması

Tablo 3.2.Kullanılan sarf malzeme ve kullanım amaçları.

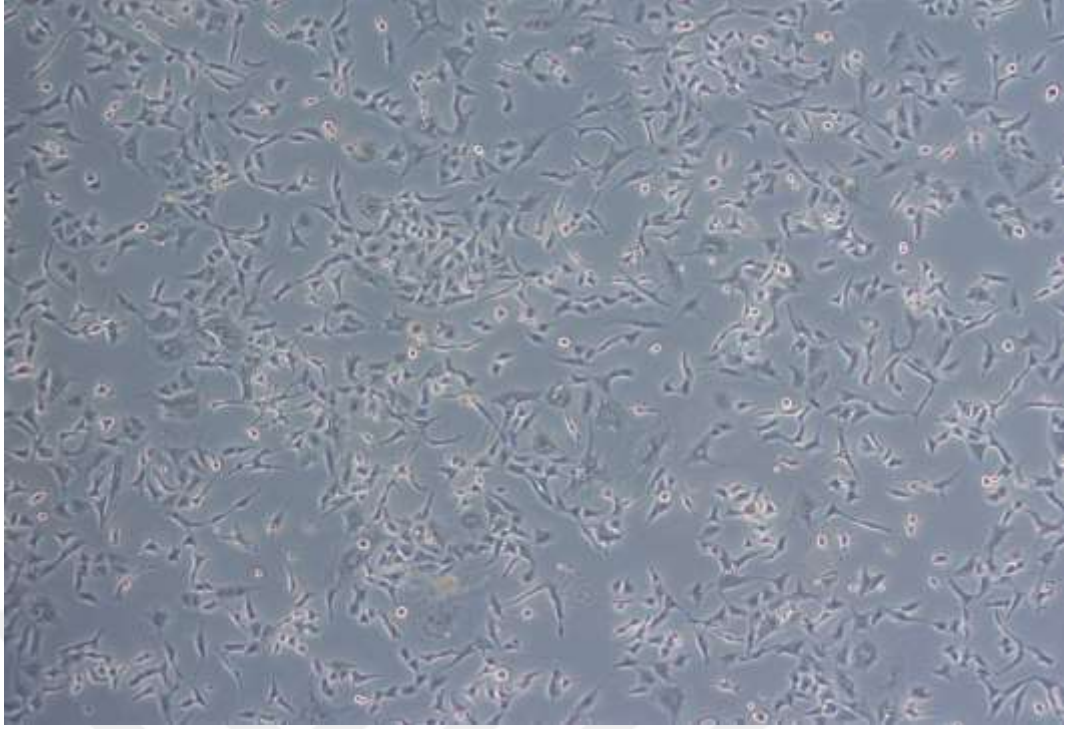
Adı/Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Oxyresveratrol (Sigma-Aldrich)	Hücrelerde etkisi araştırılan molekül
Arpe-19 (Atcc Manassas Va)	Tüm denemelerde kullanılan Retina Pigment Epitel (ARPE-19) hücre serisi
Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck)	Hücrelerinin dondurma ortamının hazırlanması, çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılması
Tripsin (Merck)	Pasaj ve ekimlerde hücrelerinin kaldırılması
Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham's F12 (Dmem-F12 Gibco)	ARPE-19 hücrelerinin büyüme ortamı
Penisilin/Streptomisin (Gibco)	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
Fetal Bovine Serum (Fbs) (Gibco)	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
L-Glutamin (Hyclone)	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
Etanol (Delta)	Yıkama işlemlerinde
Hidrojen Peroksit (Merck)	Hücrelerde toksisite oluşturmak
Tripan Mavisi (%0,5) (Biological Industries)	Hücre sayımında, canlı ve ölü hücrelerin ayırt Edilebilmesi
Cell Proliferation Kit (Xtt) (Sartorius)	Hücre canlılığı aktivitesini değerlendirmek
Cell Death Detection Elisa (Roche)	Elisa yöntemi ile hücre ölümü tespiti için kullanıldı
Human Caspase-3 Instant Elisa (Ebioscience)	Kaspaz-3 aktivitesini tespit etmek için kullanıldı
Human Total Antioxidant Status Elisa Kit (Bt Lab)	Total antioksidan seviyesinin tespiti için kullanıldı
Human Total Oxidant Status Elisa Kit (Bt Lab)	Total oksidan seviyesinin tespiti için kullanıldı
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio Rad)	Toplam protein ölçümü için kullanıldı

3.2 Hücre Kültürü Uygulamaları

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

3.2.1 Retina Pigment Epitel (ARPE-19) Hücre Serisi

Dondurularak -80 derecelik dondurucuda saklanmış ARPE-19 hücreleri %1 Penisilin-Streptomisin, %1 L-glutamin ve %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ile desteklenmiş Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) besi yerinde kültürlenerek, 37°C'de %5 CO₂ varlığında çoğaltılmıştır. Hücreler her gün inverted mikroskop ile control edildi ve yaklaşık %75-80 yoğunluğa ulaştıklarında seyreltilerek pasajlar yapıldı.



Fotoğraf 3.1. ARPE-19 Hücre hattı invert mikroskop görüntüsü.

Hücrelerin Pasajlanması

- İlk kez çözölen hücreler 25cm² flasklara 6 mL DMEM/F12 besi ortamı içerisinde ekildi.
- Hücreler %85-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra 75cm² flasklara 15 mL büyüme ortamı içerisinde pasajlandı ve çoğaltıldı.
- Hücrelerin medyumları üç dört günde bir yeni medyum ile değiştirildi.
- Deneysel aşamaların tamamı 96 kuyucuklu platelerde gerçekleştirildi.
- Hücreler doygunluğa ulaştıklarında 1:2 ya da 1:4 oranında seyreltilerek pasajlandı.

Hücrelerin Toplanması ve Dondurulması

- Flasktaki büyüme ortamı uzaklaştırıldı.
- Flask PBS ile yıkandı.
- Flasklara; 25 cm² flask için 1-2 mL, 75cm² flask için 3-5 mL önceden 37°Cye ısıtılmış tripsin/ EDTA ilave edildi.
- Flask 4-5 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15 mLlik tüplere toplandı.
- Tüplere 5'er mL medyum ilave edildi.
- Pellet istenen miktarda, önceden 37°C de inkübe edilmiş büyüme ortamı içerisine eklendi.

- Hücre süspansiyonu sayıldı, seyreltilerek flasklara ya da plaklara pasajlandı.
- Dondurulacak hücre süspansiyonuna soğuk %95 FBS %5 DMSO ilave edildi.
- Elde edilen süspansiyon cryo tüplere paylaştırılarak aşamalı olarak donduruldu ve -20°C’de muhafaza edildi.
- -20°C’de bir saat bekletildikten sonra cryo tüpler 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°C’ye, uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojene kaldırılır.

Hücrelerin Çözülmesi

- Sıvı nitrojende muhafaza edilen hücreler gerektiğinde çözülerek kullanıldı.
- Sıvı nitrojen ya da -80°C’den alınan cryo tüpler hızla 37°C’de çözüldü.
- 4°C’nin üzerindeki DMSO hücrelere toksik etki gösterdiğinden dolayı 37°C’de hücreleri çözürürken hızlı bir şekilde çalışıldı.
- Tüp içerisindeki süspansiyon 15mL’lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10mL önceden 37°C’de inkübe edilen büyüme ortamı ilave edildi.
- Tüp 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- Pelet 7 mL büyüme ortamında süspanse edildi ve 2 adet 25cm² flaska paylaştırıldı.
- Flaskalar, 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin Sayılması

Yapılacak tüm denemelerde belirli sayıda hücrenin flasklara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin Tripan mavisi boyasını hücre içine almaları ve ölü hücre olarak değerlendirilmeleri veya membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır (190). Canlı hücreler mitokondri organelinde enerji üretimi yapabildiklerinden dolayı hücre membranından giren boya maddesini aktif taşımayla hücre dışına çıkartarak, renksiz görülür ve ölü hücreler mitokondri organelinde metabolik enerji ihtiyacını yerine getirememekte hücre membranından geçen boya maddesini absorblar, hücre dışına çıkartamaz aktif taşıma için enerji ihtiyaçlarını karşılayamadıklarından ve mavi renkte görülür.

- 50 µl ARPE-19 hücre süspansiyonundan 1,5 Ml’lik eppendorf tüpüne aktarıldı.

- Üzerine 50 µl %0,5 tripan mavisi boyası ilave edilerek iyice karıştırıldı.
- Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10'ar µl örnek alınarak, özel EVE™ Lamın her iki kuyucuğuna yüklendi (Şekil.3.2).
- EVE otomatik hücre sayacı ile hücre sayımı yapıldı.
- Tripan mavisi boyasını metabolize edip parlak görünen hücreler canlı, boyayı içine alıp mavi renkte görünen hücreler ise ölü olarak değerlendirildi.
- 96'lık plate 100 µl ekildiğinde kuyucuk başına $1,1 \times 10^4$ hücre gelecek şekilde ekildi. (191).



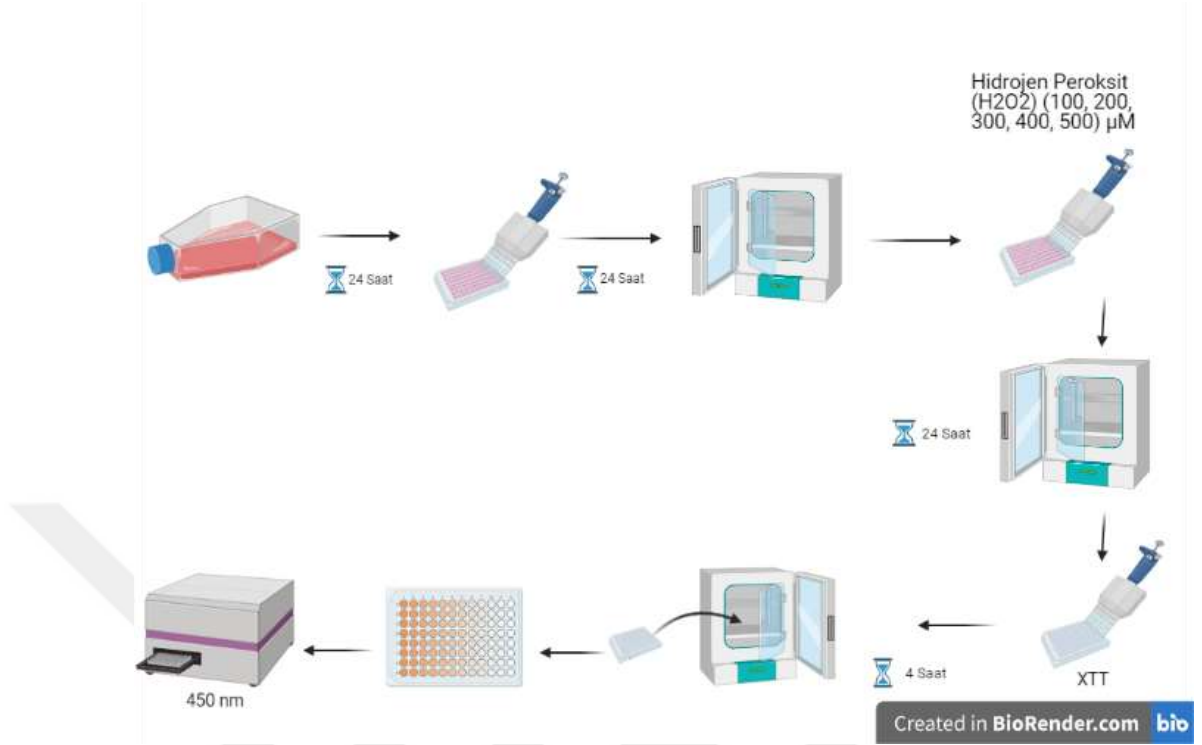
Fotoğraf 3.2. EVE otomatik hücre sayacı ile hücre sayımı.

ARPE-19 Hücre Hattında Hidrojen Peroksit ile Hasar Modelinin Oluşturulması

ARPE-19 hücre serisi üzerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) oksidatif stres kaynağı olarak uygulandı. ARPE-19 hücre ekimi 96'lık plaklara her kuyucuğa yaklaşık 22.000/200µl gelecek şekilde hücre ekimi yapıldı. ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu.

Çalışmada hücreler seri dilüsyonlar halinde hazırlanan (100-500µM) H_2O_2 çözeltisi seriler halinde gruplara bölünen hücre serisine ilave edildi. 51 µl H_2O_2 üzerine tamamlanan 5 ml DMEM/F12 eklenerek 100 µM H_2O_2 çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok çözeltiden seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda 100, 200, 300, 400 ve 500 µM hazırlanan H_2O_2 çözeltisi ile 24

saat inkübasyona bırakılan ARPE-19 hücrelerinde canlılık (sitotoksosite durumu) belirlemek üzere hazır hale getirilmiştir (192).



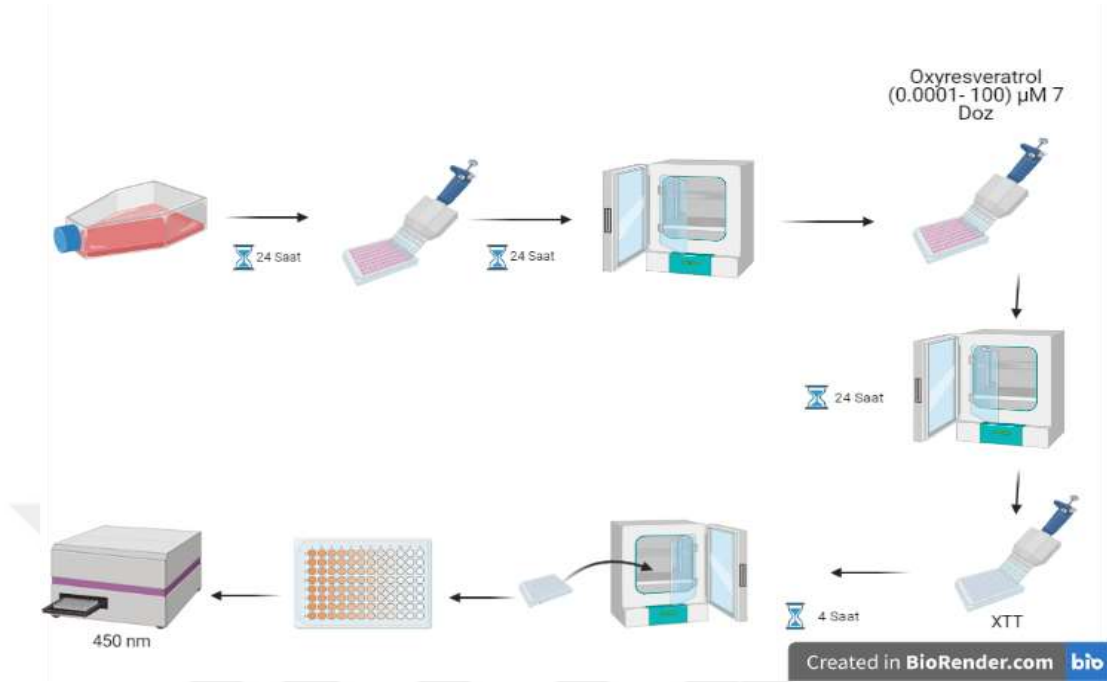
Şekil 3.1. ARPE-19 Hücre hattında hidrojen peroksit ile hasar modelinin oluşturulması.

ARPE-19 Hücrelerinde Oxyresveratrolün Etkisinin Değerlendirilmesi

Oxyresveratrol çalışmalarımızda ARPE-19 hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan hücre hasarına karşı etkisi araştırılan maddedir. Oxyresveratrolün farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Oxyresveratrol 5 mg tartılmış ve 500 µl DMSO da çözülmüştür. Oluşturulan çözeltiden 25 µl alınıp 10000 µl DMEM/F12 ile hazırlanan 10⁻⁴ M’lık çözelti DMEM/F12 ile seyreltilerek (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 ve 0,0001µM) farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır.

ARPE-19 hücre ekimi 96’lık plaklara uygun hücre serisi oluşturuldu. Bu hücre serileri %5 CO₂ ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C’ de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Oluşturulan ARPE-19 hücre serisi plaklarındaki besiyeri aspire edilerek yerine 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 ve 0,0001µM konsantrasyonlardaki Oxyresveratrol 200 µl ilave edilerek 24 saat süre ile inkübasyon edildi. İnkübasyon sürelerinin ardından XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro–5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid tuzu) canlı hücrelerin

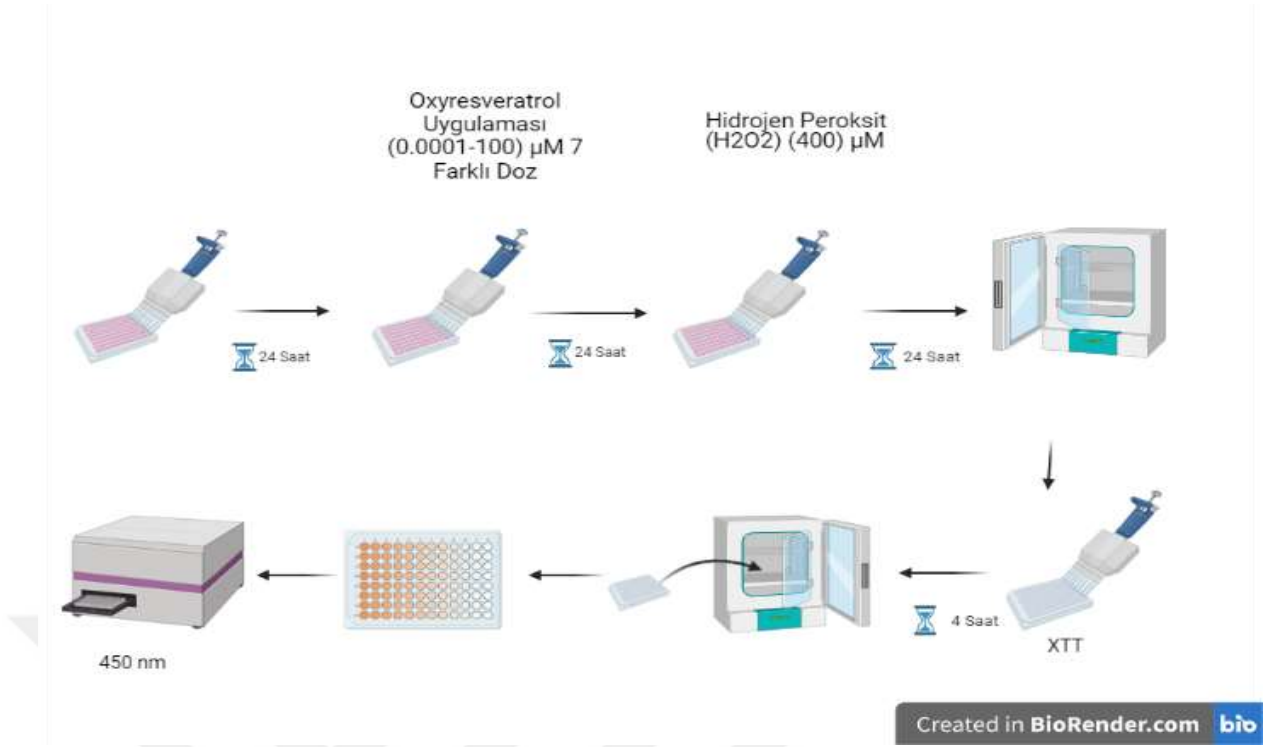
mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından bir tetrazolyum tuzunun bir formazan ürününe çevrilmesi analiz yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi.



Şekil 3.2. ARPE-19 Hücrelerinde oxyresveratrolün etkisinin değerlendirilmesi.

ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesi Oxyresveratrolün Etkisinin Değerlendirilmesi

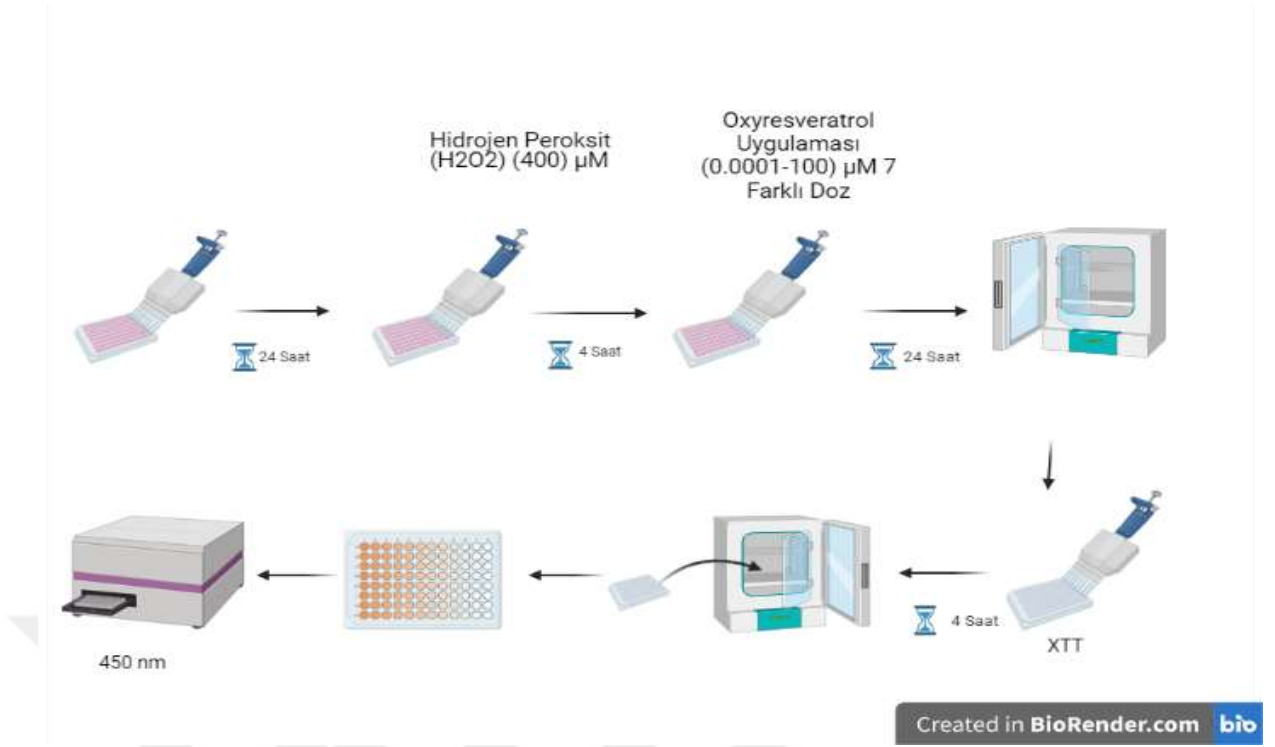
Oksidatif hasar oluşumu öncesi oxyresveratrol uygulaması için etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plağa eşit sayıda hücreler konuldu %5 CO₂ ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C’ de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından hücre kontrol, medyum kontrol ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan oxyresveratrol (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0.001 ve 0.0001µM) 100 µl uygulanarak, hücreler 24 saat süre inkübasyona bırakıldı. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda üzerine 400 µM konsantrasyonda 100µl H₂O₂ uygulandı, 20 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra XTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı değerlendirildi.



Şekil 3.3. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrolün etkisinin değerlendirilmesi.

ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşumu Sonrası Oxyresveratrolün Etkisinin Değerlendirilmesi

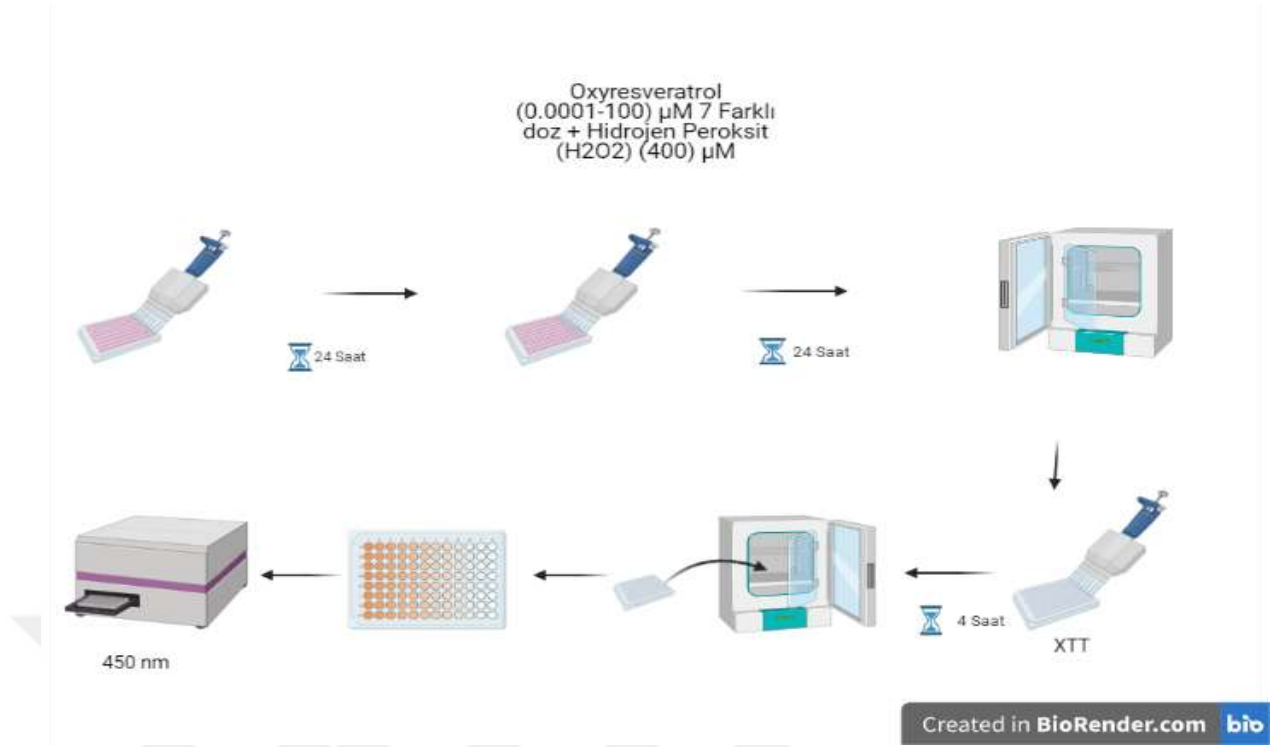
Oksidatif hasar oluşumu sonrası oxyresveratrol uygulaması için 96'lık plaklara ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. 400 μM konsantrasyondaki H_2O_2 çözeltilerinden 100 μl uygulanarak 4 saat süre inkübasyona bırakıldı. Dört saatlik inkübasyon sonunda 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0.001 ve 0.0001 μM konsantrasyonlardaki oxyresveratrol 100 μl olarak üzerine uygulandı 20 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Daha sonra XTT solüsyonu hazırlanarak hücre viabilitesi değerlendirildi.



Şekil 3.4. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası oxyresveratrolün etkisinin değerlendirilmesi.

ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşumu Sırasında Oxyresveratrolün Etkisinin Değerlendirilmesi

Oksidatif hasar oluşumu sırasında oxyresveratrol uygulaması için 96'lık plaklara ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. Oluşturulan ARPE-19 hücre serisinde plağın besiyeri aspire edilerek yerine 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 ve 0.0001µM konsantrasyonlardaki oxyresveratrol ve 400 µM konsantrasyondaki H₂O₂ çözeltilerinden 100'er µl aynı anda ilave edilerek 24 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra XTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı değerlendirildi.

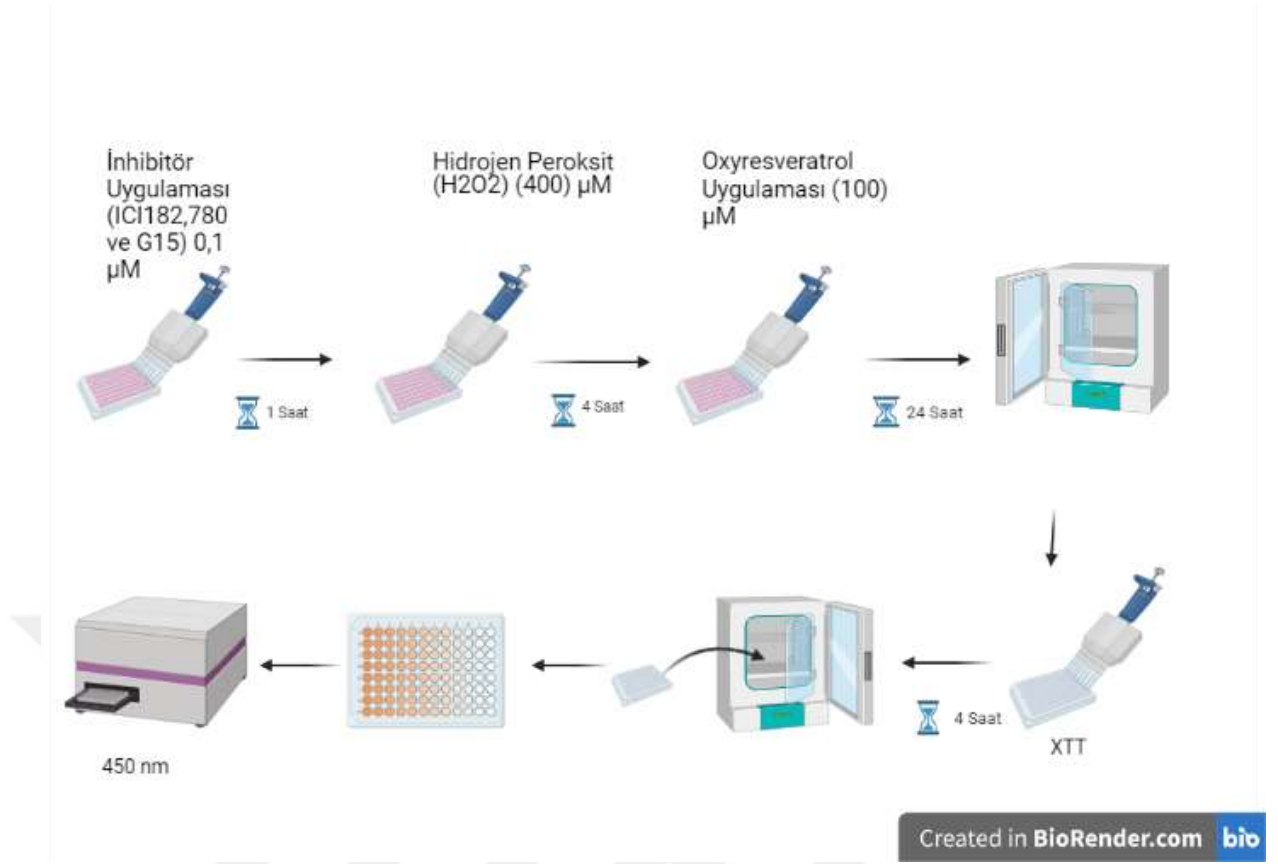


Şekil 3.5. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sırasında oxyresveratrolün etkisinin değerlendirilmesi.

3.2.2 İnhibitör Uygulanması

ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesi Oxyresveratrol Uygulamasında ICI ve G15 Östrojen Reseptör İnhibitörlerinin Etkisinin Değerlendirilmesi

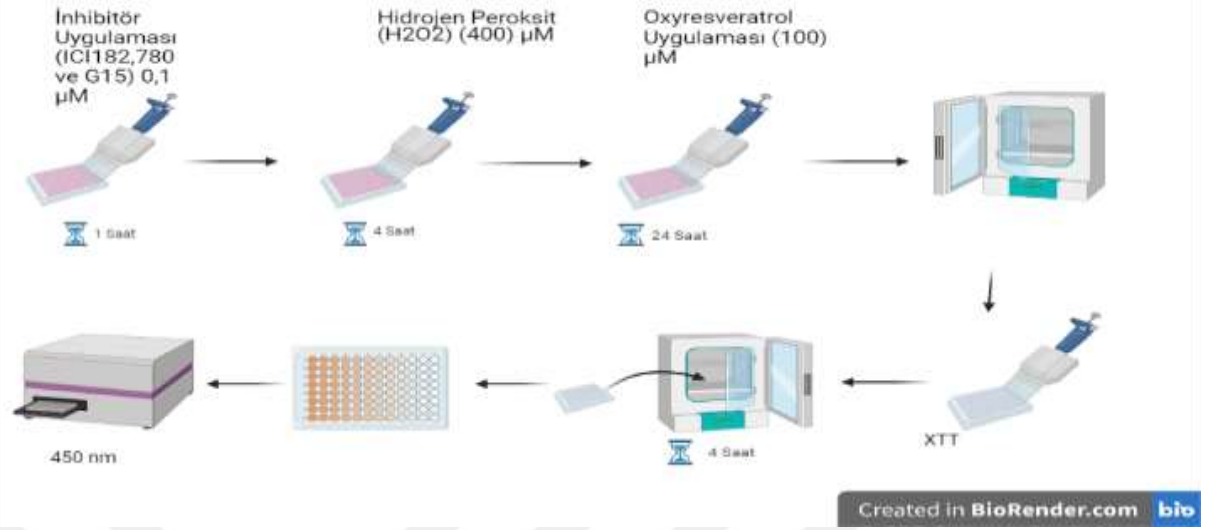
Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrolün etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plağa eşit sayıda hücreler konuldu %5 CO₂ ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C’ de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Oxyresveratrol uygulamasından 1 saat önce östrojen reseptör inhibitörü 0,1 µM ICI veya G15 75 µl uygulandı, ardından 100 µM oxyresveratrol 75 µl uygulanarak, hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda üzerine 400 µM konsantrasyonda 100µl H₂O₂ uygulandı, 20 saat süre ile inkübe edildi. Daha sonra XTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı değerlendirildi.



Şekil 3.5. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında ICI ve G15 östrojen reseptör inhibitörlerinin etkisinin değerlendirilmesi.

ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Sonrası Oxyresveratrol Uygulamasında ICI ve G15 Östrojen Reseptör İnhibitörlerinin Etkisinin Değerlendirilmesi

Oksidatif hasar oluşumu sonrası oxyresveratrol uygulaması için 96'lık plaklara ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. Hidrojen peroksit uygulamasından 1 saat önce östrojen reseptör inhibitörü 0,1 μM ICI veya G15 75 μl uygulandı, ardından 400 μM konsantrasyondaki H_2O_2 çözeltilerinden 75 μl uygulanarak 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon sonunda 100 μM oxyresveratrol 75 μl olarak üzerine uygulandı 20 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Daha sonra XTT solüsyonu hazırlanarak hücre viabilitesi değerlendirildi.



Şekil 3.6. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında ICI ve G15 östrojen reseptör inhibitörlerinin etkisinin değerlendirilmesi.

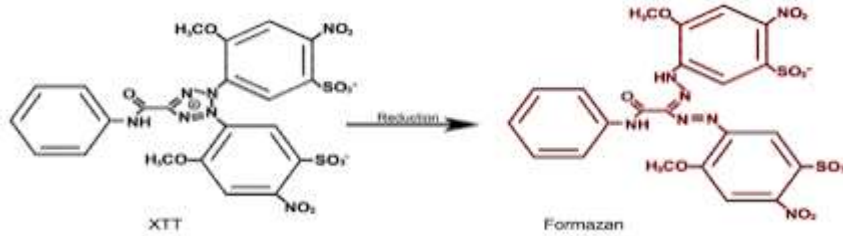
ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Sırasında Oxyresveratrol Uygulamasında ICI ve G15 Östrojen Reseptör Inhibitörlerinin Etkisinin Değerlendirilmesi

Oksidatif hasar oluşumu sırasında oxyresveratrol uygulaması için 96'lık plaklara ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. Hidrojen peroksit ve oxyresveratrol uygulamasından 1 saat önce östrojen reseptör inhibitörü 0,1 µM ICI veya G15 75 µl uygulandı, ardından 400 µM konsantrasyondaki H₂O₂ çözeltisinden 75µl ve 100 µM konsantrasyonlardaki oxyresveratrol çözeltisinden 75 µl olmak üzerine uygulandı ve 20 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Daha sonra XTT solüsyonu hazırlanarak hücre viabilitesi değerlendirildi.

3.2.3 Hücre Proliferasyon Canlılık Testi II (XTT)

Farklı konsantrasyonlardaki oxyresveratrolün farklı uygulamalardaki ARPE-19 hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Bu çalışmada, ARPE-19, hücre canlılığını değerlendirmek amacı ile günümüzde en yaygın olarak kullanılan XTT yöntemi kullanılmaktadır. XTT (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid tuzu) canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından bir tetrazolyum tuzunun bir formazan ürününe çevrilmesi (Şekil 3.7) ve ortaya çıkan bu ürün miktarının spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan hızlı ve

güvenilir bir yöntemdir (193). Bu amaçla hücreler 96-kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde DMEM besiyeri ortamında ekilmiştir. Yirmi dört saat sonra plakaların içindeki besiyeri uzaklaştırılacak ve kuyucuklara oxyresveratrol fenol red içermeyen DMEM içerisinde dilüye edilerek hücrelere 24 saat boyunca uygulandı. Kültür süresinin dolmasıyla hücrelere XTT (Cell Proliferation Kit II (XTT) çözeltisi eklenip 4 saat bekletildi ve süre sonunda 450nm dalga boyundaki absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ile saptandı. Oxyresveratrol içeren kuyucuklardan (kontrol hücreleri) okunan absorbans değeri %100 kabul edilir ve diğer örneklerin absorbanslarından canlılık değeri hesaplanır. Yüzde Canlılık = [Örnek ABS ortalama / Kontrol ABS ortalama] x 100



Şekil 3.7. XTT 'in formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu.

3.3 Biyokimyasal Analizler

3.3.1 Hücre Ölüm Tepiti

Ökaryotik hücre ölümün formlarından olan nekroz ve apoptoz, morfolojik ve biyokimyasal kriterlerle tanımlanabilmektedir. Nekroza, plazma zarının artan iyon geçirgenliği eşlik eder; hücreler şişer ve dakikalar içinde ozmotik lizis gelişir. Apoptoz, membran kabarması (zeiosis), sitoplazmanın yoğunlaşması ve endojen bir endonükleazın yanı sıra spesifik proteazların aktivasyonu ile karakterize edilir. Apoptoz, ökaryotik hücre ölümünün en yaygın şeklidir. Apoptoz sırasında aktive olan Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağımlı endonükleazlar çift sarmallı DNA'da en kolay ulaşılabilen nükleozomal bölgelerde kırıklar oluşturarak oligo- ve mononükleozomlar ortaya çıkarır. Oluşan DNA parçacıkları 180bp ve katları şeklinde ayrılmış olan fragmentleridir. Apoptoza uğrayan hücrelerin sitoplazmalarında mono- ve oligonükleozomların fazla olması DNA yıkımının plazma yıkımından bir süre önce başlamasından kaynaklanmaktadır. DNA nükleozomal olarak histon proteinleri (H2A, H2B, H3 ve H4) ile kompakt bir yapı halinde korunmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız Hücre Ölümü Tespiti Kiti ELISA (Cell Death Detection ELISA Roche 11 544 675 001), apoptoz geçiren

hücrelerin sitoplazmasında mevcut olduğu bilinen histonla ilişkili DNA fragmanlarını (mono ve oligonükleozomlar) analiz etmek için kullanıldı. Kit içeriğinde bulunan histonlara karşı yönlendirilmiş antikorlar histon H1, H2A, H2B H3 ve H4 proteinleri ile reaksiyona girerken, Anti-DNA peroksidaz (POD) antikoru tek veya çift zincirli DNA'ya bağlanarak işlev göstermektedir. Bu sistem kullanılarak ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında hücresel süpernatantta mono- ve oligonükleozom varlığı tayin edilmiş olup anti-histon antikorları ile hücre ölümü ölçülmüştür. Testin temeli kit içeriğinde bulunan monoklonal antikorların sırasıyla DNA ve histonlara yönlendirilmesi ile kantitatif sandviç enzim immünoassay prensibine dayanmaktadır. ARPE-19 hücreleri 6 kuyulu platelere ekilip tutunmaları için bir gece inkübatörde muhafaza edildikten sonra hidrojen peroksit ve oxyresveratrolün öncesinde, sonrasında ve birlikte uygulamaları yapıldı 20 saatlik inkübasyon süresi için 37°C sıcaklıkta inkübatörde bekletildi.

Kontrol Reaksiyonları

Negatif kontrol

Hücre ölümü indüksiyonu (hücresel tahlil) için bir negatif kontrol hazırlandı

Pozitif kontrol

1. İşlenmemiş hücrelerden (500 µl içinde 5×10^4 hücre/tüp, bkz. bölüm, Hücre ölümünün indüksiyonu) 1,500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
2. Süpernatantı atıldı.
3. 500 µl hypertonic buffer içinde hücre peletini yeniden süspanse edildi. (10 mM Tris, pH 7.4, 400 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 ve 10 mM MgCl_2).
4. +37°C'de 2 saat inkübe edildi.
5. Hücre parçalarını 15.000 rpm'de döndürüldü.
6. Süpernatantı dikkatlice çıkarıldı, süpernatantı inkübasyon buffer (Şişe 5) ile 1: 5 oranında seyreltili ve pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Örnek hazırlama

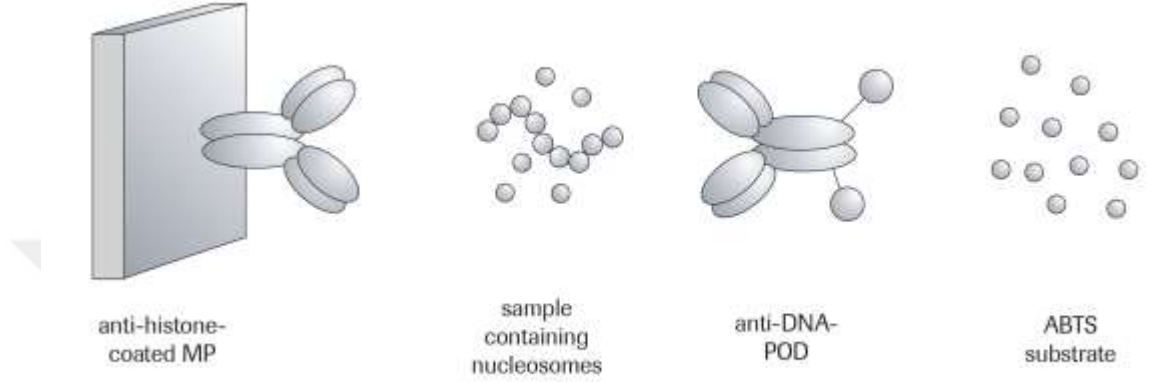
1. Hücreler platelerden tripsinizasyon işlemleri ile kaldırılarak 1500µl hacimli mikrosantrifüj tüplerine alındı (500 µl/tüp = 5×10^4 hücre/tüp).
2. Farklı konsantrasyonlarda CAM (0 µg CAM/ml ila 4 µg CAM/ml) içeren 500 ul kültür ortamı eklendi.
3. +37°C'de bir CO₂ inkübatöründe 4 saat inkübe edildi.
4. Hücreleri 200 x g'de 5 dakika santrifüjlendi.
5. Süpernatantı atıldı ve hücre peletini 1 ml kültür ortamında yeniden süspanse edildi.

6. Hücreleri 1,500 x g'de 5 dakika santrifüjlendi.
7. Hücre peletini tüp başına 500 µl İnkübasyon tamponu (Şişe 5) (1×10^5 hücre/ml) ile yeniden süspanse edildi ve iyice karıştırıldı.
8. +15 ila +25°C'de (= lizis) yaklaşık 30 dakika inkübe edildi.
9. Lizat 20.000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi.
10. 400 µl supernatant (= sitoplazmik fraksiyon) dikkatlice çıkarıldı.
11. Elde edilen süpernatanı 1:10 İnkübasyon tamponu ($= 1 \times 10^4$ hücre eşdeğeri/ml) ile önceden seyreltildi

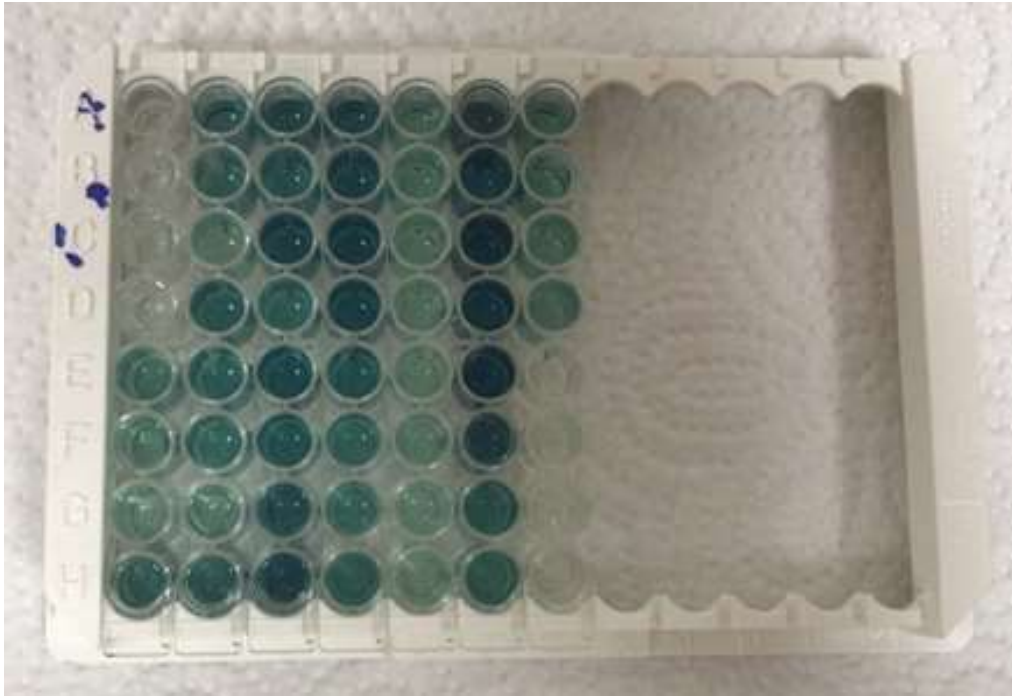
ELISA testi

1. Microplate modüllerinin her kuyucuğuna 100 µl Coating solüsyonu pipetlendi.
 - Microplate modülleri kendinden yapışkanlı kapak folyosu ile sıkıca kapatıldı.
2. +15 ila +25°C'de 1 saat +2 ila +8°C'de inkübe edildi.
3. Coating solüsyonunu emdirerek çıkarıldı.
4. Microplate modülünün her kuyucuğuna 200 µl İnkübasyon tamponu pipetlendi.
 - Microplate modülleri kendinden yapışkanlı kapak folyosu ile sıkıca kapatıldı.
5. +15 ila +25°C'de 30 dakika inkübe edildi.
6. Solüsyon uzaklaştırıldı.
 - Kuyuları, kuyu başına 300 µl yıkama solüsyonu ile üç kez durulandı; Yıkama solüsyonunu dikkatlice uzaklaştırıldı.
7. Microplate modüllerinin her kuyucuğuna 100 µl Sample solüsyonu pipetlendi.
 - İmmünolojik testin arka planının belirlenmesi için, her kuyuya 100 µl Incubation bufferi pipetlendi.
 - Microplate modülleri kendinden yapışkanlı kapak folyosu ile sıkıca kapatıldı.
8. +15 ila +25°C'de 90 dakika inkübe edildi.
9. Solüsyon uzaklaştırıldı.
 - Kuyuları, kuyu başına 250 ila 300 µl Washing solüsyonu ile üç kez durulandı; Yıkama solüsyonunu dikkatlice uzaklaştırıldı.
10. Boş pozisyon hariç, Microplate modülünün her kuyucuğuna 100 µl Konjugat solüsyonu pipetlendi.
 - Microplate modülleri kendinden yapışkanlı kapak folyosu ile sıkıca kapatıldı.
11. +15 ila +25°C'de 90 dakika inkübe edildi.
12. Solüsyonu iyice uzaklaştırıldı.
 - Kuyuları, kuyu başına 300 µl Yıkama solüsyonu ile üç kez durulandı; Yıkama solüsyonunu dikkatlice uzaklaştırıldı.

13. Microplate modüllerinin her kuyucuğuna 100 µl Substrat solüsyonu pipetlendi.
14. Renk gelişimi fotometrik analiz için yeterli olana kadar, yaklaşık 20 dakika, 250 rpm'de bir plaka çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
15. Boş bir substrat solüsyonuna göre 405 nm'de ölçüm yapmadan önce Microplatein kenarına dikkatlice vurarak kuyu içeriği homojenleştirildi.
 - Alternatif olarak, referans dalga boyu olarak 490 nm kullanıldı.



Şekil 3.8. Hücre ölüm tespiti kiti çalışma prensibi.



Fotoğraf 4.2. Hücre ölüm tespiti kiti renk değişimi.

3.3.2 Kaspaz-3

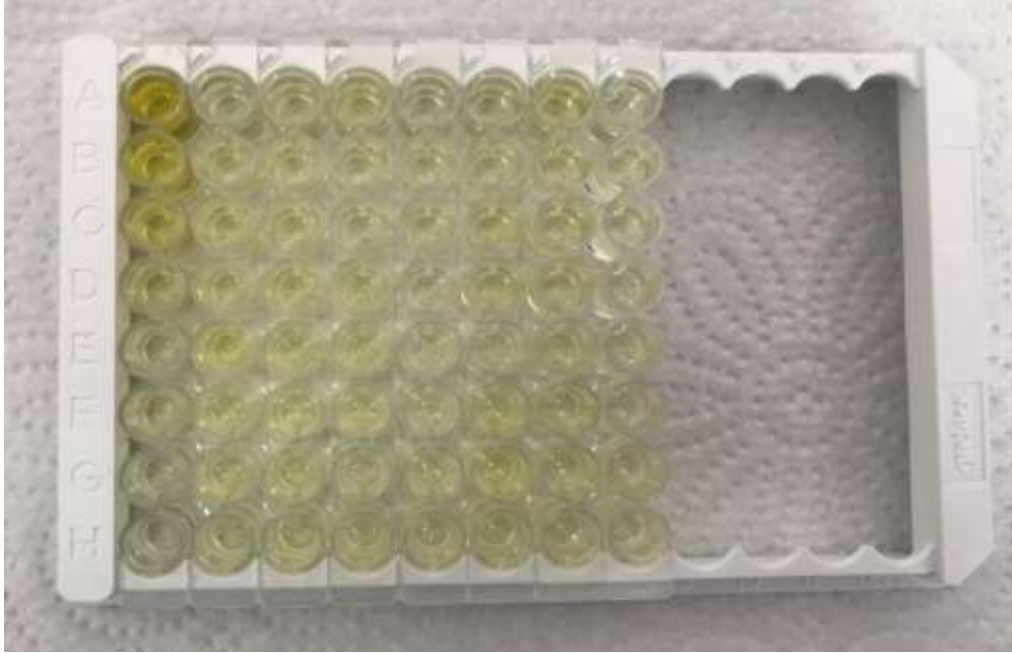
Kaspazlar, kinazlar gibi adım adım sinyal verme tarzında hareket eden aspartata özgü sistein proteazların bir ailesidir. Kaspazlar tüm hücrelerde bulunur, bu proteazların oligomerize reseptörlere alınması, otoproteolitik bölünmenin eşlik ettiği aktivasyona yol açar. Aktif kaspazlar, hücre hayatta kalması için kritik olan proteinleri parçalayan bir kaspaz kaskadı oluşturan ek kaspazları proteolize edebilir. Bu sinyal yolunun nihai sonucu, apoptoz adı verilen kontrollü hücre ölümünün bir şeklidir. Kaspaz-3, aspartat kalıntılarının karboksil ucundaki substratı parçalar. Aktif kaspaz-3 iki aktif bölgeye sahiptir ve iki öncü kaspaz-3 polipeptidinden türetilen iki özdeş büyük (~ 20 kDa) ve iki özdeş küçük (~ 10 kDa) alt birimden oluşur. Kaspaz-3, diğer kaspazlar tarafından proteolitik olarak aktive edilir. Her iki alt birim de substrat bağlanmasına ve katalize katkıda bulunur. Substratı kovalent olarak bağlayan aktif bölge sistein, büyük alt birimin C-terminalinin yakınında bulunur. Aktif kaspaz-3 iki katlı simetriye sahiptir, her biri karşı tarafta bulunan iki aktif bölge cebi. Kaspaz-3, kaspaz 8 ve 9 ile birlikte apoptotik yollarda önemli kavşaklarda yer alır. Human Caspase-3 Instant ELISA Kiti, hücre özlerinde insan Kaspaz-3'ün kantitatif tespiti için enzime bağlı bir immünosorban tahlilidir.

ARPE-19 hücreleri 6 kuyulu platelere ekilip tutunmaları için bir gece inkübatörde muhafaza edildikten sonra hidrojen peroksit ve oxyresveratrolün öncesinde, sonrasında ve birlikte uygulamaları yapıldı 20 saatlik inkübasyon süresi için 37°C sıcaklıkta inkübatörde bekletildi.

Test Protokolü

1. Hücreler platelerden tripsinizasyon işlemleri ile kaldırılarak 1500µl hacimli mikrosantrifüj tüplerine alındı
2. Standart striplerin etiketinde belirtildiği gibi tüm standart ve boş kuyulara damıtılmış su eklendi. (A1, A2 ila H1, H2).
3. Örnek kuyularına 140 µl distile su eklendi.
4. Belirlenen kuyulara her numuneden 10 µl eklendi ve içeriği karıştırıldı.
5. Kendinden yapışkanlı kapak folyosu ile sıkıca kapatıldı ve mikropilaka çalkalayıcıda 400 rpm'de oda sıcaklığında (18°C ila 25°C) 3 saat inkübe edildi.
6. Plaka Kapağını çıkarıldı ve kuyular boşaltıldı. Mikrokuyu stripleri, mikrokuyu içeriğinin kapsamlı aspirasyonu ile kuyu başına yaklaşık 400 µl Yıkama Tamponu ile 6 kez yıkandı.

7. Son yıkamadan sonra, fazla Yıkama Tamponunu çıkarmak için mikrokuyu stripleri 15 dakikadan fazla olmamak üzere emici bir kağıt üzerine baş aşağı yerleştirildi.
 8. Kör kuyucuklar dahil tüm kuyucuklara 100 µl TMB Substrate Solution pipetlendi.
 9. Mikrokuyu şeritlerini oda sıcaklığında (18° ila 25°C) yaklaşık 10 dakika inkübe edin. Yoğun ışığa doğrudan maruz kalmamasına dikkat edildi.
 10. Boş kuyucuklar dahil her kuyucuğa 100 µl Durdurma Solüsyonu hızlı bir şekilde pipetleyerek enzim reaksiyonunu durduruldu. Durdurma Çözeltisinin enzimi tamamen etkisiz hale getirmek için mikro kuyucuklar boyunca hızlı ve eşit bir şekilde yayılmasına dikkat edildi.
- Birincil dalga uzunluğu olarak 450 nm spektrofotometrede her mikro kuyunun absorbansını okundu.



Fotoğraf 4.3. Kaspaz 3 kiti renk değişimi.

3.3.3 Total Antioxidant Seviye

Erel'in geliştirdiği metoda göre, insan total antioksidan ölçme kiti (Human total antioxidant status ELISA kiti Cat.No E4350Hu) reaktifleri kullanılarak örnekler ve reaktifler eklenmesinden 10 dakika sonra spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir (194). Yöntem; örnekteki antioksidanlar, reaktiflerdeki koyu yeşil renkli 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS•+)’nin radikalini indirgenerek ABTS molekülüne dönüşümü prensibine dayanan otomatik ölçüm metodu ile tespit edildi. Örnekte bulunan antioksidan miktarı ile ilişkili olarak değişebilen, ABTS•+ radikalini ABTS’ye indirgenme oranı attıkça,

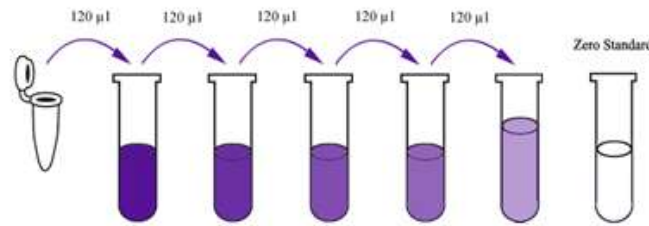
bileşiğın rengine azalmaya ya da rengin kaybolmasına neden olması prensibine dayanır. 660nm’de absorbandsaki değişim total antioksidan seviyesi ile alakalıdır. Yöntemin kalibrasyonu E vitamini analogu olan Trolox Eşdeğeri olarak isimlendirilen stabil bir antioksidan standardı ile yapılmaktadır. Çalışmamızda total antioksidant seviyelerini ölçmek için ARPE-19 hücreleri 6 kuyulu platelere ekilip tutunmaları için bir gece inkübatörde muhafaza edildikten sonra hidrojen peroksit ve oxyresveratrolün öncesinde, sonrasında ve birlikte uygulamaları yapıldı 20 saatlik inkübasyon süresi için 37°C sıcaklıkta inkibatörde bekletildi.

Reaktif Hazırlama

- Deneye başlamadan önce kullanılacak reaktifler oda sıcaklığına alındı.
- Standart 16U/ml standart oluşturmak için 120µl standardı (32U/ml) 120µl standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapmadan önce standart hafif çalkalanarak 15 dakika beklendi. 8U/ml, 4U/ml, 2U/ml ve 1U/ml solüsyonlarını oluşturmak için standart stok solüsyonunu (16U/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyrelterek hazırlandı. Standart seyreltici sıfır standart (0 ng/ml) olarak kullanıldı.
- Standart çözeltilerin tavsiye edilen seyreltilme aşaması aşağıdaki gibidir:

Tablo 3.3. Standat hazırlama (TAS).

16U/ml	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
8U/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
4U/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
2U/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
1U/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent



Standard Concentration	Standard No.5	Standard No.4	Standard No.3	Standard No.2	Standard No.1
32U/ml	16U/ml	8U/ml	4U/ml	2U/ml	1U/ml

- Yıkama Tamponu 500 ml 1x ile yıkama tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresini 25 kat distile su ile seyreltildi ve hafifçe karıştırıldı.

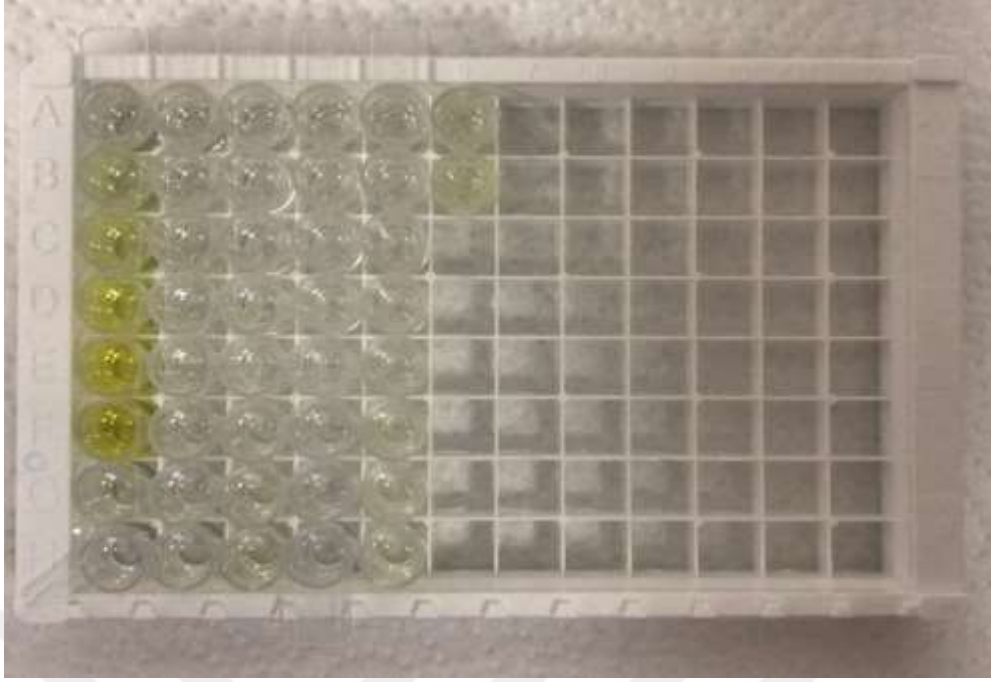
Hücre Lizatı İçin Protokol

Hücreler, test edilmeden önce aşağıdaki talimatlara göre parçalanmalıdır.

1. 6'lı plakalardaki hücreler 500 µl Tripsin ile yıkandı.
2. 250 µl Tripsin eklendi ve 37°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi.
3. 500 µl medium eklendi ve 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatantı alındı 500 µl PBS eklendi ve 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatantı alındı 250 µl Lizis Buffer eklendi ve 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi.

Test Prosedürü

1. Tüm reaktifler, standart solüsyonları ve numuneler talimatlara göre hazırlandı ve oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar kuyulara 50µl olarak eklendi.
3. Numune kuyularına 40µl numune ve ardından 10µl anti-TAS antikoru eklendi, standart kuyularına antikor eklenmedi.
4. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50µl streptavidin-HRP eklendi ve karıştırıldı. Plaka kapatıcı ile örtülerek ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
5. 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyular yıkandı ve en son kağıt havlu üzerinde kurumaya bırakıldı.
6. Her bir kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A ve ardından 50µl substrat solüsyonu B eklendi. Plak karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
7. Her kuyucuğa 50µl durdurma solüsyonu eklendi ve mavi renk hemen sarıya döndü.
8. Durdurma solüsyonunu sonrası 10 dakika içinde 450 nm de mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) ölçüldü.



Fotoğraf 4.4.TAS kiti renk değişimi.

3.3.4 Total Oksidan Seviye

Erel'in geliştirdiği metoda göre, insan total oksidan seviyesi ölçme kiti (Human total oxidant status ELISA Kit Cat.No E1599Hu) reaktifleri kullanılarak örnek ve reaktifler eklenmesinden 10 dakika sonra spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir (194). Yöntem; örnekteki oksidan maddeler Fe^{2+} -o-dianisidin kompleksini ferri (Fe^{3+}) iyona oksitler. Oksidasyon sonucu miktarı artan Fe^{3+} 'ün asidik ortamda xilenol orange ile renkli bir kompleks oluşturmaktadırlar. Oluşan rengin yoğunluğu örnekteki oksidan maddelerin toplam miktarı ile ilişkili olarak değişimler spektrofotometrede 560 nm'de tespit edilmiştir. Metotta standart olarak hidrojen peroksit kullanılmıştır, sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$ olarak verilmiştir. Çalışmamızda total oksidan seviyelerini ölçmek için ARPE-19 hücreleri 6 kuyulu platelere ekilip tutunmaları için bir gece inkübatörde muhafaza edildikten sonra hidrojen peroksit ve oxyresveratrolün öncesinde, sonrasında ve birlikte uygulamaları yapıldı 20 saatlik inkübasyon süresi için 37°C sıcaklıkta inkübatörde bekletildi.

Reaktif Hazırlama

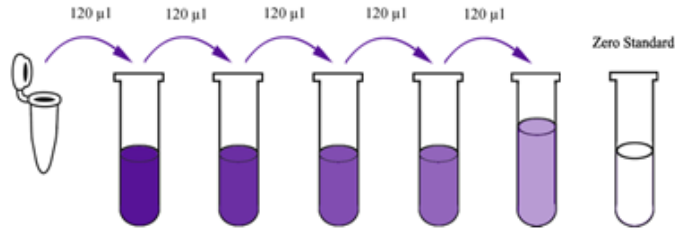
- Deneye başlamadan önce kullanılacak reaktifler oda sıcaklığına alındı.
- Standart 16U/ml standart oluşturmak için 120 μl standardı (32U/ml) 120 μl standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapmadan önce standard hafif çalkalanarak 15 dakika beklendi. 8U/ml, 4U/ml, 2U/ml ve 1U/ml solüsyonlarını

oluşturmak için standart stok solüsyonunu (16U/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyrelterek hazırlandı. Standart seyreltici sıfır standart (0 ng/ml) olarak kullanıldı.

- Standart çözeltilerin tavsiye edilen seyreltilme aşaması aşağıdaki gibidir: Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi aşağıdaki gibidir:

Tablo 3.4. Standart hazırlama (TOS).

16U/ml	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
8U/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
4U/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
2U/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
1U/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent



Standard Concentration	Standard No.5	Standard No.4	Standard No.3	Standard No.2	Standard No.1
32U/ml	16U/ml	8U/ml	4U/ml	2U/ml	1U/ml

- Yıkama Tamponu 500 ml 1x ile yıkama tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresini 25 kat distile su ile seyreltildi ve hafifçe karıştırıldı.

Hücre Lizatı İçin Protokol

Hücreler, test edilmeden önce aşağıdaki talimatlara göre parçalanmalıdır.

1. 6'lı plakalardaki hücreler 500 µl Tripsin ile yıkandı.
2. 250 µl Tripsin eklendi ve 37°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi.
3. 500 µl medium eklendi ve 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatantı alındı 500 µl PBS eklendi ve 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatantı alındı 250 µl Lizis Buffer eklendi ve 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi.

Test Prosedürü

1. Tüm reaktifler, standart solüsyonları ve numuneler talimatlara göre hazırlandı ve oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar kuyulara 50µl olarak eklendi.
3. Numune kuyularına 40µl numune ve ardından 10µl anti-TOS antikoru eklendi, standart kuyularına antikor eklenmedi.

4. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50µl streptavidin-HRP eklendi ve karıştırıldı. Plaka kapatıcı ile örtülerek ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
5. 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyular yıkandı ve en son kağıt havlu üzerinde kurumaya bırakıldı.
6. Her bir kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A ve ardından 50µl substrat solüsyonu B eklendi. Plak karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
7. Her kuyucuğa 50µl durdurma solüsyonu eklendi ve mavi renk hemen sarıya döndü.
8. Durdurma solüsyonunu sonrası 10 dakika içinde 450 nm de mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) ölçüldü.



Fotoğraf 4.5. TOS kiti renk değişimi.

3.3.5 Total Protein Ölçümü

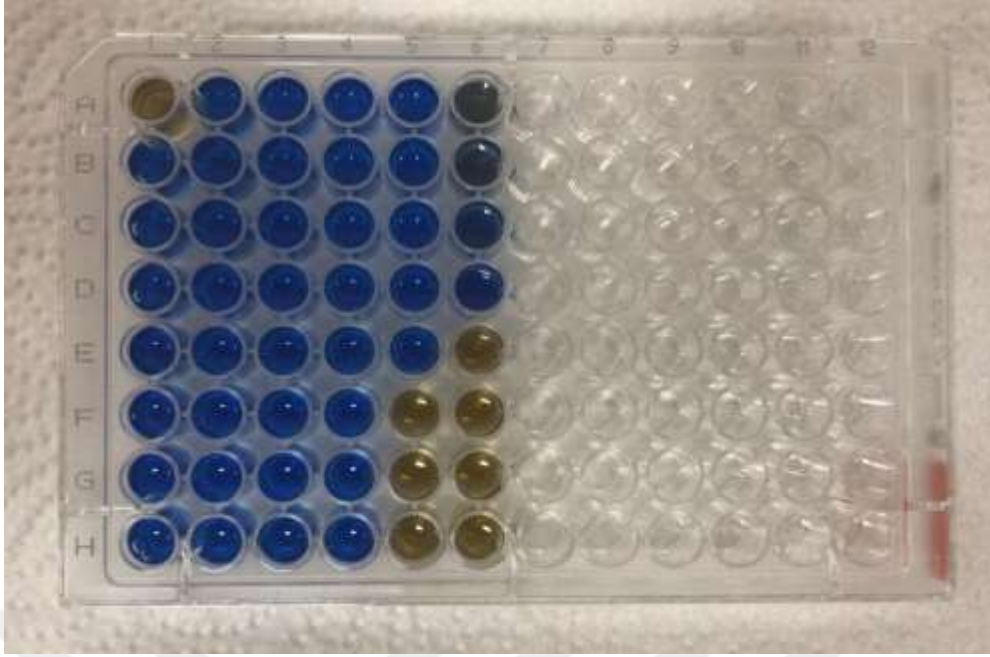
MDA analizi sırasında ilgili normalizasyon hesaplamaları için total protein ölçümü Pierce BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Kit (Thermo, Catalog number: 23227) kullanılarak yapıldı.

Standart hazırlama.

Standart tüpleri	Dilüent hacmi (µL)	BSA (Bovine serum albumin) kaynağı ve hacmi (µL)	Final konsantrasyonu (µg/mL)	BSA
A	0	Stoktan 300	2000	
B	125	Stoktan 375	1500	
C	325	Stoktan 325	1000	
D	175	B tüpünden 175	750	
E	325	C tüpünden 325	500	
F	325	E tüpünden 325	250	
G	325	F tüpünden 325	125	
H	400	G tüpünden 100	25	
I	400	0=Blank	0=Blank	

Şekil 3.9. Standart hazırlama (Protein tayini).**Protokol**

1. BCA Reagent A/BCA Reagent B 50/1 oranında, örnek sayısına göre hazırlandı.
2. Standart solüsyonları tabloya göre hazırlandı.
3. Hazırlanan standart solüsyonları her kuyucuğa 25 µL olacak şekilde eklendi.
4. Örnekler her her kuyucuğa 25 µL olacak şekilde eklendi.
5. BCA çalışma solüsyonu her kuyucuğa 200 µL eklendi sonrasında mikrolaka 30 saniye yavaşça çalkalandı.
6. Üzeri kapatılan mikrolaka, 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
7. Son olarak mikrolaka 562 nm’de mikrolaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun ölçümü yapıldı.



Fotoğraf 4.5. Protein tayini renk değişimi.

3.4 İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde normal dağılım öñşartı Shapiro-Wilk testiyle analiz edilmiş, basıklık ve çarpıklık katsayıları da incelenmiştir. Grupların karşılaştırılmasında One-Way ANOVA testi kullanılmış, çoklu karşılaştırmalar için Fisher's LSD post hoc test ve uygulamaların kontrol grubu ile, kontrolün hidrojen peroksit grubu ile karşılaştırması için Dunnet post hoc testi kullanılmıştır. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama ve standart sapma ile tablo halinde verilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS v.22 paket programı ile yapılmış ve anlamlılık düzeyi 0,05 olarak dikkate alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Hücre Kültürü Uygulamaları

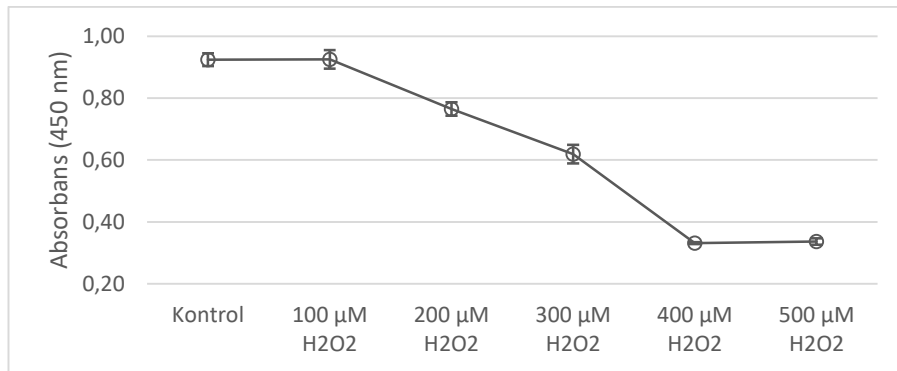
4.1.1 ARPE-19 Hücre Hattında H₂O₂ İle Hasar Modelinin Oluşturulması

ARPE-19 hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı hücre hasarı modelinin oluşturulması için kullanılan hidrojen peroksit konsantrasyon bağımlı (200 ve 400 μ M) olarak hücre ölümünü artırdı (Şekil 4.1). %50-60 arasında hücre ölümü oluşturan hidrojen peroksit konsantrasyonu (400 μ M) bundan sonraki deneylerde hücre hasar modeli oluşturulması için kullanıldı ($p < 0.001$; Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. ARPE-19 H₂O₂ ile oluşturulan hasar modelinde istatistiksel sonuçlar.

Tek Başına H ₂ O ₂ Uygulaması			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,9245	0,0208	<0,001
100 μ M H ₂ O ₂	0,9255	0,0298	
200 μ M H ₂ O ₂	0,7649	0,0218*	
300 μ M H ₂ O ₂	0,6190	0,0300*	
400 μ M H ₂ O ₂	0,3318	0,0034*	
500 μ M H ₂ O ₂	0,3371	0,0104*	

100 μ M H₂O₂ grubu kontrol grubu ile benzerlik gösterirken, diğer H₂O₂ grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmektedir ($p < 0.001$). *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.1. ARPE-19 hücrelerinde hidrojen peroksitin hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.1.2. ARPE-19 Hücrelerinde Oxyresveratrolün Etkisinin Değerlendirilmesi

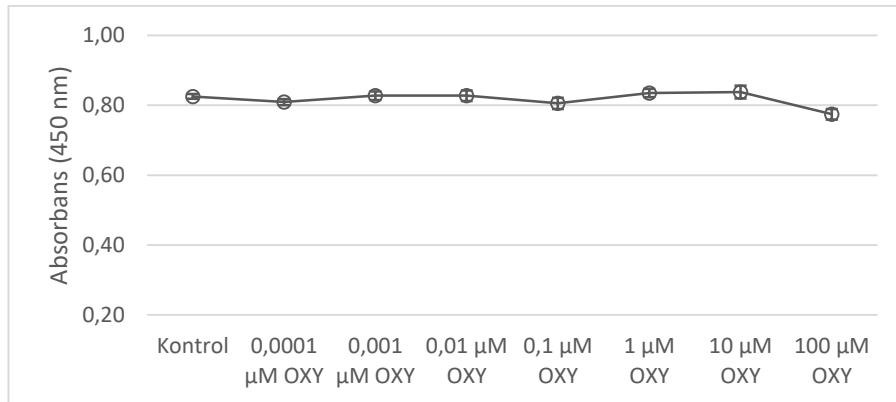
Nöroprotektif ajan olarak kullanılması planlanan oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde hücre hasarı oluşturulmadan tek başına farklı konsantrasyonlarda uygulandığında genel olarak hücre canlılığı üzerine istatistiksel anlamlı bir etki oluşturmadı (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2). Gruplar içerisinde standart sapmanın çok küçük olması nedeniyle 0,1 ve 100 μ M oxyresveratrol grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı bir etki oluşmuştur (0,1 μ M ($p=0,026$) ve 100 μ M ($p<0.001$)).

Tablo 4.2. ARPE-19 oxyresveratrolün etkisinin istatistiksel sonuçları.

Tek Başına Oxyresveratrol Uygulaması			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,8254	0,0069	<0,001
0,0001 μ M OXY	0,8093	0,0086	
0,001 μ M OXY	0,8276	0,0124	
0,01 μ M OXY	0,8274	0,0147	
0,1 μ M OXY	0,8054	0,0160*	
1 μ M OXY	0,8351	0,0119	
10 μ M OXY	0,8380	0,0183	
100 μ M OXY	0,7744	0,0154*	

0,1 μ M OXY grubu ile kontrol ($p=0,026$) ve 100 μ M OXY grubu ile kontrol ($p<0.001$) arasında anlamlı farklılık gösterirken, diğer OXY grupları ile kontrol grubu arasında benzerlik görülmektedir.

*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.2. ARPE-19 hücrelerinde oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisi.

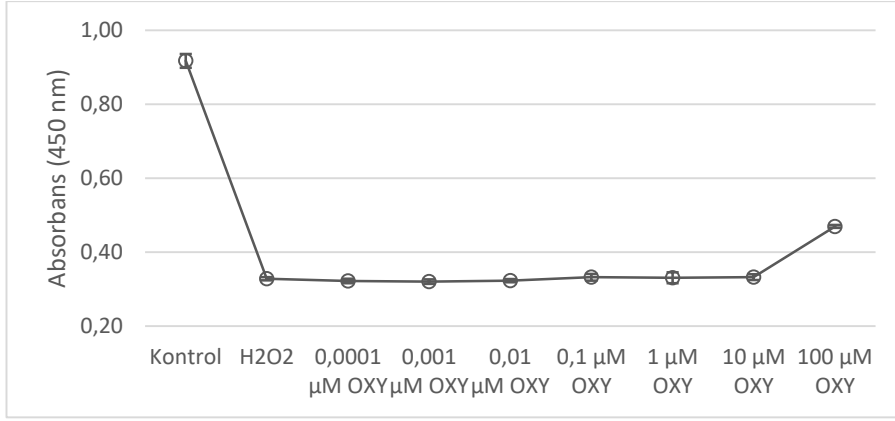
4.1.3. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesi Oxyresveratrolün Etkisinin Değerlendirilmesi

Nöroprotektif ajan olarak kullanılan oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μM H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar oluşum öncesi farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, 100 μM OXY istatistiksel anlamlı bir etki oluşturdu ($p<0.001$; Tablo 4.3 ve Şekil 4.3). 100 μM OXY hidrojen peroksitin oluşturduğu hücre hasarını yaklaşık %15 oranında azalttı (Tablo 4.3 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

H₂O₂ Uygulamasından 24 Saat Önce Oxyresveratrol Uygulaması			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,9180	0,0185	<0,001
H ₂ O ₂	0,3281	0,0041	
0,0001 μM OXY	0,3221	0,0064	
0,001 μM OXY	0,3203	0,0062	
0,01 μM OXY	0,3229	0,0043	
0,1 μM OXY	0,3321	0,0094	
1 μM OXY	0,3308	0,0148	
10 μM OXY	0,3325	0,0074	
100 μM OXY	0,4698	0,0040*	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0.001$). Bu farklılık 100 μM OXY grubu ile H_2O_2 ve kontrol ile H_2O_2 ($p<0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. Diğer OXY uygulama grupları ise istatistiksel olarak H_2O_2 grubuna benzerlik göstermektedir. *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.3. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisi.

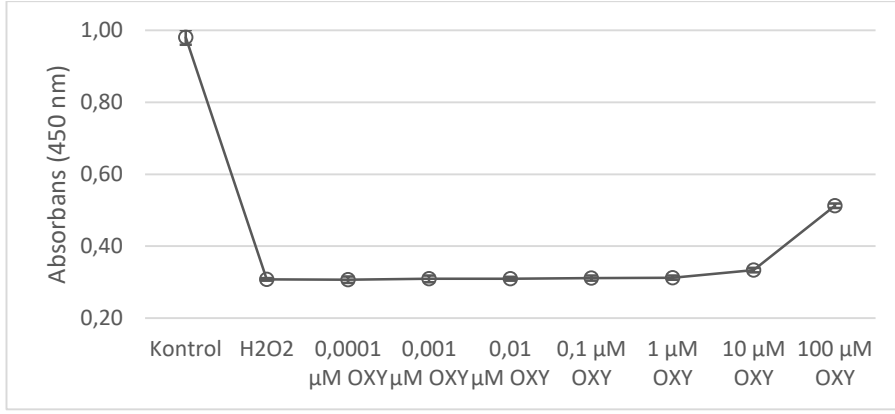
4.1.4. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Sonrası Oxyresveratrolün Etkisinin Değerlendirilmesi

Oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μM H_2O_2 ile oksidatif hasar oluşum sonrası farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, 10 μM oxyresveratrol ve 100 μM oxyresveratrol istatistiksel anlamlı bir etki oluşturdu ($p<0.001$; Tablo 4.4 ve Şekil 4.4). Hidrojen peroksitin oluşturduğu hücre hasarını 10 μM oxyresveratrol yaklaşık %3 ve 100 μM oxyresveratrol %22 oranında azalttı (Tablo 4.4 ve Şekil 4.4).

Tablo 4.4. Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

H₂O₂ Uygulasından 4 Saat Sonra Oxyresveratrol Uygulaması			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,9810	0,0206	<0,001
H ₂ O ₂	0,3078	0,0034	
0,0001 μM OXY	0,3069	0,0086	
0,001 μM OXY	0,3091	0,0092	
0,01 μM OXY	0,3091	0,0054	
0,1 μM OXY	0,3110	0,0071	
1 μM OXY	0,3124	0,0058	
10 μM OXY	0,3335	0,0063*	
100 μM OXY	0,5124	0,0063*	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0.001$). Bu farklılık 10 μM OXY grubu ile H_2O_2 ($p<0.001$), 100 μM OXY ile H_2O_2 ($p<0.001$) ve kontrol ile H_2O_2 ($p<0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. Diğer OXY uygulama grupları ise istatistiksel olarak H_2O_2 grubuna benzerlik göstermektedir. *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.4. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisi.

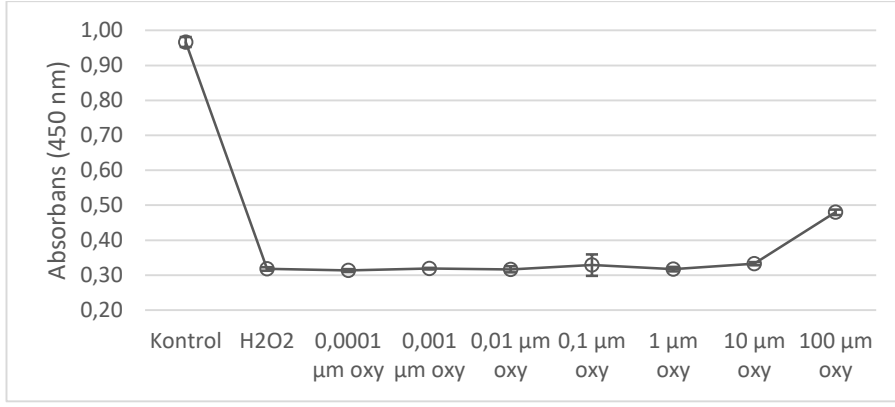
4.1.5. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Sırasında Oxyresveratrolün Etkisinin Değerlendirilmesi

Oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μM H_2O_2 ile oksidatif hasar oluşum sırasında farklı konsantrasyonlarda uygulandığında, 0,1 μM oxyresveratrol ve 100 μM oxyresveratrol istatistiksel anlamlı bir etki oluşturdu ($p=0,043$, $p<0.001$; Tablo 4.5 ve Şekil 4.5). Hidrojen peroksitin oluşturduğu hücre hasarını 0,1 μM oxyresveratrol yaklaşık %1 ve 100 μM oxyresveratrol %16 oranında azalttı (Tablo 4.5 ve Şekil 4.5).

Tablo 4.5. Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.

H₂O₂ ve Oxyresveratrolün Birlikte Uygulaması			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,9670	0,0142	<0,001
H ₂ O ₂	0,3179	0,0048	
0,0001 μM OXY	0,3133	0,0041	
0,001 μM OXY	0,3188	0,0023	
0,01 μM OXY	0,3166	0,0086	
0,1 μM OXY	0,3287	0,0311*	
1 μM OXY	0,3174	0,0065	
10 μM OXY	0,3329	0,0049	
100 μM OXY	0,4801	0,0077*	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0.001$). Bu farklılık 0,1 μM OXY grubu ile H_2O_2 ($p=0,043$), 100 μM OXY ile H_2O_2 ($p<0.001$) ve kontrol ile H_2O_2 ($p<0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. Diğer OXY uygulama grupları ise istatistiksel olarak H_2O_2 grubuna benzerlik göstermektedir. *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.5. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrolün hücre canlılığına etkisi.

4.1.6. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesi Oxyresveratrol Uygulamasında ER α ve ER β Blokörü ICI182,780'nin Etkisinin Değerlendirilmesi

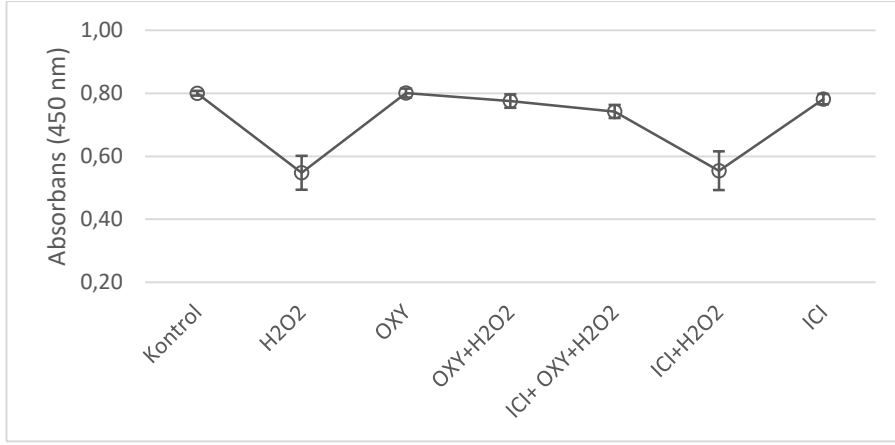
Oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μ M H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar oluşumundan 24 saat önce 100 μ M uygulandı, uygulamanın 1 saat öncesinde ise östrojen reseptör inhibitörü 0,1 μ M ICI182,780 uygulandı. Oxyresveratrol, H₂O₂ oluşturduğu hasarı istatistiksel anlamlı olarak azaltırken ($p < 0.001$), ICI182,780 uygulaması oxyresveratrolün koruyucu etkisini istatistiksel anlamlı olarak değiştirmedir. Oxyresveratrol östrojen reseptör α ve β bağımsız etki göstermiştir. ICI182,780 ise tek başına hücre canlılığı üzerine etki oluşturmamıştır ($p < 0.001$; Tablo 4.6 ve Şekil 4.6).

Tablo 4.6. Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

H ₂ O ₂ Uygulamasından 24 Saat Önce Oxyresveratrol Uygulaması ICI İnhibitör Etkisi			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,8006	0,0081	<0,001
H ₂ O ₂	0,5483	0,0541	
OXY	0,8010	0,0143	
OXY+H ₂ O ₂	0,7759	0,0214	
ICI+ OXY+H ₂ O ₂	0,7425	0,0210	
ICI+H ₂ O ₂	0,5545	0,0615	
ICI	0,7818	0,0165	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.001$). Bu farklılık OXY+H₂O₂ grubu ile H₂O₂ ($p < 0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. OXY+H₂O₂ grubu ise istatistiksel olarak ICI+ OXY+H₂O₂ grubuna benzerlik göstermektedir. ICI+H₂O₂ grubu ile H₂O₂ grubu istatistiksel olarak benzerlik gösterirken, diğer uygulama grupları ile H₂O₂ arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0.001$).

*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.6. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.

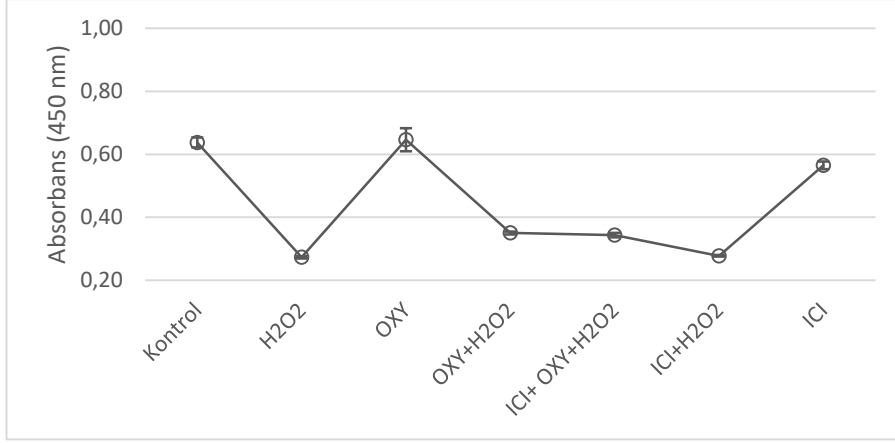
4.1.7. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Sonrası Oxyresveratrol Uygulamasında ER α ve ER β Blokörü ICI182,780'nin Etkisinin Değerlendirilmesi

Oxyresveratrol ARPE-19 hücrelerinde 400 μ M H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar oluşumundan 4 saat sonra 100 μ M uygulandı, uygulamanın 1 saat öncesinde ise östrojen reseptör inhibitörü 0,1 μ M ICI182,780 uygulandı. Oxyresveratrol, H₂O₂ oluşturduğu hasarı istatistiksel anlamlı olarak azaltırken ($p < 0.001$), ICI182,780 uygulaması oxyresveratrolün koruyucu etkisini değiştirmedir. Oxyresveratrol östrojen reseptöre ve β bağımsız etki göstermiştir. ICI182,780 ise tek başına hücre canlılığı üzerine etki oluşturmada ($p < 0.001$; Tablo 4.7 ve Şekil 4.7).

Tablo 4.7. Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.

H ₂ O ₂ Uygulamasından 4 Saat Sonra Oxyresveratrol Uygulaması ICI İnhibitör Etkisi			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,6379	0,0157	<0,001
H ₂ O ₂	0,2730	0,0033	
OXY	0,6463	0,0366	
OXY+H ₂ O ₂	0,3503	0,0045	
ICI+ OXY+H ₂ O ₂	0,3435	0,0071	
ICI+H ₂ O ₂	0,2775	0,0026	
ICI	0,5653	0,0125	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.001$). Bu farklılık OXY+H₂O₂ grubu ile H₂O₂ ($p < 0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. OXY+H₂O₂ grubu ise istatistiksel olarak ICI+ OXY+H₂O₂ grubuna benzerlik göstermektedir. ICI+H₂O₂ grubu ile H₂O₂ grubu istatistiksel olarak benzerlik gösterirken, diğer uygulama grupları ile H₂O₂ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır($p < 0.001$). *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.7. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.

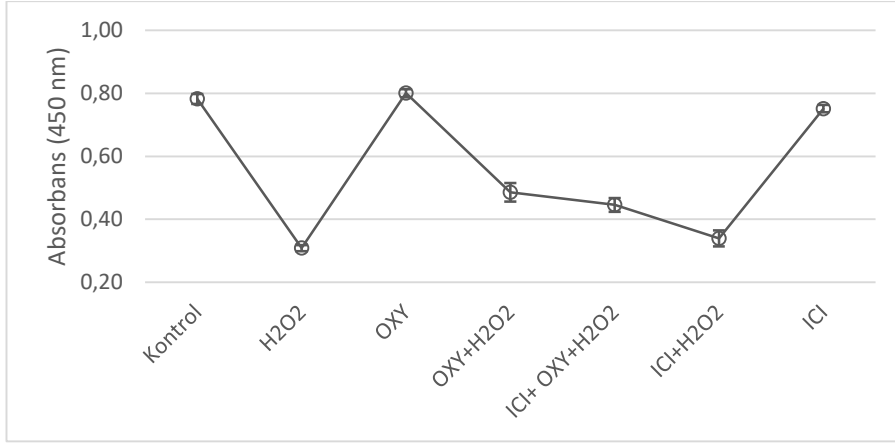
4.1.8. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Sırasında Oxyresveratrol Uygulamasında ER α ve ER β blokörü ICI182,780'nin Etkisinin Değerlendirilmesi

Oxyresveratrol ARPE-19 hücrelerinde 400 μ M H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar oluşum sırasında 100 μ M uygulandı, uygulamanın 1 saat öncesinde ise östrojen reseptör inhibitörü 0,1 μ M ICI182,780 uygulandı. Oxyresveratrol, H₂O₂ oluşturduğu hasarı istatistiksel anlamlı olarak azaltırken ($p < 0.001$), ICI182,780 uygulaması oxyresveratrolün koruyucu etkisini istatistiksel anlamlı olarak azalttı ($p < 0.001$). Oxyresveratrolün koruyucu etkisi, düşük düzeyde de olsa östrojen reseptöre ve β bağımlı görünmektedir. ICI182,780 ise tek başına hücre canlılığı üzerine etki oluşturmada ($p < 0.001$; Tablo 4.8 ve Şekil 4.8).

Tablo 4.8. Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.

H₂O₂ ve Oxyresveratrolün Birlikte Uygulaması ICI İnhibitör Etkisi			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,7824	0,0158	<0,001
H ₂ O ₂	0,3085	0,0097	
OXY	0,8010	0,0129	
OXY+H ₂ O ₂	0,4859	0,0294	
ICI+ OXY+H ₂ O ₂	0,4460	0,0217*	
ICI+H ₂ O ₂	0,3394	0,0253	
ICI	0,7518	0,0118	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.001$). Bu farklılık OXY+H₂O₂ ile H₂O₂ ($p < 0.001$), ICI+ OXY+H₂O₂ ile ICI+H₂O₂ ($p < 0.001$) ve ICI+H₂O₂ ile H₂O₂ ($p = 0,013$) grupları arasında ortaya çıkmaktadır. Diğer uygulama grupları ile H₂O₂ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p < 0.001$). *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.8. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrol uygulamasında ICI östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.

4.1.9. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesi Oxyresveratrol Uygulamasında G-proteini İle İlişkili Östrojen Reseptör 1 (GPER1) Blokörü G15'in Etkisinin Değerlendirilmesi

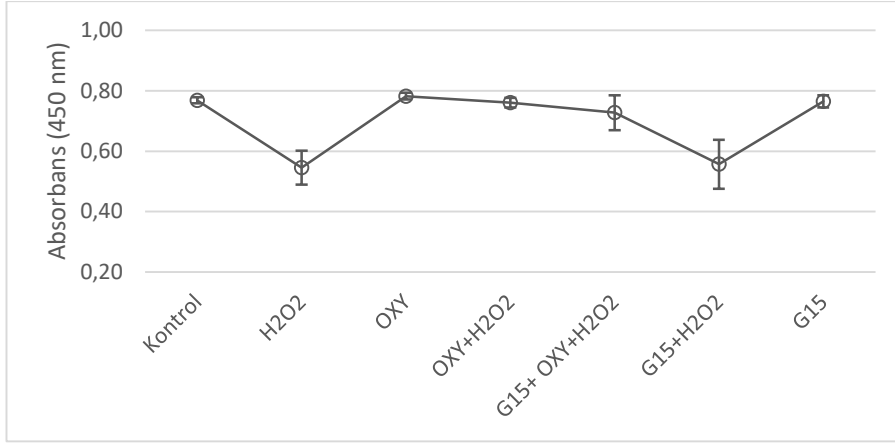
Oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μM H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar oluşumundan 24 saat önce 100 μM uygulandı, uygulamanın 1 saat öncesinde ise östrojen reseptör inhibitörü 0,1 μM G15 uygulandı, oxyresveratrol, H_2O_2 'in oluşturduğu hasarı istatistiksel anlamlı olarak azaltırken ($p<0.001$), G15 uygulaması oxyresveratrolün koruyucu etkisini değiştirmedir. Oxyresveratrol GPER1 bağımsız etki göstermiştir. G15 inhibitörünün ise tek başına hücre canlılığı üzerine etkisi olmamıştır ($p<0.001$; Tablo 4.9 ve Şekil 4.9).

Tablo 4.9. Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.

H ₂ O ₂ Uygulamasından 24 Saat Önce Oxyresveratrol Uygulaması G15 İnhibitör Etkisi			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,7685	0,0102	<0,001
H ₂ O ₂	0,5456	0,0561	
OXY	0,7824	0,0109	
OXY+H ₂ O ₂	0,7608	0,0160	
G15+ OXY+H ₂ O ₂	0,7278	0,0576	
G15+H ₂ O ₂	0,5569	0,0813	
G15	0,7650	0,0198	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0.001$). Bu farklılık OXY+H₂O₂ grubu ile H₂O₂ ($p<0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. OXY+H₂O₂ grubu ise istatistiksel olarak G15+ OXY+H₂O₂ grubuna benzerlik göstermektedir. G15+H₂O₂ grubu ile H₂O₂ grubu istatistiksel olarak benzerlik gösterirken, diğer uygulama grupları ile H₂O₂ arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır($p<0.001$).

*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.9. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum öncesi oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.

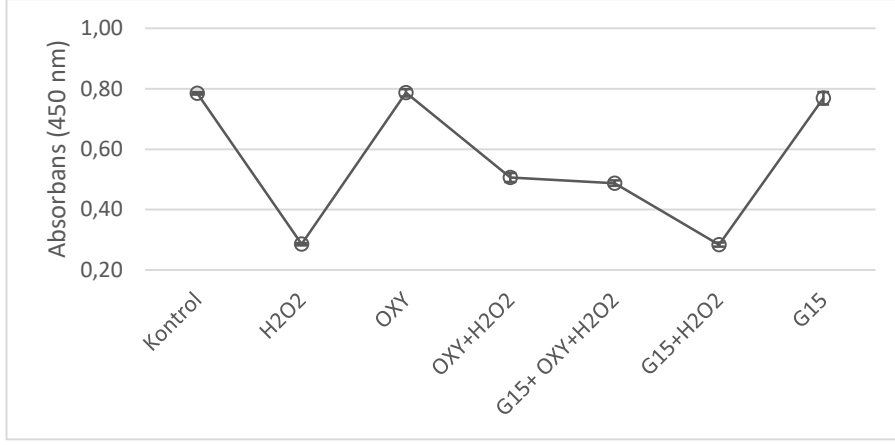
4.1.10. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Sonrası Oxyresveratrol Uygulamasında G-proteini İle İlişkili Östrojen Reseptör 1 Blokörü G15'in Etkisinin Değerlendirilmesi

Oxyresveratrol ARPE-19 hücrelerinde 400 μM H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar oluşumundan 4 saat sonra 100 μM uygulandı, uygulamanın 1 saat öncesinde ise östrojen reseptör inhibitörü 0,1 μM G15 uygulandı, oxyresveratrol, H_2O_2 oluşturduğu hasarı istatistiksel anlamlı olarak azaltırken ($p<0.001$), G15 uygulaması oxyresveratrolün koruyucu etkisini istatistiksel anlamlı olarak azalttı ($p<0.001$). Oxyresveratrolün koruyucu etkisi, düşük düzeyde de olsa GPER1 bağımlı görünmektedir. G15 inhibitörünün ise tek başına hücre canlılığı üzerine etkisi olmamıştır ($p<0.001$; Tablo 4.10 ve Şekil 4.10).

Tablo 4.10. Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.

H₂O₂ Uygulamasından 4 Saat Sonra Oxyresveratrol Uygulaması G15 İnhibitör Etkisi			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,7855	0,0045	<0,001
H ₂ O ₂	0,2858	0,0038	
OXY	0,7870	0,0124	
OXY+H ₂ O ₂	0,5061	0,0151	
G15+ OXY+H ₂ O ₂	0,4876	0,0089*	
G15+H ₂ O ₂	0,2840	0,0067	
G15	0,7693	0,0207	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0.001$). Bu farklılık OXY+H₂O₂ grubu ile H₂O₂ ($p<0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. OXY+H₂O₂ grubu ise istatistiksel olarak G15 + OXY+H₂O₂ grubuna benzerlik göstermektedir. G15 +H₂O₂ grubu ile H₂O₂ grubu istatistiksel olarak benzerlik gösterirken, diğer uygulama grupları ile H₂O₂ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0.001$). *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 8.10. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.

4.1.11. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Sırasında Oxyresveratrol Uygulamasında G-proteini İle İlişkili Östrojen Reseptör 1 Blokörü G15'in Etkisinin Değerlendirilmesi

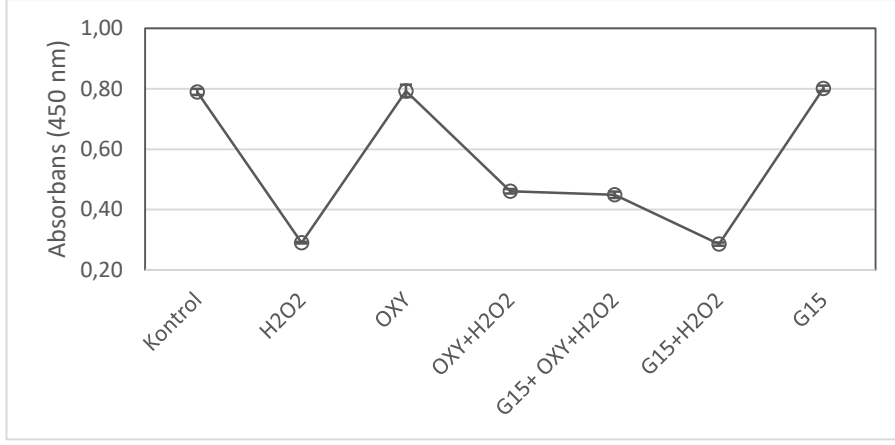
Oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μM H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar oluşumu sırasında 100 μM uygulandı, uygulamanın 1 saat öncesinde ise östrojen reseptör inhibitörü 0,1 μM G15 uygulandı, oxyresveratrol, H_2O_2 'in oluşturduğu hasarı istatistiksel anlamlı olarak azaltırken ($p<0.001$), G15 uygulaması oxyresveratrolün koruyucu etkisini değiştirmedir. Oxyresveratrol GPER1 bağımsız etki göstermiştir. G15 inhibitörünün ise tek başına hücre canlılığı üzerine etkisi olmamıştır ($p<0.001$; Tablo 4.11 ve Şekil 4.11).

Tablo 4.11. Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.

H_2O_2 ve Oxyresveratrolün Birlikte Uygulaması G15 İnhibitör Etkisi			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,7899	0,0098	<0,001
H_2O_2	0,2905	0,0026	
OXY	0,7930	0,0205	
OXY+ H_2O_2	0,4609	0,0075	
G15+ OXY+ H_2O_2	0,4493	0,0102	
G15+ H_2O_2	0,2856	0,0052	
G15	0,8015	0,0088	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0.001$). Bu farklılık OXY+ H_2O_2 grubu ile H_2O_2 ($p<0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. OXY+ H_2O_2 grubu ise istatistiksel olarak G15+ OXY+ H_2O_2 grubuna benzerlik göstermektedir. G15+ H_2O_2 grubu ile H_2O_2 grubu istatistiksel olarak benzerlik gösterirken, diğer uygulama grupları ile H_2O_2 arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0.001$).

*Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.11. ARPE-19 Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrol uygulamasında G15 östrojen reseptör inhibitörünün hücre canlılığına etkisi.

4.2. Biyokimyasal Analizler

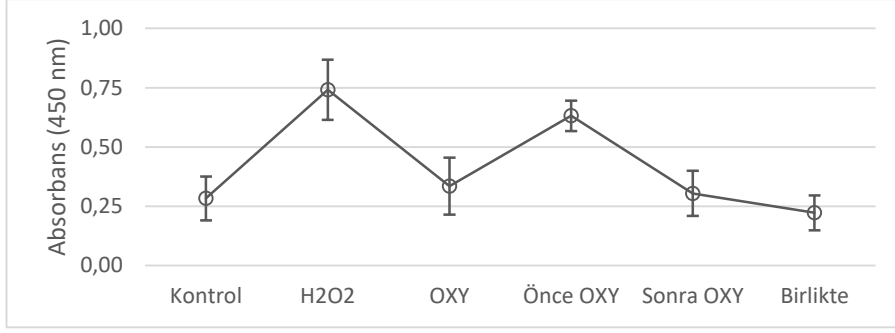
4.2.1. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesinde, Sonrasında ve Sırasında Oxyresveratrol Uygulamasında Hücre Ölümü Tespiti

Nöroprotektif ajan olarak kullanılan oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μ M H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar öncesinde, sonrasında ve sırasında 100 μ M uygulandı, hücre ölümü H_2O_2 grubuna kıyasla tüm çalışma gruplarında azalmıştır. Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır (Tablo 4.12). Oxyresveratrol, sonra oxyresveratrol ve birlikte grupları ile H_2O_2 arasında istatistiksel anlamlı bir şekilde hücre ölümünde azalma görülmektedir ($p < 0.001$). Önce oxyresveratrol grubunda da azalma görülmesine karşın H_2O_2 grubu ile istatistiksel olarak benzerlik göstermektedir. Oxyresveratrolün oksidatif stres altında ARPE-19 hücrelerinde apoptozu baskıladığı görülmektedir ($p < 0.001$; Tablo 4.12 ve Şekil 4.12).

Tablo 4.12. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında hücre ölümünün istatistiksel değerlendirilmesi.

Cell Death			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,2827	0,0926*	<0,001
H_2O_2	0,7415	0,1270	
OXY	0,3345	0,1203*	
Önce OXY	0,6315	0,0641	
Sonra OXY	0,3040	0,0952*	
Birlikte	0,2222	0,0737*	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.001$). Bu farklılık kontrol, oxyresveratrol, sonra oxyresveratrol ve birlikte grupları ile H_2O_2 ($p < 0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. Önce oxyresveratrol grubu ise istatistiksel olarak H_2O_2 grubuna benzerlik göstermektedir. *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.12. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında hücre ölümünün değerlendirilmesi.

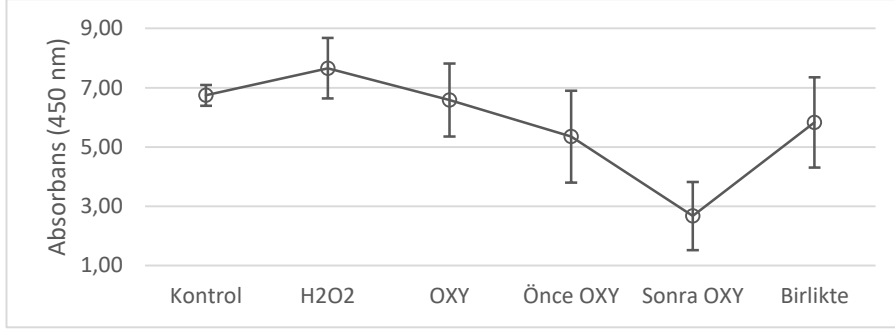
4.2.2. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesinde, Sonrasında Ve Sırasında Oxyresveratrol Uygulamasında Kaspaz-3 Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Nöroprotektif ajan olarak kullanılan oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μ M H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında 100 μ M uygulandı, kaspaz-3 aktivitesi H_2O_2 grubuna kıyasla tüm çalışma gruplarında azalmıştır. Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır (Tablo 8.13). Önce oxyresveratrol ve sonra oxyresveratrol grupları ile H_2O_2 arasında istatistiksel anlamlı bir şekilde hücre ölümünde azalma görülmektedir ($p < 0.001$). oxyresveratrol ve birlikte grubunda da azalma görülmesine karşın H_2O_2 grubu ile istatistiksel olarak benzerlik bulunmaktadır. Oxyresveratrolün oksidatif stres altında ARPE-19 hücrelerinde mitokondri aracılı apoptozu baskıladığını göstermektedir (tüm $p < 0.001$; Tablo 4.13 ve Şekil 4.13).

Tablo 4.13. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında kaspaz-3 aktivitesinin istatistiksel değerlendirilmesi.

Caspase-3			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	6,7420	0,3504*	<0,001
H_2O_2	7,6582	1,0193	
OXY	6,5845	1,2355	
Önce OXY	5,3464	1,5479*	
Sonra OXY	2,6676	1,1522*	
Birlikte	5,8303	1,5249	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.001$). Bu farklılık kontrol, önce OXY ve sonra OXY grupları ile H_2O_2 ($p < 0.001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. OXY ve birlikte grupları ise istatistiksel olarak H_2O_2 grubuna benzerlik göstermektedir. *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.13. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi.

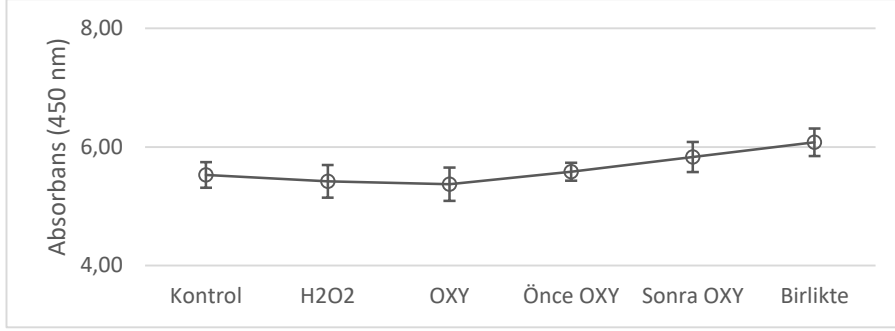
4.2.3. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesinde, Sonrasında Ve Sırasında Oxyresveratrol Uygulamasında Total Oksidan Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Nöroprotektif ajan olarak kullanılan oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μ M H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında 100 μ M uygulandı, total oksidan seviyesinde (TOS) genel olarak anlamlı bir farklılık vardır (Tablo 4.14). Post hoc test sonucuna göre sonra oxyresveratrol ($p=0,025$) ve birlikte ($p<0,001$) grupları H_2O_2 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır (Tablo 4.14 ve Şekil 4.14).

Tablo 4.14. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında total oksidan seviyelerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

TOS			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	5,5271	0,2150	<0,001
H ₂ O ₂	5,4186	0,2771	
OXY	5,3721	0,2818	
Önce OXY	5,5814	0,1529	
Sonra OXY	5,8295	0,2542*	
Birlikte	6,0775	0,2310*	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,001$). Bu farklılık kontrol ($p<0,001$), sonra OXY ($p=0,025$) ve birlikte ($p<0,001$) grupları ile H_2O_2 ($p<0,001$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. OXY ve önce OXY grupları ise istatistiksel olarak H_2O_2 grubuna benzerlik göstermektedir. *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.14. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında total oksidan seviyelerinin değerlendirilmesi.

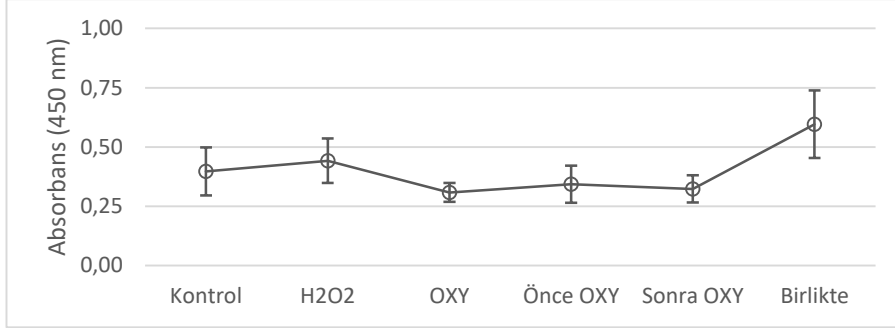
4.2.4. ARPE-19 Hücrelerinde Oksidatif Hasar Oluşum Öncesinde, Sonrasında Ve Sırasında Oxyresveratrol Uygulamasında Total Antioksidan Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Nöroprotektif ajan olarak kullanılan oxyresveratrol, ARPE-19 hücrelerinde 400 μ M H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında 100 μ M uygulandı genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.001$; Tablo 8.15), H_2O_2 grubuna kıyasla oxyresveratrol, önce oxyresveratrol ve sonra oxyresveratrol gruplarında TAS da düşüş görülürken birlikte uygulandığı grup H_2O_2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir ($p = 0,022$; Tablo 4.15 ve Şekil 4.15).

Tablo 4.15. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında total antioksidan seviyelerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

TAS			
Grup	Ortalama	SS	p
Kontrol	0,3963	0,1012	<0,001
H_2O_2	0,4418	0,0936	
OXY	0,3079	0,0400	
Önce OXY	0,3425	0,0778	
Sonra OXY	0,3225	0,0575	
Birlikte	0,5958	0,1421*	

Genel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.001$). Bu farklılık birlikte grubu ile H_2O_2 ($p = 0,022$) grubu arasında ortaya çıkmaktadır. Kontrol, OXY, önce OXY ve sonra OXY grupları ise istatistiksel olarak H_2O_2 grubuna benzerlik göstermektedir. *Gruplar arasındaki anlamlı farklılık



Şekil 4.15. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında total antioksidan seviyelerinin değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA

YBMD, dünya çapında yaklaşık 200 milyon insanı etkileyen, görme kaybı ile karakterize kronik bir hastalıktır. YBMD, tüm körlük vakalarının yaklaşık %9'unu oluşturmaktadır (19). Daha da önemlisi, YBMD prevalansı son yıllarda önemli ölçüde artış göstermektedir. 2040 yılında 288 milyona ulaşacağı öngörülmesine karşın kesin bir tedavisi de bulunmamaktadır (19).

YBMD patogenezinin temelindeki mekanizmalar yeterince tanımlanamamıştır. Ancak, oksidatif stresin RPE hücrelerinin işlev bozukluğuna neden olduğu ve ekstraselüler debris birikimi ve drusen oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir. Bunun sonucunda da bruch membranından besin geçişinin etkilenerek RPE'de atrofi meydana geldiği ve koroid tabakasında da KNV olduğu tahmin edilmektedir (71). Benzer şekilde oksidatif hasar, lipofuksin birikimi, kronik inflamasyon ve apoptozun da YBMD patogenezinde rol oynayan önemli biyolojik yolaklardır olduğu bilinmektedir (72).

Mevcut farmakoterapinin kesin bir çözüm getirmemesinin yanı sıra şiddetli görme kaybının da dahil olduğu komplikasyon riskleri taşıması ve başarılı tedavilerde bile, YBMD semptomlarının sıklıkla geri döndürülemediğinden, mevcut tedaviye alternatif veya ilave yeni tedavi arayışları gündeme gelmiştir. Daha etkili, yan tesirleri daha hafif ve hasta tarafından daha kolay tolere edilebilen ilaçlar üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir. ROS YBMD'nin ilerlemesinde yapısal değişikliklere ve hasara yol açmaktadır (135). Bu hasarların önlenmesi ve serbest radikallerin temizlenmesi için fitoöstrojenlerin etkin olacağı düşünülmektedir (19,20). Güçlü antioksidan özelliğe sahip bir fitoöstrojen olan oxyresveratrol oksidatif hasara karşı doğrudan ROS süpürme dışında, kronik inflamasyon ve apoptotik yollar üzerinden de nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (32-35).

Çalışmamızda oxyresveratrolün hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif hasarda koruyucu ve tedavi edici etkilerini hücre kültürü ortamında araştırılmasını hedefledik. Çalışmamız, ARPE-19 hücre hattında oksidatif stresin oluşturduğu hasarda oxyresveratrolün koruyucu ve tedavi edici etkilerin de östrojen reseptörünün rolünün araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgularda; oxyresveratrol ARPE-19 hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar oluşum öncesi uygulandığında 100 µM konsantrasyonda hücre

hasarını yaklaşık %15 oranında azalttığı, H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşum sonrası uygulandığında hücre hasarını 10 µM konsantrasyonda yaklaşık %3 ve 100 µM konsantrasyonda %22 oranında azalttığı, H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar oluşum sırasında uygulandığında hücre hasarını 0.1 µM konsantrasyonda yaklaşık %1 ve 100 µM konsantrasyonda %16 oranında azalttığı görüldü.

Hu ve Ark., insan mercek epitel hücre (HLEC)'lerinde yaptıkları çalışmada H₂O₂ ile oksidatif stres oluşturulmuştur. HLEC hücreleri oksidatif stres öncesi 1 saat boyunca oxyresveratrol (0, 1, 5, 10 veya 20 µM) ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı tespiti için 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılmış ve oxyresveratrolün doza bağlı bir şekilde koruyucu etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (195). Lorenz ve Ark., yaptığı çalışmada ise, sıçan astroglial hücre hattında H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stresten 30 dakika önce 100 µM oxyresveratrol uygulaması yapılmış ve diklorofloreseine (DCF) ile ölçüm yapılmıştır. Oxyresveratrol uygulamasının güçlü bir koruma sağladığı sonucuna varılmıştır (196). Yaptığımız çalışmada da nöroprotektif etkisini denediğimiz oxyresveratrolün hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkileri, bulgularımızın literatürlerle uyum içinde olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalara ek olarak çalışmamız oxyresveratrolün hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif hasar sırasında ve sonrasında tedavi edici özellik göstermesi yönünden literature yeni bir bilgi kazandırmaktadır.

Fitoöstrojenler östrojen benzeri etkilerini östrojen reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirirler. Oxyresveratrolün, antioksidan, antienflamatuar ve nöroprotektif etkileri bilinmesine karşın östrojen reseptörlerinin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, yapmış olduğumuz bu çalışmada oxyresveratrolün oluşturduğu nöroprotektif etkinin östrojen reseptör aracılı olup olmadığını tespit etmeyi amaçladık. ARPE-19 hücre hattına oksidatif stres öncesi, sonrası ve sırasında oxyresveratrol uygulaması öncesi klasik östrojen reseptör inhibitörü ICI182,780 (ER α ve ER β antagonist) ve membran ilişkili östrojen reseptör inhibitörü G-15 (GPER1 antagonist) uygulandı. Oksidatif hasar oluşum sırasında oxyresveratrolün uygulaması sonrası ortaya çıkan koruyucu etki östrojen reseptör inhibitörleri ICI182,780 tarafından ortadan kaldırılmıştır. Bu bulguya göre oxyresveratrolün ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sırasında oluşturduğu nöroprotektif etki östrojen reseptör α ve β bağımlı görünmektedir. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası oxyresveratrolün uygulaması

ile ortaya çıkan koruyu etki östrojen reseptör inhibitörleri G-15 tarafından ortadan kaldırılmıştır. Bu bulguya göre oxyresveratrolün ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum sonrası oluşturduğu nöroprotektif etki östrojen GPER1 bağımlı görünmektedir.

Zhao ve Ark. oxyresveratrolün antikanserojen etkisindeki klasik östrojen reseptörü α 'nın rolünü araştırmak amacı ile yaptıkları çalışmada, insan karaciğer kanseri hücreleri (HepG2) 48 saat boyunca 10 ve 20 μ M konsantrasyonlarda oxyresveratrol ile inkübe edilmiştir. Sonrasında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), ER α kodlayan genler ve mRNA'larının transkripsiyon seviyeleri, floresan nicel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi ile ölçülmüştür. Oxyresveratrolün, ER α aracılığıyla antikanserojen etkinlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (197). Wei ve Ark. yaptıkları çalışmada ise oxyresveratrolün östrojen benzeri işlevi aracılığıyla anti-inflamatuar etkisi araştırılmıştır. İnsan servikal epitel hücre dizisi (HeLa), MCF-7 ve murin hücreleri RAW264.7 hücrelerinde yapılan çalışma da oxyresveratrol, ER aracılı transkripsiyonel aktivasyonu, artan östrojen hedefli gen ekspresyonu ER inhibitörü ICI 182780 tarafından tersine çevrilmiştir. Buna ek olarak RAW264.7 hücrelerinde LPS ile indüklenen inflammatuar yanıt oxyresveratrol tarafından ER'ye bağlı bir şekilde önemli ölçüde bastırılmıştır (198). Bizim çalışmamızda da oxyresveratrolün ARPE-19 hücrelerinde oluşturduğu nöroprotektif etki düşük düzeyde de olsa ER α/β bağımlı görünmektedir. Yaptığımız çalışmada oxyresveratrolün, östrojen reseptörleri ile ilişkisi yukardaki çalışmalarla uyumlu görünmektedir. Yukardaki çalışmalara göre daha düşük düzeyde elde ettiğimiz östrojen reseptör α ve β bağımlılığının sebebi ise çalışılan hücre hattının farklılığından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda literatürdeki diğer çalışmalara ek olarak oksidatif hasar sırasında ve sonrasında da GPER 1'in de oxyresveratrolün oluşturduğu tedavi edici etkiye aracılık ettiği ortaya konmaktadır.

Oksidatif stres sırasında artan aşırı ROS üretimi voltaja duyarlı kalsiyum kanalları başta olmak üzere birçok iyon kanalını uyarak sitozole kalsiyum akışını arttırmaktadır. Mitokondrinin daha fazla membranının depolarize olması sonucu serbest radikallerin üretimi artmaktadır. Bu kısır döngü lipid peroksidasyonunu arttırarak apoptozu indüklemektedir (199). Sıçan kortikal nöronlarında N-metil-D-aspartat (NMDA) ile indüklenen nöronal hücre hasarında oxyresveratrolün hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki artışı baskılayarak, sıçan kortikal nöronlarını

indüklenen apoptotik hücre ölümüne karşı koruduğu sonucuna varılmıştır (200). Chao ve Ark. oxyresveratrolün parkinson hastalığındaki nöroprotektif etkilerini araştırmak amacı ile yaptıkları çalışmada, nöroblastoma (SH-SY5Y) hücrelerinde 6-hidroksidopamin (6-OHDA) nörotoksitesisi oluşturulmuştur. SH-SY5Y hücreleri 30 dakika boyunca 25 μ M oxyresveratrol veya resveratrol ile inkübe edilmiştir, ardından 2 veya 6 saat boyunca 25 μ M 6-OHDA inkübe edilmiştir. Nörotoksitesite öncesi oxyresveratrol uygulanan gruplarda, oxyresveratrol kaspaz-3 aktivitesini yaklaşık %50 oranında baskılayarak nöroprotektif etki göstermiştir. Resveratrol ile karşılaştırıldığında, oxyresveratrol'ün nöroproteksiyonda daha etkili olduğu bildirilmiştir (201). Andrabi ve Ark. serebral iskemiden sonra beyin hasarını azaltmak için, oxyresveratrolün nöroprotektif etkisini araştırdıkları çalışmada, beyin enfarktüsünü indüklemek için geçici sıçan orta serebral arter tıkanıklığı (MCAO) beyin iskemi modelini kullanmışlardır. Oklüzyondan hemen sonra ve reperfüzyon sırasında intraperitoneal olarak oxyresveratrol uygulaması yapılmıştır. 10 veya 20 mg/kg oxyresveratrol ile tedavi edilen sıçanlar, MCAO sıçanlarıyla karşılaştırıldığında beyin enfarktüsü hacmini sırasıyla yaklaşık %54 ve %63 oranında önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Apoptotik belirteçlerin değerlendirilmesi için sitokrom c, kaspaz-3 ve immünohistokimyasal boyama prosedürleri ile yapılmıştır, MCAO sıçanlarında oxyresveratrol tedavisinin sitokrom c salınımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu azalttığı sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak, immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, oxyresveratrol ile tedavi edilen grupların, MCAO sıçanlarına kıyasla, beyindeki apoptotik çekirdeklerin sayısını azalttığını gözlenmiştir. Bu in vivo inme modelinde oxyresveratrolün doza bağımlı bir şekilde nöroprotektif etki gösterdiği ve akut beyin iskemisinde beyin hasarını sınırlamak için bir terapötik strateji yönünden faydalı olabileceğini bildirmişlerdir (33). Çalışmamızda ise; hücre ölümü tespiti ve kaspaz-3 sonuçlarına göre oxyresveratrol, ARPE-19 hücre hattında hidrojen peroksit ile indüklenen hücre hasarına karşı apoptotik hücre ölümünü azaltarak koruyucu ve tedavi edici etkinlik göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları, literatür ile benzerlik göstermekle birlikte, ek olarak oxyresveratrolün tedavi edici etkinliği de gösterilmiştir.

Oksidatif stres, serbest radikallerin oluşumu ile bunların ortadan kaldırılmasından sorumlu endojen antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik sonucunda ortaya çıkar (104). Flavonoidler, antioksidan vitaminler,

enzimler fitoöstrojenlerle birlikte insan vücudunun toplam antioksidan savunma sistemine katkıda bulunarak hastalıklara karşı koruma sağlamaya yardımcı olur (164). Antioksidan özelliğe sahip olan oxyresveratrolün etkilerine dair çalışmalar kısıtlıdır. Aftab ve Ark. resveratrol ve resveratrolün bir türevi olan oxyresveratrolün ayrı ayrı ve kombine şekilde antioksidan aktivitelerini heme bazlı oksidasyon deneyi (heme-based assay) ile karşılaştırmalı bir şekilde değerlendirmişlerdir. Resveratrolün %27 oxyresveratrolün ise %33 oksidasyon inhibisyonu gerçekleştirerek güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Oxyresveratrol ve resveratrol kombinasyonunun ise %41 oranında oksidasyon inhibisyonu gerçekleştirerek güçlü bir sinerjik potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir (202). Yapmış olduğumuz çalışmada ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesinde, sonrasında ve sırasında oxyresveratrol uygulamasında total antioksidan ve total oksidan parametreleri test edilmiş olup TOS seviyelerinde artış görülürken, TAS seviyelerinde genel bir düşüş görülmekle birlikte sadece oksidatif stres sırasında uygulanan oxyresveratrol grubunda bir artış görülmektedir. Ateş ve Ark. çalışmalarında L929 hücre hattında hidrojen peroksit aracılı hücre hasarında oxyresveratrolün, proliferatif ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Sonuçları çalışmamızla benzer şekilde TOS seviyeleri artış gösterirken TAS seviyelerinde düşüş görülmektedir. Oxyresveratrol'ün doza bağlı olarak, antioksidan aktiviteden oksidana doğru geçiş yaptığını, flavonoid olan ve molekül yapısında ortohidroksi grubu bulundurmayan oxyresveratrolün; ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu] radikalini indirgeme seviyesi düşük olmasından kaynaklandığını düşünmektedirler (203).

Çalışmamızda antioksidan ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu bilinen oxyresveratrolün insan retinal pigment epitel hücrelerinde oksidatif hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkileri ortaya konulmuş ayrıca bu koruyucu ve tedavi edici etkilerde östrojen reseptörlerinin rolü olup olmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak oxyresveratrolün oksidatif stres kaynaklı ilerleyici dejenerasyon, yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve diyabetik retinopatinin önlenmesinde ve tedavisinde deney hayvan çalışmaları sonrasında alternatif bir tedavi olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda ARPE-19 hücre hattında hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif stres öncesi, sonrası ve sırasında oxyresveratrol uygulaması hücre canlılığını artırarak hücrede oksidatif hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkinlik göstermiştir.
2. Oxyresveratrolün koruyucu ve tedavi edici etkisini apoptotik yollar üzerinden gerçekleştirdiği tespit edilmiştir.
3. Oxyresveratrolün koruyucu ve tedavi edici etkisinde klasik östrojen reseptörlerinin kısmi olarak aracılık ettiği sonucuna varılmıştır.
4. Ayrıca oxyresveratrolün koruyucu ve tedavi edici etkisinde membran ilişkili G-proteini ile ilişkili estrojen reseptörü'nünde (GPER1) kısmi olarak aracılık ettiği gösterilmiştir.
5. Yapmış olduğumuz in vitro çalışma oxyresveratrolün terapötik ajan olarak geliştirilmesi için ön çalışma niteliğindedir. Oxyresveratrolün nöroprotektif bir etki mekanizmasına sahip olması ve kan beyin bariyerini rahat geçebilmesi hayvan çalışmaları sonrasında, yaşa bağlı maküler dejenerasyon dahil olmak üzere retina hastalıklarının tedavisinde etkin bir terapötik ajan olarak geliştirilebileceği düşüncesini desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR

Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.

1. H Sies, E Cadenas. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985;311(1152): 617-31.
2. Lopez-Alarcona C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on. *Analytica Chimica Acta.* 2013; 763: 1e10.
3. Pisoschi A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2015; 97: 55-74.
4. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huyc C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4(2): 89-96.
5. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004; 266(1-2): 37-56.
6. Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Int J Pharma Sci Res.* 2010; 1(3): 185-192.
7. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010; 4(8): 118-126.
8. Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Molecular Aspect of Medicine.* 2011; 32: 305-315.
9. Masuda T, Shimazawa M. Hara H. Oxidative Stress in Retinal Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017; 14.
10. Chiquita S, Rodrigues-Neves AC, Baptista FI, Carecho R, Moreira PI, Castelo-Branco M, et al. The Retina as a Window or Mirror of the Brain Changes Detected in Alzheimer's Disease: Critical Aspects to Unravel. *Mol Neurobiol.* 2019; 56(8): 5416-5435.
11. Country MW. Retinal metabolism: a comparative look at energetics in the retina. *Brain Res.* 2017; 1672: 50–57.
12. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *European Journal of Ophthalmology.* 2011; 21(6): S3–S9.
13. Campbell MI, Humphries P. The blood-retina barrier: tight junctions and barrier modulation. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2012; 763: 70–84.
14. Ivanova E, Alam NM, Prusky GT, Sagdullaev BT. Blood-retina barrier failure and vision loss in neuron specific degeneration. *JCI Insight.* 2019; 5: 126747.
15. Handa JH, Rickman CB, Dick AD, Gorin MB, Miller JW, Toth CA, et al. A systems biology approach towards understanding and treating non-neovascular age-related macular degeneration. *Nat. Commun.* 2019; 10: 3347.

16. Jun S, Datta S, Wang L, Pegany R, Cano M, Handa JT. The impact of lipids, lipid oxidation, and inflammation on AMD, and the potential role of miRNAs on lipid metabolism in the RPE. *Exp. Eye Res.* 2019; 181: 346–355.
17. Dias MF, Joo K, Kemp JA, Fialho SL, Cunha AS, Woo SJ, et al. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: basic research and clinical perspectives. *Prog Retin Eye Res.* 2018; 63: 107-131.
18. Shu W, Dunaief JL. Potential treatment of retinal diseases with iron chelators. *Pharmaceuticals.* 2018; 11: E112.
19. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng CY, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2014; 2(2): e106-16.
20. Stahl A. The diagnosis and treatment of age-related macular degeneration. *Dtsch Arztebl Int.* 2020; 117: 513-9.
21. Adhikari A, Devkota HP, Takano A, Masuda K, Nakane T, Basnet P, et al. Screening of Nepalese crude drugs traditionally used to treat hyperpigmentation: in vitro tyrosinase inhibition. *International Journal of Cosmetic Science.* 2008; 30: 353-360.
22. Arung ET, Kusuma IW, Iskandar YM, Yasutake S, Shimizu K, Kondo R. Screening of Indonesian plants for tyrosinase inhibitory activity. *Journal of Wood Science.* 2005; 51: 520–525.
23. Burlando B, Clericuzio M, Cornara L. Moraceae plants with tyrosinase inhibitory activity: A review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry.* 2017; 17: 108-121.
24. Huo Y. Mulberry Cultivation and Utilization In China, Mulberry for Animal Production. *FAO Animal Production and Health Paper.* 2002; 147: 11-44.
25. Verma AR, Vijayakumar M, Rao CV, Mathela CS. In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. *Food and Chem. Toxicol.* 2010; 48: 704-709.
26. Yuan TT, Zhang ND, He YJ, Li M, Xu QY, Zhang HT. Research progress of phytoestrogens-like chemical constituents in natural medicines. *China journal of Chinese materia medica.* 2014; 39(23): 4526–4531.
27. Ososki AL, and Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research.* 2003; 17 (8): 845–869.
28. Gaya P, Sánchez-Jiménez A, Peirotén A, Medina M, Landete JM. Incomplete metabolism of phytoestrogens by gut microbiota from children under the age of three. *Int J Food Sci Nutr.* 2018; 69: 334–343.
29. Büyüktuncer Z. Fitoöstrojenlerin menopoz üzerine etkileri. In *IV. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi Bildiriler Kitabı*; 2000. p. 67.
30. Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry.* 2004; 65: 995–1016.

31. Wilson T, Temple NJ. Health benefits of soy isoflavones Nutritional Health Strategies for Disease Nutritional Health Strategies for Disease Prevention. Humana Press Inc. 2001;; 75-85.
32. Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, et al. In-vitro and in-vivo anti inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. J Pharm Pharmacol.. 2003; 55(55): 1695-700.
33. Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol (t rans-2,3, 4 ,5tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. Brain Res. 2004; 13: 98-107.
34. Likhitwitayawuid KB, Sritularak K, Benchanak V, Lipipun J, Schinazi RF. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. Natural Product Research. 2005; 19(2): 177–182.
35. Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, et al. Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. Antiviral Research. ; 91(2): 154–160.
36. Hu X, Liang Y, Zhao B, Wang Y. Oxyresveratrol protects human lens epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis by activation of Akt/HO-1 pathway. Journal of Pharmacological Sciences. 2019;; 166-173.
37. Chung O, Kim KO, Lee BY, Kim MH, Chung YR, Park HY et al. In-vitro and in-vivo antiinflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. J Pharm Pharmacol. 2003; 55(12): 1695-700.
38. Wu Y, Li S, Liu J, Liu X, Ruan W, Lu J, et al. Stilbenes from *Veratrum maackii* Regel Protect against Ethanol-Induced DNA Damage in Mouse Cerebellum and Cerebral Cortex. ACS Chem Neurosci. 2018; 9(7): 1616-1624.
39. Wang CP, Zhang LZ, Li GC, Shi YW, Li JL. Mulberroside a protects against ischemic impairment in primary culture of rat cortical neurons after oxygen–glucose deprivation followed by reperfusion. Journal of Neuroscience Research. 92: 944–954.
40. Wei J, Chen JR, Pais EMA, Wang TY, Miao L, Li L, et al. Oxyresveratrol Is a Phytoestrogen Exerting Anti-inflammatory Effects Through NF-κB and Estrogen Receptor Signaling. Inflammation. 2017; 40(4): 1285-1296.
41. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Anatomy and Physiology. 8th ed. New York: McGraw Hill; 2008.
42. Lawrence MS, Miller JW. Ocular tissue permeabilities. International Ophthalmology Clinics.. 2004; 44 (3): 53-61.
43. Addo RT. Ocular Drug Delivery: Advances, Challenges and Applications. 1st ed.: Springer International Publishing; 2016.
44. Masland RH. Retinaninal organizasyonu. Nöron. 2012; 76(2): 266-80.

45. Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol*. 2008; 2(4): 879-89.
46. Jie Zhang, Lei Shi, Yong Shen. The retina: A window in which to view the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*. 2022;(77): 101590.
47. O'dwyer PA. Temel ve Klinik Bilimler Kursu: Retina and Vitreous. In *Ophthalmology AAo. Retina and Vitreous*.: Güneş Tıp Kitapevleri; 2008-2009. p. 12:7-89.
48. Snell RS, Lemp MA. The eye ball. In *Clinical Anatomy of the Eye*.: Blackwell Science Inc.; 1998. p. 132-213.
49. Snell RS, Lemp MA. Clinical anatomy of the eye. The eye ball.. Blackwell Science Inc. 1998; 2: 132-213.
50. Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci*. 2014; 15(8): 507-19.
51. Masland RH. The tasks of amacrine cells.. *Vis Neurosci*. 2012 ; 29(1): 3-9.
52. Schubert HD. Structure and function of neural retina. In Yanoff M DJ, editor. *Ophthalmology*. Mosby.; 2009. p. 511-4.
53. Marmor MF. The retinal pigment epithelium. In Yanoff M DJ, editor. *Ophthalmology*.: Mosby; 2009. p. 515-7.
54. Thumann G, Hoffman S, Hinton DR. Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium. In SJ. R. Basic Science and Inherited Retinal.: Elsevier&Mosby; 2006. p. 137-152.
55. Bron AJ, Tripathi R, Tripathi B. The Retina. In Wilff's *Anatomy of the Eye and Orbit*. London; 1997. p. 460-465.
56. Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye*. 2001; 15: 384-389.
57. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*. 2005; 85,(3): 845–881.
58. Yang S, Zhou J, Li D. Functions and Diseases of the Retinal Pigment Epithelium. *Front. Pharmacol*. 2021; 12(727870).
59. Ben-Shabat S, Parish CA, Vollmer HR, Itagaki Y, Fishkin N, Nakanishi K, et al. Biosynthetic studies of A2E, a major fluorophore of retinal pigment epithelial lipofuscin. *J Biol Chem*. 2002; 277(9): 7183-90.
60. Pautler E, Tengerdy C. Transport of acidic amino acids by the bovine pigment epithelium. *Exp Eye Res*. 1986; 43: 207-14.
61. Miyamoto Y, Del Monte M. Na⁺-dependent glutamate transporter in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35: 3589-98.

62. Harik S, Kalaria R, Whitney P, Andersson L, Lundahl P, Ledbetter S, Perry G. Glucose transporters are abundant in cells with 'occluding' junctions at the blood--eye barriers. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 4261-4.
63. Marshall J. The ageing retina: physiology or pathology. ; 1. *Eye* 1. 1987; 1: 282-295.
64. Tarnowski BI, Shepherd VL, McLaughlin BJ. Expression of mannose receptors for pinocytosis and phagocytosis on rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29: 742-748.
65. Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, Murray I. Macular pigment and age-related macular degeneration. *Ophthalmol.* 1999; 83: 867-77.
66. Newsome D, Miceli M, Liles M, Tate D, Oliver P. Antioxidants in the retinal pigment epithelium. *Prog Retina Res.* 1994; 13: 101-23.
67. Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Fong T, Zamiri P. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* 2002; 42(4): 487-95.
68. Marçon CR, Maia M. Albinism: epidemiology, genetics, cutaneous characterization, psychosocial factors. *An Bras Dermatol.* 2019; 94(5): 503-520.
69. Ducloyer JB, Meur GL, Cronin T, Adjali O, Weber M. Gene therapy for retinitis pigmentosa. *Med Sci.* 2020; 36(6-7): 607-615.
70. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet.* 2018; 392(10153): 1147-1159.
71. Ferris FL, Fine SL, Hyman L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol.* 1984; 102: 1640-1642.
72. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122(4): 598-614.
73. Klein R, Klein BE, Jensen SC, Meuer SM. The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 1997; 104(1): 7-21.
74. Abdelsalam A, Priore LD, Zarbin MA. Drusen in age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression. *Surv Ophthalmol.* 1999; 44 (1): 1-29.
75. Parment S, Lynn C, Glass RM. Age-related macular degeneration. *JAMA.* 2006; 295(20): 2438.
76. Sarks JP, Sarks SH, Killingsworth MC. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium.. *Eye.* 1988; 2(5): 552-577.
77. Salimiaghdam N, Riazi-Esfahani M, Fukuhara PS, Schneider K, Kenney MC. Age-related Macular Degeneration (AMD): A Review on its Epidemiology and Risk Factors. *The Open Ophthalmology Journal.* 2019;(13): 90-99.

78. Gess AJ, Fung AE, Rodriguez JG. Imaging in neovascular age-related macular degeneration. *Semin Ophthalmol.* 225-233; 26(3): 2011.
79. Al-Zamil WM, Yassin SA. Recent developments in age-related macular degeneration: a review.. *Clinical interventions in aging.* 2017; 12: 1313.
80. Brown D, Heier JS, Boyer DS, Freund KB, Kaiser P, Sarraf JEK. Current best clinical practices-management of neovascular AMD. *J VitreoRetinal Dis.* 2017; 1(5): 294-297.
81. Karaçorlu SA, Karaçorlu M. Makula hastalıkları. In O'Dwyer PA AY, editor. *Temel Göz Hastalıkları.: Güneş Tıp Kitabevleri;* 2010. p. 559-573.
82. Hogan MJ. Role of retinal pigment epithelium in macular disease. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1972; 76: 64-80.
83. Burns RP, Feeney-Burns L. Clinico-morphological correlations of drusen and Bruch membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1980; 78: 206-225.
84. Nickells RW, Zack DJ. Apoptosis in ocular disease: a molecular review. *Ophthalmic Genetics.* 1996; 17: 145-165.
85. Hinton DR, He S, Lopez PF. Apoptosis in surgically excised choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116: 302-309.
86. Douglas R. Green, Fabien Llambi. *Cell Death Signaling.* Cold Spring Harb Perspect Biol.. 2015 ; 7(12): a006080.
87. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 1995; 6(1): 3-16.
88. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev..* 1993; 14(2): 133-51.
89. Hu R, Zhai Q, Liu W, Liu X. An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: roles of Bcl-2 family proteins, caspases, Ca(2+)-dependent proteases and protein kinase C. *J Cell Biochem.* 2001; 81(4): 583-93.
90. Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011; 1807: 735–745.
91. Lossi L, Merighi A. In Vivo Cellular And Molecular Mechanisms Of Neuronal Apoptosis In The Mammalian Cns. *Prog Neurobiol.* 2003; 69: 287-312.
92. Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. In John Wiley & Sons , editor. *Molecular biology of cancer.* New York, ABD,; 2003. p. 2-5.
93. Zou H, Henzel WJ, Liu X. Apaf-1, a human protein homologous to C elegans CED-4, participates in cytochrome c dependent activation of caspase 3. *Cell.* 1997; 90: 405-413.
94. Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International Journal of Cell Biology.* 2010; 370835: 6.

95. Eröz R, Karataş A, Alkoç AO, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptozis Hakkında Bilinenler. *Duzce Medical Journal*. 2012; 14(2): 87-101.
96. Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Molecular Cancer Therapeutics*. 2003; 2: 573–580.
97. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516.
98. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2011; 30: 87.
99. Juo P, Kuo CJ, Yuan J. Essential requirement for caspase 8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade.. *Curr Biol*. 1998; 8: 1001-1008.
100. Hakem R, Hakem A, Duncan GS. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo.. *Cell*. 1998; 94: 339-352.
101. Abbas R, Larisch S. Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death—The Story of ARTS and SMAC. *Cells*. 2020; 9(3): 663.
102. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008; 2: 73-78.
103. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000; 7(3): 153-163.
104. Li J, Wuliji O, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(12): 24438–24475.
105. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*. 2016; 53(6): 4094–4125.
106. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2007; 292(5): H2023–H203.
107. Babior BM. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*. 2004; 16(1): 42–47.
108. Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007; 9(6): 731–739.
109. Li X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Hematol Oncol*. 2013;6.
110. Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact*. 1994; 91: 133-140.
111. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997; 22(5): 885–888.

112. Young IS, Woodside J V.. Antioxidants in health and disease.. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 176-186.
113. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49: 479-93.
114. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2012; 428010: 11.
115. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995; 45(8): 1594–1601.
116. Morales-González JA. Oxidative Stress and Diseases. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants.*; 2013. p. 364-365.
117. Gille JJ, Joenje H. Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat Res.* 1992; 275: 405-414.
118. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Letters.* 2003; 540: 3-6.
119. Ricart KC, Fisman ML. Hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cultured cortical cells grown in serum-free and serum-containing media. *Neurochem Res.* 2001; 26: 801-808.
120. Lesuisse C, Martin LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol.* 2002; 51: 9-23.
121. Hirrlinger J, Hamprecht B, Dringen R. Application and modulation of a permanent hydrogen peroxide-induced oxidative stress to cultured astroglial cells. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1999; 4: 223-229.
122. Almeida A, Ciudad P, Bolanos JP. Nitric oxide accounts for an increased glycolytic rate in activated astrocytes through a glycogenolysis-independent mechanism. *Brain Res.* 2002; 945: 131-134.
123. Harris ME, Wang Y, Pedigo NW, Hensley K, Butterfield DA, Carney JM. Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. *J Neurochem.* 1996; 67: 277-286.
124. Butterfield DA. Alzheimer's disease: A disorder of oxidative stress. *Alzheimer's Dis Rev.* 1996; 1: 68-70.
125. Butterfield DA, Yatin SM, Varadarajan S, Koppal T. Amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. *Methods Enzymol.* 1999; 309: 746-768.
126. Milhavet O, Lehmann S. Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev.* 2002; 38: 328-339.

127. Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E, Caboche J. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci.* 2002; 22: 2174-2184.
128. Teunissen CE, Markerink-van Ittersum M, de Bruijn C, Steinbusch HW, de Vente J. Evaluation of 3-nitrotyrosine as a marker for 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in Lewis and Wistar rats and strain-specific whole brain spheroid cultures. *Brain Res.* 2002; 931: 5-20.
129. Carrasco E, Werner P. Selective destruction of dopaminergic neurons by low concentrations of 6-OHDA and MPP(+): protection by acetylsalicylic acid aspirin. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002; 8: 407-411.
130. Grunblatt E, Mandel S, Gassen M, Youdim MB. Potent neuroprotective and antioxidant activity of apomorphine in MPTP and 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl.* 1999; 55: 57-70.
131. Speciale SG. MPTP: insights into parkinsonian neurodegeneration. *Neurotoxicol Teratol.* 2002; 24: 607-620.
132. Erdoğan MA, Taşkiran D. Rotenon ile İndüklenen İn Vitro Parkinson Hastalığı Modelinde Glukagon Benzeri Peptid-1 Analogu Ekzenatidin Nöron Sağkalımına Etkisi. *SdÜ Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2019; 10(4): 362-368.
133. Kiliçaslan D. Retina pigment epitel hücrelerinde (ARPE-19) Hidrojen peroksid ile oluşturulan oksidatif strese p-gnosembri ve pinostrobinin hücre canlılığı üzerindeki etkinliğinin araştırılması[doktora tezi]. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi; 2018.
134. Albayrak A. Glioblastoma hücresinde hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif Streste quercetin ve donepezilin hücre canlılığı üzerindeki etkinliğinin araştırılması[doktora tezi]. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi; 2022.
135. Gordoïs A, Cutler H, Pezzullo L. An estimation of the worldwide economic and health burden of visual impairment. *Global Public Health.* 2012; 7(5): 465–481.
136. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. “Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell.* 2002; 1(2): 117–123.
137. Calderón-Larrañaga A, Vetrano DL, Welmer AK, Grande G, Fratiglioni L, Dekhtyar S. Psychological correlates of multimorbidity and disability accumulation in older adults. *Age and ageing.* 2019; 48(6): 789–796.
138. Ruan Y, Jiang S, Musayeva A, Gericke A. Oxidative Stress and Vascular Dysfunction in the Retina: Therapeutic Strategies. *Antioxidants.* 2020; 9(8): 761.
139. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology.* 2010; 459(6): 923-939.
140. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 280: 1-8.

141. Thrane M, Paulsen PV, Orcutt MV, Krieger TM. Soy Protein: Impacts, Production, Impacts, Production and Applications. Elsevier Inc. 2017;; 23-45.
142. Brown E, DiSilvestro R, Babaknia A, Devor S. Soy versus whey protein bars: Effects on exercise training impact on lean body mass and antioxidant status. *Nutrition Journal*. 2004; 3: 22-26.
143. Disilvestro RA, Mattern C, Wood N, Devor ST. Soy protein intake by active young adult men raises plasma antioxidant capacity without altering plasma testosterone. *Nutrition Research*. 2006; 26: 92-95.
144. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of Human Estrogen Receptor α by Protein Kinase A Regulates Dimerization. *Mol. Cell. Biol*. 1999; 19: 1002–1015.
145. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27(4): 299-402.
146. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003; 86: 225–230.
147. Korach KS, Hewitt SC, Couse JF. Estrogen receptor transcription and transactivation Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Research*. 2000; 2: 345-352.
148. Nilsson S and Gustafsson JA. Estrogen receptors: Therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 89: 44–55.
149. Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Coutts AS, Watson P. The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1998; 65 (1-6): 175-180.
150. Batistatou A, Stefanou D, Goussia A, Arkoumani E, Papavassiliou AG, Agnantis NJ. Estrogen receptor β (ER β) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004; 130: 405–410.
151. Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocrine reviews*. 2004; 25(6): 869-98.
152. Lazari MF, Lucas TF, Yasuhara F, Gomes GR, Siu ER, Royer C. Estrogen receptors and function in the male reproductive system. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009; 53(8): 923-33.
153. Paterni I, Bertini S, Granchi C, Macchia M, Minutolo F. Estrogen receptor ligands: a patent review update. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2013; 23(10): 1247-71.
154. Minutolo F, Macchia M, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor β ligands: recent advances and biomedical applications. *Medicinal research reviews*. 2011; 31(3): 364-442.

155. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*. 1997; 45: 607–617.
156. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF.. *Mol Endocrinol*. 2000; 14: 1649–1660.
157. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005; 307(1): 625–1630.
158. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005; 146: 624–632.
159. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007; 138(42): 265-266.
160. Sharma G, Prossnitz ER. G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) and sex-specific metabolic homeostasis. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1043: 427–453.
161. Jala VR, Radde BN, Haribabu B, Klinge CM. Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer. *BMC cancer*. 2012; 12: 624.
162. Chen C, Gong X, Yang X, Shang X, Du Q, Liao Q, Xie R, Chen Y, Xu J. The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease (Review). *Oncology Letter*. 2019 ; 18(6): 5673-5680.
163. Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. (). *Phytotherapy Research*. 2003; 17(8): 845–869.
164. Büyüktuncer Z. Fitoöstrojenlerin menopoz üzerine etkileri. In IV. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi Bildiriler Kitabı; 2000. p. 67.
165. Bennetts HHW, Underwood EEJ. The oestrogenic effects of subterranean clover (*trifolium subterraneum*); uterine maintenance in the ovariectomised ewe on clover grazing. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci*. 1951; 29: 249–253.
166. Petrine JCP, Bianco-Borges BD. The influence of phytoestrogens on different physiological and pathological processes: An overview. *Phytother Res*. 2021; 35(1): 180-197.
167. İnanç N, Tuna Ş. Fitoöstrojenler ve Sağlıkta Etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*. 2005; 2(2): 91-95.
168. Setchell KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones.. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998; 68: 1333-1346.
169. Song TT, Hendrich S, Murphy PA. Estrogenic Activity Of Glycitein, A Soy Isoflavone. *J. Agric. Food Chem*. 1999; 47: 1607-1610.

170. Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary Phytoestrogens and Health. *Phytochemistry*. 2004; 65: 995-1016.
171. Albertazzi P, Purdie DW. The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas*. 2002; 42: 173-185.
172. Cassidy A. Phytoestrogens and women's health. *Women's Health Medicine*. 2004; 1(1): 30-33.
173. Knight DC, Eden JA. Phytoestrogens - A short review. *Maturitas*. 1995; 22: 167-175.
174. Ibarreta D, Daxenberger A, Meyer HHD. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. *APMIS*. 2001; 109:161–184.
175. Cvejjic J, Bursac M, Atanackovic M. Phytoestrogens: "Estrogene-Like" Phytochemicals. Elsevier. 2012; 38: 1-35.
176. Dutta S, Parames SM. Phytoestrogens as Novel Therapeutic Molecules Against Breast Cancer. *Natural Product Drug Discovery*. 2021;197-229.
177. Likhitwitayawuid K, Sornsute A, Sritularak B, Ploypradith P. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006; 16: 5650–5653.
178. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35(3): 569-82.
179. Likhitwitayawuid K. Oxyresveratrol: Sources, Productions, Biological Activities, Pharmacokinetics, and Delivery Systems. *Molecules*. 2021; 26(14): 4212.
180. Wu Y, Li S, Liu J, Liu X, Ruan W, Lu J, et al. Stilbenes from *Veratrum maackii* Regel Protect against Ethanol-Induced DNA Damage in Mouse Cerebellum and Cerebral Cortex. *Abstract Send to ACS. Chem Neurosci*. 2018; 189(7): 1616-1624.
181. Wang CP, Zhang LZ, Li GC, Shi YW. Mulberroside A protects against ischemic impairment in primary culture of rat cortical neurons after oxygen–glucose deprivation followed by reperfusion. *Journal of Neuroscience Research*. 2014; 92: 944–954.
182. Wei J, Chen JR, Pais EMA, Wang TY, Miao L. Oxyresveratrol Is a Phytoestrogen Exerting Anti-inflammatory Effects Through NF- κ B and Estrogen Receptor Signaling. *Inflammation*. 2017; 40: 4.
183. Nakajima Y, Inokuchi Y, Nishi M, Shimazawa M, Otsubo K, Hara H. Coenzyme Q10 protects retinal cells against oxidative stress in vitro and in vivo. *Brain Research*. 2008; 1226: 226–233.
184. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: Effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*. 2003; 9: 64–76.

185. Tadtong S, Chatsumpun N, Sritularak B, Jongbunprasert V, Ploypradith P, Likhitwitayawuid K. Effects of oxyresveratrol and its derivatives on cultured P19-derived neurons. *Trop. J. Pharm. Res.* 2016; 15: 2619.
186. Wang L, Zhao H, Wang L, Tao Y, Du G, Guan W, et al. Effects of selected resveratrol analogues on activation and polarization of lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *J. AgriFood Chem.* 2020; 68: 3750–3757.
187. Hur J, Kim S, Lee P, Lee YM, Choi SY. The protective effects of oxyresveratrol imine derivative against hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells. *Free Rad. Res.* 2013; 47: 212–218.
188. Hu S, Zheng Z, Zhang X, Chen F, Wang M. Oxyresveratrol and trans-dihydromorin from the twigs of *Cudrania tricuspidata* as hypopigmenting agents against melanogenesis. *J. Funct. Foods.* 2015; 13: 375–383.
189. Heo I, Kim H, Lee M, Kho Y, Lim SS, Park B, et al. FOXO3a Activation by oxyresveratrol of *Morus bombycis* Koidzumi extract mediates antioxidant activity. *Anim. Cells Syst.* 2016; 20: 39–47.
190. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 1-2(65): 55-63.
191. Özkaya AB. Hct-116 kolon kanser hücre hattında yeşil çay etken maddesi olan (-)-epigallocatekin-3 gallat'ın apoptoz üzerine etkisinin incelenmesi [yüksek lisans tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2009.
192. Dinç E, Ayaz L, Kurt AH. Protective Effect of Combined Caffeic Acid Phenethyl Ester and Bevacizumab Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Human RPE Cells. *Current Eye Research.* 2017; 42(12): 1659-1666.
193. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ. Cell Viability Assays. In: Markossian S GE. *Assay Guidance Manual* [Internet].: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016
194. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37: 277–285.
195. Hu X, Liang Y, Zhao B, Wang Y. Oxyresveratrol protects human lens epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis by activation of Akt/HO-1 pathway. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2019; 139(3): 166-173.
196. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide.* 2003;(9): 64–76.
197. Zhao F, Qin J, Liang Y, Zhou R. Exploring anti-liver cancer targets and mechanisms of oxyresveratrol: in silico and verified findings. *Bioengineered.* 2021; 12(2): 9939-9948.
198. Wei J, Chen JR, Pais EMA, Wang TY, Miao L, Li L, et al. Oxyresveratrol Is a Phytoestrogen Exerting Anti-inflammatory Effects Through NF-κB and Estrogen Receptor Signaling. *Inflammation.* 2017; 40: 1285–1296.

- 199.Crompton M. Mitochondria and aging: a role for the permeability transition? *Aging Cell*. 2004; 3: 3-6.
- 200.Ban JY, Cho SO, Choi SH, Yeon HSJ, Bae KH, Song KS, et al. Neuroprotective Effect of *Smilacis chinae* Rhizome on NMDA-Induced. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2007; 106: 68 – 77.
- 201.Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RCC. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 45 : 1019–1026.
- 202.Aftab N, Likhitwitayawuid K, Vieira A. Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol. *Natural Product Research*. 2010; 24(18): 1726-33.
- 203.Ateş FM. L929 fibroblast hücrelerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif stres hasarında oksiresveratrolün etkilerinin araştırılması [yüksek lisans tezi]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2021.

