



**T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

***CUL4B* GENİNİN YAŞA BAĞLI KATARAKT İLE İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

CEM KARAOSMANOĞLU

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Danışman
PROF.DR. SALİHA HANDAN YILDIZ**

2021-AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

***CUL4B* GENİNİN YAŞA BAĞLI KATARAKT İLE İLİŞKİSİNİN**
İNCELENMESİ
DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN
CEM KARAOSMANOĞLU

DANIŞMAN
PROF.DR. SALİHA HANDAN YILDIZ

**Bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 19.DOK.002 numaralı proje ile
desteklenmiştir.**

2021 – AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK



KABUL VE ONAY



TEŞEKKÜR

Eğitim olanaklarımızı en üst seviyede oluşturan ve yönlendiren Anabilim Dalı BaŐkanımız Sayın Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN baŐta olmak üzere akademi yolculuğumda yanımda olan tüm hocalarıma, özellikle Doktora tez projemin hazırlanması, yürütülmesi ve yazımının her aşamasında değerli bilgi ve önerileri ile beni yönlendirerek destek olan, yardımını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ'a teŐekkürlerimi sunarım.

Her zaman ve her durumda yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Cem KARAOSMANOĞLU

Afyonkarahisar, Haziran 2021

CUL4B GENİNİN YAŞA BAĞLI KATARAKT İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Cem KARAOSMANOĞLU

**Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora Tezi**

Ocak 2021

Danışman: Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ

ÖZET

Yaşa Bağlı Katarakt, yaşlı nüfus arasında görüş kaybı ve bozukluğunun en yaygın nedeni olarak bilinmektedir. Lens epitel hücrelerinin apoptoza uğraması hücre bazda kataraktın oluşumu için temel bir olaydır. CUL4B, cullin-RING E3 ligaz sisteminin temel bir bileşeni olarak hedef proteinlerin übikütinasyon ve proteozomal degradasyonlarını yürüterek birçok hücre bazda görev yapar. CUL4B geninin Yaşa Bağlı Katarakt ile ilişkisi bilinmemektedir. Bu nedenle, Yaşa Bağlı Katarakt hastalarında ve HLE-B3 hücre hattındaki CUL4B gen ifadesini inceleyerek, apoptoz üzerindeki etkilerini araştırdık.

Anteriör Lens Kapsülü örnekleri, oksidatif stresi taklit etmek için farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ile muamele edilmiş HLE-B3 hücre hattı örnekleri ile muamele edilmemiş kontrol örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirdik. CUL4B gen ifadesini kantitatif Real-Time PCR (RT-qPCR) yöntemi, testlerini WST-1 analizi ile yaptık. CUL4B genine özgü susturucu RNA (siRNA) kullanarak CUL4B gen ifadesini baskıladık. Deney gruplarında Bcl-2, Kaspaz 3, Bax ve Bid apoptotik markörlerinin protein düzeyindeki ifadelerini Western blot analizi ile belirledik.

CUL4B gen ifadesinin hem anteriör lens kapsül örneklerinde (p<0,0001) hem de H₂O₂ ile muamele edilmiş örneklerde, kontrole göre anlamlı düzeyde (p<0,05) azaldığını belirledik. H₂O₂ ile muamele edilmiş örneklerde CUL4B protein ifadesi kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır (p<0,01). HLE-B3 hücre hattında siRNA aracılığıyla, CUL4B ifadesini hem mRNA (p<0,01) hem de protein düzeyinde (p <0,001) yüksek oranda inhibe ettik. CUL4B siRNA kullanılmış örneklerde, Bcl-2 ve Kaspaz 3 proteinlerinin ifadesi azalmıştır (p<0,01).

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular CUL4B gen ifadesinin baskılanmasının lens epitel hücrelerinde apoptoza sebep olabileceğini göstermektedir. Yaşa Bağlı Katarakt gelişiminde ve tedavisinde CUL4B geninin etkilerinin anlaşılması için çalışma verilerimizin yapılacak yeni araştırmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, CUL4B, siRNA transfeksiyonu, Yaşa Bağlı Katarakt

INVESTIGATION OF *CUL4B* IN ASSOCIATION WITH AGE-RELATED CATARACT

Cem KARAOSMANOĞLU

Afyonkarahisar Health Sciences University
Institute of Graduate Education Department of Medical Genetics PhD Thesis
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora Tezi
June 2021
Supervisor: Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ

ABSTRACT

Age-related cataract (ARC) is the most common reason for visual impairment and blindness in elderly people. Apoptosis of lens epithelial cells is a well-known cellular event in ARC. Cullin-4B (*CUL4B*) is a core component of the Cullin-RING E3 ligase complex, which plays an important role in various biological processes by mediating the ubiquitination and proteasomal degradation of target proteins. However, the role of *CUL4B* in ARC is unclear. Therefore, we analyzed *CUL4B* expression in patients with ARC and in the HLE-B3 cell line and its effects on apoptosis.

We extracted total RNA from anterior lens capsules of patients with ARC and from HLE-B3 cells treated with different concentrations of H₂O₂ to mimic oxidative stress and untreated HLE-B3 cells. We detected *CUL4B* expression using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). We determined cell viability using the WST-1 assay. We performed siRNA transfection to silence *CUL4B* expression in the cell line. We assessed the protein levels in H₂O₂-treated and untreated cells, knockdown of *CUL4B*, and the effect of *CUL4B* knockdown on protein levels of apoptotic markers Bcl-2, Caspase-3, Bax, and Bid through western blot analysis.

CUL4B was downregulated in anterior lens capsules ($p < 0.0001$) and H₂O₂-treated HLE-B3 cells ($p < 0.05$). *CUL4B* levels were significantly lower in H₂O₂-treated HLE-B3 cells than in untreated cells ($p < 0.01$). *CUL4B* was significantly knocked down at the mRNA ($p < 0.01$) and protein levels ($p < 0.001$) in HLE-B3 cells. Bcl-2 and Caspase-3 were significantly downregulated ($p < 0.01$) in the knockdown group.

Together, these findings show that silencing of *CUL4B* may promote apoptosis in lens epithelial cells. Our study may help understand the role of *CUL4B* in ARC pathogenesis and treatment.

Keywords: Age-related cataract, Apoptosis, *CUL4B*, siRNA transfection.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
1.1. Göz Anatomisi.....	2
1.1.1 Lens Kapsülü.....	4
1.1.2 Lens Epiteli.....	5
1.1.3 Fiber Hücreler.....	6
1.2. Lens Fizyolojisi ve Biyokimyası.....	7
1.3. Epidemiyoloji.....	12
1.4. Katarakt Etyolojisi.....	14
1.4.1 Genetik Faktörler.....	15
1.4.2. Maternal ve Fetal Faktörler.....	15
1.4.3. Cinsiyet.....	16
1.4.4. Irk ve Etnik Köken.....	16
1.4.5. Yaşlanma.....	16
1.4.6. Hipertansiyon.....	17
1.4.7. Sigara Kullanımı.....	18
1.4.8. Oksidatif Stres ve Oksidantlar.....	18
1.4.9. Lipit İçeriği ve Kolesterol.....	18
1.4.10. Travma.....	19
1.4.11. Komplike Nedenler.....	19
1.4.12. Metabolik Nedenler.....	20

1.4.13. Toksik Etki.....	21
1.5 Yaşa Bağlı Katarakt.....	22
1.5.1 Yaşa Bağlı Kortikal Katarakt.....	22
1.5.2. Nükleer Katarakt.....	24
1.5.3. Posterior Subkapsüler Katarakt	25
1.6. Fakoemülsifikasyon.....	26
1.7. <i>CULAB</i> Geni	27
1.7.1. <i>CULAB</i> ve Merkezi Sinir Sistemi	28
1.7.3. <i>CULAB</i> , DNA Hasarı ve Tamiri	29
1.7.4. <i>CULAB</i> ve Hücre Döngüsü	30
1.7.5. <i>CULAB</i> ve Apoptoz.....	30
1.7.6. <i>CULAB</i> ve İlişkili Sinyal Yolakları.....	31
1.8 Oksidatif Stres	31
1.8.1. ROS Üretim Sistemleri	32
1.8.2. ROS Yıkım Sistemleri	33
1.8.3. ROS ve Apoptoz	33
1.9. Yaşa Bağlı Katarakt ve Apoptoz	34
1.9.1. Katarakt Gelişimini Başlatan Apoptoz Mekanizmaları	35
1.9.2. Lens Apoptotik Regülatörleri	35
1.9.2.1. Lens İntrinsik Apoptotik Yolağı	36
1.9.2.2. Lens Ekstrinsik Apoptotik Yolağı	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	39
2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	40
2.3. Yöntemler	41
2.3.1. Anteriör Lens Kapsülü Örneklerinden RNA İzolasyonu.....	41
2.3.2. HLE-B3 Hücre Hattından RNA İzolasyonu	41
2.3.3 cDNA Sentezi	42
2.3.4 <i>CULAB</i> ve <i>ACTB</i> Genlerinin qPCR İle İfadesinin Ölçülmesi	43
2.3.5. HLE-B3 Hücre Kültürü	44
2.3.6. H ₂ O ₂ Uygulaması.....	45
2.3.7. WST Testi	45
2.3.8. HLE-B3 Hücrelerinden Protein İzolasyonu.....	46

2.3.9. BCA Kiti ile Protein Miktar Tayini	47
2.3.10. Western Blotlama	47
2.3.11. siRNA Transfeksiyon İşleminin HLE-B3 Hücrelerine Uygulanması	49
2.3.12. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	50
3. BULGULAR	51
3.1. <i>CUL4B</i> İfade Düzeyinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi	51
3.1.1. Anteriör Lens Kapsül Örneklerinde <i>CUL4B</i> mRNA İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi	53
3.2. H ₂ O ₂ İle Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerinin Canlılığının WST-1 İle Belirlenmesi.....	53
3.3. H ₂ O ₂ Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerindeki <i>CUL4B</i> mRNA İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi	54
3.4. <i>CUL4B</i> siRNA'ları İle Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerindeki <i>CUL4B</i> mRNA İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi.....	55
3.5. H ₂ O ₂ Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerindeki <i>CUL4B</i> Protein İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi	56
3.6. <i>CUL4B</i> siRNA'ları İle Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerindeki <i>CUL4B</i> Protein İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi.....	57
3.7. <i>CUL4B</i> İfadesi Baskılanmış HLE-B3 Hücrelerinde Apoptotik Markırların Değerlendirilmesi	58
4. TARTIŞMA	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR	63
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

CUL4B: Cullin-4B

cDNA: komplementer DNA

siRNA: Small interfering RNA

ACTB: Beta aktin

mRNA: mesajcı RNA

H₂O₂: Hidrojen peroksit

CRL: Cullin-RING E3 Ligaz

mV: minivolt

kDa: Kilodalton

nM: Nanomolar

µM: Mikromolar

mg: Miligram

µm: Mikrometre

ml: Mililitre

ng: Nanogram

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

AREDS: Yaşa bağlı göz hastalıkları çalışması (Age-Related Eye Disease Study)

LOCS III: Lens Opasiteleri Sınıflandırma Sistemi III (Lens Opacities Classification System III)

ATCC: American Type Culture Collection

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

qPCR: Kantitatif PCR

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: <i>CUL4B</i> ve <i>ACTB</i> genleri için qPCR reaksiyon miksi.....	43
Tablo 2.2: <i>CUL4B</i> ve <i>ACTB</i> genlerine ait dizi bilgileri ve RT ² qPCR Primer Assay katalog numaraları.....	43
Tablo 2.3: <i>CUL4B</i> ve <i>ACTB</i> gen ifadelerinin tespiti için kullanılan Real Time PCR programı.....	44
Tablo 2.4: Akrilamid jel içeriği.....	47
Tablo 3.1: Vaka grubunun demografik özellikleri.....	51
Tablo 3.2: Vaka grubuna ait yaşa bağlı katarakt alt tipleri.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Göz anatomisi.....	2
Şekil 1.2: Lens anatomisi.....	3
Şekil 1.3: İnsan lens kapsülünün kalınlık değişimleri.....	4
Şekil 1.4: İnsan lens kısımları.....	5
Şekil 1.5: Lens içinde gerçekleşen taşınım mekanizmaları.....	8
Şekil 1.6 H ₂ O ₂ sinyali.....	10
Şekil 1.7 3-hidroksikinürenin UV-filtre ve oksidasyon görevleri.....	11
Şekil 1.8: Kortikal Katarakt.....	23
Şekil 1.9: Nükleer Katarakt.....	24
Şekil 1.10: Posterior subkapsüler katarakt	25
Şekil 1.11 CUL4b ile ilişkili faktörler.....	28
Şekil 1.12 H ₂ O ₂ ve apoptoz.....	34
Şekil 3.1: <i>CUL4B</i> ve <i>ACTB</i> genlerine ait kantitatif amplifikasyon eğrileri.....	52
Şekil 3.2: <i>CUL4B</i> ve <i>ACTB</i> genlerine ait Erime Eğrileri.....	52
Şekil 3.3: Anteriör lens kapsül örnekleri ve HLE-B3 hücrelerindeki RT-qPCR ile tespit edilmiş <i>CUL4B</i> mRNA ifadesi gösterilmiştir.	53
Şekil 3.4: 25-500 µmol/l H ₂ O ₂ ile muamele edilmiş HLE-B3 hücre hattının WST-1 ile canlılığının ölçülmesi.	54
Şekil 3.5: 24 saat 250 µmol/l H ₂ O ₂ , 48 saat 200 µmol/l H ₂ O ₂ ve 72 saat 100 µmol/l H ₂ O ₂ ile muamele edilmiş HLE-B3 hücrelerindeki RT-qPCR ile <i>CUL4B</i> mRNA ifadesi gösterilmiştir.	54

Şekil 3.6: HLE-B3 hücre hattı, kontrol siRNA ve *CUL4B* siRNA örneklerinin RT-qPCR ile *CUL4B* mRNA ifadesi gösterilmiştir.....55

Şekil 3.7: 24 saat 250 µmol/l H₂O₂, 48 saat 200 µmol/l H₂O₂ ve 72 saat 100 µmol/l H₂O₂ ile muamele edilmiş HLE-B3 hücrelerindeki western blotlama ile *CUL4B* protein ifadesi gösterilmiştir.....56

Şekil 3.8: HLE-B3 hücre hattı, kontrol siRNA ve *CUL4B* siRNA örneklerinin Western Blotlama ile *CUL4B* protein ifadesi gösterilmiştir.57

Şekil 3.9 HLE-B3 hücre hattı, kontrol siRNA ve *CUL4B* siRNA örneklerinin Western Blotlama ile apoptotik markırların ifadesi gösterilmiştir.....58

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yaşa bağı katarakt dünya çapında görme kaybının bir numaralı nedenidir (Hu ve ark., 2019). Yaşa bağı katarakt yüksek insidansa sahiptir ve gelişmekte olan ülkelerde en önemli halk sağığı problemlerinden biridir (Cedrone ve ark., 1999; Li ve ark., 2019). Kataraktın tek tedavi şekli kataraktlı lensin cerrahi müdahale ile çıkarılmasıdır (Meekins ve ark., 2011). Cerrahi girişim uygulanabilir olmasına rağmen, önemli sayıdaki katarakt hastası bu imkânın sunulduğu sağıık hizmetlerine ulaşmakta zorluk çekerken bir taraftan da postoperatif komplikasyonlarla karşı karşıya kalmaktadır (Gupta ve ark., 2014). Yaşa bağı katarakt oluşumunu geciktirebilmek hastaların ameliyat ihtiyacını yaklaşık %45 oranında azaltabilme potansiyeli taşımaktadır (Zhou ve ark., 2012). Bu nedenle katarakt patogenizinde etkin olabilecek biyomarkırları tanımlamak önem arz etmektedir.

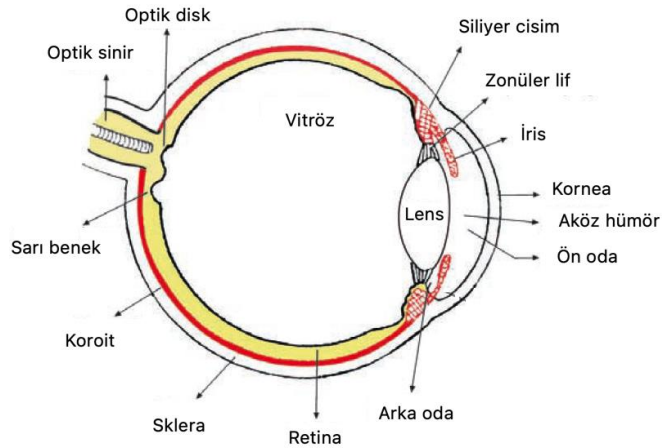
Oksidatif stres, Hidrojen Peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) nedeniyle oluşur. Lens, içinde bulunduğu ortam yüksek oranda ROS içerdiğinden gelişmiş bir savunma sistemine sahiptir. Ancak H_2O_2 gibi majör oksidantlar ve yaş ile beraber savunma mekanizması zayıflar böylelikle enzimler kristallinler ve şaperonlar gibi lens proteinleri oksidatif stres nedeniyle agregasyona ve oksidasyona uğrarlar (Babizhayev ve ark., 2016; Chen ve ark., 2009). Oksidatif stres katarakt için yatkınlık faktörüdür. Reaktif oksijen türlerinin (H_2O_2 gibi) katarakt hastalarında aköz hümörda normal bireylere göre daha fazla oranda bulunduğu gösterilmiştir (Chieh ve ark., 2010). Bu tip bir stress lens epitel hücrelerinin apoptozunu tetikler ve katarakt başlatılmış olur (Tu ve ark., 2019). Oksidatif stres, insan lens epitel hücrelerinin apoptozunun indükleyicisidir. Apoptoz birçok biyolojik olayda kritik görevler üstlenen programlı hücre ölümü işlemidir. Aynı zamanda Yaşa Bağı Kataraktın başlangıcı ve ilerlemesinde genel bir faktör olarak da gösterilmiştir (Babizhayev ve ark., 2016).

Kullin 4B (CUL4B) bir iskele proteini olarak Kullin-RING E3 Ligaz (CRL) kompleksinin bir üyesidir ve hücre döngüsü, DNA replikasyonu ve DNA hasar cevabı gibi birçok hücreyel olayda görevli proteinlerin yıkılmasında görev alır (Li ve ark., 2017). Son zamanlarda kanser türlerinin de yer aldığı çok çeşitli hastalıklarda *CUL4B* geninin anormal düzeylerde ifade bulunduğu bildirilmiştir (Qi ve ark., 2019; Li ve ark., 2019; Liu ve ark., 2019). İnsan osteosarkoma (U2OS) ve Normal insan fibroblast (NHf)

hücre hatlarına H_2O_2 uygulandığında *CULAB* ekspresyonunda azalma görülmüştür. H_2O_2 ile muamele edilen bu hücreler oksidatif stres ile karşı karşıya bırakıldığında *CULAB* geninin susturulması oksidatif stresi artırabilirken, *CULAB*'nin aşırı ekspresyonu ise oksidatif stres altında hücrelerin hayatta kalmasını desteklediğine işaret etmektedir (Wei ve ark., 2015). *CULAB* ekspresyonunun inhibe edilmesinin, kolorektal kanser hücrelerinde proliferasyonu durdurarak apoptoza neden olduğu hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (Song ve ark., 2015). Bu bulgular *CULAB* geninin kataraktın gelişmesinde önemli bir biyomarkır olabileceğine işaret edebilir. Aynı zamanda, *CULAB* yaşa bağlı katarakt gelişiminin geciktirilmesi için önemli terapötik strateji olabilir. Ancak, *CULAB* ifadesinin katarakt gelişimi üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle, *CULAB* gen ifadesinin yaşa bağlı katarakt hastalarında belirleyerek lens epitel hücreleri üzerine apoptotik etkilerin değerlendirmeyi amaçladık.

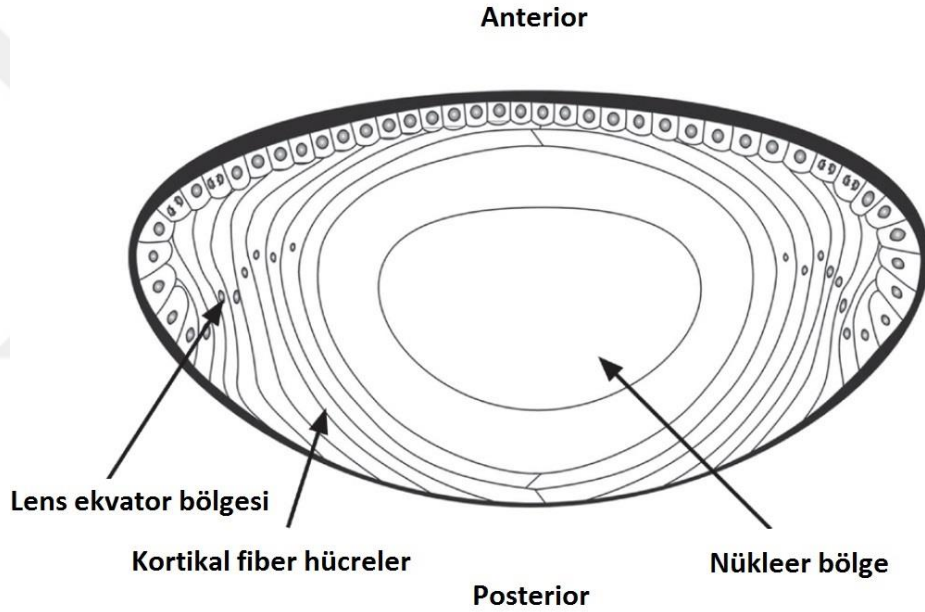
1.1. Göz Anatomisi

Lensin en temel fonksiyonu ışığın retina üzerine odaklanarak aktarılmasıdır. Bu fonksiyonunu gerçekleştirebilmek için yapısında diğer dokulara göre daha yüksek konsantrasyonlarda bazı proteinler mevcuttur. Lens ile ilgili ilk bilimsel çalışmalar yaklaşık yüzyıl önce Sir David Brewster tarafından morina balığının lens yapısını ortaya çıkarmasına dayanır (Brewster, 1833). Mörner lens içinde yüksek miktarda bulunan, günümüzde kristalin olarak adlandırılan çözünebilir yapısal proteinleri 1894 yılında tanımlamıştır (Mörner, 1894). Renwick kataraktla ilişkili ilk lokusu tanımlamıştır (Renwick ve Lawler 1963).



Şekil 1.1 Göz anatomisi (Jogi, 2009).

Lens, posteriör yüzeyi daha dik bir eğri şeklinde bikonveks yapıdadır (Şekil 1.1). Anteriör eğrilik yarıçapı sekiz μm ile 14 μm arasında iken posteriör yüzeyin eğrilik yarıçapı beş μm ile sekiz μm arasındadır. Anteriör ve posteriör yüzeylerin merkezleri kutuplar olarak isimlendirilirken anteriörün posteriör kutupa uzaklığı lens kalınlığı olarak ifade edilir. Akomodasyona uğramamış lensin kalınlığı üç buçuk mm ile beş mm arasındadır. Yaşam boyunca her yıl 0,02 mm artış gösterir. Lensin nazal temporal ölçümü lens çapı olarak adlandırılır. İnfantlarda altı buçuk mm olarak ölçülürken, 13-19 yaş arası dokuz mm iken çok az değişim gösterir. Ekvator ise iki kutup arasında lensin en geniş çevresini ifade eder (Patterson ve ark., 1992; Strenk ve ark., 1999).



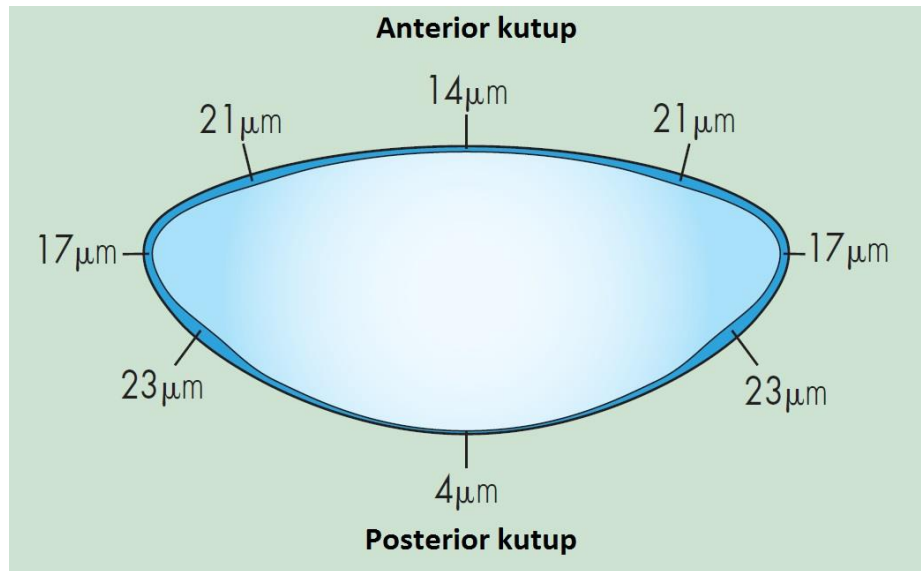
Şekil 1.2 Lens anatomisi (Shetal ve ark., 2007).

İnsan lens ağırlığı doğumda 65 mg, on yaşına geldiğinde 160 mg iken bu yaştan itibaren yavaş büyüme sergileyerek 90 yaşında kadar 250 mg ağırlığa ulaşır. Lens içeriğini oluşturan proteinlerin %60'ından fazlası diğer dokulara oranla lens yapısında daha fazla miktarda bulunur. Lens kolajen kapsül ile çevrilidir. Lensin anteriör kısmında epitel hücreler posterior kısmında ise fiber hücreler mevcuttur (Şekil 1.1). Akomodasyon sırasında kapsül bariyer görevi görerek lens şeklinin korunmasına yardımcı olur. Kapsülün temel yapı bileşenleri arasında tip dört kolojen, laminin, entaktin, perlecan, tip 18 kolojen, heparin sülfat proteoglikan ve fibronektin sayılabilir. Bu bileşenler arasından ilk dört tanesi matriksi oluşturmak için bir araya gelen en büyük yapısal proteinlerdir. Kapsül filamentleri aynı boyutta ve paralel bir biçimde dizilmiş yapıdadır.

Filamentler posteriör kutup bölgesinde en ince, ekvator bölgesinde ise en kalın forma sahiptir. Fibrilin ve elastin fiberleri, ekvatorda özellikle dış zonular bölgede bir araya gelirler. Gestasyonun beş ile altıncı haftasında lens kapsülü tespit edilebilir duruma gelmektedir. Yaşam boyunca anteriör olarak kübik epitel hücreler tarafından, posteriör olarak ise fiber hücreler tarafından üretilmeye devam eder (Mann ve ark., 1964; Cammarata ve ark., 1986; Koretz ve Handelman, 1986; Harding ve ark., 1977; Wistow ve Piatigorsky, 1988; Mir ve ark., 1998).

1.1.1 Lens Kapsülü

Lens kapsülü lensin tamamını çevreleyen saydam bir örtüdür. Kapsülün kalınlığı lokasyonuna göre değişir. Posteriör kutupta üç buçuk μm ekvatorda ortalama yedi μm dir. Anteriör kutuptaki kapsül kalınlığı yaşla birlikte yaklaşık 11-15 μm artış gösterir. Anteriör kutbu çevreleyen halkasal bölge en kalın yer gibi görünür. Yaş ilerlemesi ile 13,5-16 μm artış gösterir. Kapsül öncelikli olarak kollojenden oluşur. Fiberlerin lamellar düzenlenmelerinden dolayı yüksek seviyede elastiktir ancak elastik fiberler içermez. Tüm lens komponentlerini kuşatarak lens şeklinin sağlanmasına yardım eder. Lens kapsülü albümin ve hemoglobin gibi büyük moleküllerin lense geçişinin önlenmesi için bariyer fonksiyonu sağlar. Anteriör epitelyum tarafından üretilir ve anteriör lens kapsülü yaş ilerlemesi ile kalınlaşır. Posteriör lens kapsülünün kalınlığı yaşam boyunca çok az değişir (şekil 1.2) (Remington, 2005).

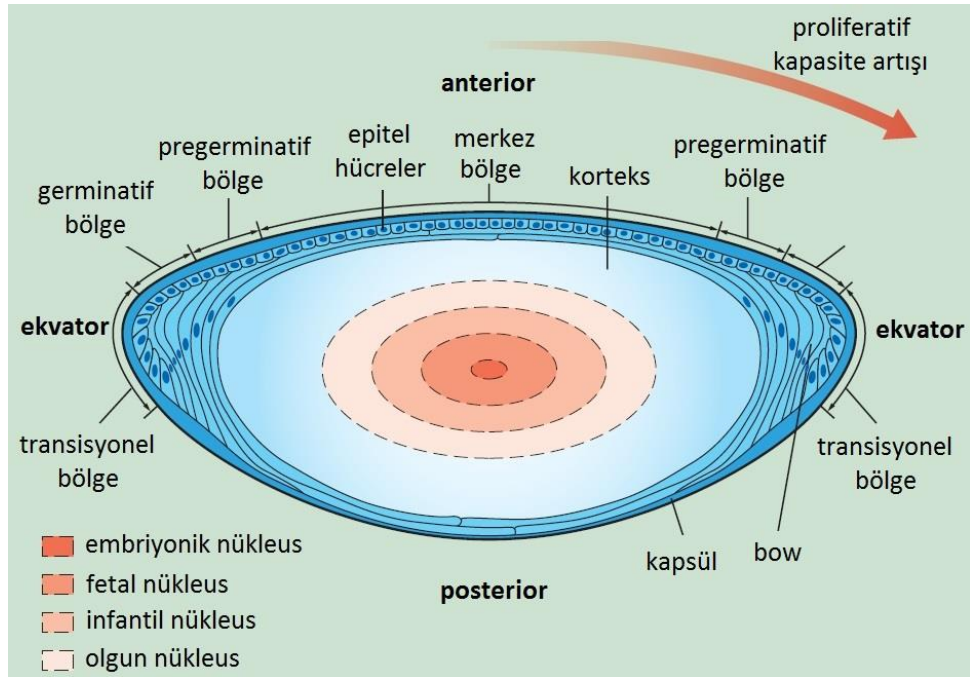


Şekil 1.3 İnsan lens kapsülünün kalınlık değişimleri (Yanoff ve Duke, 2014).

Kapsül, erken embriyolojik gelişim dönemlerinde ortaya çıkar ve ilk lens fiberlerini tamamen çevreler. Lens, kapsül tarafından erken prenatal gelişim sırasında lens epiteli ve fiberlerini tecrit ettiği için virüs ve bakteri enfeksiyonlarından korunum sağlar. Postnatal olarak anterior lens epiteli ve posterior lens fiberleri matriks salgılar ve kapsülün iç kısmına depolar. Lens yaşamı boyunca büyümeye devam ederken kapsülde büyür. Ancak bu gelişimin moleküler mekanizması bilinmemektedir. Kapsül suya, küçük çözülmüş maddelere ve lens büyümesi ve fonksiyonu için gerekli olan proteinler için geçirgendir. Kapsül proliferasyon, migrasyon ve farklılaşma gibi işlevleri regüle eden moleküllerin ve büyüme faktörlerinin birikimi için depo vazifesi görür (Remington, 2005).

1.1.2 Lens Epiteli

Anterior lens epiteli, anterior lens kapsülüne bitişik tek katmanlı kübik epitel hücrelerinden oluşur (Şekil 1.3). Posterior epitelyum primer lens fiber hücrelerinin oluşumu için embriyolojik gelişim sırasında kullanıldığından ötürü mevcut değildir. Epitel hücrelerin bazal kısmı kapsüle bitişiktir. Bu hücrelerin apikal kısımları lensin merkezine, içe doğru yönelmiştir ve lateral membranları, ara bağlantı proteinleri ve dezmozomlar ile bitişiktir (Remington, 2005).



Şekil 1.4 İnsan lens kısımları (Yanoff, 2014)

Bu tip bağlantı sistemi iyonların ve düşük moleküler ağırlıklı metabolitlerin değişimine izin vermektedir. Hücreler çok az sayıda sıkı bağlantılara sahip olmalarından dolayı hücre dışı ortama bu moleküllerin geçirgenliğini imkânsız kılmaktadır. Anterior kübik epitel hücreler organeller bakımında zengin olmakla beraber, mikrotübül, spektrin, α -aktin, aktin, miyozin ve vimentin gibi hücre iskeleti proteinlerini de bol miktarda bulundururlar. Epitel hücrelerin hücre iskeleti proteinlerini yüksek miktarda içermesinin, akomodasyon sırasında hücre yapılarının korunmasını sağladığı düşünülmektedir. Hem lens epitel hücreleri hem de fiber hücreler yüksek oranda kristallin proteinleri içerir (Hejtmancik ve Shiels, 2015).

1.1.3 Fiber Hücreler

Fiber hücreler lens nükleusunun içeriğini oluştururlar. Nükleus içeren kortikal fiber hücre katmanları nükleus içermeyen merkez fiber hücreleri etrafında yüksek düzeyde organize olurlar. Fiber hücrelerin organizasyonları ve bu fiber hücrelerin hücre içi yapılarının özelleşmesi ışık geçirgenliğini sağlayarak lens saydamlığı için önem teşkil eder. Lens saydamlığına etki eden bir başka faktör ise fiber hücreler arasında bulunan minimum düzeydeki boşluklardır. Fiber hücreler arasındaki bağlantılar sayesinde metabolitlerin bu hücreler arasında değişimi sağlanmaktadır. Lens kristallinleri, suda çözünen proteinlerin %90'ını oluşturmaktadır. Mikrotübül, α -aktin, aktin, miyozin proteinlerinin yanında fiber hücrelerin ana protein çeşididir (Hejtmancik ve Shiels, 2015).

Lens, fiber hücrelerden meydana gelmektedir. Fiber hücrelerin oluşumu gelişimsel bir yol izler. Bu süreçte germinatif bölgede yer alan tek katmanlı lens epitel hücrelerinden fiber hücrelerine farklılaşma başlamaktadır. Epitel hücreler lateral olarak ekvator bölgesine göç ederler. Bu bölgede hücrelerde uzama gerçekleşir ve sekonder fiber hücrelerine dönüşüm başlar. Işık geçiriminin artırılması için mitokondri, golgi ve endoplazmik retikulum gibi organeller degrade olurlar. Bu işlemlerden dolayı nükleer fiber hücreler bu organellerden yoksundurlar. Nükleer fiber hücrelerinin üzerine yeni kortikal fiber hücreler yerleşmeye başladığında bu hücreler, lens epitel hücrelerin yer aldığı anterior kısım ve posterior kapsüle doğru uzamaya başlar (Hejtmancik ve Shiels, 2015).

1.2. Lens Fizyolojisi ve Biyokimyası

Lensin ana işlevi ışığı kırmasıdır. Saydam lensin minimum ışık saçılımına sahip olması için bu durum gereklidir. Lens üzerine düşen ışığın kırılma indisi, fiber hücrelerin protein içeriğine bağlıdır. Lens saydamlığı, kan damarlarının yokluğu, az sayıda hücresel organelin olması, fiberlerin düzenli dizilişi ve ışığın dalga boyuna göre farklılaşan indislerin arasındaki mesafenin bir fonksiyonudur. Hücre ve fiber fonksiyonunu koruyan anterior epitelinde yüksek metabolik aktivite meydana geldiği ve preekvator bölgenin yüksek bir mitotik aktiviteye sahip olması nedeniyle bu hücreler önemli miktarda enerji kullanırlar. Lens avasküler olduğu için birçok besin maddesi, vitreusun da katkıda bulunduğu ancak esasen aköz hümördan elde edilir (Remington, 2005).

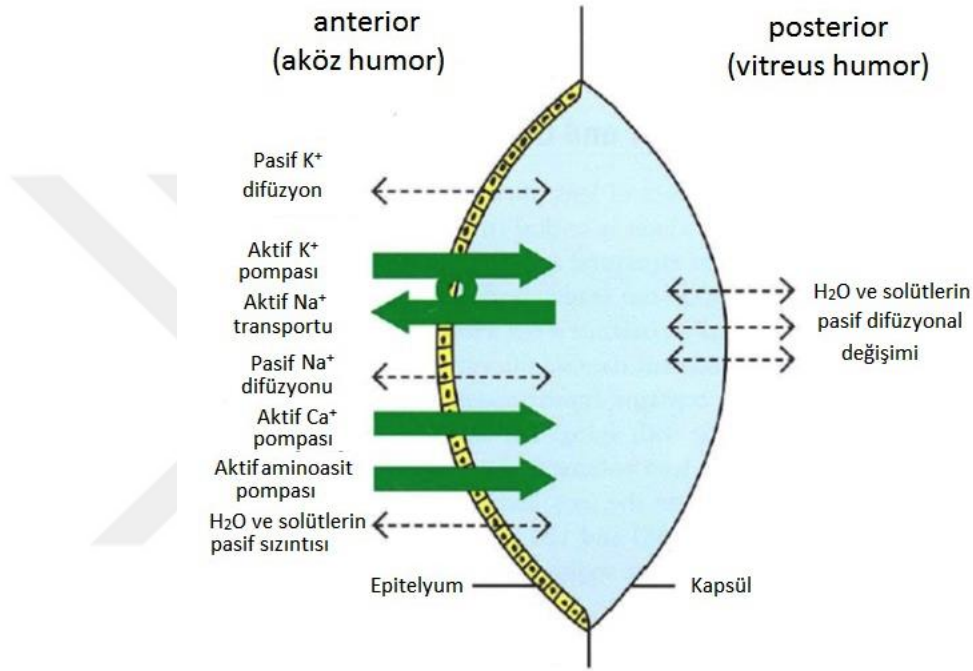
Lens kapsülü su, iyonlar, küçük moleküller ve moleküler ağırlığı 70 kDa kadar olan proteinlere karşı geçirgendir. Epitel hücreler ve fiber hücreler birçok kanal, iyon pompaları ve transport elemanları içerir (Yanoff ve Duke, 2014).

Fiber hücreler yüksek miktarda negatif yüklü kristallin proteini içerir. Bu nedenle, pozitif yüklü katyonlar elektriksel nötrlüklerini korumak için lense giriş yapar ve hücre içi sıvıların osmolaritesi hücre dışı sıvılara göre daha büyük olur. Plazma membranları, K^+ seçici kanalları ile negatif voltaja ayarlıdır. Bu özellikten ötürü sıvı akışkanlığı minimize edilir (Yanoff ve Duke, 2014).

Na^+ iyonları, K^+ iyonları karşılığında aktif taşınma ile hücrelere girer. Na^+ iyonları, konsantrasyon gradiyenti oluşturacak şekilde lens boyunca difüze olur ve iyon kanalları vasıtasıyla epitel hücrelerini ve yüzey fiber hücrelerini terk eder. Na^+ iyonları, posteriordan anteriora akışkanlık halinde iken, K^+ iyonları anteriordan posteriordan doğru akışkanlık gösterirler (Yanoff ve Duke, 2014).

pH gradiyenti nükleustan perifere doğru artış göstermesine rağmen; lensin hücre içi pH değeri yaklaşık olarak yedidir. Lens içindeki proton miktarı, pozitif yüklü iyonların içe doğru akımı ve oksijensiz glikoliz ile oluşan laktik asit nedeniyle arttığından; lens hücreleri devamlı olarak hücre içi protonları dışarı atmaya ihtiyaç duyar. Lens pH dengesi, hücre içi asit seviyesinin regüle eden mekanizmalar sayesinde korunmaya çalışılır (Yanoff ve Duke, 2014).

Amino asit ve glukozun büyük bir kısmı aköz sıvı yoluyla anterior yüzeyden lens içine giriş yapar. Buna ek olarak lens, keto asitleri aminoasit haline çevirebilmektedir. Lens pompa-sızıntı sistemi gibi hareket eder (şekil 1.4). Aminoasitler lens içine anterior yüzeyden pompalanırken, pasif olarak posterior taraftan sızıntı halinde dışarı çıkarlar (Yanoff ve Duke, 2014).



Şekil 1.5 Lens içinde gerçekleşen taşınım mekanizmaları (Bobrow, 2011)

Lens glikozu aköz hümör vasıtasıyla elde eder. Lens çevresinde düşük oksijen konsantrasyonu olduğundan dolayı Adenozin trifosfat (ATP) üretiminin %70'i anaerobik metabolizmadan elde edilir. Aerobik glikoliz ve Kerbs döngüsü mitokondri taşıdıkları için epitel hücreleri ile sınırlıdır. Lens korteksinin en yakın yeri organellere sahip yeni oluşmakta olan fiber hücrelerdir. ATP aktivitesi epitel hücrelerde ve yeni oluşmakta olan fiber hücrelerde daha yüksek, kutup yakınlığında ise daha düşüktür. Lens nükleusunda aktivite bulunmaz ve nükleusda yer alan fiber hücreler protein sentezleyemez (Remington, 2005).

Lens termodinamik olarak verimli olmayan reaksiyonları gerçekleştirebilmek için enerjiye gereksinim duyar. Adenozin trifosfat (ATP) enerjinin temel kaynağıdır. ATP'nin büyük çoğunluğu glukozun oksijensiz metabolize edilmesinden elde edilir.

Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH), pentoz fosfat yolağı ile üretilir. NADPH, yağ asitleri ve glutatyon gibi önemli hücresel bileşenlerin sentezi için indirgeyici olarak kullanılmaktadır (Yanoff ve Duke, 2014).

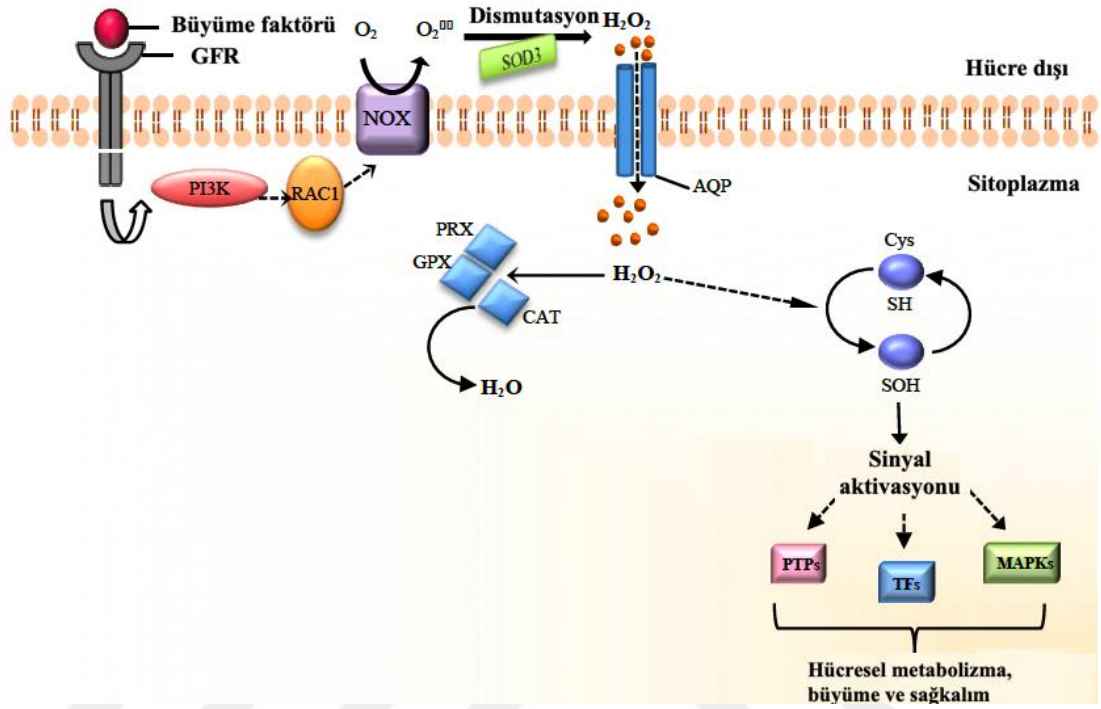
Lens vasküler yapıda olmadığı için hipoksik ortam içinde yer alır. Bu nedenle lens ATP ihtiyacının yaklaşık %70'i oksijensiz glikolizis neticesinde elde edilir. Lens glukozunun yaklaşık %3'ü trikarboksilik asit döngüsüne iletilir. Trikarboksilik asit döngüsü lens ATP ihtiyacının %25'ini karşılar. Glikolizis ve trikarboksilik asit döngüsü enerjetik olarak zengin iki molekülün üretilmesine aracılık eder. Bu moleküllerden biri nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş formu (NADH) iken diğeri ise flavin adenin dinükleotidnin indirgenmiş formudur (FADH₂). Bu moleküller elektronlarını oksijene taşır ve yüksek miktarda serbest enerji çıkışına neden olurlar. Elde edilen enerji ATP yapımında kullanılmaktadır. Bu döngü lens içinde sadece epitel hücre tabakasında gerçekleşmektedir (Yanoff, 2014).

Lens, diğerk dokulardan çok daha yüksek protein konsantrasyonuna sahiptir. En yüksek konsantrasyona sahip proteinler, kristallinler ve lens fiber majör intrinsik 26 (MIP26) proteinleridir. Bu proteinlerin sentezleri sadece organel içeren epitel hücrelerinde ve kortikal fiber hücrelerinde olmaktadır (Yanoff ve Duke, 2014).

Lens proteinlerini degrade eden enzimler lens içinde inhibe olduklarından dolayı uzun sürelerce stabil kalabilirler. Proteinlerin degradasyonu übikütin adı verilen 8,5 kDa ağırlığa sahip protein tarafından koordine edilir. Bu degradasyon sistemi ATP'ye gereksinim duyduğundan dolayı en çok epitel hücrelerde aktif durumdadır. Proteinler endopeptidaz ile peptitlerine, ekzopeptidaz ile aminoasitlerine ayrılırlar. Endopeptidaz kalsiyum ve magnezyum ile yaklaşık olarak pH 7,5'de aktive olurlar. Bu enzimin başlıca substratı α -kristallin proteinleridir. Kalpain I ve II proteazı epitel hücreler ve kortekste bulunmaktadır. Kalpainler kristallin ve hücre iskeleti proteinlerini parçalarlar Lens temel ekzopeptidazı aminopeptidazdır. Bu enzim pH 8,5-9,0 arasında aktive olur ve peptitlerin N-terminal ucundan aminoasitlere etki eder (Yanoff ve Duke, 2014).

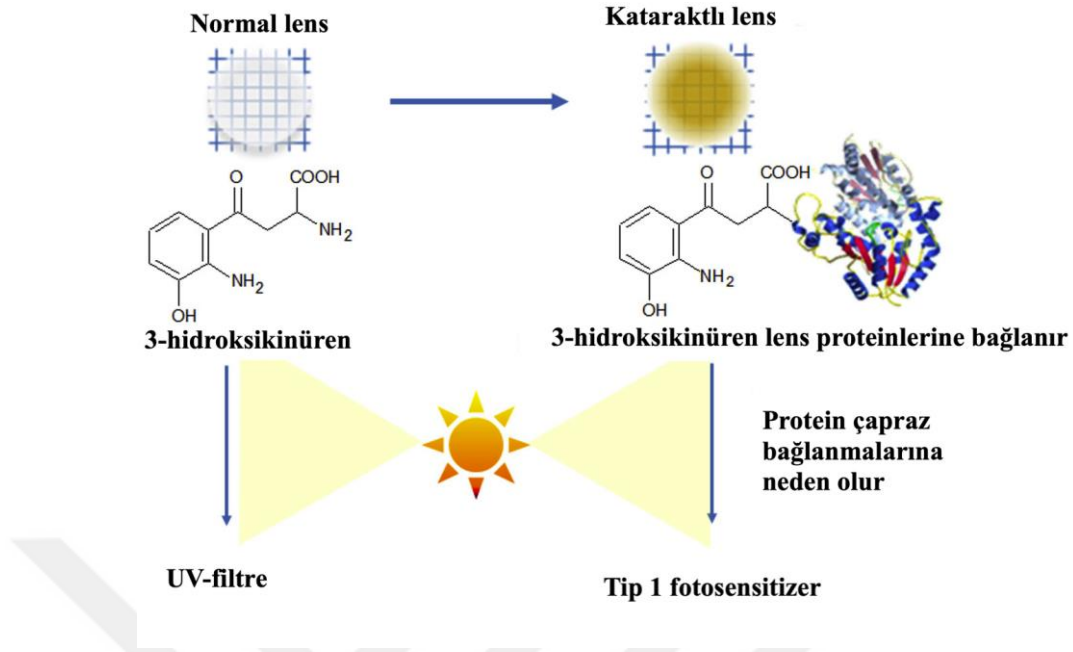
Reaktif Oksijen Türleri (ROS) yüksek düzeyde reaktif oksijen radikalleridir. Bu radikaller lipitlere proteinlere karbonhidratlara ve nükleik asitlere zarar verirler. ROS türleri arasında süper oksit anyon, hidroksil ucu taşıyan radikaller, hidroperoksil

radikaller, lipid peroksil radikaller ve hidrojen peroksit (H_2O_2) sayılabilir. ROS hücre metabolizması ve fotokimyasal reaksiyonlar neticesinde ortaya çıkmaktadır.



Şekil 1.6 H_2O_2 sinyali (Marzo ve ark., 2018).

Işık fotoekzitasyonunun akabinde fotosensitizer tarafından absorbe edildiğinde geçici uyarılmış triplet durumu oluşturur. Bu oluşum diğer moleküller ile etkileşime girerek serbest radikallerin oluşuma neden olur. Özellikle 295-400 nm dalga boyundaki optik radyasyonun sürekli olarak lens içine girmesi nedeniyle lens dokusu fotokimyasal reaksiyonlara karşı hassas hale gelmektedir. Lensde yer alan en büyük ultraviyole (UV) absorbe eden moleküller ya serbest halde ya da aminoasitlerin (triptofan) aromatik zincirlerine bağlı vaziyette bulunurlar (Şekil 1.9) (Yanoff ve Duke, 2014).



Şekil 1.7 3-hidroksikinürenin UV-filtre ve oksidasyon görevleri (Avila ve ark., 2019).

ROS aynı zamanda aköz sıvıda yüksek miktarda H_2O_2 bulunmasından dolayı oluşarak lens içine girebilmektedir. Reaktif oksijen türlerinin hücreye verdiği hasarlar birçok yolla meydana gelmektedir. Membran lipitlerinin peroksidize olması aldehitlerin oluşmasına neden olur. Bu durum sırasıyla membran lipitleri ve proteinlerin arasında çapraz bağlantılara sebep olur. İkinci olarak, ROS DNA bazlarına modifikasyon gibi hasarlar vererek DNA tamir mekanizmalarının verimliliğini düşürmektedir. Son olarak proteinlerin polimerizasyon ve çapraz bağlantılarına neden olarak kristalin agregatlarına ve katalaz ve glutatyon redüktaz gibi birçok antioksidant role sahip önemli enzimlerin inaktivasyonuna neden olur. ROS tarafından indüklenen hasara karşı lens kendini birçok yolla savunur. Süperoksit anyonları süperoksit dismutaz ile dismutasyon geçirirler. Bu dönüşüm neticesinde H_2O_2 oluşur. Oluşan H_2O_2 , dış kaynaklı H_2O_2 ile birlikte katalaz ya da glutatyon peroksidaz ya da her ikisinin birlikte etkisi ile birlikte detoksifiye edilir. Katalaz enzimi epitel hücrelerinde fiber hücrelerine göre daha fazla miktarda bulunur. Glutatyon peroksidaz ise hem epitel hem de fiber hücrelerinde yüksek miktarda bulunur. Glutatyon sistemi H_2O_2 'ye karşı koruma sağlarken aynı zamanda lipit peroksidlerin nötralize edilmesinden doğan lipit serbest radikallerden de korunmada görevlidir (Yanoff ve Duke, 2014).

1.3. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre katarakt görme kaybının ve bozukluğunun bir numaralı nedenidir. Popülasyonun yaşlanması ile birlikte görme kaybının prevalansı her yıl artış göstermektedir. DSÖ, dünya genelindeki 34 milyon görme yetisini kaybetmiş bireyin yaklaşık üçte birinin ve çocuk bireylerin yarısının Güney Doğu Aysa'da bulunduğunu bildirmektedir (Gupta ve ark., 2014). Katarakt geri döndürülebilir görme kaybının bir numaralı nedeni olarak görülmektedir. Dünya sağlık örgütüne göre 2020 yılına dek 40 milyondan fazla bireyi etkilemesi beklenmektedir. Ayrıca DSÖ tarafından 2000 ve 2020 yılları arası yapılan katarakt ameliyatlarının yaklaşık 3 katına çıkması gerektiği bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1 milyon kişide 5000 cerrahi operasyon gerçekleştirilirken, Çin Halk Cumhuriyeti'nde ise bu sayı 500'e kadar düşmektedir. Görme bozukluğu ve yaşa bağlı kataraktın yaşlı bireylerde artmış ölüm oranları için bağımsız bir risk faktörü olabileceği gösterilmiştir. Katarakt 40 yaş ve üstü yaklaşık 20 milyon Amerikan vatandaşını etkilediği ya da her altı kişiden birini etkilediği rapor edilmiştir (Rosenfeld, 2007).

Kataraktın tedavisinde cerrahi girişim tek çözüm olduğundan, sağlık hizmetlerine ulaşmada bireylerin sosyoekonomik durumu oldukça etkindir. Bu problem gelişmekte olan ülkeler için kritiktir. Amerika Birleşik Devletleri'nde katarakt cerrahisinin ekonomi üzerine etkisi devasa boyuttadır. Katarakt tedavisi için yılda yaklaşık 3,4 milyar Amerikan doları harcanmaktadır. Katarakt tedavisi için yapılan cerrahi girişim sayısından daha fazla sayıdaki, hastaların kliniklerdeki muayeneleri ve testleri de hesaba katıldığında finansal etki daha da büyümektedir (Rosenfeld, 2007).

Yaşa bağlı katarakt, prevalansından dolayı oldukça büyük sosyoekonomik etkiye sahiptir. Lens opaklığının standardize edilmiş ve geniş çevrelerce kabul edilmiş bir sınıflandırma sistemi olmadığından, kataraktın insidansı ve prevalansının tam olarak değerlendirilmesinde güçlükler yaşanmaktadır. Yaşa bağlı kataraktın nedeni olan lens opaklığının şekli, yoğunluğu ve lokasyonu değişkenlik gösterir. Bu nedenle katarakt tanımlamalarının çoğunluğu görüş keskinliğinin kantitatif olarak azalması ve lens morfolojisindeki değişikliklerin slit-lamp mikroskobu ile tanımlanmasını gerektirir. Yaşa bağlı kataraktın toplumdaki sıklığını tespiti genel popülasyondan elde edilen bilgilerden çok seçici gruplardan gelen veriler ile tahmin edilmektedir. Son olarak

birçok yaşlı bireyde katarakt patolojisinin yanında görmek yetisindeki azalmada bulunmaktadır. Bu hastaların görüş yeteneğindeki azalma yanlılıkla katarakt nedeniyle lens değişimlerine bağlanmış olabilir (Rosenfeld, 2007).

Katarakt üzerine geçmişten günümüze bir dizi çalışma yürütülmektedir. Yaşa bağlı katarakt çalışması (Age Related Eye Disease Study, AREDS) 1990'lı yıllar boyunca yürütülmüştür. Diğer bulguların yanında, bu çalışma lens opaklığının derecesini sınıflandırmanın güvenilirliği daha çok erken zamanda gelişen lens değişimlerini içeren geniş bir çalışma grubunda göstermiştir. AREDS sisteminin kataraktı patolojilere göre sınıflandırması daha sonraki kataraktın insidansı ve gelişimi üzerine yapılacak çalışmalar için uygulanabilir bir sınıflandırma sistemidir (AREDS, 2001).

The Beaver Dam Eye çalışması 1980'lerin sonunda başlamış büyük popülasyon tabanlı bir çalışmadır. Çalışmaya göre 74 yaşından büyük kadınların %45,9'unun erkeklerin ise %38,8'inin görüş yeteneğini bozacak seviyede katarakta sahip oldukları ortaya çıkmıştır (Klein ve ark., 1998). Baltimore göz araştırmasına göre; 40 yaşından büyük bireylerde yüzde on ya da daha fazla orandaki hastada katarakt, görme kaybının sorumlusudur (Sommer ve ark., 1991). Boylamsal katarakt çalışması (Longitudinal Study of Cataract, LSC) lens opaklığı için risk faktörlerinin epidemiyolojik bir çalışmasıdır. Bu çalışmada nükleer opaklaşma, artan yaş, ırk, düşük sosyoekonomik düzey, sigara kullanımı ve aile hikayesi, bireyde önceden posterior subkapsuler katarakt bulunması ve erken gözlük kullanımı ile ilişkili bulunmuştur. LSC yeni lens opaklaşma durumlarını ve lentiküler opaklaşmanın ilerlemesini Lens opaklığı sınıflandırma sistemi (Lens Opacities Classification System III, LOCS III) kullanarak değerlendirmiştir. Çalışmaya katılan bireylerin yaş ortalaması 65 olarak ölçülmüştür. Çalışma başladıktan iki yıl sonra bireylerin yüzde altısında, beş yıl sonra yüzde sekizinde yeni lens opaklaşması tespit edilmiştir. Beş yılın sonunda kortikal ve PSC gelişiminin insidansı sırasıyla %7,7 ve %4,3 olarak bulunmuştur. Beş yılın sonunda çalışmaya katılan bireylerin 1/13'ünde yeni kortikal katarakt, 1/24'ünde ise yeni PSC tespit edilmiştir. Kortikal kataraktın ilerleme oranı beş yıllık süre zarfında %16,2 bulunurken, PSC için bu oran %55,1'dir (Leske ve ark., 1997). Beş numaralı AREDS çalışması nükleer opaklaşmasının daha çok kadınları, beyaz ırk dışındaki ırkları, sigara kullananları ve maküler drusen içerenleri etkilediği tespit edilmiştir. Orta seviyede nükleer opaklık, yüksek sosyoekonomik seviyedeki bireylerde, diyabet geçmişi olan ve steroid içermeyen antiinflamasyon

ilaçlar kullanan bireylerde daha az olduğu görülmüştür. Orta seviyedeki kortikal kataraktın ise koyu iris rengi, büyük maküler drusen, kilo alma, parlak güneş ışığına maruziyet ve tiroid hormon kullanımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (AREDS raporu, 2001).

Katarakt, dünyadaki tüm görme yetisinin kaybetmiş vakaların yaklaşık %33'ünden sorumludur (Pascolinive Mariotti, 2011). Son yıllarda katarakt insidansı ve prevalansının belirlenmesi için çalışmalar yoğunlaşmıştır.

50 yaşın üstündeki yetişkin bireylerde, katarakt prevalansı %47,8 olarak ölçülmüştür. Katarakt prevalansı 2002 yılında avrupada %19,3 olarak değerlendirilmiştir (Resnikoff ve ark., 2004). Yaşa bağlı kataraktın Avrupadaki prevalansı 52-62 arasındaki yaş gruplarında yüzde beş artış gösterirken, 60-69 yaş grubunda %30'a, 70 yaşını geçkin bireylerde ise %64'e çıkmaktadır (Das ve ark., 1994). İtalyada yapılan popülasyon tabanlı bir çalışmada, nükleer kaynaklı lens opaklığı %18,5, kortikal opaklık %12,9, ve PSC'den kaynaklı lens opaklığı ise %10,8 olarak ölçülmüştür. Tüm katarakt tipleri yaşlı bireylerde daha fazla tespit edilmiştir. Kadın bireylerde erkeklere oranla bir buçuk kat daha fazla katarakta rastlanılmaktadır. İleri seviyedeki katarakt 60-69 yaş aralığındaki vakaların 1/3'ünde ve 70 yaş ve ilerisindeki vakaların 2/3'ünde tespit edilmiştir (Giuffre ve ark., 1994). Lübnan'da yapılan araştırmada, katarakt görme yetisini kaybeden vakaların %38,5'inde tespit edilmiştir (Waked ve ark., 2007). Almanya'da 100.000 kişiden 3.32 kişi katarakt nedeniyle görme yetisini kaybetmektedir ve görme kaybının en önemli ikinci nedeni olarak bildirilmektedir (Trautner ve ark., 2003). 2010 yılında yapılan Reykjavik göz çalışmasında tek taraflı görme bozukluğuna sahip vakaların %50'sinin katarakt nedeniyle olduğu bildirilmektedir (Gunnlaugsdottir ve ark., 2010). Katarakt %9,5 ile Finlandiya popülasyonunda en sık rastlanan kronik göz hastalığı olarak bildirilmektedir. Finlandiya vatandaşlarının %53'ünün katarakt operasyonu geçirdiği belirtilmektedir (Laitinen ve ark., 2009). İspanya'da gerçekleştirilen araştırmada katarakt prevalansı 64 yaşından büyük erkek bireylerde %69,5 iken, kadın bireylerde %65,5 olarak görülmüştür (Navarro Esteban ve ark., 2007).

1.4 Katarakt Etyolojisi

Kristalin lensin birinci fonksiyonu ışık geçirgenliğine izin vererek, ışığın retina üzerine odaklanmasını sağlamaktır. Lensin bu fonksiyonunu gerçekleştirilmesi için ışık

geçirgenliğinin olması, lens hücrelerin ve proteinlerinin yüksek düzeyde organize olması gerekmektedir. Lens fiber hücrelerinde protein konsantrasyonu son derece yüksektir. Bu sayede kırılma indisi kendisinin çevreleyen sıvıdan daha yüksektir ve lensin ışığı kırması sağlanır. Katarakt, lens saydamlığını ya da ışık saçılımı ve absorbe ettiği ışık ile sağlanması gereken görüş keskinliği kaybettiği zaman ortaya çıkar (Malhotra, 2007).

Katarakt genetik, metabolik, beslenme bozuklukları ya da çevresel etkenler nedeniyle ya da diyabet ve retinal dejeneratif gibi diğer sistemik hastalıkların sekonder etkisi ile ortaya çıkabilir. Yaşa bağlı katarakt, diğer katarakt türleri arasında en sık görülen türdür. Yaşa bağlı katarakt için en önemli risk faktörü yaştır ve dünya çapında büyük bir sağlık sorunudur. Gelişmekte olan ülkelerde cerrahi sağlık hizmetlerine ulaşım sınırlıdır. Bu nedenle görme kaybının en büyük nedenidir. Cerrahi girişim dışında efektif bir tedavi yolu olmadığı için problem gelecek on yıllarda dünya popülasyonunun yaşlanması neticesinde artan bir şekilde devam edecektir (Malhotra, 2007).

1.4.1 Genetik Faktörler

Genetik nedenlerle gelişen katarakt bireyin kromozomal paternindeki anormallikten kaynaklanmaktadır. Konjenital kataraktların 1/3'ü genetik kaynaklıdır. Mikroftalmi, aniridi, anterior kamaranın gelişimsel anormallikleri, retinal dejenerasyonlar, kromozom anomalileri, Lowe sendromu ya da nörofibromatozis gibi multisistem genetik hastalıklar ile birlikte gelişebilmektedir. *PITX3* geninin, anterior segmentteki mezenşimal disgeneziye neden olduğu kalıtsal katarakt vakalarında olduğu rapor edilmiştir. Mendeliyen kalıtım gösteren kalıtsal kataraktlar otozomal dominant, resesif ya da X kromozomuna bağlı olarak kalıtılmaktadır. Fenotipik olarak aynı kataraktlar farklı gen lokuslarında meydana gelen mutasyonlar nedeniyle oluşabilir (Gupta ve ark., 2014).

1.4.2. Maternal ve Fetal Faktörler

Hamilelik döneminde ya da erken infant dönemde malnütrasyon ailesel olmayan zonüler katarakt ile ilişkilendirilmiştir. Rubella, toksoplazmozis gibi maternal enfeksiyonlar da konjenital katarakt ile ilişkilidir. Endokrin sistem bozuklukları, alkol ya da ilaç (kortikosteroidler) kullanımı ve hamilelik sırasında radyasyona maruziyet infantlarda katarakt gelişimi için risk faktörleridir. Hamileliğin son üç ayındaki

intrauterin hipoksi, Lowe sendromu, miyotonik distrofi de infantlarda katarakt için risk faktörleridir (Gupta ve ark., 2014).

1.4.3. Cinsiyet

Kadın bireyler erkek bireylere göre daha fazla katarakt geliştirme riskine sahiptirler. Bunun sebebi, muhtemelen post menepoz dönemde östrojenden yoksun olmaları ile açıklanmaktadır (Gupta ve ark., 2014).

1.4.4. Irk ve Etnik Köken

Afrika ve İspanyol orjinli Amerikalılar beyaz ırka göre yaklaşık iki kat daha fazla katarakt geliştirme riskine sahiptirler. Diyabet ve diğer tedavi yöntemlerinin eksik olmasından dolayı bu farkın bu denli fazla olması üzerine yorumlar yapılmaktadır (Gupta ve ark., 2014).

1.4.5. Yaşlanma

Yaşa bağlı (senil) katarakt, bilinen bir mekanik, kimyasal ya da radyasyon kaynaklı bir travma geçmişi olmayan 40 yaş ve üzeri bireylerde gelişen katarakt tipi olarak tanımlanmaktadır. Yaşlı popülasyonda ilerleyici bir karakter sergileyerek oldukça sık görülmektedir (Gupta ve ark., 2014). Suda çözünebilir alfa kristallin miktarı yaş ile azalır. 45 yaşındaki bir bireyin Lens nükleusunda alfa kristallin yer almaz. Alfa kristallin diğer kristallinlerin agregatlar oluşturmasını önlemeye yardımcı olur. Suda çözünmeyen agregatlar yaş ile artış gösterir (Remington, 2005).

Lens yaşam boyunca büyür. Lens kalınlığındaki artış sekiz ile 40 yaş arasında gerçekleşir. Olgun lens fiber hücreleri organellerini kaybeder. İyonların, besinlerin ve antioksidantların transportundaki azalma katarakt oluşumuna katkı sağlayan hasarlara neden olabilir. Yaş ilerlemesi ile fiber hücrelerinin membran geçirgenliğinde bir artış olur. İyonik pompalar iyon dengesinin bozulmasını telafi edemezler. Lens içindeki sirkülasyon, glutatyon ve su akışının korteks-nükleus sınırında kısıtlar ve değiştirir. Akuoporinlerdeki önemli değişiklikler su akışının bozulmasına neden olur (Remington, 2005).

Glutasyon ve askorbat protein modifikasyonlarının önlenmesi ve serbest radikal hasarından korunumu sağlar. Glutasyonun miktarındaki azalma proteinler ve membranların oksidatif hasarına yol açar. Glutasyon konsantrasyonundaki azalma katarakt gelişimi ile ilişkilidir. Orta yaşta gelişen korteks ve nükleusun arayüzünde lokalize olan ve küçük moleküllerin korteksten nükleusa geçişini engellediği öngörülen bir bariyer üzerinde düşünülmektedir. Bu bariyer nükleusta glutasyonun azalmasının nedeni olabilir. Ara bağlantılarda bir konneksin modifikasyonu fiber hücreler arasındaki iletişimde bir bozulmaya neden olur. Bu modifikasyonun bariyerin oluşum nedenlerinden olabileceği belirtilmektedir. Lens nükleusunun en iç kısmında aquaporin kanal proteinlerindeki değişimler orta yaş civarı (40-50) meydana gelir. Bu kanalların yarısı yukarıda ifade edilen bu bariyerde kaybolmaktadır. Bu değişiklikler su kanallarının tıkanmasına yol açarak bariyer fonksiyonuna katkıda bulunur (Remington, 2005).

Protein parçalanması ve agregat oluşumunun fiber hücre membranlarına zarar vermesi, glutasyon eksikliği, oksidatif hasar, artmış kalsiyum seviyesi, anormal lens epitel hücre göçü gibi spesifik mekanizmalar yaşa bağlı katarakt gelişiminin nedenleri arasında sayılabilir. Takip eden diğer faktörler yukarıda sayılan mekanizmaların etkilerini artırarak katarakt gelişimini etkileyebilir (Remington, 2005).

1.4.6. Hipertansiyon

Diabetin katarakta neden olması üzerine yapılan klinik çalışmalarda, arterial hipertansiyonun da yüksek prevalans ile mevcut olduğu bulunmuştur. Nakano farelerinin lens epitelinde, lentiküler iyonik aktarımın azalması, Na^+ K^+ adenosin trifosfatazın (ATPaz) azalmasına neden olarak katarakt oluşumuna yol açtığı rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada Na^+ K^+ ATPaz inhibitörleri ile yapılan *in vitro* çalışmalar ile de diabetin katarakt oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2014). Su toplanmasına izin veren membran geçirgenliğindeki artış ya da iyon pompası fonksiyonsuzluğu nedeniyle sıvı akışkanlığında bozulma meydana gelebilir. Na^+/K^+ ATPaz pompa aktivitesi önemli derecede azalırsa sitoplazmaya Na^+ ve beraberinde su akışı olur. Bunun sonucunda lens fiber hücreleri şişer ve lens saydamlığı azalır (Remington, 2005).

1.4.7. Sigara Kullanımı

Birçok çalışmada sigara kullanımının katarakt oluşumu üzerindeki rolünün altı çizilmiştir. Bu çalışmalarda sigara kullanan bireylerde 2-3 kat oranda katarakt oluşturma riski bulunduğu bildirilmiştir. Sigara kullanım dozu ile nükleer kataraktın derecesi arasında pozitif korelasyon izlenmiştir. Sigara dumanında bulunan aromatik bileşenlerin lentiküler bileşenleri oksidatif olarak modifiye ettiği gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2014).

1.4.8. Oksidatif Stres ve Oksidantlar

Oksidatif stres katarakt gelişimde önemli bir faktör olduğu hayvan deneylerinde ve kültüre edilmiş lens modellerinde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Oksidatif süreç lens yaşlandıkça ve protein konsantrasyonu arttıkça artan bir eğilim gösterir. Oksidantların aşırı üretimi oldukça zararlı olmakla beraber genetik materyal üzerine ciddi etkileri vardır. Oksidasyon üzerine var olan teorilerden biri, lens yaşlanmasının ve bariyerlerin, glutatyon ve diğer koruyucu antioksidantların lense dolayısıyla nükleusa girişini önlediği böylece lensin oksidasyona karşı hassas durumda olduğunu belirtir (Gupta ve ark., 2014).

Lens içeriğinde bulunan nükleik asitler, proteinler ve lipitlerin oksidatif hasara maruz kalması yaşa bağlı kataraktın oluşmasında bir numaralı etken olarak görülmektedir. Oksidatif stresin katarakt etmeni olduğu hem insanlarda hem de hayvanlarda birçok çalışma ile gösterilmiştir. X ışını ya da ultraviyole (UV) ve mikrodalga gibi diğer tip radyasyonlara maruz kalınmasının oksidatif stres kaynağı teşkil ettiği için katarakt oluşumu ile sonuçlanabildiği belirtilmektedir. Deneysel olarak hayvanlara ya da tedavi amacı ile insanlara uygulanan hiperbarik oksijen maruziyetinde benzer sonuçlar doğrulanabilmektedir. Oksidasyon hipotezini destekleyen epidemiyolojik çalışmalarda, parlak güneş ışığına yüksek seviyede maruz kalınmasının yaşa bağlı katarakt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Malhotra, 2007).

1.4.9. Lipit İçeriği ve Kolesterol

Membran lipitlerinin metabolizmasının birçok katarakt türünün oluşumunu etkilediği bilinmektedir. Lens membranı, diğer bilinen membran türlerine oranla yüksek düzeyde

kolesterol içermektedir. Katarakt gelişimi, bu hücrelerde kolesterol birikimi ve dağıtımının artışı ile ilişkilidir. Smith-Lemli-Opitz sendromu ve mevalonik asidüri, kolesterol metabolizmasında görevli enzimleri etkileyen mutasyonlar sonucu oluşur bu sendromlara sahip hastalarda katarakt gelişebilir. Statin gibi kolesterol ilaçlarının da kolesterol birikimini önleyerek katarakt oluşumuna neden olabileceği bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2014).

1.4.10. Travma

Katarakt gözü etkileyen hasarlar ile de oluşabilir. Göz ile temas ettiğinde çıkarılması güç olan objeler fiziksel hasara sebep olarak lens kapsülünü bozar. Dış lens kapsülü yırtıldığı zaman iç lens şişmeye başlar ve proteinlerin denatüre olması ile beyaz renge bürünür. Lens kapsülünü etkileyen hasar olmadan sadece şok etkisi yapan durumlarda da subkapsüler başlangıçlı yıldız görünümlü katarakt gelişebilir. Bu tip sakatlanmalar genellikle lensin daha yumuşak olduğu genç bireylerde görülür. Kaynakçılık ve cam fırınlarının bulunduğu ortamlarda çalışan insanlar travmatik başlangıçlı katarakt için daha çok hassasiyet gösterirler (Gupta ve ark., 2014).

1.4.11. Komplike Nedenler

Bu tanım kataraktın sistemik ve dejeneratif hastalıkların yanında sekonder şekilde lensde bulunması durumuna göndermede bulunur.

Kutanöz hastalıklarla ilişkili lens opasitesi genç yaşta, bilateral gelişir ve sendromatik katarakt olarak isimlendirilir. Atopik katarakt özellikle çocuk bireyleri etkileyen atopik dermatit (AD) ile ilişkilidir. Mekanizması bilinmemekle beraber kaşınma alışkanlığı olmasının etken rol oynayabileceği bildirilmiştir. AD'li hastalar aköz hümörda yüksek düzeyde protein fibrillerine sahiptirler. Poikiloderma, vasküler atrofikus, skleroderma ve keratoz foliküleriz kataraktla ilişkili diğer cilt hastalıklarıdır (Gupta ve ark., 2014).

Glukom ve tedavisinde kullanılan demekaryum ve izofluorat gibi ilaçlar katarakt için yüksek risk oluştururlar. Fuchs Heterokromik İridosiklitis, Still Hastalığı, Kornea Ülseri, Endoftalmit, Üveit, Miyopik Korioretinal Dejenerasyon, Retinis Pigmentoza ve diğer retinal pigment dejenerasyonları, Retinoblastoma ya da Melanoma katarakt oluşumu için göz ile ilişkili diğer hastalıklardır. Miyopik değişiklikler katarakt

gelişiminin öncesinde olabilir. Nükleer kataraktın gelişiminin öncesinde oluşan miyop ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Posterior subkapsüler kataraktın miyop nedeniyle lensin ışığı kırma gücünün değişmesi ile yüksek düzeyde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2014).

1.4.12. Metabolik Nedenler

Katarakt endokrin hastalıklar ve biyokimyasal anormallikler ile gelişebilir. Galaktozemik ve diyabetik kataraktlar bu tip katarakt gelişimine örnek olarak verilebilir (Gupta ve ark., 2014).

Galaktozemi doğuştan galaktoz metabolizma kusurudur. Galaktoz 1 fosfat üridil transferaz (GPUR) ve Galaktokinaz (GK) eksikliğinden gelişir. Yağ damlası şeklinde lens merkezinde oluşan lens opasitesi galaktozemi nedeniyle oluşan kataraktın karakteristik özelliğidir. Bilateral olarak gelişir (Gupta ve ark., 2014).

Diyabetin tedavisinin aksatıldığı durumlarda ciddi sistemik ve oküler komplikasyonlar gelişmektedir. Diyabet hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar ile katarakt nedeni olduğu gösterilmiştir. Diabetes Mellitus (DM) kontrol altına alınmadığında oküler dokularda enzimatik olmayan protein glikasyonu ile ilişkili olan hiperglisemi, ozmotik stres ve oksidatif stres ile sonuçlanır (Gupta ve ark., 2014).

İnsülin tedavisi, egzersis ve iskemi indüklü hipoglisemi katlanmamış protein cevabına (UPR) neden olur. UPR ile apoptotik yollar aktive olarak lens epitel hücre apoptozu oluşur (Gupta ve ark., 2014).

Katarakt değişiklikleri paratiroid tetani ile ilişkili olabilir. Atrofi ya da paratiroid bezlerin alınması ile gelişebilir. Noktasal şekilli ya da çok renkli kristal benzeri yapılar opasite subkapsüler bölgede oluşabilir (Gupta ve ark., 2014). Aynı zamanda Sitoplazmik Ca^{++} miktarındaki artış saydamlığın kaybı ile ilişkilidir (Remington, 2005).

Katarakt hipotiroidizm ya da kretinizimin genel özelliklerinden biri değildir. Ancak kataraktla hipotiroidizm arasında bazı ilişkiler bildirilmiştir. Lens opaklığının hipotiroidizm vakalarında görüldüğü bilinmektedir. Paratiroide müdahale etmeden yapılan tiroidektominin mavi nokta halinde beliren katarakta neden olabileceği bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2014).

Bakır metabolizmasındaki bozukluk Wilson hastalığı (hepatolentiküler dejenerasyon) ile sonuçlanır. Wilson hastalığına sahip bireylerde anterior lens kapsülü bölgesinde lens opasitesi gelişir (Gupta ve ark., 2014).

Deney hayvanları çalışmaları ve *in vitro* çalışmalar ile mikrobesein eksikliklerinin katarakta neden olduğu gösterilmiştir. Aldo redüktaz şeker metabolizmasındaki anormallikler katarakt oluşumu için temel teşkil eder. Beslenme bozukluğuna sahip katarakt hastalarının lenslerinde protein çözünürlüğündeki bozuklukların artış gösterdiği ile ilgili önermeler mevcuttur. Triptofan eksiliğinin kataraktı indüklediği bildirilmiştir. Düşük folik asitin deney hayvanları üzerindeki etkilerinden biri de katarakt geliştirmesidir. Düzenli multivitamin kullanımının tüm katarakt tiplerinin gelişimine karşı riskin azalmasında faydalı olduğu gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2014).

Özellikle çinko ve bakır elementleri gibi eser elementlerin katarakt oluşumundaki rolleri üzerine önermeler mevcuttur. Deney hayvanları ve insanlardaki çalışmalar çeşitli inorganik minerallerin katarakt oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu elementler katarakt gelişimi için etken faktörler olarak oldukça ilgi çekmektedirler (Gupta ve ark., 2014).

Neonatal hipoglisemi, aminoasidoüri, homosistinüri, Hurler hastalığı gibi diğer metabolik hastalıklar da katarakt gelişimine neden olurlar (Gupta ve ark., 2014).

1.4.13. Toksik Etki

Kortikosteroidler, sakinleştiriciler ve radyomimetik ilaçlar gibi birçok ilaç katarakt gelişimine neden olabilmektedir. Steroid kullanımı sekonder katarakt gelişimi için dördüncü en önemli faktör iken tüm katarakt nedenlerinin yaklaşık %4,7'sini oluşturur. Sistemik steroidlerin yanında oküler topikal steroidler ve krem formları da katarakt oluşumu için risk teşkil etmektedir. Prednisone gibi steroidler lensin içinde bulunduğu destek dokunun normal metabolizmasını bozar. Göz kapaklarına uygulanan düşük oranlı steroid kremler bile göz içi basıncını artırdığı için katarakt ile sonuçlanabilir. Kortikosteroid indüklü kataraktın mekanizması bilinmese de ozmotik dengesizlik oksidatif hasar ya da lens büyüme faktörlerine hasar verebilme özelliklerinden dolayı katarakt gelişimine katkısı olduğu düşünülebilir. (Gupta ve ark., 2014).

1.5 Yaşa Bağlı Katarakt

Yaşa bağlı katarakt yaşı ilerlemiş bireylerde görme bozukluğunun en yaygın nedenidir. Yaşa bağlı kataraktın patogenezi multifaktöriyel özellik gösterir ve tam olarak anlaşılammıştır. Lens yaşlandıkça ağırlığı ve kalınlığı artar ve akomodasyon yeteneği azalır. Yeni kortikal lens fiberleri oluştuğca lens nükleusu sıkışmaya ve zarar görmeye (nüklear siklerozis) başlar. Kristalin proteinleri kimyasal modifikasyonlar ile değişmeye ve yüksek moleküler ağırlıklı proteinler halinde agregatlar oluşturmaya başlarlar. Protein agregatlarının oluşması ile lensin kırılma indisinde dalgalanmalar meydana gelir. Böylelikle lens saydamlığında azalma olur. Nükleer lens proteinlerinin kimyasal modifikasyonları aynı zamanda ilerleyici pigmentasyona da neden olur. Lens yaş ile beraber sarı ve kahverengimsi bir hal almaya başlar. Yaşa bağlı olarak lens içinde glutatyon konsatrasyonu ve potasyum miktarında azalma ile sodyum ve kalsiyum oranında artış gözlenir (Rosenfeld, 2007).

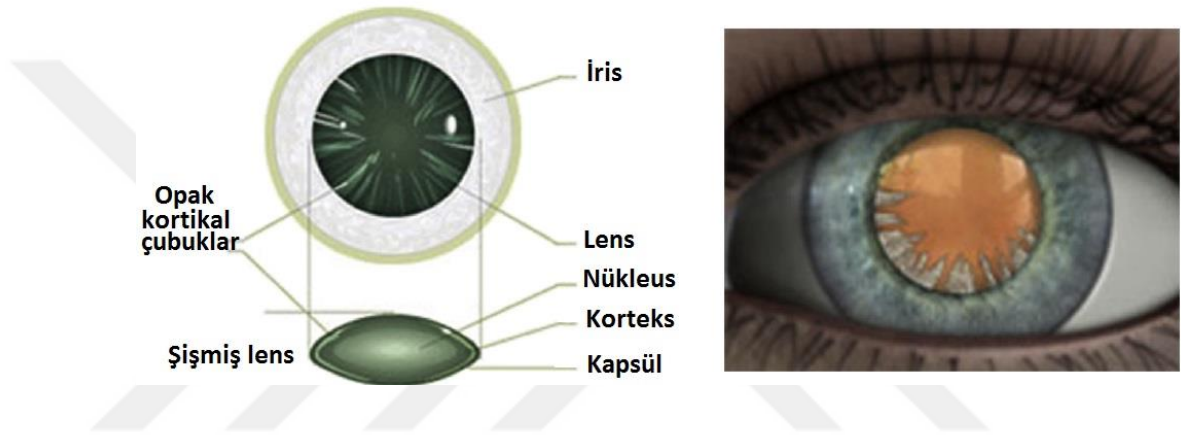
Yaşa bağlı kataraktın kortikal, nükleer ve posterior subkapsüler olmak üzere başlıca üç tipi bulunmaktadır. Bu katarakt tipleri hem opasitenin bulunduğu bölgeye göre hem de opasitenin oluşmasını sağlayan patolojiye göre farklılık gösterir. Yaşa bağlı bu üç katarakt tipi için birçok risk faktörü ortaktır (Malhotra, 2007).

1.5.1 Yaşa Bağlı Kortikal Katarakt

Kortikal katarakt üç majör katarakt tipi içerisinde en sık rastlanılan çeşididir. Kortikal tabakanın lens nükleusuna göre yoğunluğu daha azdır. Bundan dolayı aşırı su toplanmasına karşı daha hassas yapıdadır. Kortikal tabakanın bu hassasiyeti elektrolit dengesizliğine neden olabilir, nihayetinde diyabet ve galaktozemide de gösterildiği gibi lens kortikal fiber hücrelerinde bozulmaya neden olur. Kortikal fiber hücrelerin bu durumundan dolayı bu tip kataraktın osmotik stres nedeniyle oluşabileceği düşünülmektedir. Kataraktın erken gelişim evresindeki işaretler vakuol oluşumu, su ceplerinin oluşumu, lamellar ayırım gibi olayları barındırır. Bu değişimler zaman içerisinde bireyin lens fiber hücrelerine zarar verir ve geri dönüşü olmayan opaklaşmaya yatkınlık oluşturabilir. (Malhotra, 2007).

Lens korteksinin iyonik kompozisyonundaki değişiklikler ve devamında lens fiberlerinin hidratlanma durumlarındaki değişiklikler kortikal opaklaşmaya neden olur.

Kortikal katarakt genellikle bilateral gelişirken sıklıkla asimetriktir. Görme yeteneğine olan etkisi opaklığın geliştiği bölgeye göre değişkenlik gösterir. Kortikal kataraktın en genel semptomlarından biri araç tepe lambaları gibi odaklanmış yoğun ışık kaynaklarından gelen parıldamadır. Aynı zamanda monoküler diplopi de (çift görme) oluşabilir. Kortikal kataraktın ilerleme derecesi değişkenlik göstermektedir. Bazı olgularda kortikal katarakt opaklık durumları uzun periyotlar boyunca değişmeden kalırken diğerleri hızlı bir ilerleme kaydeder (Rosenfeld, 2007).



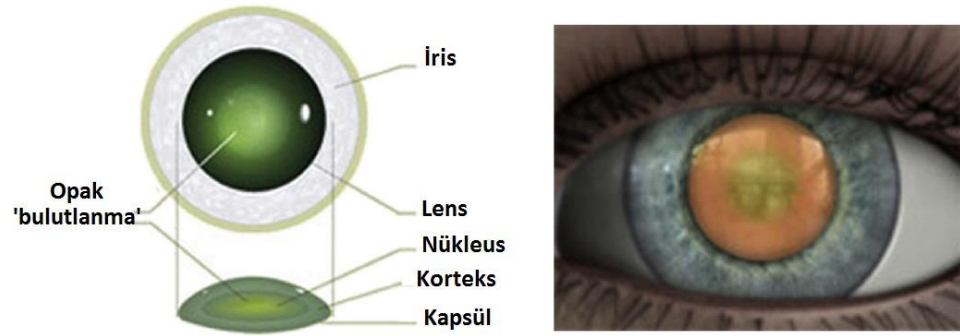
Şekil 1.8 Kortikal Katarakt (Thompson ve Lakhani, 2015).

Kortikal katarakt oluşumunun ilk işareti anterior ve posterior kortekste vakuoller ve su yarıklarının slit-lamp mikroskobu ile görülebilir halde olmasıdır. Kortikal lamel sıvı ile ayrılabilir durumdadır. Kama şeklindeki opaklıklar (genellikle kortikal çubuklar) lens periferinin yakınında oluşur ve opaklığın merkeze doğru sonunu işaret eder (Şekil 1.5). Kortikal çubuklar slit-lamp mikroskobisi ile görüntülendiğinde beyaz opaklar halinde gözlenirken, retroiluminasyon ile görüntülendiğinde koyu gölgeler halinde gözlemlenir. Kama şeklindeki opaklıklar genişleyebilir ve büyük kortikal opaklıkları oluşturacak şekilde birleşebilirler. Lens su almaya devam ederken, şişebilir ve şişkin (intumescent) kortikal katarakt haline gelir. Kapsülden nükleusa kadar tüm korteks beyaz ve opak hale gelir. Bu tip durum olgun (mature) katarakt olarak isimlendirilir (şekil 1.5). Kortikal katarakt histopatolojik olarak lens fiberlerinin hidropik şişmeleri ile karakterizedir (Rosenfeld, 2007).

1.5.2. Nükleer Katarakt

Nükleer katarakt yaşlı bireylerde, normal sklerozisin artışı ve lens nükleusunun sertleşerek sararması neticesinde ortaya çıkar. Çalışmalar nükleusun optik yoğunluğunun kademeli ilerlemesinin yaş ile paralel seyrettiğini bildirmişlerdir (Malhotra, 2007).

Bir dereceye kadar nükleer sklerozis ve sararma orta yaşı geçkin bireylerde fizyolojik olarak normal kabul edilmektedir. Bu durum görüşü minimal düzeyde etkilemektedir. Aşırı derece nükleer sklerozis ve sararma nükleer katarakt olarak değerlendirilir ve lensde merkezi opaklığa neden olur. Sklerozis, sararma ve opaklığın derecesi slit-lamp mikroskobu ile değerlendirilir.



Şekil 1.9 Nükleer Katarakt (Thompson ve Lakhani, 2015).

Nükleer kataraktın ilerlemesi yavaş bir eğilim gösterir. Genellikle bilateral olmasına rağmen asimetrikte olabilir. Nükleer katarakt tipik olarak uzak görüş yeteneğini yakın görüş yeteneğine göre daha fazla etkiler. Nükleer kataraktın erken safhalarında lens nükleusunda ilerleyici bir zarar verme durumu söz konusudur. Bu durum sıklıkla lensin kırılma indisinde artışa neden olur ve kırılım miyopik geçiş gösterir. Bazı vakalarda, miyopik geçiş, presbiyopi yok ise gözlüksüz yakın görüş imkânı verir. Nadir olarak bazı vakalarda sklerotik nükleus ve lens korteksi arasındaki kırılma indisinin değişmesi monoküler diplopiye (çift görme) neden olmaktadır. Lensin ilerleyici sararması görülebilen ışık spektrumunda özellikle mavi renk tonlarının ayırımı sağlama yeteneğinde azalmaya neden olur. Fotopik retinal fonksiyon ilerlemiş nükleer katarakt olgularında azalma gösterebilir. Çok ileri düzeydeki nükleer kataraktlı bireylerde lens

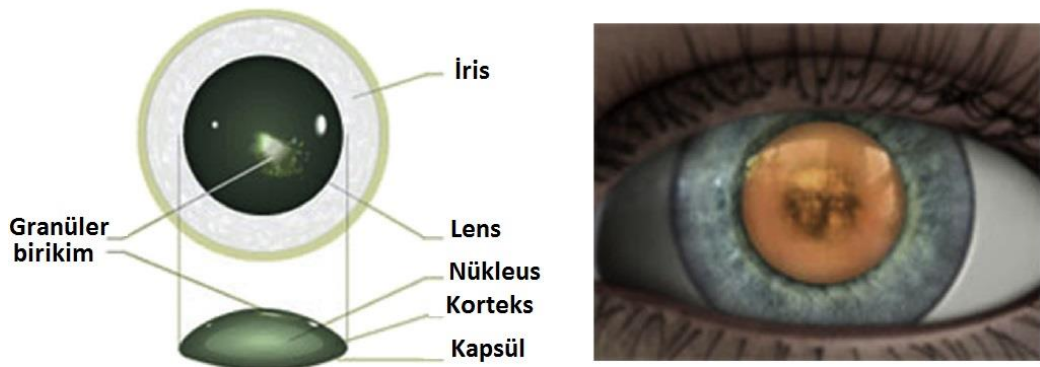
nükleusunun opak ve kahverengi halde olması (brunescent) nükleer katarakt olarak isimlendirilir (Rosenfeld, 2007).

Nükleer katarakt lens yapısal proteinlerdeki (α -, β - ve γ -kristalinler) fizyolojik değişimlerle ilişkilidir. Bu proteinler oksidasyon, enzimatik olmayan glikolizasyon, proteolizis, deaminasyon ve fosforilasyon ile yüksek moleküler ağırlıklı agregatlar haline gelirler. Nükleer lens proteinlerinin kimyasal modifikasyonları lensin önce sararmasına, sonra kahverengi olmasına en son siyahlaşmasına neden olur (Malhotra, 2007).

Nükleer katarakt, histopatolojik olarak lens nükleusunun hücresel laminasyonlarının kaybı ile birlikte homojenizasyon göstermesi şeklinde karakterize edilir (Rosenfeld, 2007).

1.5.3. Posterior Subkapsüler Katarakt

Posterior subkapsüler katarakt (PSC), nükleer ve kortikal katarakta göre daha az rastlanılan bir katarakt çeşididir. Kataraktın ilerlemiş evrelerinde nükleer ve kortikal kataraktla beraber bulunduğu görülmüştür. PSC retroilüminasyon ile kolaylıkla fark edilebilmektedir. PSC'ye sahip hastalar erken evrelerde yakın objelere odaklanma ve parlama problemlerinden şikâyet ederler. Akomodasyon sırasında göz bebeği daralır. Işık göz girişinde merkeze konsantre şekilde düşer. PSC tam olarak merkezde yer aldığı için makulanın üzerine görüntünün odaklanma yeteneği bozulur ve ışık saçılımı oluşur. (Malhotra, 2007).



Şekil 1.10 Posterior subkapsüler katarakt (Thompson ve Lakhani, 2015).

PSC pupil açıklığının çoğunu, parlak ışık tarafından ya da akomodasyon ile büzülme indüklendiğinde gizler. Bu nedenle hastalar sıklıkla parlak ışık şartlarında parlamalardan ve az görmeden dolayı şikâyet ederler. PSC'li hastalarda yakın görüş keskinliği uzak görüşe göre azalma eğilimi gösterir. Bazı hastalar monoküler diplopi sergilerler. Slit-lamp mikroskopisi ile PSC'nin en iyi şekilde tespiti, açılmış pupil yoluyla sağlanır (Rosenfeld, 2007).

Posterior subkapsüler katarakt, slit lamp ile posterior kapsülün önünde yer alan granüler iç yüzeyin karakteristiğini göstermek için, yakın ve geniş ışınlar uygulanarak direkt ilüminasyon yöntemi ile incelenebilmektedir. Bu teknik hastaların tolere edebileceği ışık parlamasının üstünde bir uygulama olduğu için uzun direkt ilüminasyon kullanışlı olmayabilir. Bu nedenle retroilüminasyon daha çok opaklığın sınırlarını ortaya çıkarmak için uygun bir yöntemdir (Malhotra, 2007).

PSC erken evrelerde merkez posterior subkapsüler bölgede direkt ilüminasyon ile toz benzeri bir yapıda görülebilir iken retroilüminasyon ile görülmesi oldukça zordur. Posterior subkapsüler bölgedeki tozlanma nihayetinde yoğunlaşarak retroilüminasyon ile görülebilir forma gelmektedir. PSC, radyasyon, steroid alımı, diyabet ve retinal dejenerasyonunun sonucunda gelişebilir (Malhotra, 2007).

1.6. Fakoemülsifikasyon

Modern katarakt cerrahisinin ilkeleri küçük kesikler yapılarak fakoemülsifikasyon ile kataraktlı lensin çıkarılması işlemine dayanır. Katlanabilir IOL implantları lokal anestezi altındaki hastaya uygulanır (Malhotra, 2007).

Fakoemülsifikasyon, Kelman tarafından kataraktın çıkarılması için ses üstü dalgaları kullanan tek enstrümanlı bir yöntem halinde 1967 yılında tanımlanmıştır. Bu teknik ses üstü dalga özelliğine sahip, pizoelektrik kristali kullanarak elektrik enerjisini titreşimli şok dalgaları haline dönüştüren bir prob yardımıyla uygulanır (Malhotra, 2007).

Lensi parçalamak için birçok fakoemülsifikasyon yöntemi mevcuttur. Böl ve ye (Divide and conquer) ve fako veya Phaco-chop yöntemleri en sık kullanılan yöntemlerdir. Böl ve ye yöntemi lens nükleusunun sistematik olarak bölünüp fragmanlar haline getirilmesi ardından ise emülsifiye edilmesi esasına dayanır. Fakoemülsifikasyon yöntemi ise ilke

olarak Nagahara tarafından 1993 yılında bilim dünyasına tanıtılmıştır. Bu yöntem nükleusun yarılması prensibine dayanır. Nükleus kesim enstrümanı ile yarılarak fakoemülsifikasyon ucuna oturtulur. Fako yönteminin ana amacı fakoemülsifikasyon zamanını ve kullanılan enerjiyi azaltmaktır. Böylelikle korneal endotelyum kaybı minimize edilmektedir. Bu teknik, kesim enstrümanı uygulaması sırasında anterior kapsülün yırtılmasını önlemek için oldukça dikkat gerektirir (Malhotra, 2007).

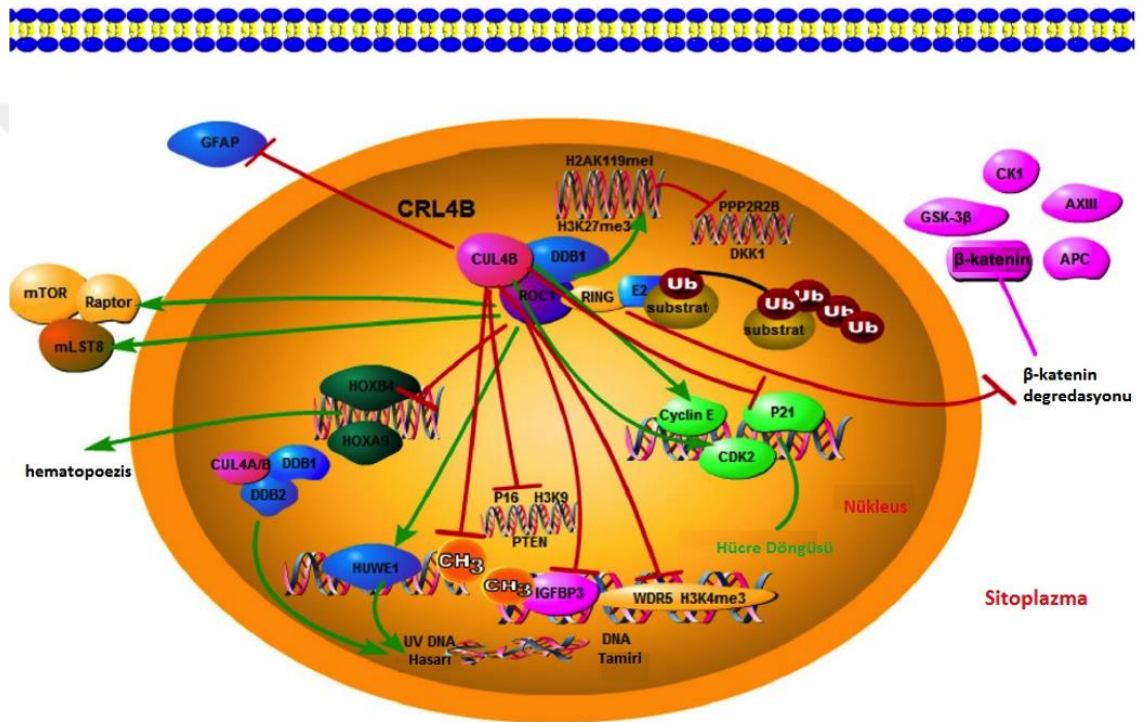
1.7. *CUL4B* Geni

CUL4B geni X kromozomunun q27 bölgesinde yer alır. 22 ekzona sahiptir ve 913 aminnoasitlik bir protein kodlar. Cullin proteinleri birçok memelide evrimsel olarak korunmuş bir protein ailesidir. Cullin 1, Cullin 2, Cullin 3, Cullin 4A, Cullin 4B, Cullin 5, Cullin 7 ve Cullin 9 (PARC) olmak üzere insan genomunda 8 alt tipi mevcuttur. Cullin proteinleri 'Really interesting new gene' (RING) E3 ligazların en büyük sınıfıdır. RING box proteinlerine göre yüksek düzeyde korunmuş homolog domainleri ile bağlanarak scaffold fonksiyonu gösterirler. Cullinler, hücre döngüsü ve sinyal regülasyonu içeren hücre biyolojisi davranışlarını içine alan çeşitli proteinlerin seçici degradasyonunda anahtar rol oynar. Son zamanlarda kanser gelişimi üzerine etkileri incelenmektedir (Li ve Wang, 2017).

Cullin 4 ailesinin Cullin 4A (*CUL4A*) ve Cullin 4B *CUL4B* olmak üzere iki üyesi bulunmaktadır. *CUL4B*, *CUL4A* ile %83 oranında dizi homolojisi gösterir. *CUL4A* ve *CUL4B*'nin neredeyse aynı yolla çeşitli hücresel aktivitelerde yer aldığı düşünülmektedir. Ancak, *CUL4A* ve *CUL4B*'nin fonksiyonları ve spesifik mekanizmaları arasında büyük farklılıklar olduğu son zamanlarda gösterilmiştir. *CUL4A* diğer proteinlerden farklı olarak C terminalinde nükleer lokalizasyon sinyali (NL8) taşır. *CUL4B* proteininde ise, bu sinyal dizisi N terminalde yer almaktadır. *CUL4A* ve *CUL4B* substrat adaptör protein olan hata spesifik DNA-bağlayan protein 21 (DDB21) ile etkileşime girebilirler. Genom bütünlüğünün korunması, DNA replikasyonu ve hücre döngüsü gibi hücresel fonksiyonlarda yer alırlar. *CUL4B* WD tekrarı içeren protein 5 (WDR5) ve peroksidoksin III (PrxIII) gibi *CUL4A* tarafından hedeflenemeyen substratlarla etkileşime geçer (Li ve Wang, 2017).

CUL4B pankreatik dokuda, endokrin bezlerde, beyincikte, alt genital sistemde, kemik iliğinde ve testislerde yüksek düzeyde eksprese olur (Li ve Wang, 2017).

Son zamanlarda solid tümörlerde *CUL4B*'nin fonksiyonu aydınlatılmaya çalışılmaktadır. *CUL4B*'nin anormal ekspresyonu pek çok hastalıkta ve fizyolojik proseslerde gösterilmektedir. *CUL4B*'nin kanser hücrelerinde ekspresyon azalış ya da artışının hücre proliferasyonunda, DNA hasarı ve tamirinde, hücre döngüsünün ilerlemesinde, metastaz, invazyon, DNA metilasyonu, histon asetilasyon modifikasyonu ve sinyal yollarında merkezi bir rol oynadığı çalışmalarda gösterilmiştir (Li ve Wang, 2017).



Şekil 1.11 CUL4b ile ilişkili faktörler (Li ve Wang, 2017).

1.7.1. *CUL4B* ve Merkezi Sinir Sistemi

Prx III, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyeleri üzerine etkin bir CUL4B substratıdır. Prx III, ROS regülasyonuna katılarak nöral hücre gelişimine dolaylı yoldan etki etmektedir. CUL4B ekspresyonu azaldığında PrxIII birikimi artış gösterir. Bu şekilde hücrelerde ROS seviyesinin aşağıya çekilmesi sağlanmış olur. Böylelikle hücreler hipoksi ve H₂O₂ indüklü apoptoza karşı direnç artışı geliştirirler. Hücre proliferasyonu ve normal hücresel fonksiyonların etkinliği değişir (Li ve ark., 2011).

CUL4B iskele proteininin beyin gelişiminde gerekli olduğu yapılan çalışmalarca gösterilmiştir. *CUL4B* genini etkileyen varyantlar ile serebral malformasyonlar arasında ilişki olduğu bilinmektedir. *CUL4B*'nin hipokampustaki nöronal organizasyonda yer aldığı ve beyin gelişiminde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Dong ve ark., 2015).

Malign glioma tümör oluşumunda *CUL4B* onkogen rolü üstlenmektedir *CUL4B* gen ifadesi azaldığında glioma hücrelerinin proliferasyon kapasitesi azalarak tümör gelişiminin yavaşlatılabildiği gösterilmiştir (Dong ve ark., 2015).

1.7.2. *CUL4B* ve Kanser

Özafagus, akciğer, gastrik, kolon, pankreatik, serviks, renal, karaciğer ve mesane tümörlerinde *CUL4B* gen ekspresyon değişiklikleri tespit edilmiştir. Özafagus ve serviks kanser hücrelerinde yüksek düzeyde *CUL4B* ekspresyonu gözlemlenmiştir (Li ve Wang, 2017).

CUL4B gen ekspresyonunun artış göstermesi hücrelerin farklılaşması, invazyon yetenekleri kazanması ve metastaz yapması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda *CUL4B* gen ekspresyonunun epitel mezensimal geçiş üzerine etkin olduğu *CUL4B* geninin susturulması ile ispatlanmıştır (Li ve Wang, 2017).

1.7.3. *CUL4B*, DNA Hasarı ve Tamiri

Kullin RING E3 ligaz kompleksleri (CRL) kullin ailesinin DNA hasarı ve tamir işlevlerinde görev alan çeşitli üyelerini içerir. CUL4A DDB1-CSA kompleksi oluşturarak nükleotid tamir mekanizmasına katılmaktadır. *CUL4B* ve *CUL4A* yüksek düzeyde dizi homolojisi gösterirler. *CUL4B*, *CUL4A* dan farklı olarak kendine has 149 aminoasitlik bir dizi içermektedir. *CUL4A* ve *CUL4B* proteinleri DNA homolog rekombinasyon tamir mekanizmasında DDB1-CUL4^{CTD2} kompleksini oluşturarak yer alır. Hem DDB1-CUL4A^{CTD2} hem de DDB1-CUL4B^{CTD2} UV hasarına uğramış DNA'yı tanırlar. *CUL4B* hücre nükleusuna DDB2'den bağımsız olarak DDB1 transferini sağlar. UV hasarlı DNA'nın tamir prosesinin regülasyonunda *CUL4B* yer almaktadır (Li ve Wang, 2017).

1.7.4. *CUL4B* ve Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücre büyümesinin devam ettirilmesi için önemli bir mekanizmadır. Hücre döngüsünde meydana gelen regülasyon bozukluklarının tümör hücresine dönüşüm ile sonuçlandığı bilinmektedir. Hücre döngüsünün ilerlemesi siklinler ve siklin bağımlı kinazlar gibi birçok mekanizma ile korunmaktadır. Siklin E önemli bir hücre döngüsü kontrol elemanıdır. DNA'nın G1-S geçişinde düzgün şekilde replike olmasını garanti altına almak için Siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2) ile etkileşime geçer. Birçok çalışmada siklin E'nin übikütin geçişli proteolizis sistemi ile regüle edildiği bildirilmiştir. *CUL4B* geni susturulduğu zaman siklin E birikimi oluşmaktadır. Böylelikle S fazının uzayarak hücre proliferasyonu baskılanmaktadır. Sonuç olarak *CUL4B* hücre proliferasyonu üzerinde etkin bir proteindir (Li ve Wang, 2017).

P21, siklin bağımlı kinaz (Cyclin depended kinase, CDK) inhibitörüdür. CDK2 aktivasyonunu inhibe ederek hücre döngüsünü regüle etmektedir. P21, hücre döngüsünün G1 fazında birikir ve S fazında degrade olur. *CUL4B*, P21 fonksiyonunu P21 proteinini kodlayan *CDKN1A* genini transkripsiyonel baskılayarak negatif şekilde regüle eder. *CUL4B* hücre proliferasyonunu *CDKN1A* 'yı kısmi baskılayarak artırır (Li ve Wang, 2017).

CUL4B, *CDC6*'yı pozitif regüle ederek DNA replikasyonunu artırır. *CDC6*, pre-replikasyon komplekslerinin oluşması için gereklidir. *CUL4B*, *CDC6* fosforilasyonu ve stabilizasyonundan sorumludur. *CUL4B*, *CDK2*'yi miR-372/373 aracılığıyla negatif regüle ederek ekspresyonunu artırır (Li ve Wang, 2017).

1.7.5. *CUL4B* ve Apoptoz

CUL4B geninin ekspresyonunun azalması hücre döngüsünün S fazında durmasına ve apoptozu tetikleyen DNA replikasyon anomalilerine neden olan hücre proliferasyonunun inhibe olmasına neden olur. *CUL4B* ekspresyonunun baskınlanması ile koleorektal kanser hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inhibe olduğu ve proliferasyonun baskılanarak hücrelerin apoptoza uğradığı bilinmektedir. Osteosarkoma

hücrelerinde *CUL4B* gen ekspresyonunun inhibe olması proliferasyonu durdurmakta ve apoptozu teşvik etmektedir (Li ve Wang, 2017).

1.7.6. *CUL4B* ve İlişkili Sinyal Yolakları

CUL4B ile birçok sinyal yolağının ilişkili olduğu bilinmektedir. Özellikle Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ile ilişkisinden dolayı birçok kanser türünde Wnt/ β -katenin sinyalinin anormal aktivitesi gösterilmektedir. *CUL4B*, β -katenini GSK3-geçişli degradesyondan korumaktadır. Bunun yanı sıra, *CUL4B*/PRC2 komplekslerinin Wnt inhibitörlerini baskılamak için H2AK119me1 ve H3K27me3'ü teşvik ederek Wnt sinyal yolağını aktifleştirmektedir.

CUL4B, mTOR aktivitesini DDB1, mTOR kompleksinin bileşeni olan mLST8 ve Raptor ile ilişkiye girerek etkiler. *CUL4B* geninin baskınlanması mTOR geçişli S6K1 fosforilasyonunu azaltmaktadır. Aynı zamanda *CUL4B* baskınlanması *CDKN2A* ve *PTEN* gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının artmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı *CUL4B*, PI3K/Akt/mTOR yolağının etkisini artırarak hücre sağ kalımı üzerine etki göstermektedir (Li ve Wang, 2017).

1.8 Oksidatif Stres

Oksidatif stresin katarakt oluşumuna olan katkısı, kataraktlı ve sağlıklı lense ait olan lipid kompozisyonu, protein modifikasyonları ve antioksidantların konsantrasyon oranlarının karşılaştırılması ile tespit edilmiştir. Oksidatif stres ile Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) oluşumu lens hücrelerinde oksidatif hasara neden olur ve katarakt oluşumuna katkı sağlar (Berthoud ve Beyers, 2009).

Kataraktlı lenslerde proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın okside olması gözlemlenen bir durumdur. Proteinlerin sülfidril grupları okside olmuş metiyonin içerir ve tiyollenmiş ya da disülfid olmayan bağlar ile çarpaz bağlanmış durumdadır. Bu değişimler neticesinde proteinler yüksek moleküler ağırlıklı olarak agregatlar halinde çökerler. Bu tip modifikasyonlar lensin redoks durumundaki değişikliklerin sonucu olarak oluşabilir. Aslında, lens içinde yüksek konsantrasyonda olan indirgeniş glutatyon redüktaz (GSH) kataraktlı lensde azalmış durumdadır. GSH azalması, disülfid bağ oluşumu ya da protein

katlanma bozuklukları yoluyla glutatyon redüktazın inaktivasyonu ile sonuçlanabilir (Berthoud ve Beyer, 2009).

Fotooksidasyonda da yaşa bağlı kataraktın gelişmesine katkıda bulunabilir. Ultraviyole (UV) ışınlar ROS üretimini teşvik ederler. İnsan lensinde triptofan derivatları gibi serbest UV filtreleri yaşla beraber azalırken protein bağlı UV filtreleri H₂O₂ gibi peroksitleri üretir. Serbest UV filtrelerin azalması ve lens proteinlerine bağlanması, lensi ilerleyici şekilde UV hasarına ve oksidasyona yatkın hale getirmektedir (Şekil 1.9) (Berthoud ve Beyer, 2009).

Lens hücrelerindeki enzimler, kristallinler ve şaperonlar gibi proteinler oksidatif stres ile modifiye, denatüre olur ve agregat oluştururlar. Bu değişimler katarakt oluşumu için yeterli ortamı sağlar (Berthoud ve Beyer, 2009).

1.8.1. ROS Üretim Sistemleri

Serbest radikaller ya da ROS, süperoksit anyon (O₂⁻), hidroksil radikalleri (OH) ve H₂O₂ içerirler. Tüm bu bileşenler katarakt oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu bileşenler arasında OH, küçük olması ve nötr olması nedeniyle reaktivlik durumu en yüksek olan radikaldir. H₂O₂ plazma membranını kolaylıkla geçebildiği için lens dışında üretilmesi oksidatif stresin artmasına ve dolayısıyla katarakt oluşumuna yol açabilmektedir. Aköz hümörda H₂O₂'nin normal konsantrasyonu 25-30 µM iken, katarakt hastalarında bu miktara yaklaşık üç katı kadar fazladır (Berthoud ve Beyer, 2009).

ROS hücre içindeki mitokondri, peroksizomlar ya da sitoplazma gibi çeşitli kompartımanlarda endojen olarak üretilir. Lipoksigenazlar, NADPH oksidaz, sitokrom P450 gibi enzimatik aktiviteler ya da mitokondri elektron transportu yoluyla normal metabolik olayların bir sonucudur. ROS aynı zamanda H₂O₂ ile metal iyonların etkileşimine girmesi ile de oluşabilir (Berthoud ve Beyer, 2009).

NADPH oksidaz sistemi de ROS üretimine katılabilir. Rac1, Rac2, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} gibi NADPH oksidaz kompleksinin farklı bileşenleri lens içinde eksprese olurlar. Bu bileşenlerin yer aldığı kompleks yapı fagositlerde karakterize edilmiştir. Aktif fagosit oksidaz kompleksi p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}'nin ve GTPaz Rac'ın p22^{phox} ile gp91^{phox}'nin (NADPH oksidaz katalitik bölgesi) sitozolden membran

ilişkili heterodimeri ile etkileşime gireceği yer olan plazmaya translokasyonu neticesinde uyarılarak oluşturulur. Aktif oksidaz oksijeni azaltmak ve superoksit oluşturmak için elektronları NADPH üzerinden transfer eder (Berthoud ve Beyer, 2009).

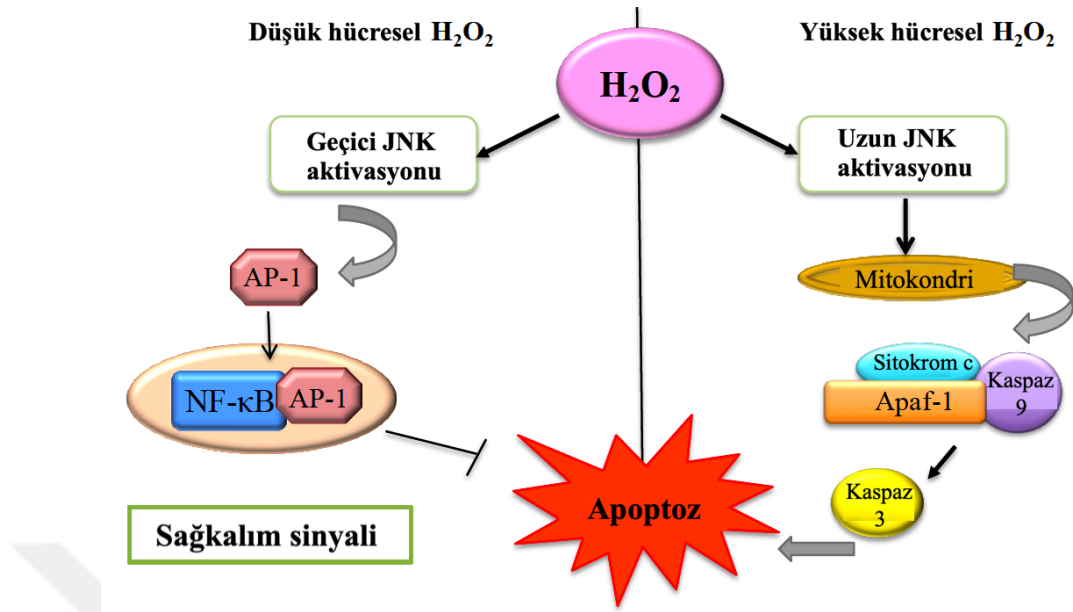
1.8.2. ROS Yıkım Sistemleri

Lens fonksiyonel olarak ışığın retina üzerine odaklanmasını sağlamasından dolayı eksternal lokasyonda yer alır. Lensin bu yerleşimi onu oksidatif strese maruz bırakmaktadır. Ancak, lens enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar içerdiğinden, kendisini oksidatif strese karşı korur aynı zamanda oksidatif hasara uğramış hücre bileşenlerini tamir eder. Enzimatik olmayan mekanizmalar yüksek konsantrasyonda askorbat, indirgenmiş glutatyon (GSH), kristallinler ve serbest UV filtrelerinden oluşmaktadır (Berthoud ve Beyer, 2009).

Superoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazlar (glutatyon peroksidazlar, peroksidoksinler, mikroperoksidazlar) ile ROS degrade olur. Superoksit dismutaz, O_2^- 'nin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizler. H_2O_2 'yi substrat olarak kullanan katalaz enzimi ya da glutatyon peroksidaz (GSHPx-1) tarafından degrade olur. H_2O_2 enzimatik olmayan yolla indirgenmiş glutatyon tarafından degrade edilir (Berthoud ve Beyer, 2009).

1.8.3. ROS ve Apoptoz

Oksidatif stres ROS üretim ve yıkım oranındaki dengesizlik nedeniyle oksidize olmuş bileşiklerin oluşmasına karşılık gelir. Bu bileşenler hücrede artış gösterdiğinde hücrelerin bu bileşenler üzerindeki kontrol gücü azalmaya başlar. Neticede oksidatif stres oldukça yükselir ve hücrede apoptoz tetiklenmiş olur. Lens gelişimi ve patolojisinde apoptozun önemli bir yeri vardır. Hücresel stres faktörleri ya da apoptoz yolağının aktivatörlerinden olan H_2O_2 'nin lens epitel hücrelerinin ölümüne neden olabileceği gösterilmiştir.



Şekil 1.12 H₂O₂ ve apoptoz (Marzo ve ark., 2018).

Ara bağlantı proteinlerinin izleyici etkisi nedeniyle apoptoz sinyalini artırabilmektedir. Ancak, ara bağlantı proteinlerinin protein kinaz C bağlı kapanmalarının hücrenin hayatta kalması ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir. Çünkü indüklenmiş bu kapama apoptotik sinyallerin hücre içine geçişini engelleyebilir. PKC nin H₂O₂ ile aktifleşmesi ya apoptotik sinyalleri üretir ya da bu kanalların kapanmasına yol açabilir (Berthoud ve Beyer, 2009).

1.9. Yaşa Bağlı Katarakt ve Apoptoz

Hem epidemiyolojik hem de deneysel çalışmalarda oksidatif stres, UV ışığa ve anormal kalsiyum metabolizması gibi çok sayıda faktörün yaşa bağlı kataraktın oluşumuna neden olduğu gösterilmektedir. Stres faktörleri, lens epitel hücrelerinin apoptoza girmesine neden olarak, lens fiber hücreleri üzerindeki epitel hücre kontrolünün kaybolmasına ve katarakt oluşumuna yol açmaktadır. Yaşa bağlı kataraktın oluşumunda epitel hücrelerin stres kaynaklı apoptoza uğraması genel bir mekanizma olarak bilinmektedir (Zhang ve Yan, 2010).

Lens epitel hücrelerinin çeşitli stres faktörleri ile gerçekleşen apoptozu, katarakt oluşumu için genel bir mekanizmadır. Lens epitel hücrelerinin UV ışınımı indüklü P53 bağımlı apoptozu ilk olarak Söderberg'in laboratuvarında yapılan çalışmalar ile

gösterilmiştir. Ratlarda gelişen kortikal kataraktın UV ışınımı nedeniyle oluştuğuna dair ilk kanıt olarak literatürdeki yerini almaktadır (Michael ve Vrensen, 1998; Ayala, 2007).

Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar ile katarakt oluşumunun başlangıcında ve ilerlemesinde stresin apoptozu uyardığı sonucuna varılmıştır. Katarakt hastalarında yapılan çalışmalarda da bu sonuçlar doğrulanmıştır. Lens epitel hücre sayısının yaşlanma ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir. Bireyin yaşının ilerlemesiyle beraber lens epitel dokusunun yoğunluğunun azaldığı bulunmuştur (Zhang ve Yan, 2010).

1.9.1. Katarakt Gelişimini Başlatan Apoptoz Mekanizmaları

Stresle uyarılan lens epitel hücrelerinin apoptozu farklı mekanizmalar ile katarakt oluşumunu başlatır. İlk olarak, lens epitel hücre ölümü lensin genel büyümesini sekteye uğratar. Böylelikle, kataraktlı lensin kalınlığına etki ederek düşük sayıdaki epitel hücreler içeren bir yapının oluşması sağlanır. İkinci olarak, epitel hücrelerin fiber hücreleri üzerindeki homeostatik düzenleyici kontrollerinde kayıp meydana gelir böylelikle lens fiber hücrelerin saydamlık ve bütünlüğü bozulur. Hasarlı epitel hücrelerden kalsiyum salınımı oluşur. Salınan kalsiyum fiber hücrelerine geçtiğinde hücresel sistein proteaz kalpainler ya da kaspazlar aktive olurlar. Bu aktivasyon ise hücre iskeleti komponentleri ve lens kristalinlerini degrade ederler. Tüm bu zincirleme olaylar, kortikal ve nükleer katarakta neden olan dokuya elektrotların ve su alımının artması ile birlikte kristalin agregatların oluşmasına yol açar (Zhang ve Yan, 2010).

1.9.2. Lens Apoptotik Regülatörleri

Hücre ölümü sinyali, sitoplazmik membranda yer alan ölüm reseptörleri yoluyla iletilir. Spesifik bir ölüm reseptörüne bağlanan ligand FADD, TRADD ya da diğer ilişkili bileşenleri aktive ederek prokaspaz-8 ve diğer aşağı yöndeki kaspazların aktive olmasına neden olur. Hücre ölümünün bu yolla iletilmesine ekstrinsik ölüm yolağı adı verilir (Ashkenazi ve Dixit, 1999). Diğer yandan, oksidatif stres gibi faktörler nedeniyle ölüm sinyali Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından aktararak hücre içinde gerçekleşebilir. Hücre ölümünün bu yolla iletilmesine ise intrinsik ölüm yolağı adı verilir (Gross ve ark., 1999). Hem intrinsik hem de ekstrinsik yollar lens içinde aktif şekilde rol almaktadır.

P53 tümör baskılayıcı proteini apoptoz regülatörü olarak görev yapar. Apaf-1, Bcl-2, Bax, Bak, DR5, Fas ve diğer apoptoz ilişkili genlerin transkripsiyonel regülasyonunda görev alır ya da Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri ile etkileşime geçer. P53 tümör baskılayıcı proteini lensin çeşitli kısımlarında düşük miktarda eksprese olur. *αB-kristallin* geni baskılandığında P53 seviyesinde artış olduğu hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Mutant transkripsiyon koaktivatörleri ve önemli transkripsiyon faktörlerinin baskınlanması gibi durumlar söz konusu olduğunda gelişmekte olan fare lensinin hem p53 hem de p53'ten bağımsız diğer yollar aracılığı ile apoptoza uğradığı görülmüştür. Aynı zamanda lens epitel hücrelerinde p53 proteini proapoptotik Bak proteinini regüle etmektedir. P53-Bak yolağının hem lens apoptozu hem de farklılaşması üzerine etkin bir rolü vardır (Zhang ve Yan, 2010).

1.9.2.1. Lens İntrinsik Apoptotik Yolağı

Bcl-2 ailesinin üyeleri intrinsik apoptotik yolağın anahtar elemanlarıdır. Bcl-2 ailesinin Bcl-2, Bax, Bad ve Bcl-x(s/l) gibi üyeleri civciv lensinde tespit edilmiştir. Okadaik asit ile serin/treonin protein fosfataz-1 inhibisyonunun tavşan lens epitel hücrelerinde apoptozu aktive ettiği görülmüştür. Birçok çalışmada lens epitel hücreleri TGFβ, E2F1 ve E2F2 over ekspresyonu, mitomisin C, interferon gamma, UV ışınımı gibi farklı stres faktörleri ile muamele edilmiştir. Tüm bu ajanlar Bcl-2 ekspresyonunu azaltırken Bax ekspresyonunu artırmıştır. Lens epitel hücre apoptozu ile ilişkili olan insan polar kataraktında Bcl-2 mRNA ve proteininin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan, bFGF ile baskılanmış apoptozun, serum noksanlığı ve Bcl-2'nin ekspresyonunun artmasıyla uyarıldığı görülmüştür. Bcl-2'nin over ekspresyonunun, hücre farklılaşmasına aracılık eden sinyal yolları ile ilişkili olduğu civciv ve farelerde kanıtlanmıştır. Bcl-2, Bax ve Bcl-X apoptotik proteinlerinin lens farklılaşmasında yer almasından dolayı aynı zamanda apoptotik olmayan rollere sahip oldukları bildirilmektedir (Zhang ve Yan, 2010). Bcl-2 proteininin apoptoz ve farklılaşma üzerine etkisine ek olarak, lens epitel hücrelerinde gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Bcl-2 lens epitel hücrelerinde over eksprese olduğunda oksidatif stres indüklü apoptoza karşı zayıf bir koruma yeteneği sergilemektedir (Mao ve ark., 2001).

İntrinsik hücre ölümü yolağı mitokondride aktive olduktan sonra sinyal kaspaz 9 ve devamında kaspaz 3'ün aktive olması için apoptozoma iletilir. Aktif kaspazlar, stresle

indüklenmiş lens epitel hücrelerinde ya da kültüre edilmiş lens organında meydana gelen apoptoz sırasında gözlenmiştir (Zhang ve Yan, 2010).

1.9.2.2. Lens Ekstrinsik Apoptotik Yolağı

Ekstrinsik apoptotik yolak ilk olarak kültüre edilmiş insan lens epitel hücrelerinde çalışılmıştır. Mitomisin C, *in vitro* olarak insan lens epitel hücrelerine uygulanarak apoptoz indüklenmiştir. Fas, TRAMP, TRAIL-R2 ve TRAILR3 proteinleri apoptozun gerçekleşmesinde etkin olan proteinlerdir. Kültüre edilmiş HLE-B3 hücreleri 4-hidroksinonenal ile indüklendiğinde apoptoz Fas proteinine bağlı olarak gelişir. Fas geçişli apoptoz diyabetik retinopati nedeniyle gelişen katarakt vakalarında tespit edilmiştir. Bu tip apoptoz hem primer kültüre edilen lens epitel hücrelerinde hem de HLE-B3 hücre hatlarında kollojen IV ile inhibe edilebilmektedir (Zhang ve Yan, 2010).

Yaşa bağlı Katarakt göz lensinin yaşla birlikte saydamlığını kaybetmesidir. Bu kayıp pek çok farklı etkene dayanmaktadır. Bunlar içinde ROS varlığı dikkate değer bir bileşendir. ROS varlığında lens hücrelerinin apoptoza yöneldiği bilinmektedir. CUL4B proliferasyon ve apoptoz gibi pek çok farklı moleküler yolakta ve bu yolaklar ile bağlantılı hastalıklarda çalışılmış übikülin ligaz kompleksinin bir üyesidir. Çalışmamızda *CUL4B*'nin apoptoz prosesindeki önemli rolü nedeniyle, yaşa bağlı katarakt gelişimindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda çalışmamız katarakt hastalığı ile *CUL4B* geni ile katarakt hastalığının ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamıza dahil edilen vakaların tüm inceleme ve değerlendirmeleri Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 03.08.2018 tarih ve 2018/8-196 numaralı onayıyla; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Göz Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Göz Hastalıkları polikliniğine Eylül 2018 tarihinden itibaren başvuran, anamnez ve fizik muayenesi ile yaşa bağlı katarakt tanısı konulan 47 vaka çalışmaya dahi edilmiştir.

Olgu seçimlerinde;

- Yaşa bağlı katarakt tanısı almış olmak,
- Katarakt nedeniyle az görüyor olmak,
- 60 yaş üzeri ve 90 yaşından küçük olmak kriterleri aranmıştır.

Çalışmada dışlama kriteri ise;

- Daha önce intraokuler cerrahi geçiren vakalar
- Oküler inflamasyonu olan vakalar
- Oküler travma geçiren vakalar
- Sistemik veya topikal steroid kullanan vakalar
- Konjenital katarakt toksik katarakt yapma potansiyeli olan ilaç kullanımı (fenotiazinler, kolinerjikler, trankilizanlar, fotosensitif ilaçlar, diüretikler)
- Göz üzerine radyoterapi alan vakalar
- Diyabet hastası olan bireyler dahil edilmemiştir.

Fakoemülsifikasyon işleminin öncesi lens ön yüzünde bulunan anteiör lens kapsülü ek müdahale olmaksızın rutin cerrahi işlem sırasında çıkarılarak dikkatli bir şekilde RPMI-1640 besi ortamına içerisinde alındı. Çalışma grubu olarak yaşa bağlı katarakt tanısı almış 47 vakanın lens kapsülü, kontrol grubu olarak ise HLE-B3 lens epitel hücre hattı kullanılmıştır.

Çalışmamızda, yaşa bağlı katarakt tanısı almış hastaların fakoemülsifikasyon işlemi sırasında çıkarılan lens kapsülleri ile kontrol hücre grubu arasında *CULAB* ekspresyonunu değerlendirdik. HLE-B3 lens epitel hücre hattında H₂O₂ uygulamasını takiben oluşan *CULAB* ekspresyon değişimini değerlendirdik. Bu verilerden yola çıkarak HLE-B3 lens epitel hücre hattında siRNA ile *CULAB* ekspresyonunu baskıladık. Seçtiğimiz apoptotik markırlar ile *CULAB*'nin apoptoz sürecine olan etkisini gösterdik.

2.1. Kullanılan Cihazlar

- Karbondioksitli etüv (Thermo Scientific)
- Homojenizatör (Sonics)
- Laminar flow (Metis)
- PCR cihazı (SenQuest)
- Inverted mikroskop (Leica)
- RotorGene Real Time PCR cihazı (Qiagen)
- Kemilüminesans görüntüleme (Bio-rad)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific)
- Vorteks (Biosan)
- Kuru ısıtıcı blok (Stuart)
- Soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific)
- Spin vorteks (Biosan)
- Mikropipet takımı (Thermo Scientific)
- Derin dondurucu -20°C (Arçelik)
- Derin dondurucu -80°C (Thermo Scientific)
- +4°C soğutucu (Arçelik)
- Vakum cihazı (Integra)

2.2. Kullanılan Kimyasallar

- Besiyeri EMEM (Biological industries)
- Besiyeri RPMI (Biological industries)
- Fetal Bovine Serum (Biological industries)
- Penisilin/Streptomisin antibiyotik (Biological industries)
- L-Glutamin (Biological industries)
- Tripsin-EDTA (Biological industries)
- Primerler (*CUL4B*, *ACTB*) (Qiagen)
- Qiazol Isolation Reagent (Qiagen)
- SyberGreen master mix (Qiagen)
- cDNA sentez kiti (Qiagen)
- Hidrojen peroksit (Sigma-Aldrich)
- 6 kuyucuklu hücre kültürü kabı (Corning)
- 24 kuyucuklu hücre kültürü kabı (Corning)
- 96 kuyucuklu hücre kültürü kabı (Corning)
- T-25 flask (Corning)
- WST-1 testi (Roche)
- BCA testi (Thermo Scientific)
- RIPA solüsyonu (Cell Signaling Technology)
- CUL4B antikor (Abcam)
- β -Aktin antikor (Cell Signaling Technology)
- Bcl-2 antikor (Cell Signaling Technology)
- Kaspaz 3 antikor (Cell Signaling Technology)
- Bax antikor (Cell Signaling Technology)
- Bid antikor (Cell Signaling Technology)
- Lipofektamin (Invitrogen)
- CUL4B siRNA (Ambion)
- Negatif kontrol siRNA (Ambion)
- CUL4B plazmid vektör (Origene)
- Negatif kontrol plazmid vektör (Origene)

2.3. Yöntemler

2.3.1. Anteriör Lens Kapsülü Örneklerinden RNA İzolasyonu

Anteriör lens kapsülü örneklerinden RNA eldesi Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Almanya; Kat. No: 79306) ve RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research, CA, USA) kullanarak aşağıda belirtilen üretici firmanın protokolü uygulanarak yapıldı.

1. Kültüre edilen Anteriör Lens epitel hücrelerinin üzerine bir ml Qiazol Lysis Reagent uygulanarak, oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonunda parçalanmış hücre içeriği iki ml santrifüj tüplerine alındı. Üzerine 0,2 ml kloroform eklenerek 15 saniye vorteks yapılarak oda ısısında üç dakika inkübe edildi.
3. 4°C de 12.000×g de 15 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonunda üsteki renksiz aköz faz ayrı bir 1,5 ml santrifüj tüpüne alındı. Üzerine aköz fazın miktarı kadar %95-100 etanol ilave edildi.
5. Karışım Zymo-Spin™ IC Column içine alındı ve oda ısısında 15.000×g de bir dakika santrifüj edildi.
6. Spin column ayrı bir toplama kabına yerleştirildi ve üzerine 400 µl RNA prep buffer ilave edildi. Oda ısısında 15.000×g de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Spin column ayrı bir toplama kabına yerleştirildi ve üzerine 700 µl RNA Wash buffer ilave edildi. Oda ısısında 15.000×g de 2 dakika santrifüj edildi.
8. Spin column üzerine 12 µl nuclease-free H₂O eklendi.
9. RNA miktarını tayin etmek için NanoDrop ND-1000 spektrofotometre kullanıldı.
10. RNA örnekleri -80°C de saklandı.

2.3.2. HLE-B3 Hücre Hattından RNA İzolasyonu

Lens epitel hücre örneklerinden RNA eldesi Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Almanya; Kat. No: 79306) kullanarak aşağıda belirtilen üretici firmanın protokolü uygulandı.

1. Kültüre edilen Anteriör Lens epitel hücrelerinin üzerine bir ml Qiazol Lysis Reagent uygulanarak, oda ısısında beş dakika inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonunda parçalanmış hücre içeriği iki ml santrifüj tüplerine alındı. Üzerine 0,2 ml kloroform eklenerek 15 saniye vorteks yapılarak oda ısısında üç dakika inkübe edildi.
3. 4°C de 12.000×g'de 15 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonunda üsteki renksiz aköz faz 1.5 ml santrifüj tüpüne alındı. Aköz fazın üzerine 0,5 ml izopropil alkol eklenerek oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
5. 4°C de 12.000×g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
6. Bir ml %75'lik DEPC-treated etanol eklenerek 4°C'de 7.500×g'de beş dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant uzaklaştırılarak RNA peleti kurumaya bırakıldı.
8. RNA peleti üzerine 10 µl nuclease-free H₂O eklendi.
9. RNA miktarını tayin etmek için NanoDrop ND-1000 spektrofotometre kullanıldı.
10. RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

2.3.3 cDNA Sentezi

Farklı konsantrasyonlarda elde edilen RNA örneklerini cDNA'ya çevirmek için, 500 µg ile 1000 µg arasında değişen miktarlarda RNA kullanılarak RT² HT First Strand cDNA sentez kiti (Qiagen, Kat. No: 330411) ile üretici firmanın aşağıda belirtilen protokolü kullanıldı.

1. Sekiz µl RNA örneği üzerine iki µl Genomik DNA eliminasyon miksi 0,2 ml PCR tüplerinin içinde pipetlendi.
2. On µl total karışım 42°C'de beş dakika PCR cihazında inkübe edildi.
3. On µl reverz-transkripsiyon miksi karışımın üzerine eklendi.
4. Tüp, 42°C'de 15 dakika hemen ardından 95°C'de beş dakika PCR cihazında inkübe edildi.
5. Her örnek üzerine 91 µl nuclease-free H₂O eklendi.
6. Örnekler Real-Time PCR uygulamasına kadar -20°C'de saklandı.

2.3.4 *CUL4B* ve *ACTB* Genlerinin qPCR İle İfadesinin Ölçülmesi

CUL4B genin mRNA kantitasyonunun belirlenmesi için qPCR yöntemi kullanılarak uygulama RotorGeneQ cihazında yapıldı. Üretici firmanın protokolü doğrultusunda uygulama gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlandı. *CUL4B* gen ifadesinin normalizasyonu için Beta-aktin (*ACTB*) geni kullanıldı.

Tablo 2.1 *CUL4B* ve *ACTB* genleri için qPCR reaksiyon miksi

Reaksiyon bileşeni	Miktar
RT ² SYBR Green Mastermix (Qiagen, Kat. No:330500)	12,5 µl
cDNA	1 µl
RT ² qPCR Primer Assay	1 µl
Nuclease-free H ₂ O	10,5 µl
Toplam miktar	25 µl

Tablo 2.2 *CUL4B* ve *ACTB* genlerine ait dizi bilgileri ve RT² qPCR Primer Assay katalog numaraları

Gen adı	RefSeq No	Band uzunluğu	Referans pozisyonu*	Katalog numarası
<i>CUL4B</i>	NM_003588.3	151 baz çifti	845	PPH00925E
<i>ACTB</i>	NM_001101	174 baz çifti	730	PPH00073G

*Referans pozisyonu ilgili RefSeq dizisinin başlangıcına göre amplicon dizisi içinde yer alan bir pozisyonur.

1. RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen, Kat. No:330500), RT² qPCR Primer Assay ve cDNA kullanılmadan önce kısaca santrifüj edildi.
2. PCR bileşenleri Tablo 2.1'de belirtilen miktarlarda hazırlanarak 0,2 ml PCR tüplerine pipetlendi.
3. PCR ürünleri kısa bir santrifüjün ardından, tablo 2.3'de gösterilen PCR şartları doğrultusunda RotorGeneQ cihazına yüklendi.

Tablo 2.3 *CUL4B* ve *ACTB* gen ifadelerinin tespiti için kullanılan Real Time PCR programı

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 dakika	95°C
45	15 saniye	95°C
	1 dakika	60°C
Erime Eğrisi		

- CUL4B* ve *ACTB* genleri için threshold cycle (CT) değerleri belirlendi. *CUL4B* gen ifadesi, *ACTB* geni ifade düzeyine göre normalize edildi.
- CUL4B* ve *ACTB* genlerinin CT değerleri excel dosyası olarak kaydedildi. CT değerlerinin analizi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile gerçekleştirildi. Delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) metodu aşağıda ifade edilmiştir.

$$\Delta Ct = Ct (\text{CUL4B örnek}) - Ct (\text{ACTB örnek})$$

$$\Delta Ct = Ct (\text{CUL4B kontrol}) - Ct (\text{ACTB kontrol})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{örnek}) - \Delta Ct (\text{kontrol})$$

$$\text{Normalize olmuş hedef genin ifade seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

- İstatistiksel olarak 0,05'den küçük olan p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

2.3.5. HLE-B3 Hücre Kültürü

- HLE-B3 lens epitel hücre hattı (ATCC® katalog no: CRL-11421) ATCC'den temin edilmiştir. %20 Fetal Bovin Serum içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besi yeri içerisinde %5 CO₂ ile nemlendirilmiş 37°C'de ki etüvde kültüre edildi.

2. HLE-B3 hücreleri %70-80 konfluent olduğunda Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanarak, %0,25 (w/v) Trypsin-0,53mM EDTA solüsyonu ile 60 saniye inkübe edildi.
3. Flask yüzeyinden kalkan hücreler üzerine EMEM besi yeri ilave edilerek tripsin inaktivasyonu sağlandı.
4. Hücreler 125g'de on dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak 1 ml %1 FBS içeren EMEM besi yeri ilave edilerek pipetleme ile hücreler homojenize edildi.
5. On µl hücre süspansiyonu ve on µl Trypan Blue Dye 0,2 ml pcr tüpünde karıştırıldı. Counting Slide üzerine yükleme yapılarak cell counter cihazında ölçüm gerçekleştirildi.
6. 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına kuyucuk başına 1×10^4 hücre gelecek şekilde %1 FBS içeren EMEM besi ortamında ekim gerçekleştirildi.
7. HLE-B3 hücreleri, %5 CO₂ ile nemlendirilmiş 37°C'de ki inkübatörde yüzeye tutunmaları için 24 saat inkübe edildi.

2.3.6. H₂O₂ Uygulaması

1. 9,8 Molar Hidrojen Peroksit solüsyonu (Almanya, H1009-5ML) çözücü olarak fosfat tamponlu salin içinde dilüe edildi.
2. On milimolar ve bir milimolar konsantrasyonlarda H₂O₂ elde edildi.
3. 25 µm 50 µm, 100 µm, 150 µm, 200 µm, 250 µm, 300 µm, 350 µm, 400 µm, 450 µm ve 500 µm konsantrasyonlarda H₂O₂ HLE-B3 hücrelerine uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Deney an az üç kez tekrar edildi.

2.3.7. WST Testi

1. Örnek başına 100 µl fenol red içermeyen RPMI-1640 ve on µl cell proliferation Reagent WST-1 (Roche, Almanya) karışımı hazırlandı.
2. H₂O₂ içeren besi yeri uzaklaştırılarak, hazırlanan karışım kuyulara uygulandı.
3. %5 CO₂ ile nemlendirilmiş 37°C'deki inkübatörde iki saat inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda Multiskan Go cihazında (Thermo Scientific, ABD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi.

5. Elde edilen datalar ile lowess eğrisi çizildi ve yarı maksimum inhibitör konsantrasyon IC₅₀ değerleri 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri için ayrı ayrı hesaplandı.

2.3.8. HLE-B3 Hücrelerinden Protein İzolasyonu

HLE-B3 hücreleri 24 saat için kontrol örneği ile 250 µm, 48 saat için kontrol örneği 200 µm ve 72 saat için kontrol örneği ile 100 µm olmak üzere her kültürde 7×10^5 hücre olacak şekilde 100 mm petri kaplarına ekim yapıldı. Hücreler %70 yoğunluğa eriştikleri zaman yukarıda konsantrasyonlarda ve sürelerde H₂O₂ uygulaması gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinin sonucunda aşağıdaki adımlar izlenerek protein izolasyonu gerçekleştirildi.

1. 34,84 mg PMSF (fenilmetilsülfonil florür) bir ml izopropil alkol içinde çözdürüldü. 500 µl lizis buffer içerisine 2,5 µl İzopropil alkol içinde hazırlanan fenil metil sülfonil florid (PMSF) çözeltisi eklendi. Karışım miktarı protein izolasyonunda kullanılacak örnek miktarına göre ayarlandı.
2. H₂O₂ içeren besi ortamı uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandı.
3. Hücre kazıyıcı ile hücreler petrinin yüzeyinden kazındı.
4. Hücrelerin üzerine EMEM besi ortamı eklenerek hücreler 15 ml santrifüj tüplerine alındı.
5. 1500 rpm'de on dakika santrifüj edildi.
6. Besi ortamı uzaklaştırıldı. Her örnek için hazırlanmış olan 500 µl lizis solüsyonu eklendi.
7. Buz üzerinde örnekler 30 dakika inkübe edildi.
8. Her örnek hücrelerin ve hücre yapıların parçalanması için Sonikasyon cihazında (Sonics & Materials, USA) 15 saniye homojenize edildi.
9. Örnekler 14500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.

2.3.9. BCA Kiti ile Protein Miktar Tayini

BCA protein assay kit (Thermo scientific) ile aşağıdaki adımlar takip edilerek izole edilen proteinlerin kolorometrik tespiti ve kantifikasyonu gerçekleştirildi.

1. Her örnek için, Reagent A solüsyonundan 200 µl ve Reagent B solüsyonundan dört µl alınarak karışım elde edildi.
2. 96 kuyucuklu kültür kaplarına elde edilen karışım uygulandı.
3. 25 µl protein örneği ve albümin standartları karışımın üzerine uygulandı.
4. 37°C'deki etüvde 30 dakika inkübe edildi.
5. Thermo Scientific Multiskan Go cihazında (Thermo scientific) 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi.

2.3.10. Western Blotlama

HLE-B3 hücrelerinden elde edilen total proteinlerin değerlendirilmesi için western blotlama yöntemi kullanılmıştır.

a) Jele yükleme ve running işlemi

1. Proteinlerin elektrik alanda yürütülmesi için akrilamid jel tabloda verilen şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 2.4 Akrilamid jel içeriği.

	Yükleme jel (%4)	Ayırıcı jel (%10)
ddH ₂ O	3 ml	2 ml
Akrilamid	660 µl	1670 µl
Tris	1260 µl (0,5 M pH 6.8)	1250 µl (1.5 M pH 8.8)
%10 SDS	50 µl	50 µl
%10 APS	25 µl	25 µl
TEMED	5 µl	15 µl

2. Tablo 2.4 de belirtilen staking jel en son Amonyum persülfat (APS) ve Tetrametiletilediamin (TEMED) ilave edilerek camlar arası boşluğa verildi.
3. Hava kabarcıklarının önlenmesi için Bütanol ilave edildi.
4. Jelin donması için 40-60 dakika arası beklendi.
5. Bütanol boşaltıldı ve kurutma kâğıdı ile kalan bütanol tamamen uzaklaştırıldı.

6. Separating jel en son APS ve TEMED ilave edilerek camlar arası boşluğa verildi.
7. Tarak yerleştirilir. 30-45 dakika beklendi.
8. Camlar, kısa cam iç tarafa bacak şekilde running aparatına, running aparatıda tanka yerleştirildi.
9. Inner chamber running buffer ile doldurularak, tarak çıkarıldı.
10. Dilüe edilmiş örnekler 1x loading buffer ile eşitlendi. Her örneğe 1:1 oranında 2x loading buffer ilave edilerek 95⁰C'de beş dakika inkübe edilir.
11. Markır ve örnekler jele yüklenir.
12. 150 Volt'da 90 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi.
- b) Transfer işlemi
 1. Running aparatı açılarak camlar aparat yardımı ile açıldı.
 2. Jel beyaz filtre üzerine yerleştirildi.
 3. Jelin açığta kalan yüzüne PVDF membran yerleştirildi.
 4. PVDF membran üzerine beyaz filtre yerleştirildi.
 5. Beyaz filtreler arasında ki jel ve membranlar süngerler arasına alınarak sandviç yerleştirildi.
 6. Sandviç transfer kasetine takıldı.
 7. 250 mA'de iki saat transfer işlemi gerçekleştirildi.
- c) Antikor uygulama ve görüntüleme
 1. Transferden çıkan membran iki defa beş dakika TBST ile çalkalayıcı ile yıkandı.
 2. 0,5 gr yağsız süt tozu on ml TBST içerisinde karıştırılarak membran üzerine iki saat boyunca bloklama uygulandı.
 3. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, membran iki defa beş dakika TBST yıkandı.
 4. 0,5 gr yağsız süt tozu ve beş µl primer antikor on ml TBST içerisinde çözdürüldü.
 5. Membran primer antikor ile 14-16 arası 4⁰C'de inkübasyona bırakılır.
 6. İnkübasyon sonunda primer antikor uzaklaştırılarak membran üç defa beş dakika TBST ile yıkanır.
 7. 0,5 gr süt tozu ve beş µl sekonder antikor on ml TBST içerisinde çözdürüldü.
 8. Membran sekonder antikor ile iki saat 4⁰C'de inkübe edildi.

9. İnkübasyon sonunda sekonder antikor uzaklaştırılarak membran üç defa beş dakika TBST ile yıkandı.
10. Membran üzerine bir ml Immobilon Crescendo Western HRP substrat uygulanarak görüntüleme cihazına (Bio-Rad ChemiDoc MP, USA) yerleştirildi. Beş dakika inkübasyon için beklendi.
11. Image lab versiyon 6.1 yazılımı ile görüntüleme gerçekleştirildi.

2.3.11. siRNA Transfeksiyon İşleminin HLE-B3 Hücrelerine Uygulanması

1. Liyofilize halde ki *CULAB* genine ait 5 nM s532420, s532422, 16044 kodlu silencer select siRNA'lar ve negatif kontrol siRNA (Thermo scientific) içeren tüpler kısaca santrifüj edildi.
2. 50 µL nükleaz free su kullanılarak siRNA konsantrasyonları 100 pmol/µL olacak şekilde stok hazırlandı ve alikotlanarak -20°C de saklandı.
3. On pmol/µL (10 µM) konsantrasyonda kullanıma hazır siRNA'lar alikotlanarak -20°C de saklandı.
4. HLE-B3 hücreleri 2'şer kontrol, siRNA *CULAB* ve siRNA kontrol olmak üzere her kültürde 1×10^6 hücre olacak şekilde altı kuyucuklu kültür kaplarına ekildi.
5. Dokuz µL Lipofectamine RNAiMAX Reagent'i, 150 µL Opti-MEM besi ortamı içinde dilüe edildi.
6. 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM *CULAB* siRNA'ları, ayrı ayrı hücre kültürü kuyularında 150 µL Opti-MEM besi ortamı içinde dilüe edildi.
7. siRNA'lar ile lipit kompleksi 1:1 oranında karıştırıldı.
8. Karışım, oda ısısında beş dakika inkübasyona bırakıldı.
9. %10 Fetal Bovin Serum içeren EMEM besi yeri HLE-B3 hücrelerine uygulandı. 250 µL siRNA karışımı besi yeri üzerine ilave edilerek %5 CO₂ ile nemlendirilmiş 37°C de ki inkübatörde 24 saat inkübe edildi.
10. 24. saat sonunda besi yeri uzaklaştırılarak %10 Fetal Bovin Serum ve %1 100U/ml penisilin içeren EMEM hücrelere uygulandı.
11. HLE-B3 hücreleri %5 CO₂ ile nemlendirilmiş 37°C de ki inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı.

2.3.12. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

CUL4B ve *ACTB* gen ifade düzeylerindeki değişimler karşılaştırılırken, t-test analiz metodu kullanıldı. H_2O_2 'nin HLE-B3 hücrelerine olan etkisinin analizinde Tek Faktörlü Varyans Analizi (One-Way Anova) metodu kullanıldı. Yukarıda belirtilen analiz metodları GraphPad Prism versiyon dokuz yazılımı üzerinden gerçekleştirildi. Western blotlama sonucunda elde edilen protein bantlarının kantitasyonu imagej 1.52q yazılımı ile hesaplandı ve ifade düzeylerindeki değişimler için t-test analiz metodu kullanıldı. P değerinin 0,05'ten küçük olduğu karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



3. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen, yaşları 61-91 aralığında değişen 47 katarakt hastasının demografik özellikleri tablo 3.1 de gösterilmektedir. Vakalar, Lens Opasitesi Sınıflandırma Sistemine (LOCSIII) göre sınıflandırılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.1 Vaka grubunun demografik özellikleri

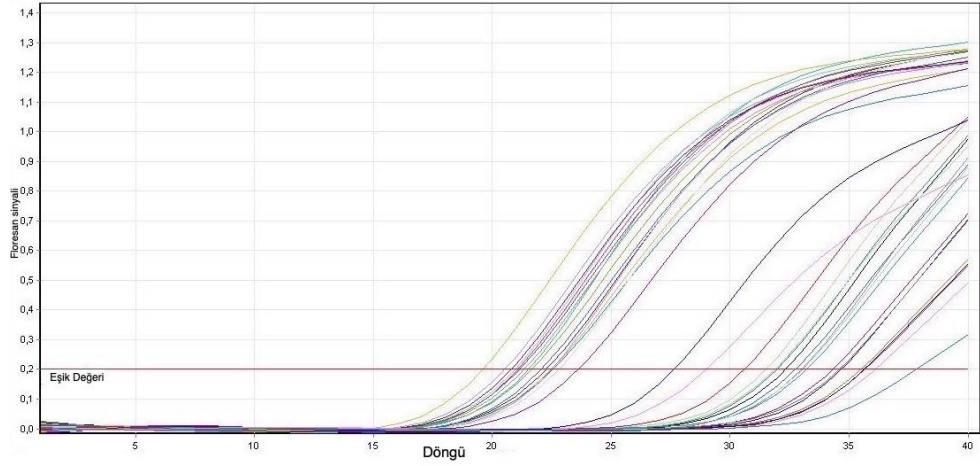
Değişken	Yaşa bağlı katarakt 47
Yaş, mean mean \pm SD	72.5 \pm 8.72
Erkek (%)	26 (%55)
Kadın (%)	21 (%45)

Tablo 3.2 Vaka grubuna ait yaşa bağlı katarakt alt tipleri

	Nükleer (N)	Kortikal (K)	Posteriyör subkapsüler (P)
0	10	-	-
I	17	-	-
II	16	-	-
III	4	14	-
IV	-	24	-
V	-	8	-

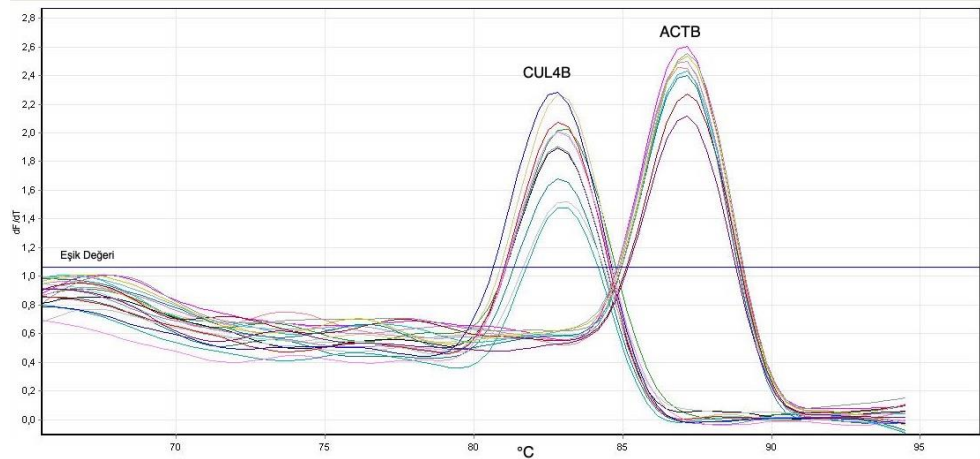
3.1. *CULAB* İfade Düzeyinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

CULAB gen ifadesi katarakt hastalarından alınan anteriör lens kapsüllerinden elde edilen epitel hücrelerinden, HLE-B3 hücrelerinden, H₂O₂ muamele edilmiş HLE-B3 hücrelerinden *CULAB* siRNA ile muamele edilmiş HLE-B3 hücrelerinden edilen örneklerin, normalizasyon referans gen olarak seçilen *ACTB* genine göre yapılmıştır. Kantitatif PCR reaksiyonu RotorGeneQ cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerin kantitasyonu, özgül olmayan belirleme sistemi SYBR green boyası kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.1 *CUL4B* ve *ACTB* genlerine ait kantitatif amplifikasyon eğrileri. Dikey ekseninde floresan sinyali, yatay ekseninde qPCR döngü sayıları ve CT (eşik değeri) yer almaktadır.

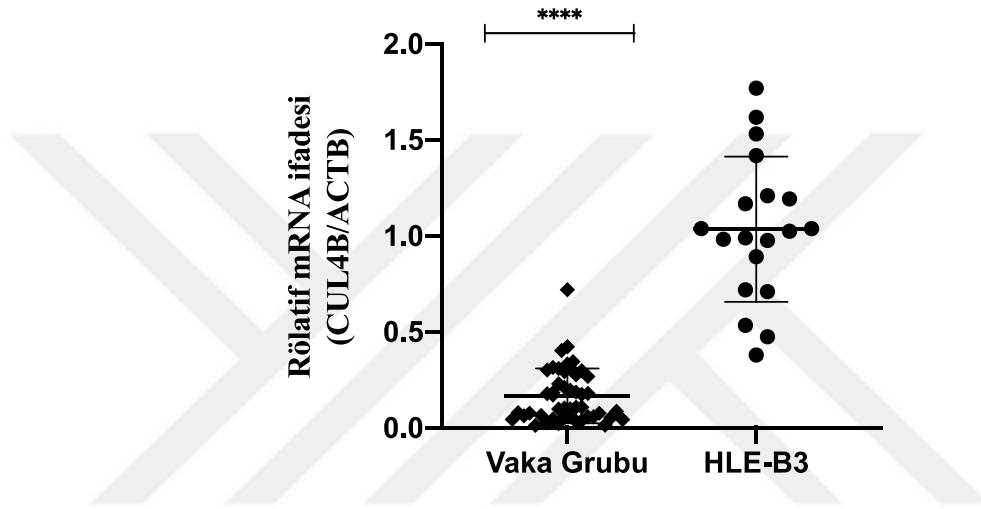
Kantitatif PCR ile elde edilen *CUL4B* ve *ACTB* genlerine ait amplifikasyon eğrileri şekil 3.1 de gösterilmiştir. *CUL4B* geninin *ACTB* genine göre normalize edilmiş ifadesi $\Delta\Delta C_t$ metodu ile hesaplandı. Reaksiyonda amplifiye olan örneklerden CT değerleri daha küçük olanlar göreceli olarak diğer örneklerle göre daha yüksek oranda temsil edilmektedir. *CUL4B* ve *ACTB* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesinde, primerlerin bağlanması ile oluşan ürünlerle doğru orantılı olarak floresan ışığa artış göstermektedir. Erime Eğrisi sayesinde *CUL4B* ve *ACTB* genlerine ait amplifikasyonların gerçekleştiği şekil 3.2 de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 *CUL4B* ve *ACTB* genlerine ait Erime Eğrileri. Dikey ekseninde floresan sinyali, yatay ekseninde ise ilgili genlere ait Erime Eğrisi °C derece cinsinden yer almaktadır.

3.1.1. Anteriör Lens Kapsül Örneklerinde *CUL4B* mRNA İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

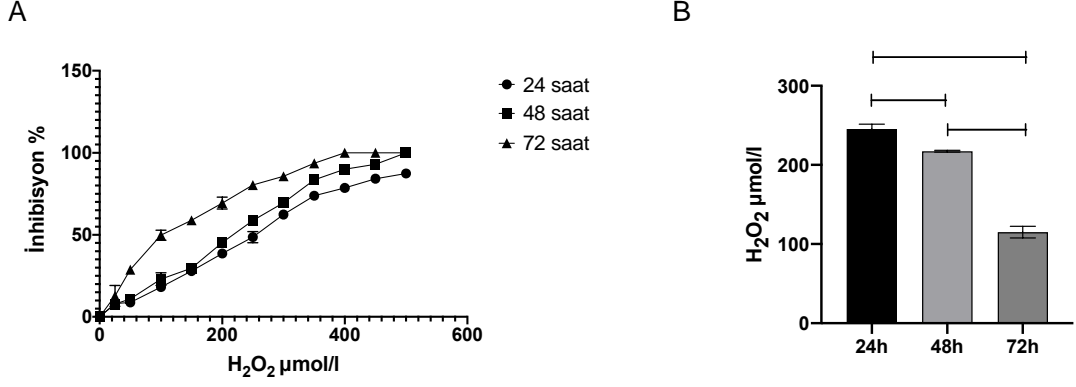
Anteriör lens kapsül örnekleri ve HLE-B3 hücre hattından elde edilen epitel hücrelerindeki *CUL4B* gen ifadesi değerlendirilmiştir. 47 anteriör lens kapsül örneklerinin tamamında *CUL4B* gen ifadesi, HLE-B3 hücrelerine göre 0,84 kat seviyesinde (**** $p<0,001$) azalış göstermiştir.



Şekil 3.3. Anteriör lens kapsül örnekleri ve HLE-B3 hücrelerindeki RT-qPCR ile tespit edilmiş *CUL4B* mRNA ifadesi gösterilmiştir. Gen ifadesi *ACTB* (β -Actin) genine göre normalize edilmiştir. Sonuçların analizi için student t testi kullanılmıştır. Sonuçların yayılımı için, ortanca değer ve standart sapma (mean \pm SD) kullanılmıştır. Her nokta üç qPCR reaksiyonunun ortalamasını temsil etmektedir. **** $p<0,0001$.

3.2. H₂O₂ İle Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerinin Canlılığının WST-1 İle Belirlenmesi

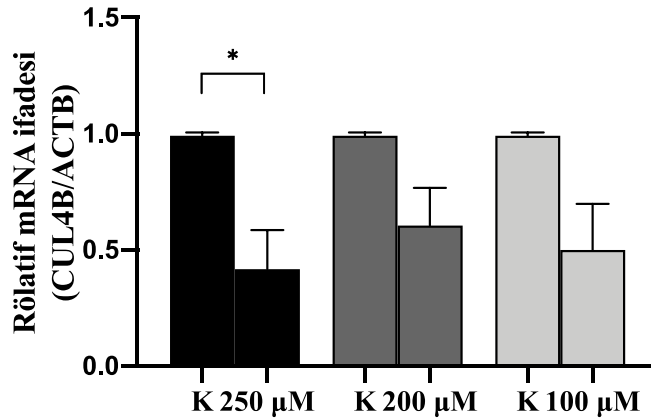
HLE-B3 hücreleri farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'ye (25-500 μ M) maruz bırakılmıştır. Hücreler 24, 48 ve 72 saat %5 CO₂ ile nemlendirilmiş 37°C'de ki etüv içerisinde inkübe edildi. IC₅₀ değerleri; sırasıyla 24 saat için 248,223 \pm 6,228 μ mol/l, 48 saat için 201,331 \pm 1,027 μ mol/l ve 72 saat için ise 103,122 \pm 7,497 μ mol/l konsantrasyonlarda elde edilmiştir. Böylelikle elden edilen bu konsantrasyonlar *CUL4B* gen ifadesinin hem RT-qPCR ile mRNA düzeyinde hem de immünoablottlama ile protein seviyesinde belirlenmesi için seçildi.



Şekil 3.4 25-500 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 ile muamele edilmiş HLE-B3 hücre hattının WST-1 ile canlılığının ölçülmesi. A) 24, 48 ve 72 saat H_2O_2 uygulamaları çizgi grafik ile gösterilmiştir. B) IC_{50} değerleri sütun grafik ile ifade edilmiştir. Sonuçların analizi için One Way Anova (tek yönlü varyans analizi) testi kullanılmış ve gruplar arasındaki fark tukey testi ile belirlenmiştir. Sonuçların yayılımı için, ortanca değer ve standart sapma (mean \pm SD) kullanılmıştır. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.3. H_2O_2 Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerindeki *CUL4B* mRNA İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

H_2O_2 muamele edilmiş HLE-B3 hücre hattında, *CUL4B* gen ifadesi değerlendirilmiştir. *CUL4B* gen ifadesi, HLE-B3 kontrol hücrelerine göre; 24 saat H_2O_2 muamelesi için 0,58 kat (* $p < 0,05$), 48 saat için 0,4 kat ve 72 saat için ise 0,5 kat azalış göstermiştir. 24 saat 250 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 muamele edilmiş HLE-B3 hücre hattında *CUL4B* gen ifadesinin azalışı anlamlı bulunurken (* $p < 0,05$), 48 saat 200 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 ve 72 saat 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 ile muamele edilmiş HLE-B3 hücre hatlarında *CUL4B* ifadesinin azalışı anlamlı bulunmamıştır.

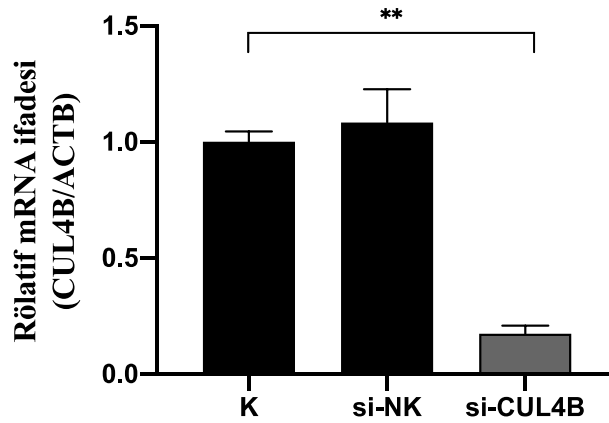


Şekil 3.5 24 saat 250 µmol/l H₂O₂, 48 saat 200 µmol/l H₂O₂ ve 72 saat 100 µmol/l H₂O₂ ile muamele edilmiş HLE-B3 hücrelerindeki RT-qPCR ile *CUL4B* mRNA ifadesi gösterilmiştir. Sonuçların analizi için student t testi kullanılmıştır. Sonuçların yayılımı için, ortanca değer ve standart sapma (mean ± SD) kullanılmıştır. Her sütun en az üç qPCR reaksiyonunu temsil etmektedir. K: Kontrol, *p<0,05

3.4. *CUL4B* siRNA'ları İle Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerindeki *CUL4B* mRNA İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

CUL4B siRNA ile muamele edilmiş HLE-B3 hücreleri, Negatif Kontrol siRNA ile muamele edilmiş HLE-B3 hücreleri ve HLE-B3 hücre hattındaki *CUL4B* gen ifadesi değerlendirilmiştir.

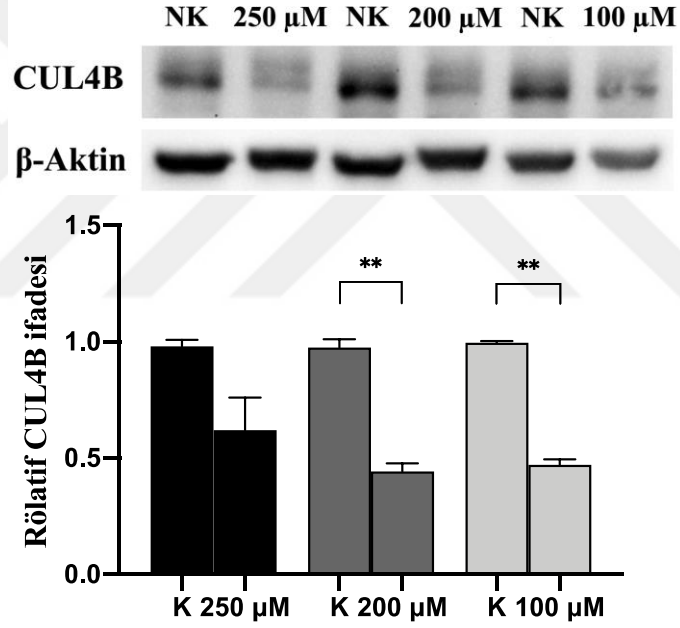
CUL4B genine ait beş nM s532420, s532422, 16044 kodlu silencer select siRNA'lar havuzlama yöntemi ile HLE-B3 hücrelerine uygulanmıştır. *CUL4B* genini baskılanması için en verimli konsantrasyon 25 nM olarak tespit edilmiştir. Negatif Kontrol siRNA da 25 nM olarak uygulanmıştır. *CUL4B* siRNA uygulanmış hücrelerde *CUL4B* mRNA ifade düzeyi kontrol siRNA uygulanmış hücreler ve HLE-B3 hücrelerine göre 0,85 kat (**p<0,01) azalış göstermiştir.



Şekil 3.6 HLE-B3 hücre hattı, kontrol siRNA ve *CUL4B* siRNA örneklerinin RT-qPCR ile *CUL4B* mRNA ifadesi gösterilmiştir. Sonuçların analizi için One Way Anova (tek yönlü varyans analizi) testi kullanılmış ve kontrol grubu ve diğer gruplar arasındaki fark dunnett testi ile belirlenmiştir. Sonuçların yayılımı için, ortanca değer ve standart sapma (mean ± SD) kullanılmıştır. Her sütun en az üç qPCR reaksiyonunu temsil etmektedir. K: Kontrol, si-NK: Negatif Kontrol siRNA, si-CUL4B: siRNA *CUL4B*. **p<0,01.

3.5. H₂O₂ Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerindeki CUL4B Protein İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

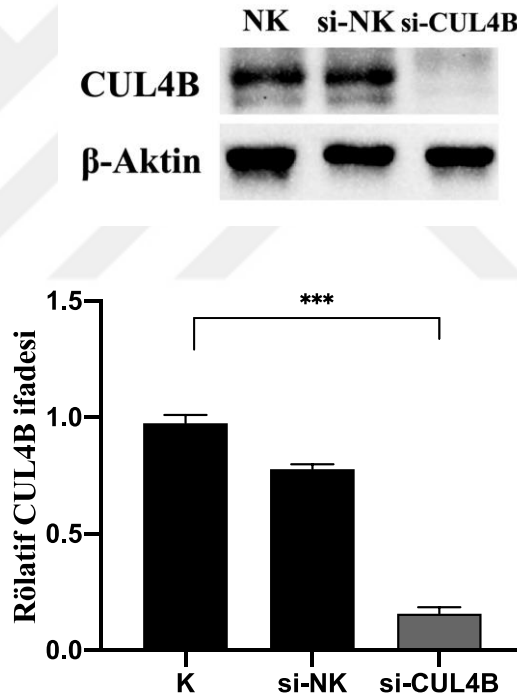
H₂O₂ ile muamele edilmiş HLE-B3 hücre hattında, CUL4B protein ifadesi western blotlama ile değerlendirilmiştir. 24 saat için 250 µmol/l H₂O₂, 48 saat için 200 µmol/l H₂O₂ ve 72 saat için 100 µmol/l H₂O₂ uygulanmıştır. CUL4B protein ifadesi, tüm H₂O₂ konsantrasyonlarda azalış göstermiştir. 48 saat 200 µmol/l H₂O₂ ve 72 saat 100 µmol/l H₂O₂ ile muamele edilmiş HLE-B3 hücre hatlarındaki CUL4B protein ifadesinin azalışı istatistiki olarak anlamlı bulunurken (*p<0,05), 24 saat 250 µmol/l H₂O₂ uygulaması için CUL4B protein ifadesinin azalışı anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.7 24 saat 250 µmol/l H₂O₂, 48 saat 200 µmol/l H₂O₂ ve 72 saat 100 µmol/l H₂O₂ ile muamele edilmiş HLE-B3 hücrelerindeki western blotlama ile CUL4B protein ifadesi gösterilmiştir. Sonuçların analizi için student t testi kullanılmıştır. Sonuçların yayılımı için, ortanca değer ve standart sapma (mean ± SD) kullanılmıştır. Her sütun en az üç western blotlama analizini temsil etmektedir. K: Kontrol **p<0,01.

3.6. *CUL4B* siRNA'ları İle Muamele Edilmiş HLE-B3 Hücrelerindeki *CUL4B* Protein İfadesinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

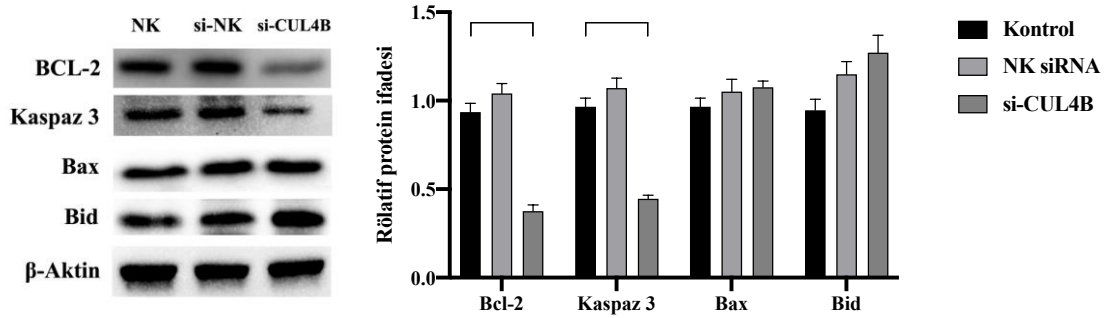
CUL4B siRNA'ları, Negatif Kontrol siRNA ve HLE-B3 hücre hattındaki *CUL4B* protein ifadesi değerlendirilmiştir. *CUL4B* genine ait 5 nM s532420, s532422, 16044 kodlu silencer select siRNA'lar havuzlama yöntemi ile HLE-B3 hücrelerine uygulanmıştır. *CUL4B* genini baskılanması için en verimli konsantrasyon 25 nM olarak tespit edilmiştir. Negatif Kontrol siRNA'da 25 nM olarak uygulanmıştır. *CUL4B* siRNA (**p<0,01) ve negatif kontrol siRNA (*p<0,05) uygulanmış hücrelerde, HLE-B3 kontrol hücrelerine göre *CUL4B* protein ifadesi istatistiki olarak anlamlı seviyede azalış göstermiştir.



Şekil 3.8 HLE-B3 hücre hattı, kontrol siRNA ve *CUL4B* siRNA örneklerinin Western Blotlama ile *CUL4B* protein ifadesi gösterilmiştir. One Way Anova (tek yönlü varyans analizi) testi kullanılmış ve kontrol grubu ve diğer gruplar arasındaki fark dunnett testi ile belirlenmiştir. Sonuçların yayılımı için, ortanca değer ve standart sapma (mean ± SD) kullanılmıştır. Her sütun en az üç western blotlama reaksiyonunu temsil etmektedir. K: Kontrol, NK si-NK: Negatif Kontrol siRNA, si-CUL4B: siRNA *CUL4B*. ***p<0,001.

3.7. *CUL4B* İfadesi Baskılanmış HLE-B3 Hücrelerinde Apoptotik Markırların Değerlendirilmesi

HLE-B3 negatif kontrol, siRNA negatif kontrol ve *CUL4B* siRNA örneklerindeki Bcl-2, Kaspaz 3, Bid ve Bax apoptotik markırları western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. *CUL4B* siRNA uygulanmış hücreler, HLE-B3 negatif kontrol hücrelerine göre Bcl-2 protein ifadesi istatistiki olarak anlamlı seviyede azalış göstermiştir (** $p < 0,01$). *CUL4B* siRNA uygulanmış hücreler, HLE-B3 negatif kontrol hücrelerine göre Kaspaz 3 protein ifadesi de istatistiki olarak anlamlı seviyede azalış göstermiştir (** $p < 0,01$). *CUL4B* siRNA uygulanmış hücreler, HLE-B3 negatif kontrol hücrelerine göre Bid protein ifadesi kısmi artış sergilemiştir. Bid protein ifadesindeki artış istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Bax proteini ise ifade azalışı ya da artışı sergilememiştir. Bu sonuçlara göre incelenen apoptotik markılar dikkate alındığında; *CUL4B*'nin baskılanmasının, apoptozu etkilediği gösterilmiştir.



Şekil 3.9 HLE-B3 hücre hattı, kontrol siRNA ve *CUL4B* siRNA örneklerinin Western Blotlama ile apoptotik markırların ifadesi gösterilmiştir. Sonuçların analizi için student t testi kullanılmıştır. Sonuçların yayılımı için, ortanca değer ve standart sapma (mean \pm SD) kullanılmıştır. Her sütun en az üç western blotlama reaksiyonunu temsil etmektedir. K: Kontrol, NK siRNA: Negatif Kontrol siRNA, si-CUL4B: siRNA *CUL4B*. ** $p < 0,01$.

4. TARTIŞMA

Katarakt, lensin opaklaşması ile saydamlığını yitirmesi neticesinde lense düşen ışığın azalması ve görüşün kötüleşmesi ile oluşur. Yaşa bağlı katarakt birçok nedenden dolayı oluşabilir. Bu nedenle, multifaktöriyel bir hastalık olarak nitelendirilir. Yaşa bağlı kataraktın indükleyici nedenleri arasında yaşlanma, sistemik hastalıklar, sigara kullanımı, oksidatif stres ve diyet sayılabilir (Gupta ve ark., 2014). Oksidasyon Yaşa bağlı katarakt için majör bir yatkınlık faktörü olarak düşünülmektedir. H_2O_2 bir reaktif oksijen türü olarak aköz hümör ve lens içinde bulunmaktadır. Oksidasyon lens epitelinde oksidatif stresi artırarak katarakt oluşumunda başlatıcı faktör olarak bildirilmektedir. Oksidatif stres reaktif oksijen türleri (ROS) ve lensin antioksidant mekanizması arasındaki dengesizlikten dolayı oluşur. Bu tip bir stres, katarakt için hücre düzeyinde temel bir olay olan lens epitel hücre apoptozunu indükler (Bai ve ark., 2018; Ma ve ark., 2018).

Kullinler memelilerde evrimsel olarak yüksek düzeyde korunmuş protein ailesidir. İnsan genomunda kullin 1, kullin 2, kullin 3, kullin 4A, kullin 4B, kullin 5, kullin 7 ve kullin 9 olarak bilinen PARC olmak üzere alt tipi mevcuttur. Kullin proteinleri really interesting new gene (RING) E3 ligazların en büyük sınıfında RING kutu proteinlerine yüksek düzeyde korunmuş homoloji domainleri vasıtasıyla bağlanarak iskele proteini olarak fonksiyon gösterir. Kullinler hücre döngüsü ve sinyal regülasyonunu içeren çok çeşitli hücresel olaylarda görevli proteinlerin seçici degradasyonunda da anahtar rol oynarlar. Kullin 4 (*CUL4*) ailesinin *CUL4A* ve *CUL4B* olmak üzere iki üyesi bulunmaktadır. *CUL4B* ile *CUL4A* %83 oranında dizi benzerliği gösterirler. *CUL4B* pankreatik dokuda, serebellumda, kemik iliğinde ve testislerde yüksek oranda ifade bulur (Li ve Wang, 2017).

CUL4B geninin katarakt gelişimi ve ilerlemesindeki rolü bilinmemektedir. Çalışmamız *CUL4B* geninin katarakt ile ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu çalışma ile ilk defa *CUL4B* geninin mRNA düzeyinde yaşa bağlı katarakt hastalarında, HLE-B3 hücre hattına göre daha düşük düzeyde ifade bulunduğunu tespit ettik. Bu amaçla, HLE-B3 hücrelerini H_2O_2 ile muamele ederek hücresel düzeyde oksidatif stresi taklit ettik. Bu uygulama sonunda, H_2O_2 ile muamele edilmiş hücrelerde kontrol hücrelerine göre daha

düşük seviye *CUL4B* ifadesi gözlenmiştir. Oksidatif stres altında *CUL4B* hücre sağkalımını destekleyici olarak çalışırken, artmış ROS seviyesinin *CUL4B* ifadesinin azalması neticesinde ortaya çıktığı bildirilmiştir (Wei ve ark., 2015). Elde ettiğimiz bu sonuç lens epitel hücrelerinde *CUL4B* ifadesinin oksidatif stres altında düşük seviyede belirlenmesini açıklayabilir. Yüksek düzeyde oksidatif stresin olduğu bir ortamda hücrelerin, *CUL4B*'nin substratı, aynı zamanda da bir radikal temizleyici olan PrxIII'ü yüksek düzeyde tutmak için, *CUL4B* ifadesini azaltarak kendilerini oksidatif hasara karşı koruduğu bildirilmiştir. *CUL4B*'nin baskılanmasının, PrxIII artışı ile sonuçlandığı ve bu durumun hücrelerin ROS ve H₂O₂-indüklü apoptoza karşı direnç geliştirmelerini sağladığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2011). Benzer şekilde, bir E3 ligazı olan E6AP eksik hücrelerde, Prx1 akümüasyonu oluşması, reaktif oksijen türlerinin azalmasını sağlar. Bu durum oksidatif stres indüklü hücre ölümünü negatif olarak regüle etmektedir (Wolyniec ve ark., 2013). Ancak, artan ROS seviyesinin mi *CUL4B* ifadesini azalttığı, yoksa *CUL4B*'nin baskılanmasının mı ROS seviyesini artırdığı bilinmemektedir. Bu hipotezin test edilmesi sürecinde çalışmamız, *CUL4B* gen regülasyonunun değişiminin araştırılması için apoptoz prosesine dahil olan diğer proteinlerin de değerlendirileceği yeni çalışmalar için temel bir veri seti oluşturmaktadır. Bu veriler göz önüne alındığında, *CUL4B* gen regülasyonunun değişiminin araştırılması ve lens epitel hücrelerde oksidatif strese karşı koruyucu rolü olup olmadığının daha iyi anlaşılması için yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

CUL4B regülasyonunun bozulmuş olduğu ve potansiyel bir onkogen olarak rol oynadığı birçok çalışma rapor edilmiştir. *CUL4B* ifadesinin azalması hücre proliferasyonunu inhibe ederken, apoptoza neden olup DNA replikasyonunun düzenli gerçekleşmesine sekte vurmaktadır. *CUL4B* ifadesinin baskılanması, Wnt/ β -Katenin hücre sinyal yolağının inhibe olmasına neden olarak, hücre proliferasyonunun durmasına yol açarken apoptozu teşvik ettiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile kolorektal kanser hücrelerinde gösterilmiştir. *CUL4B* siRNA ile transfekte edilmiş gastrik kanser hücrelerinde, erken apoptotik hücrelerin belirlendiği bildirilmiştir (He ve ark., 2018). Benzer şekilde, Osteosarkom hücrelerinde *CUL4B* gen ifadesinin baskılanması, proliferasyon sürecini bozarken apoptozu indüklemektedir (Chen ve ark., 2014). Ancak, *CUL4B*'nin, tümör mikroçevresini negatif yönde regüle ederek bir tümör baskılayıcı gen olarak

davrandığını gösteren çalışmalara da rastlanmaktadır (Qian, ark., 2015). Başka bir çalışmada ise, *CUL4B* genine benzer şekilde p53 übikütinasyonu ve degradasyonundan sorumlu bir E3 ligaz olan *MDM2*'nin lens epitel hücre apoptozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ser166 ve 186 bölgelerinden fosforile olan *MDM2*'nin kataraktlı ve apoptotik lens epitel hücrelerinde kontrol örneklerine göre daha düşük oranda temsil edildiği bulunmuştur. *MDM2*'nin bozulmuş aktivitesi yaşa bağlı katarakt (Wang ve ark., 2020) ve lens epitel hücrelerinin apoptozu ile ilişkilendirilmiştir (Zhang, ark., 2014).

CUL4B apoptoz ile ilişkili olduğundan, lens epitel hücrelerinde apoptotik etkisinin belirlenmesi değerli görünmektedir. *CUL4B*, oksidatif stres ve apoptoz üçgenini düşünerek; *CUL4B* ifadesini baskılamak suretiyle, apoptotik markırları inceledik. *CUL4B* ifadesinin sessizleştirilmesi apoptotik markırlardan Bcl-2'nin ve Kaspaz 3'ün protein ifadesinin azalmasına neden olurken, Bid protein ifadesinde ise az miktarda bir artışa neden olmuştur. Yukarıda belirtilen çalışmalar ile uyumlu olarak, çalışmamız da *CUL4B* siRNA ile transfekte edilen hücrelerin apoptoza girdiğine işaret etmektedir. Ancak, bu sonuç sadece bir yöntem ile elde edilmiştir. Bu durum çalışmamız için bir limit oluşturmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar, apoptotik markırlara yönelik başka yöntemlerle araştırılarak desteklenebilir.

Sonuç olarak, *CUL4B*'nin anormal ifadesi birçok malignan hastalıkta tespit edilmiştir. *CUL4B* birçok kanser türünde onkogen olarak çalışmaktadır. *CUL4B* hücre döngüsü, promotör metilasyonu ve histon deasetilasyonu, DNA hasarı ve tamiri gibi geniş yelpazede hücre işlevleri regüle ederek hastalıkların gelişmesi ve ilerlemesini etkilemektedir. *CUL4B* ifadesinin baskılanması hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanırken, *CUL4B* ifadesinin artışı kanser ilişkili birçok sinyal yolağının aktivasyonu ile yakından ilişkilidir. Bundan dolayı, *CUL4B* hastalıkların gelişmesini ve ilerlemesini geniş çapta hücre işlevleri regüle etmek suretiyle etkileyebilmektedir. *CUL4B* kanser teşhis ve tedavisinin yanında, oksidatif stresle ilişkili hastalıkların anlaşılması için de önemli bilgiler sağlama potansiyeline sahiptir. Ancak, *CUL4B*'nin hücrede rol oynadığı mekanizmaların açıklığa kavuşturulması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, LOCS III derecelendirme sistemine göre derece 3-4 kortiko-nükleer tip katarakt hastalarındaki *CULAB* ifadesini, HLE-B3 lens epitel hücre hattı ile karşılaştırarak bulduğumuz sonuç üzerinden, hücre kültürü çalışmaları ile *CULAB* geninin katarakt ile ilişkisini apoptoz üzerinden değerlendirmeye çalıştık.

CULAB ifadesinin vaka grubu ve hücre hattı kontrol örneklerinde tespiti için qPCR kullanarak kantitatif değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızın ilk etabında hasta örneklerindeki *CULAB* ifadesinin tespiti yer almıştır. Kataraktlı lens epitel hücrelerinde *CULAB* ifadesi 0,16 kat azalış ($p<0,001$) sergilemiştir. Çalışmamızın ikinci etabında ise, bulunan bu sonucun katarakt indüktanı olan oksidatif stres altındaki hücrelerde de uyum gösterip göstermediğinin incelenmesi oluşturmaktadır. Oksidatif stres altındaki hücrelerde de katarakt hastalarındaki gibi düşük miktarda *CULAB* ifadesi olduğunu hem transkripsiyon hem de translasyon aşamasında tespit ettik. *CULAB* ifadesinin azalışının katarakt için temel hücresel bir mekanizma olan apoptoz üzerine olan etkisini araştırma aşaması ise çalışmamızın üçüncü ve son etabını oluşturmaktadır. *CULAB* ifadesinin azalışı apoptotik markırlar üzerinden değerlendirildiğinde, apoptoza sebep olabileceği sonucuna ulaştık.

Kataraktlı hastalarda, *CULAB* ifadesinin düşük olmasının hastalık patogenezi ile uyumlu olabileceği sonucuna vardık. Elde ettiğimiz sonuçların *CULAB* geninin katarakt gelişimindeki rolünün aydınlatılması için önemli veriler sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Age-Related Eye Disease Study Research Group. (2001) Risk factors associated with age-related nuclear and cortical cataract: a case control study in the Age-Related Eye Disease Study. AREDS report no. 5. *Ophthalmology*, 108, pp.1400-1408.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Current Opinion in Cell Biology* 11, pp. 255-260.
- Avila, F., Ravello, N., Zanooco, A.L., Gamon, L.F., Davies, M.J., Silva, E. (2019) 3-Hydroxykynurenine bound to eye lens proteins induces oxidative modifications in crystalline proteins through a type I photosensitizing mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*. 141, pp.103-114.
- Ayala, M., Strid, H., Jacobsson, U., Soderberg, P.G. (2007) p53 expression and apoptosis in the lens after ultraviolet radiation exposure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48, pp.4187-4191.
- Babizhayev, M.A. (2016) Generation of reactive oxygen species in the anterior eye segment. Synergistic codrugs of N-acetylcarnosine lubricant eye drops and mitochondria-targeted antioxidant act as a powerful therapeutic platform for the treatment of cataracts and primary open-angle glaucoma. *BBA, Clinical*. 19(6), pp.49-68.
- Bai, J., Yu, N., Mu, H., Dong, L., Zhang, X. (2018) Histidine protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress injury through the NF- κ B pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 119(2), pp.1637-1645.
- Berthoud, V.M., Beyer, E.C. (2009) Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxid Redox Signal*. 11(2), pp.339-353.
- Bobrow, J.C. (2011) 2011-2012 *Basic and clinical science course, section 11: Lens and cataract*. In: *Pathology*. Revised edition. San Francisco: American Academy of Ophthalmology, pp. 43-60.
- Brewster, D. (1833) On the anatomical and optical structure of the crystalline lens of animals, particularly that of cod. *Philos Trans R Soc Lond*. 123: pp.323–332.
- Cammarata, P.R., Cantu-Crouch, D., Oakford, L., Morrill, A. (1986) Macromolecular organization of the bovine lens capsule. *Tissue Cell*. 18: pp.83–97.
- Cedrone, C., Culasso, F., Cesareo, M., Mancino, R., Ricci, F., Cupo, G. et al. (1999) Prevalence and incidence of age-related cataract in a population sample from Priverno, Italy. *Ophthalmic Epidemiology*. 6(2), pp.95-103.
- Chen, Y., Mehta, G., Vasiliou, V. (2009) Antioxidant Defenses in the Ocular Surface. *The Ocular Surface*. 7(4), pp.176–185.
- Chen, Z., Shen, B.L., Fu, Q.G., Wang, F., Tang, Y.X., Hou, C.L. et al. (2014) CUL4B promotes proliferation and inhibits apoptosis of human osteosarcoma cells. *Oncology reports*. 32, pp.2047-2053.
- Chieh, M., Peng, Y., Chen, S., Chiou, S. (2010) Senile cataracts and oxidative stress. *Journal of Clinical Gerontology & Geriatrics*. 1, pp.17-21.

- Das, B.N., Thompson, J.R., Patel, R., Rosenthal A.R. (1994) The prevalence of eye disease in Leicester: a comparison of adults of Asian and European descent. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 87, pp.219–222.
- Dong, J., Wang, X.Q., Yao, J.J., Li, G., Li., X.G. (2015) Decreased CUL4B expression inhibits malignant proliferation of glioma in vitro and in vivo. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 19(6), pp.1013–1021.
- Giuffre, G., Giammanco, R., Di Pace, F. Ponte, F. (1994) Casteldaccia eye study: prevalence of cataract in the adult and elderly population of a Mediterranean town. *International Ophthalmology* 18, pp.363–371.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*.13, pp.1899-1911.
- Gunnlaugsdottir, E., Arnarsson, A., Jonasson, F. (2010) Five-year incidence of visual impairment and blindness in older Icelanders: the Reykjavik Eye Study. *Acta Ophthalmol* 88, pp.358–366.
- Gupta, V.B., Rajagopala, M., Ravishankar, B. (2014) Etiopathogenesis of cataract: an appraisal. *Indian Journal of Ophthalmology*. 62, pp.103-110.
- Gupta, V.B., Rajagopala, M., Ravishankar, B. (2014) Etiopathogenesis of cataract: an appraisal. *Indian Journal of Ophthalmology*. 62(2), pp.103-110.
- Harding, J.J., Rixon, K.C., Marriott, F.H.C. (1977) Men have heavier lenses than women of the same age. *Experimental Eye Research*. 25(6):651.
- He, F., Cheng, X.M., Gu, W.L. (2018) Effects of cullin 4B on the proliferation and invasion of human gastric cancer cells. *Molecular medicine Reports*. 17, pp.4973-4980.
- Hejtmancik, J.F., Shiels, A. (2015) Overview of the Lens. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 134, pp.119-127.
- Hu, X., Liang, Y., Zhao, B., Wang Y. (2019) 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*, 139(3), pp.166-173.
- Jogi R. (2009) *Basic Ophthalmology*. Fourth Edition. Raipur, India: Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Klein, B.E., Klein, R., Lee, K.E. (1998) Incidence of age-related cataract: the Beaver Eye Study. *Arc Ophthalmol*. 116, pp.219-225.
- Koretz, J.F., Handelman, G.H. (1988) How the human eye focuses. *Scientific American*. 256: pp.92–99.
- Laitinen, A., Laatikainen, L., Harkanen, T., Koskinen, S., Reunanen, A., Aromaa, A. (2009) Prevalence of major eye diseases and causes of visual impairment in the adult Finnish population: a nationwide population-based survey. *Acta Ophthalmol* 88, pp.463–471.
- Leske, M.C., Chylack Jr, L.T., He, Q., Wu, S.Y., Schoenfeld, E., Friend, J. et al. (1997) Incidence and progression of cortical and posterior subcapsular opacities: the Longitudinal Study of Cataract. The LSC Group. *Ophthalmology*. 104, pp.1987-1993.

- Li, Q., Pan, H., Liu, Q. (2019) MicroRNA-15a modulates lens epithelial cells apoptosis and proliferation through targeting B-cell lymphoma-2 and E2F transcription factor 3 in age-related cataracts. *Bioscience Reports*. 39(12).
- Li, X., Lu, D., He, F., Zhou, H., Liu, Q., Wang, Y. et al. (2011) Cullin 4B protein ubiquitin ligase targets peroxiredoxin III for degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 286(37), pp.32344–32354.
- Li, X., Lu, D., He, F., Zhou, H., Liu, Q., Wang, Y. et al. (2011) Cullin 4B Protein Ubiquitin Ligase Targets Peroxiredoxin III for Degradation. *The journal of biological chemistry*. 286(37), pp.32344-32354
- Li, Y., Wang, X. (2017) The role of cullin4B in human cancers. *Experimental Hematology and Oncology*. 15; 6:17.
- Li, Y., Wang, X. (2017) The role of cullin4B in human cancers. *Experimental Hematology & Oncology*. 6:17.
- Li, Y., Zhou, X., Zhang, Y., Yang, J., Xu, Y., Zhao Y. et al. (2019) CUL4B regulates autophagy via JNK signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Cell Cycle*. 18(4), pp.379-394.
- Liu, A., Zhang, S., Shen, Y., Lei, R., Wnag, Y. (2019) Association of mRNA expression levels of Cullin family members with prognosis in breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. 98(31): e16625.
- Ma, T.J., Lan, D.H., He, S.Z., Ye, Z., Li, P., Zhai, W. et al. (2018) Nrf2 protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative and ER stress: The ATF4 may be involved. *Experimental Eye Research*. 169, pp.28-37.
- Malhotra, R. (2007) *Eye Essentials: Cataract Assessment, Classification and Management*. United Kingdom: Butterworth Heinemann.
- Mann I. (1964) *The Development of the Human Eye*. New York: Grune and Stratton; 1964.
- Mao, Y., Xiang, H., Wang, J., Korsmeyer, S., Reddan, J., Li, D.W. (2001) Human bcl-2 gene attenuates the ability of rabbit lens epithelial cells against H₂O₂-induced apoptosis through down-regulation of the alpha B-crystallin Gene. *Journal of Biological Chemistry* 276, pp.43435-43445.
- Marzo, N.D., Chisci, E., Giovannoni, R. (2018) The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells*. 7(10), pp.141-156.
- Meekins, L.C., Afshari, N.A. (2011). Ever-evolving technological advances in cataract surgery: can perfection be achieved? *Current Opinion in Ophthalmology*. 23(1), pp.1-2.
- Michael, R., Vrensen, G.F., Van Marle, J., Gan, L., Soderberg, P.G. (1998) Apoptosis in the rat lens after in vivo threshold dose ultraviolet irradiation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 39, pp. 2681-2687.
- Mir, S., Wheatley, H.M., Hussels, I.E., Whittum-Hudson, J.A., Traboulsi, E.I. (1998) A comparative histologic study of the fibrillin microfibrillar system in the lens capsule of normal subjects and subjects with Marfan syndrome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 39(1), pp.84–93.

- Morner, C.T. (1894) Untersuchungen der protein-substanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 18: pp.61–106.
- Navarro Esteban, J.J., Gutierrez Leiva, J.A., Valero Caracena, N., Buendia Bermejo, J., Calle Puron, M.E., Martinez Vizcaino, V.J. 2007 Prevalence and risk factors of lens opacities in the elderly in Cuenca, Spain. *European Journal of Ophthalmology*. 17, pp.29–37.
- Pascolini, D., Mariotti, S.P. (2011) Global estimates of visual impairment: 2010. *British Journal of Ophthalmology*. 96(5), pp.614-618.
- Patterson, C.A., Delamere, N.A. (1992) The lens. In Hart WM, editor: *Adler's physiology of the eye*, ed 9, Mosby, p 348.
- Qi, M., Hu, J., Cui, Y., Jiao, M., Feng, T., Li, X. et al. (2019) CUL4B promotes prostate cancer progression by forming positive feedback loop with SOX4. *Oncogenesis*. 4;8(3):23.
- Qian, Y., Yuan, J., Hu, H., Yang, Q., Li, J., Zhang, S. et al. (2015) The CUL4B/AKT/b Catenin Axis Restricts the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells to Prohibit the Establishment of a Tumor-Permissive Microenvironment. *Cancer research*. 75(23), pp.5070-5083.
- Raj, S.M., Vasavada, A.R., Kaid Johar, S.R., Vasavada, V.A., Vasavada V.A. (2007) Post-Operative Capsular Opacification: A Review. *International Journal of Biomedical Science*. 3(4), pp.237-250.
- Remington, L.A., Goodwin, D. (2005) *Clinical Anatomy of the Visual System*. Third edition. United Kingdom: Butterworth-Heinemann.
- Renwick, J.H., Lawler, S.D. (1963) Probable linkage between a congenital cataract locus and the Duffy blood group locus. *Ann Hum Genet*. 27: pp.67–84.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G.P. et al. (2004) Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 82, pp.844–851.
- Rosenfeld, S.I. (2007) 2007-2008 *Basic and clinical science course, section 11: Lens and cataract*. In: *Epidemiology of Cataracts*. Revised edition. San Francisc: American Academy of Ophthalmology, pp. 86-89.
- Sommer A., Tielsch J.M., Katz J., Quigley, H.A., Gottsch, J.D., Javitt, J.C. et al. (1991) Racial Differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore. *The New England Journal of Medicine*. 325, pp.1412-1417.
- Song, B., Zhan, H., Bian, Q., Li, J. (2015) Knockdown of CUL4B inhibits proliferation and promotes apoptosis of colorectal cancer cells through suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 8(9), pp.10394-10402.
- Strenk, S.A., Semmlow, J.L., Strenk L.M. et al. (1999) Age-related changes in ciliary muscle and lens: a magnetic resonance imaging study, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40:1162.
- Thompson, J., Lakhani, N. (2015) Cataracts. *Prim Care*. 42(3), pp.409-423.

- Trautner, C., Haastert, B., Richter, B., Berger, M., Giani, G. (2003) Incidence of blindness in southern Germany due to glaucoma and degenerative conditions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, pp.1031–1034.
- Tu, Y., Li L., Qin, B., Wu, J., Cheng, T., Kang, L. et al. (2019) Long noncoding RNA glutathione peroxidase 3–antisense inhibits lens epithelial cell apoptosis by upregulating glutathione peroxidase 3 expression in age-related cataract. *Molecular Vision*. 25, pp.734-744.
- Waked, N., Saad A., Mehanna, C., Sleilaty, G., Kortbaoui, R. (2007) Prevalence, causes, and risk factors for blindness and visual impairment among nursing home residents in Lebanon. *Journal Français D'Ophtalmologie*. 30, pp.497–502.
- Wang, Z., Su, D., Sun, Z., Liu, S., Sun, L., Li, Q. et al. (2020) MDM2 phosphorylation mediates H₂O₂-induced lens epithelial cells apoptosis and age-related cataract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 528(1), pp.112-119.
- Wei, Z., Guo, H., Liu, Z., Zhang, X., Liu, Q., Qian, Y. et al. (2015) CUL4B impedes stress-induced cellular senescence by dampening a p53-reactive oxygen species positive feedback loop. *Free Radical Biology and Medicine*. 79: pp.1-13.
- Wistow, G.J., Piatigorsky, J. (1988) Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem*. 57: pp.479–504.
- Wolyniec, K., Levav-Cohen, Y., Jiang, Y.H., Haupt, S., Haupt, Y. (2013) The E6AP E3 ubiquitin ligase regulates the cellular response to oxidative stress. *Oncogene*. 32, pp. 3510-3519.
- Yanoff M., Duke, J.S. (2014) *Ophthalmology*. Fourth Edition Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Zhang, L., Yan, Q., Liu, J.P., Zou, L.J., Liu, J., Sun, S. et al. (2010) Apoptosis: its functions and control in the ocular lens. *Current Molecular Medicine*. 10(9), pp.864-875.
- Zhang, Y., Zhang, X., Lu, H. (2014) Aberrant activation of p53 due to loss of MDM2 or MDMX causes early lens dysmorphogenesis. *Developmental Biology*. 396(1), pp.19-30.
- Zhou, P., Luo, Y., Liu, X., Fan, L., Lu Y. (2012) Down-regulation and CpG island hypermethylation of CRYAA in age-related nuclear cataract. *The FASEB Journal*. 26(12), pp.4897-4902.

EKLER

EK-1: İntihal Yazılım Programı Raporu



ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM

Lisans: Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2007)

Yüksek Lisans: Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (2011)

YABANCI DİL

İngilizce: YDS, 71,25

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl Kurum

2019 Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi

Görev

Öğretim Görevlisi

YAYINLAR

Ağaoğlu N. B., Varol N., Yıldız S. H., Karaosmanoğlu C., Duman R., Özdemir Erdoğan Erdoğan M., Solak M. "Relationship between SIRT1 gene expression level and disease in age-related cataract cases". Turk J Med Sci 2019 Aug 8;49(4):1068-1072.