

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA KALSİYUM SİNYALİ,
APOPTOSİS VE OKSİDATİF STRES DEĞERLERİ ÜZERİNE
MAVİ IŞIK (405 nm), AMFENAK VE MELATONİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mehmet ARGUN

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Levent TÖK

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
3173-TU 2-12 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2013

ÖNSÖZ

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Levent TÖK başta olmak üzere, Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU, Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ ve Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK'e;

Uzmanlık eğitimim süresince bana her türlü imkanı ve desteği sağlayan Göz Hastalıkları ABD Başkanı Doç. Dr. Özlem Y. TÖK başta olmak üzere Anabilimdalımızdaki değerli hocalarıma;

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma;

Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine;

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim aileme;

Teşekkür ederim...

Dr. Mehmet ARGUN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Anatomi	3
2.1.1. Retina Anatomisi	3
2.1.2. Maküla Anatomisi	4
2.1.3. Ora Serrata	6
2.1.4. Vitreus.....	6
2.1.5. Retina Kan Dolaşımı.....	6
2.2. Retina Pigment Epiteli Özellikleri	6
2.2.1. Kan-Retina Bariyeri ve Transepitelial Transport	8
2.2.2. Görsel Siklus ve Vitamin A Metabolizması	9
2.2.3. Fotoreseptör Dış Segmentlerinin Fagositozu.....	9
2.2.4. Işığın Emilimi ve Fotooksidasyona Karşı Koruma	10
2.2.5. İmmün Fonksiyon.....	10
2.2.6. Büyüme Faktörleri ve Sitokinler	10
2.3. Serbest Radikaller.....	11
2.4. Antioksidanlar	13
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar	13
2.5. Melatonin.....	15
2.5.1. Melatonin Sentezi	16
2.5.1.1. Melatonin Sentezinin Kontrolü	16
2.5.2.2. Melatoninin Etki Mekanizması	17
2.5.2.3. Melatoninin Antioksidan Etkisi	18
2.6. Amfenak'ın Genel Özellikleri	19
2.7. Hücre içi Kalsiyum (Ca^{+2}) Sinyali	20

2.8. Hücre İçerisine Ca^{+2} Giriş Kanalları	20
2.8.1. Hücre içi Depolardan Ca^{+2} SALINIMI.....	21
2.8.2. Hücre içi Ca^{+2} Salınım Habercileri.....	22
3. MATERYAL ve METOD	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	23
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.1.3. Hücre Canlılığı (MTT Analizi).....	25
3.1.4. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	26
3.1.4.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ..	26
3.1.5. Hücre İçi Ca^{+2} Salınımının Ölçülmesi	28
3.1.6. Lipit Peroksidasyon Analizi	28
3.1.7. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi.....	29
3.1.8. Kaspaz -3 ve -9 aktivitelerinin Tayini	29
3.1.9. Apoptosis	29
3.1.10. ROT Üretimi	31
3.1.11. Protein Tayini	31
3.1.12. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. ARPE-19 Hücrelerinde Amfenak'ın Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	32
4.2. ARPE-19 Hücrelerinde Melaton'in Hücre Canlılığı Üzerine Terapötik Dozunun Tayini	32
4.3. ARPE-19 Hücrelerinde Lipid Peroksidasyon Düzeyleri.....	33
4.4. ARPE-19 Hücrelerinde GSH ve GSH-Px Düzeyleri	34
4.5. ARPE-19 Hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu (Ca^{+2}) _i Salınımı Düzeyleri	35
4.6. ROT Üretimi.....	40
4.7. Apoptozis Düzeyleri.....	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
ÖZET.....	50
ABSTRACT	51
KAYNAKLAR	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADPR	: Adenozin di-fosfat riboz
cADPR	: Siklik ADPR
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi Kalsiyum İyonu
CCl₃·	: Triklormetil
Cu	: Bakır
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTNB	: 5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
InsP₃	: Inositol 1,4,5 trifosfat
KAT	: Katalaz
KMÖ	: Kistoid makula ödemi
LPO	: Lipid peroksidasyon
MEL	: Melatonin
MTT	: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NAT	: N-asetil transferaz
NO·	: Nitrik oksit radikali
NSAİİ	: Non-steroid Anti-enflamatuar İlaç
NUDT9-H	: TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge
O₂	: Moleküler oksijen
¹O₂	: Singlet Oksijen
O₂·⁻	: Süperoksit Radikali
ROO·	: Peroksil
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RPE	: Retina Pigment Epiteli
Se	: Selenyum

SCN	: Supra kiazmatik nükleus
SOD	: Süperoksit dismutaz
SR	: Sarkoplazmik Retikulum
TRP	: Transient receptor potential
TRPA	: Transient receptor potential ankyrin
TRPC	: Transient receptor potential classical
TRPL	: Transient receptor potential Like
TRPM	: Transient receptor potential melastatin
TRPML	: Transient receptor potential mucolipin
TRPM2	: Transient receptor potential melastatin 2
TRPP	: Transient receptor potential polycystin
TRPV	: Transient receptor potential vanilloid
YBMD	: Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu
Zn	: Çinko
2-APB	: 2-Aminoethoxydiphenyl borate

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar	27
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. N-asetil-5 metoksitriptamin (Melatonin)'in kimyasal yapısı	15
Şekil 2. Melatonin sentezi.....	16
Şekil 3. Melatonin sentezinin kontrolü	17
Şekil 4. Melatoninin antioksidan fonksiyonu	19
Şekil 5. Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellenmesi	30

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Retinanın histolojik kesiti.....	4
Resim 2. Makular Anatomi.....	5

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Mavi dalga boyundaki ışığın, Amfenak ve Melatoninin ARPE-19 hücrelerindeki lipid peroksidasyon düzeylerine etkileri	33
Grafik 2. ARPE-19 hücre guruplarında GSH düzeyleri	34
Grafik 3. ARPE-19 hücre guruplarında GSH-Px düzeyleri.....	35
Grafik 4. ARPE-19 hücre guruplarında sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği	35
Grafik 5. ARPE-19 hücre gruplarında oksidatif stresin neden olduğu sitozole Ca^{+2} salınımı üzerindeki etkileri	36
Grafik 6. Kontrol grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği	37
Grafik 7. Işık grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği.....	37
Grafik 8. Amfenak grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği.....	38
Grafik 9. Melatonin grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği	38
Grafik 10. Işık+Amfenak grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği...	39
Grafik 11. Işık+Melatonin grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği .	39
Grafik 12. Işık+Amfenak+Melatonin grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği	40
Grafik 13. ARPE-19 hücre gruplarında ROT üretim miktarı	40
Grafik 14. ARPE-19 hücre gruplarında apoptozis düzeyleri	41

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasansı (YBMD) gelişmiş ülkelerde yaşlılarda en önemli körlük nedenidir (1). YBMD'nin patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır ve bu güne kadar etkin tedavisi ve önlemi yoktur. Uzun süre ışığa maruz kalmanın YBMD başlangıcına yol açabileceği çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (2-5).

İnsan retina hücresi yüksek enerjili ultraviyole ışığa (UV) karşı kornea ve lens tarafından 400 nm altındaki UV ışığın emilmesi sayesinde korunmakta buna rağmen görülebilir ışık tarafından hasar oluşturulabilmektedir (6). Görülebilir ışık spektrumunun bileşenleri retina pigment epitel hücrelerindeki (RPE) biyolojik kromoforlar tarafından absorbe olabilir, bu da hücresel disfonksiyona ve hücresel ölüme neden olabilir (7). Mavi ışık spektrumu (400-500nm) nispeten yüksek enerjiye sahiptir ve dokulardaki hücre ve organellere penetre olabilir. Mavi spektrumlu ışığın retina dokusuna zarar verdiği bilinmektedir (8-12). Fotoresptör dış segmentinin ara yüzünde rodopsin tarafından oluşturulan kromoforlar protein A2E gibi lipofüksinin majör komponentidir (7, 13). Bu kromoforlar RPE hücrelerindeki radikallerin ana kaynağı olarak kabul edilmiş, mavi ışığın lipofüksin olmadan RPE hücrelerine zarar verebileceği yakın zamanda gösterilmiş (14, 15). Bazı hücre kültür çalışmalarında mavi ışığın RPE mitokondrilerinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu direk indüklediği (14) ve ROT tarafından oluşturulan mitokondrial DNA hasarının (16) apoptozise yol açtığı (17) gösterilmiş. Birçok çalışmada mavi ışık, RPE ve YBMD'de mavi ışığın indüklediği apoptozis mekanizması arasındaki ilişki (12, 15) üzerinde durulmasına rağmen erken YBMD'de RPE hücre ölümü görülmez. Aslında, epidemiyolojik veriler coğrafik atrofi tipinde hücre ölümünü göstermiştir ve bu ilerleyen yaşla birlikte kanda melatonin seviyelerinin anlamlı şekilde azalması, YBMD hastalarının %10-15'ini oluşturmakta ve hastalığın geç dönemlerinde görülmektedir (18).

Melatonin (N-asetyl-5-methoxytryptamine) memeli pineal bez ve retinası tarafından doğal olarak üretilen endojen bir nörohormondur. Melatonin seviyesi gece artmakla birlikte gece-gündüz ritmisite gösterir (19, 20). İlerleyen yaşla birlikte kanda melatonin seviyelerinin anlamlı şekilde azalması, yaşlanma sürecinde

fizyolojik bir rolü olduğunu desteklemektedir (21, 22). Melatonin retinada fotoreseptör hücreleri tarafından sentezlenmekte (23) ve sentezi pineal bezdeki sirkadyen ritme benzer şekilde olmaktadır. Fotoreseptörlerden sentezlenen melatoninin karanlık adaptasyonu sağlayan ve sirkadyen retinal fizyolojiyi düzenleyen lokal parakrin bir modölatör olduğu düşünülmektedir (24, 25). Son zamanlarda melatoninin etkili bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir (26). Melatonin hidroksil radikali, süperoksit anyonu, peroksit radikali ve tek oksijeni içeren farklı reaktif oksijen türlerini doğrudan temizleyebilmektedir. Ayrıca, melatoninin glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon S-transferaz gibi antioksidatif enzim aktivitelerini arttırdığı bulunmuş (27-29). Melatonin oksidatif hasara karşı yardımcı olarak hücre membranını stabilize edebilmektedir (30). Melatonin retinada, ışık ile oluşturulan serbest radikallere karşı fotoreseptör dış segment membranını korur (31, 32) ve RPE hücrelerinde iskemi ile oluşan apoptozisi engeller (33).

Amfenak (2-amino-3-benzoylbenzeneacetic acid) nonsteroid anti-enflematuar (NSAİİ) bir ilaçtır. NSAİİ'lar siklooksijenaz (COX) yolunu engelleyerek prostaglandin üretimini sınırlar (34). Ayrıca amfenak'ın serbest radikal oluşumunu önleyici etkisi de bulunmaktadır. Amfenak 1 mM derişimde rat polimorfonükleer lökosit (PMN)'lerinde önemli ölçüde opsonize zymosan ile başlatılmış süperoksit anyonu oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. (35).

Biz çalışmamızda RPE hücrelerinde ışık ile oluşturulan oksidatif stresi azaltmaya yönelik melatonin ve amfenak'ın koruyucu etkilerini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

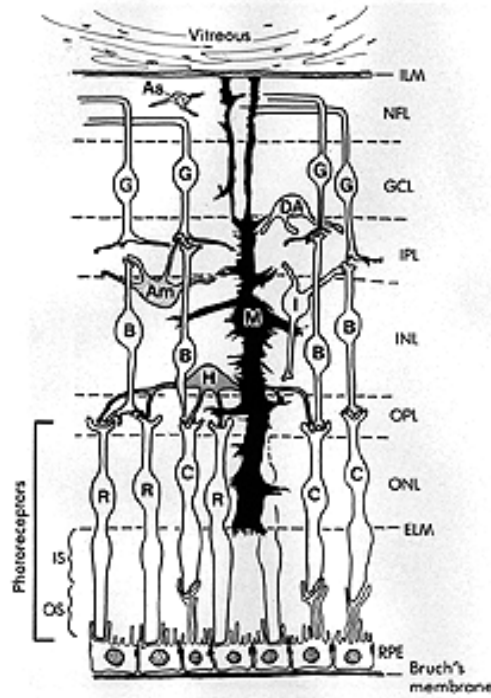
2.1. Anatomi

2.1.1. Retina Anatomisi

Retina gözün en iç tabakasıdır ve nöroektodermden gelişir. İki katmanı vardır, dış retina pigment epiteli (RPE) ve iç nöral retina. Bunların arasında ise potansiyel bir boşluk bulunur. Duyusal tabaka ile RPE arasındaki bu potansiyel fizyolojik boşluğa, "subretinal alan" denir.

Retina, vorteks venlerinin skleraya girdiği yerde meydana gelen daire ile santral (posterior) ve periferik (anterior) olmak üzere iki kısma ayrılabilir. Retina histolojik olarak incelendiğinde 10 tabakadan oluştuğu görülür (Resim 1). İçten dışa doğru bu tabakalar şu şekildedir:

1. İç limitan membran
2. Sinir lifleri tabakası
3. Ganglion hücreleri tabakası
4. İç pleksiform tabaka
5. İç nükleer tabaka
6. Dış pleksiform tabaka
7. Dış nükleer tabaka
8. Dış limitan membran
9. Koni ve basiller
10. Retina pigment epiteli.



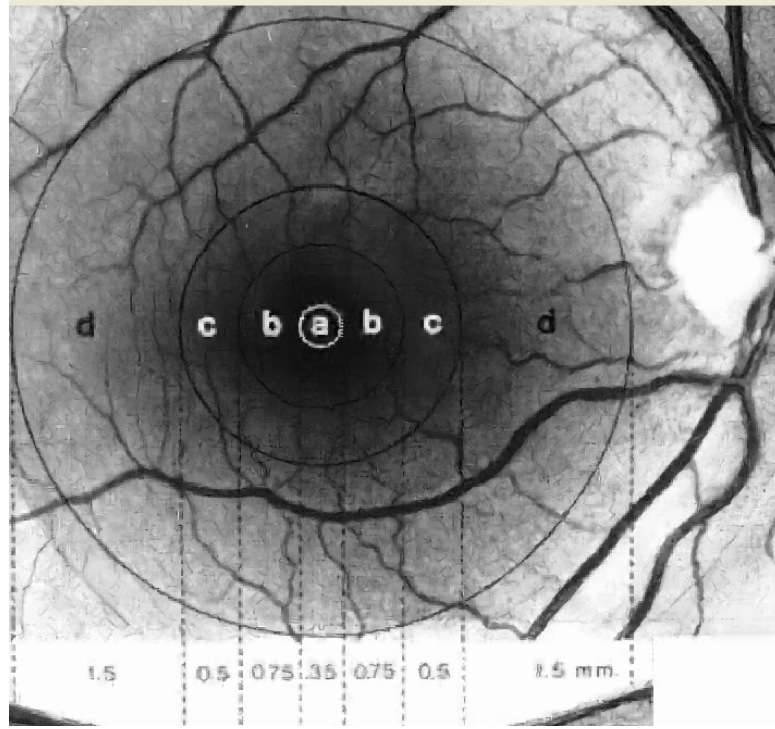
Resim 1. Retinanın histolojik kesiti

(Retina pigment epitel(RPE), Koniler(C), Basiller(R), Dış limitan membran(ELM), Dış nükleer tabaka(ONL), Dış plexiform tabaka(OPL), iç nükleer tabaka(INL), iç plexiform tabaka(IPL), Ganglion hücre tabakası(GCL), Sinir lifleri tabakası(NFL), iç limitan membran(ILM)).

Duyusal retina 3 adet nükleer ve 3 adet fibriler tabakadan oluşmaktadır. Nükleer tabakalar; fotoreseptörlerin nükleuslarını içeren dış nükleer tabaka, bipolar, horizontal, amakrin ve müller hücrelerinin nükleuslarını içeren iç nükleer tabaka, ganglion hücrelerinin nükleuslarını içeren ganglion hücreleri tabakasıdır. Fibriler tabakalar; kon ve rodların, bipolar ve horizontal hücrelerle sinaps yaptığı dış plexiform tabaka, bipolar, amakrin ve ganglion hücrelerinin sinaps yaptığı iç plexiform tabaka, ganglion hücrelerinin aksonlarının oluşturduğu sinir lifleri tabakasıdır. İç limitan membran, müller hücrelerinin ayakları (foot plate) oluşturulan, müller hücresi bazal membranıdır.

2.1.2. Maküla Anatomisi

Santral retina ya da maküla bölgesi, histolojik olarak gangliyon hücre tabakasında en az iki nükleus tabakası içeren bölge şeklinde tanımlanır. Topografik olarak maküla 4 kısımdan oluşur (Resim 2).



Resim 2. Makular Anatomi. foveola (a), fovea(b), parafovea (c) ve perifovea (d).

Fovea, santral retinanın iç, yani vitreusa bakan yüzünde hafif bir çöküklük veya ekskavasyonudur. Fovea, optik sinir başı merkezinin 4,0 mm temporalinde ve 0,8 mm aşağısında yer alır. Fovea yaklaşık 1,5 mm çaplı alandır. Foveada sinir lifleri, ganglion hücreleri ve iç pleksiform tabakaları yoktur. Foveal çukurluğun merkezindeki fotoreseptör katmanında sadece koniler bulunmaktadır.

Foveola 350 mikron çaplı ve 150 mikron kalınlığında, yalnız konilerin yer aldığı fovea çukurluğudur. Avasküler foveola kapillerlerin oluşturduğu bir halka ile çevrelenir. Foveola merkezinde çapı yaklaşık 150-200 mikron olan ve en keskin görmeyi sağlayan umbo yer alır.

Parafovea foveayı çevreleyen, 0,5 mm genişliğindeki bölgedir. İç retina tabakasında, özellikle iç nükleer ve ganglion hücre tabakasında belirgin hücre artışı ile karakterizedir.

Perifovea 1,5 mm genişliğindedir ve dış sınırı fovea merkezinden 2,75 mm uzaktadır.

2.1.3. Ora Serrata

Retina ile silier cisim arasındaki sınıra ora serrata denilir. Limbustan uzaklığı temporalde 7 mm, nazalde 5 mm'dir. Periferik retina ora serrataya doğru ilerledikçe attenue olur.

2.1.4. Vitreus

Vitreus arka kamara arkasındaki tüm globu dolduran, berrak, transparan, jel benzeri bir maddedir. Hacmi 4 cc'dir ve volümü glob volümünün yaklaşık üçte ikisidir. %99'u sudan oluşur ve özgül ağırlığı 1.0053-1.0089 arasındadır. Vitreus hyaluronik asit içeren sıvı fazda ve kollajen benzeri madde içeren katı fazda olabilir. Vitreus korteksi yaklaşık 100 µm kalınlıktadır ve ön ve arka hyaloidi içerir. Tüm vitreusu çevreler ve kollajen fibrilleri, hücreler, proteinler ve mukopolisakkaridlerin kondansasyonundan oluşur.

2.1.5. Retina Kan Dolaşımı

Retinanın dış pleksiform tabakaya kadar uzanan dış bölgesini, koryokapillaris ile koroidal dolaşım beslerken, iç kısmını da oftalmik arterin ilk dalı olan santral retinal arter ve dalları besler. Retina kapillerleri çoklu arteriyoler bağlantılar içerir. Kapillerler, sinir lifleri katında yüzeyel ağ, iç nükleer katta intraretinal ağ olmak üzere birbiriyle ilişkili iki kat oluştururlar. Retina kapillerlerinde endotel hücreleri düzenli bir dizilim gösterir ve terminal barlarla birbirine bağlı olup kan-retina bariyerini oluştururlar. Bu hücrelerden bazal membranları ile ayrılan ve perisit denen intramural hücrelerin de bu bariyerin korunmasında önemli rolleri vardır. Retina venleri de esas olarak arterlerin dağılımını izler. Az miktarda bağ doku ile desteklenen bir endotel katından oluşurlar. Santral retinal ven arterin girdiği yerden optik siniri terk eder.

2.2. Retina Pigment Epiteli Özellikleri

Retina pigment epiteli (RPE) sensörial retina ile Bruch membranı arasında yerleşmiş olup tek sıra küboidal hücrelerden oluşmuştur ve yaklaşık 5 milyon pigment hücresi bazal laminasına sıkıca tutunmuştur. Zengin damar ağından oluşmuş

koryokapillaris ile fotoreseptörler arasında yerleşiktir. Görme sisteminin bütünlüğünün korunmasında çok sayıda kritik göreve sahiptir. Bu görevlerin başında fotoreseptörlerin dökülmüş olan dış segmentlerinin fagosite edilmesi, retinol metabolizması, ekstrasellüler matriksin düzenli olarak oluşturulup yerinde kalması, iyon ve metabolit naklinin düzenlenmesi gelmektedir. Erişkin gözünde normalde RPE içinde mitotik aktivite bulunmamaktadır. Hücre büyüklüğü 10 µm ile 60 µm arasında değişir. RPE hücrelerinin yoğunluğu fovea merkezinden perifer retinaya doğru giderek azalır. RPE hücrelerinin apeksi fotoreseptörlerin dış segmentleri ile yüz yüze olup RPE tabanı alttaki Bruch membranına sıkı yapışıklık gösterir. RPE bazal membranı Bruch membranının en iç tabakasına karşılık gelir.

Retina ve RPE subretinal boşluk dediğimiz potansiyel bir aralık ile ayrılmışlardır. Apikal hücre membranı 3-7 µm uzunluğunda çok sayıda mikrovillüs ile karakterizedir. Villüsler fotoreseptörlerin dış segmentleri ile parmaklı bağlantılar oluşturur ve bu yapılanma retina ve RPE arasındaki anatomik olmayan yapışıklığın sürdürülmesinde önemli etkindir çünkü retina ve RPE arasında sıkı kavşak bağlantıları bulunmamaktadır. Retina-RPE temasının devamını sağlayan diğer etken ise ekstrasellüler matriks ve RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden salınan nöral hücre adezyon molekülüdür (N-CAM). Ekstrasellüler matriks içinde laminin ve fibronektin gibi adezyon moleküllerinin bulunmaması ve anatomik bağlantının olmaması nedeni ile patolojik durumlarda sensöriyel retina pigment epitelinden kolayca ayrılabilir. RPE hücreleri apikal membranında yerleşik olan Na^+/K^+ ATPase pompa sistemi RPE tarafından koroide olan aktif sodyum akımında kritik rol alır. RPE hücrelerinin lateral yüzleri zonula okludens ve zonula adherens kavşakları ile birbirine sıkı yapışiktir. Bu kavşaklar makromoleküllerin koryokapillaris ile yer değiştirdiği yer olan subretinal aralığı geçişlere kapatır ve Verhoeff membranı adını alır. Bu bağlantı sayesinde yüksek transepitelial direnç ve kan retina bariyeri oluşur. Bu bağlantı moleküllerinin bazıları koroidden dış retina katlarına besin taşınması ve aksi yönde su, iyon ve atıkların atılmasından sorumludur. Bazolateral hücre membranlarında da bulunan Gap kavşakları hücreler arası iyon ve metabolit değişiminde görev yapar (36-38). Retinanın RPE ile olan yapışıklığı aktif ve pasif olan güçler tarafından sağlanır ve devam ettirilir. Vitreus jelinin endotamponat sağlaması, transretinal sıvı gradienti, fotoreseptörler arası madde ve koroidin osmotik basıncı pasif güçleri

oluşturur. RPE apeksinde yerleşik $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pompası ve sekonder olarak HCO_3 transport sistemi ile subretinal boşluktan su ve elektrolitleri aktif olarak dışarı pompalayarak retinanın yatışıklığını devam ettirir. RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden salınan N-CAM'da retinal yatışıklığın sağlanmasına katkıda bulunur.

2.2.1. Kan-Retina Bariyeri ve Transepitelial Transport

Dış kan retina bariyeri anatomik olarak RPE hücreleri tarafından oluşturulur. RPE hücreleri hem bu bariyeri oluşturur hem de fenestre koryokapillaris ve dış retina katları arasındaki sıvı ve molekül alışverişini kontrol eder. Bunu RPE hücreleri arasındaki sıkı kavşak-bağlantı kompleksleri ve RPE membran proteinlerinin polarize dağılımı sağlar. Kavşak bağlantılar üç komponentten oluşmuş olup (zonula adherens, gap junctions ve zonula okludens), RPE hücreleri arasındaki güçlü elektriksel bağlantı ve dış kan-göz bariyerini oluşturur. Sıkı bağlantılar hücreler arası sıvı difüzyonunu engellediği için molekülerin yer değişimi bizzat RPE hücrelerinin içinden gerçekleşir.

RPE hücrelerinin apeksindeki mikrovillüsler ve tabanındaki plazma membran katlantıları hücrenin yüzey alanını oldukça genişletir ve besin ve katabolitlerin değişimi görevinde önemli rol oynar. Retinanın yatışık kalmasında RPE hücrelerinin subretinal boşluktan sıvıyı çektiklerinde gelişen emme mekanizması rol oynamaktadır. Su ve elektrolitlerin subretinal aralıktan dışarıya aktif olarak pompalanması $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pompası ve HCO_3 transport sistemi ile gerçekleştirilir. Akuaporin insan RPE hücresinde bulunmakta ve tek sıra RPE içinden suyun transportunu kolaylaştırmaktadır (39-42). RPE apikal yüzünde yerleşik olan $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase sodyum ve potasyum iyonlarının plazma membranından geçişini kontrol eder ve fotoreseptörler arası maddede bu iyonların dengede kalması ve membran potansiyellerin oluşmasını sağlar. Işık subretinal aralıktaki K^+ konsantrasyonunu azalttığı için $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase aktivitesinin değişmesi ile RPE hücrelerinin transport fonksiyonunu etkilemektedir (40).

2.2.2. Görsel Siklus ve Vitamin A Metabolizması

Retinada görme fotoreseptör dış segmentlerinin disk membranlarında ışığa duyarlı pigmentlerin fotolizi ile başlar ve rejenerasyonu ile devam ettirilir. Döngü süreci fotoreseptörler ve RPE arasında retinoidlerin yer değiştirmesine bağlıdır. Işığa duyarlı görme pigmentlerinin tümünün içeriğinde A vitamini yer almaktadır. Üç adet sitozolik retinoid-bağlayıcı protein bulunur. Bunlar all-trans-retinol için hücresel retinol-bağlayıcı protein (CRBP), 11-cis-retinal için hücresel retinaldehit-bağlayıcı protein (CRALBP) ve all-transretinol için yüksek afinitesi olan RPE65 proteindir (retina pigment epitel duyarlı protein 65kDa) (43, 44).

Transport mekanizmaları kandan retinolün alınması yanında fotoreseptörler ile RPE arasında retinolün değişimi için kullanılır. Plazma membran reseptörüne bağlanan retinol esterifiye olur ve buradan CRBP'ye transfer olur. CRBP ve CRALBP pigment epiteli içinde retinoidlerin taşınmasında görev alırlar. RPE içindeki CRBP hücre içine alınan retinolü interfotoreseptör matriksi içine bırakır. Retinol interfotoreseptör matriksi içinden fotoreseptörlere ulaşır. İnterfotoreseptör retinoid bağlayıcı protein (IRBP), 11-cis-retinaldehidin RPE içinden fotoreseptörlere transferi ve all-trans-retinolün retinadan RPE içine transferinde aracı olarak çalışır.

2.2.3. Fotoreseptör Dış Segmentlerinin Fagositozu

RPE hücrelerinin fagositoz fonksiyonunda iki ayrı mekanizma söz konusudur. Birincisi yavaş ve nonspesifik olup yabancı maddelerin fagositozunda etkindir. İkincisi ise dökülmüş olan dış segmentlerin hızlı ve reseptör aracılı alınmasında etkindir. Bu sayede diurnal olarak dökülen fotoreseptörlerin dış segmentleri distal uçları yenilenebilmektedir. İnternalizasyon basamağı ile hücre içine alınan segmentlere sindirici enzimler içeren lizozomlar yapışarak fagolizozomlar oluşur. Lizozomal enzimler fagolizozom içinde hapsedilmiş olan dış segmentleri hidrolize ederek küçük moleküllere dönüştürür. Bu küçük moleküller hücre içine dağılarak tekrar kullanılırlar. Sindirilemeyen materyal ise hayat boyu hücre içinde birikir ve birleşerek lipofussin granüllerini oluşturur (45-49). RPE hücresi bu degradasyon süreci sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen ara ürünlerinin etkilerinden kendisini bir grup antioksidan enzimler ile savunur.

2.2.4. Işığın Emilimi ve Fotooksidasyona Karşı Koruma

Retina ışığa doğrudan ve sık olarak maruz kalan tek nöral dokudur. Bu durum retinal hücrelere son derece toksik olan lipid peroksidasyonunu kolaylaştırır. Ayrıca retina vücudun nispeten en çok oksijen tüketen ve dolayısı ile yüksek oranda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açan bir dokudur. RPE hücreleri bu yüksek oksidatif stresin dengelenmesinde çok önemli rol oynar. RPE’de bulunan melanin ve lipofussin gibi pigmentler farklı dalga boylarına ve özel dalga boyuna bağlı risklere karşı özelleşmişlerdir. RPE hücreleri enzimatik antioksidan olarak yüksek oranda süperoksit dismutaz ve katalaz, enzimatik olmayan antioksidan olarak da lütein, zeaksantin veya askorbat gibi karotenoidleri içerir. Glutasyon ve melanin de antioksidan savunma sistemine önemli katkıda bulunur. Melanin granülleri bazal yüze daha yakındırlar ve ışığın emilimi yanında hücre içindeki fotokimyasal olayların sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerin bağlanmasında önemli rol oynarlar (40, 43). Melaninin ışığı absorbe etmesi etkili bir antioksidan görevi görerek RPE hücrelerini korur ve metabolik aktivitesini düzenler. Melanindeki yapısal veya fonksiyonel değişiklikler antioksidan kapasitenin kaybına neden olabilir (50).

2.2.5. İmmün Fonksiyon

RPE hücrelerinin sağladığı pasif bariyer yanında Transforming-growth factor-beta (TGF- β) gibi bağışıklık baskılayıcı sitokinlerin de aktif olarak sekrete eder. Enflamatuvar bir cevap varlığında, RPE enflamatuvar mediatörlerin faaliyetini engelleyebilir. RPE hücreleri aktif olarak tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) reseptörleri sekrete eder ve lokal olarak TNF- α etkisini inhibe edebilir. Gözün immün ayrıcalıklı bir alan olarak kalmasında hangi mekanizmaların çalıştığı tam olarak bilinmese de RPE hücrelerinin önemli bir rol üstlendiği açıktır.

2.2.6. Büyüme Faktörleri ve Sitokinler

RPE hücreleri TGF- β 2, bFGF, aFGF, FGF-5, HGF ve PDGF-A gibi faktörleri ve bu faktörlere karşılık gelen reseptörleri sekrete edebilir. Fibroblastik büyüme faktörleri tipik olarak RPE hücre proliferasyon ve migrasyonuna yardımcı olur. Sağlıklı gözde RPE tarafından sekrete edilen Pigment epiteli kaynaklı faktör (PEDF),

retina ve koryokapillarisin yapısal bütünlüğünün devamına yardım eder. RPE tarafından sentezlenen ve düşük konsantrasyonda sekrete edilen diğer bir vazoaaktif faktör olan VEGF endotelial hücre apoptozisini önler ve koryokapillarisin sağlam endotele sahip olması için gereklidir. ApoA1 tüm retina katlarında bulunmakla beraber ana kaynağının RPE olduğu düşünülmektedir. ApoA1 retinayı oksidatif stresten korur ve lipotoksisiteyi engeller veya duraklatır (51, 51-54)

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Başka bir ifadeyle serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir (55, 56). Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler (57, 58). Her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü artırır, dolayısıyla serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (59-62). İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan O₂ yapısı gereği radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla ‘ROT’ ifade edilmektedir. ROT ve serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar (63). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (64).

Fizyolojik olarak serbest radikaller endojen kaynaklı olarak indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında bol miktarda üretilir. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı (parasetamol, nitrofurantoin

gibi), solventler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler (62, 65, 66).

Serbest radikaller vücutta 3 yolla meydana gelir:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, iki adet reaktivite düzeyi yüksek serbest radikal oluşur (58).

2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücreyel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur (62, 67).

3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. O_2 'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin ($O_2^{\cdot-}$) oluşumuna neden olur (68).

Bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal olmayan türler radikal haline gelir (69). Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (62, 64, 67).

Organizmada oluşan serbest radikallerin en önemlileri ve büyük kısmı O_2 kaynaklı radikallerdir(70). O_2 'in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür (71). O_2 'in kısmi indirgenmesinden, ROT arasında yer alan $\cdot OH$ ve $O_2^{\cdot-}$ oluşmaktadır. Ayrıca $^1O_2$ ve H_2O_2 molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (72).

2.4. Antioksidanlar

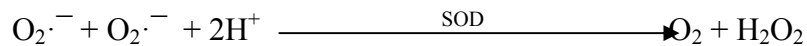
Serbest radikal reaksiyonları nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (68). ROT'un yarılanma ömürleri kısadır fakat başlattıkları serbest radikal zincir reaksiyonları ile doku hasarına sebep olmaktadır (73). Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (62, 68).

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir (74). Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir. SOD'un yapısında bakır (Cu), çinko (Zn) ve manganez (Mn), GSH-Px de ise selenyum (Se) iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar (75-77). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise C ve E vitaminleri, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten sorumludur. SOD, GSH-Px ve KAT enzimlerinden ayrı olarak C ve E vitaminleri de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir (78). Her ikisi de hücre membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (68, 74, 79).

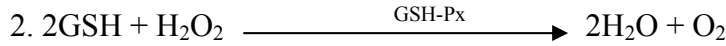
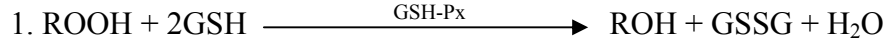
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

Başlıca antioksidan enzimler: SOD, KAT ve GSH-Px' dir (80).

Süperoksit Dismutaz (SOD): $O_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. SOD, hücrelerdeki $O_2^{\cdot-}$ düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir $O_2^{\cdot-}$ radikalini yükseltirken, diğer $O_2^{\cdot-}$ radikalini H_2O_2 'e indirger (81) .



Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): GSH-Px, glutasyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (73).



GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) indirgerken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldırabilme özelliğine sahiptir(61).

Selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere farklı substratlar kullanan iki tip GSH-Px vardır. Selenyumdan bağımsız formu organik H_2O_2 moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (60).

Fagositik hücrelerde majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev yapan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Endoplazmik retikulumdan salınan H_2O_2 'in dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GSH-Px aktivitesindeki azalma, H_2O_2 'in artmasına ve hücrede şiddetli bir hasara yol açmaktadır (73).

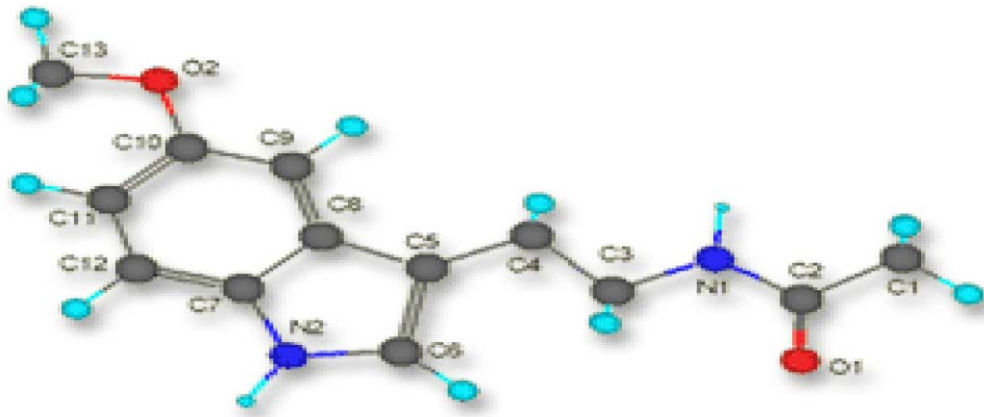
Ayrıca GSH-Px, araşidonik asit metabolizmasının iki temeli olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarının aktivasyonunu arttırarak, tümör oluşumunda anahtar rol oynar.

Glutasyon (GSH): GSH, sistein içeren bir tripeptit yapısında olup in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve ekzojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (74).

GSH, DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkindir; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar (82).

2.5. Melatonin

Melatonin (MEL) ilk kez 1958 yılında kurbağa ve balıkların melanositlerinde bulunan bir renk pigmenti olarak tanımlanmış ancak daha sonra 1993 yılında melatoninin bütün memeli hayvanlarda bulunan ve pineal bezden salınan ve canlıların biyolojik ritmini düzenleyen bir hormon olduğu gösterilmiştir. Hatta 1996 yılından sonra da omurgasızlar ve protozoalar da dahil olmak üzere birçok canlının yapısında varlığı ispatlanmıştır (83). Melatoninin kimyasal yapısı şekil 1’da gösterilmiştir.

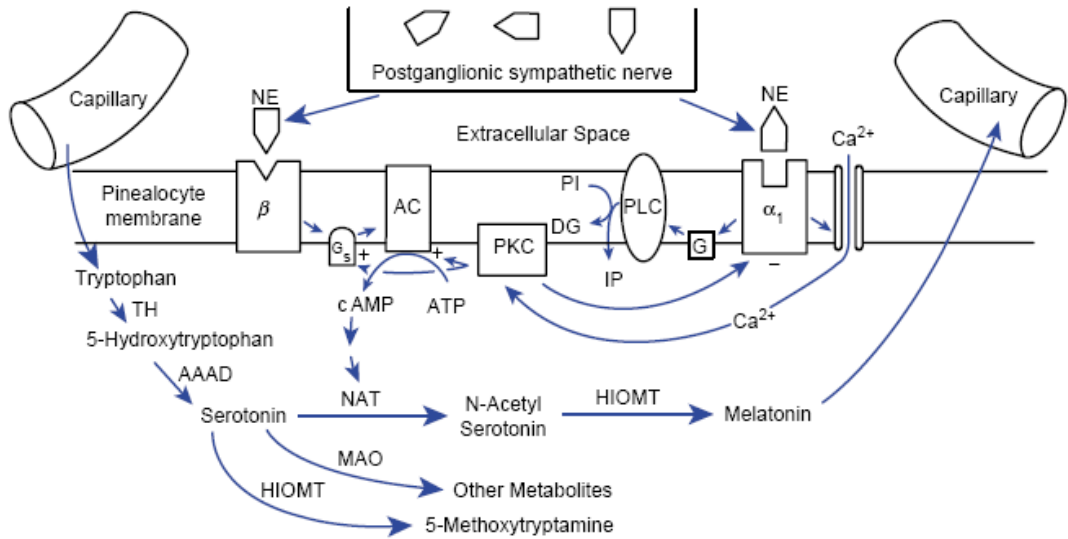


Şekil 1. N-asetil-5 metoksitriptamin (Melatonin)’in kimyasal yapısı

Pineal bez (epifiz bezi), insanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alır. Total vücut ağırlığına göre oldukça küçük olan bu bez (insanlarda 50-150 mg), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır. Bezin yapısı, bez hücrelerinin çoğunu oluşturan ve gerek indolaminleri (çoğunluğu melatonin) gerekse peptidleri (arjinin, v.b) üreten pinealositler ve nöroglia hücreleri olmak üzere iki hücre türünden oluşur. Pineal bez, memelilerde fotik bilgileri nöroendokrin sinyallere dönüştürür. Retinadan algılanan görsel bilgiler, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği ve sempatik sinir sistemi yoluyla, pineal beze yansıtılır (84). Fotik impulslar taşıyan sempatik efferent lifler pineal beze ulaştığında, özellikle karanlıkta, norepinefrinin pinealosit membranında beta-adrenerjik reseptöre bağlanması ile bir seri reaksiyon başlar.

2.5.1. Melatonin Sentezi

Melatonin diğer adıyla N-asetil-5-metoksitriptamin ilk kez sıgır pineal ekstrelerinde melanin granüllerini agrege etme ve kurbağa derisinin rengini açma yeteneği fark edilerek tanımlanmıştır. Melatonin biyosentezi, kandan beze difüze olan triptofanın, pineal bezde triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmesiyle başlar. Böylece meydana gelen 5-hidroksi triptofan, L-aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybeder ve neticede serotonin (5-hidroksi triptamin) meydana gelir. Pineal bez, serotonin konsantrasyonu açısından vücutta en zengin organdır. Serotonin asetilasyonu, N-asetil transferaz aracılığı ile gerçekleşir. Burada Asetil CoA, asetil donörü olarak rol oynar. Meydana gelen N-asetil serotonin, metil donörü olarak S-adenozilmetionin'in kullandığı ve hidroksi indol-O-metil transferaz'ın katalizlediği son basamakta N-asetil 5-metoksitriptamin; melatonin'e dönüşür ve böylece melatonin biyosentezi tamamlanır (84, 85).

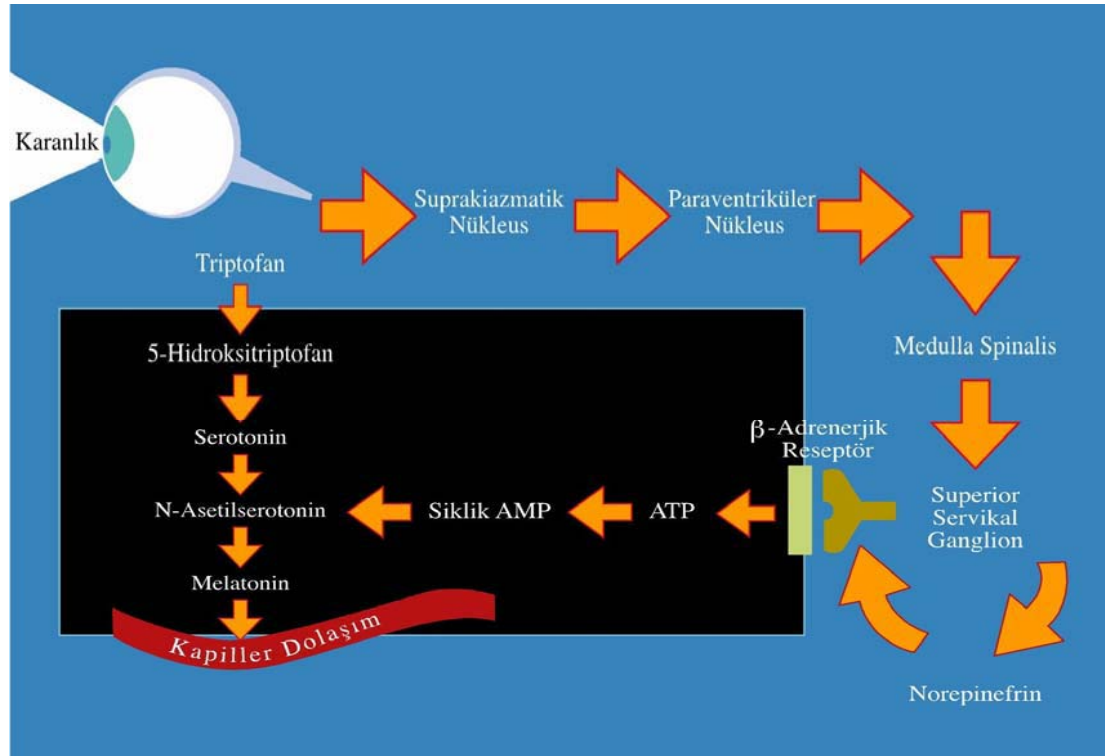


Şekil 2. Melatonin sentezi (Hardeland et al., 2006)

2.5.1.1. Melatonin Sentezinin Kontrolü

Melatonin salgısı, canlı türlerine göre farklılık gösteren sirkadiyen bir ritme sahiptir. Bu farklılık, hormonun gece pikinin meydana geldiği saatler ve süreleri ile ilgilidir. Serum melatonin konsantrasyonu, geceleri gündüze göre 3-10 kat daha yüksektir. Melatonin salgısının sirkadiyen ritmi endojen kökenlidir, bu da uyarıların

suprakiazmatik çekirdekten çıktığını yansıtır (85). Melatonin sentezi ve salgılanması karanlıkta uyarılırken, ışık ile baskılanmaktadır.



Şekil 3. Melatonin sentezinin kontrolü (Reiter 1991).

2.5.2.2. Melatoninin Etki Mekanizması

Pineal bezden dolaşıma verilen melatonin lipofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır (86). İnsan beyninin çeşitli bölgelerinde, retina, bağırsaklarda, overlerde, kan damarlarında ve karaciğerde, melatonin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Farmakolojik ve kinetik gruplara ait zara bağlı iki melatonin bağlanma yeri tanımlanmıştır:

1-MT1 (yüksek afinite (pikomolar)) yerleri

2-MT2 (düşük afinite (nanomolar)) yerleri (87, 88).

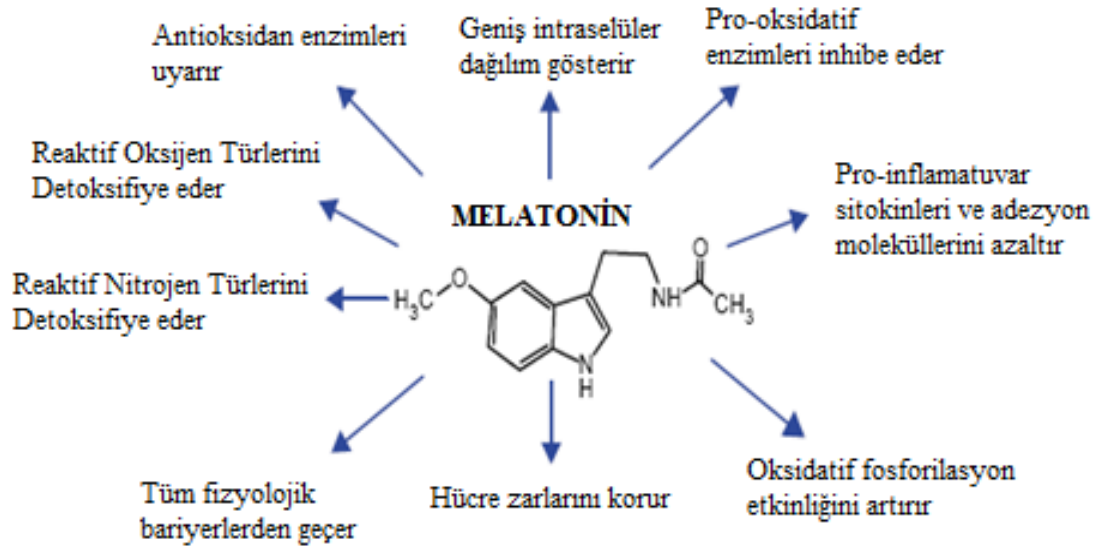
MT1 reseptörlerinin aktivasyonu hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesinin baskılanmasına neden olur (89). MT1 reseptörü aracılığı ile termoregülasyonda, arterial vazokonstriksiyonda, kanser hücrelerinin proliferasyonunda, üreme ve metabolik fonksiyonlarda rol alır. MT2 reseptörü aracılığıyla ise, supra kiazmatik nükleus (SCN)'daki nöronal termoregülasyonda, retinada dopamin salgısının

inhibisyonunda, vazodilatasyonun indüklenmesinde, arterial yatakta lökosit rulo formasyonunun oluşumunun engellenmesinde ve immun cevabın artırılmasında rol oynadığı bilinmektedir (90).

2.5.2.3. Melatoninin Antioksidan Etkisi

Melatonin beyindeki pineal bezden ışık ritmine bağlı olarak salgılanmakta olup, kanser gibi hastalıklarda serbest radikaller inhibisyonu yolu ile kuvvetli antioksidan özelliğe sahip olduğuna dair son 10 yıl içerisinde bildirimlerin arttığı gözlenmektedir (26, 86).

Melatonin yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle $\cdot\text{OH}$ ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Melatoninin antioksidan etkileri Şekil 4'de gösterilmiştir. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, bütün hücre kompartmanlarındaki biyomolekülleri, serbest radikal oluşumuna karşı bölgesel olarak yerinde korur (91). Çok reaktif olan hidroksil radikallerinin yıkıcı etkilerine karşı primer nonenzimatik savunma mekanizmasını oluşturur ve yapılan araştırmalarda organizmayı oksidatif hasara karşı korumada melatonin bilinen diğer antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, E vitamini, askorbik asit gibi) daha etkili görülmüştür (26). Askorbik asit (C vitamini), α - tokoferol (E vitamini) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanlardan farklı olarak, melatonin peroksit radikalini yakalayarak, yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır. Melatoninin bu etkilerinin diğer antioksidanlardan daha güçlü olduğu, in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (92). Melatonin direkt antioksidan etkilerinin yanı sıra, dolaylı olarak da antioksidan sisteme katkıda bulunur. Sıçanlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesinin, melatonin uygulandıktan sonra arttığı gözlenmiştir. Pinealektomi yapılan sıçanların karaciğer, akciğer ve beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesinde anlamlı düşüşler saptanmıştır (26, 92).



Şekil 4. Melatoninin antioksidan fonksiyonu

2.6. Amfenak'ın Genel Özellikleri

Amfenak (2-amino-3-benzoylbenzeneacetic acid) NSAİ bir ilaçtır. NSAİ'lar COX yolunu engelleyerek prostaglandin üretimini sınırlar (34). Prostaglandin oluşumu, operasyon sonrası inflamasyon ve kistoid maküla ödeme yol açan başlıca nedensel faktördür. Nepafenak, amfenak'ın amid analogudur ve nepafenak, metabolik dönüşüm ile göz içi dokular tarafından hidrolize olarak güçlü bir siklooksijenaz inhibitörü olan amfenak'a dönüşür (93). Amfenak hem COX1 hemde COX2 yolunu inhibe etmektedir. Bu dönüşüm korneada sınırlı olmakla beraber asıl olarak iris-siliyer cisim ve koroid-retinada gerçekleşmekte ve anlamlı bir biyoaktivasyon gerçekleşmektedir. Nepefenak retina ve koroid'de prostaglandin E2 (PGE2) sentezini anlamlı şekilde azaltmaktadır. Ayrıca PGE2 aracılı kan retina bariyeri yıkımını ve vitröz dokuda protein ekstravazasyonunu anlamlı şekilde inhibe eder (94).

Amfenak'ın serbest radikal oluşumunu önleyici etkiside bulunmaktadır. Amfenak 0.1 mM derişimde rat PMN sinde önemli ölçüde opsonize zymosan ile başlatılmış O_2^- oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (35).

2.7. Hücre içi Kalsiyum (Ca^{+2}) Sinyali

Hayatın ilk basamağı olan fertilizasyondan başlayarak gen transkripsiyonu, kas kasılması, hormon salınımı, öğrenme, hafıza, hücrelerin farklılaşması, gelişmesi, nekroz ve apoptozla tanımlanabilecek hücre ölümü gibi birçok olaydan sorumlu olan bir hücre içi ikincil haberci olan kalsiyumun evrenselliği, birçok hücreyel reaksiyonda üstlendiği görevden kaynaklanmaktadır. İstirahat halindeki bir hücrede $[\text{Ca}^{+2}]_i$ konsantrasyonu yaklaşık olarak 100 nM civarındadır. Depolarizasyon, hormon aktivasyonu vb olaylar hücredeki $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artış mekanizmalarını tetikler ve $[\text{Ca}^{+2}]_i$ konsantrasyonu 1–3 μM seviyesine yükselir. Bu yükselmenin tüm fizyolojik olayları kontrol edebilmesinin sırrı hızı, genliği ve yer ve zamanla (spatio-temporal) ilgili modelinden kaynaklanmaktadır.

Ca^{+2} un sinyal üretimine yönelik fonksiyonu sitozolik miktarının artması ile doğru orantılıdır (95-98). Bu artış nukleusdan sızma yolu ile olabileceği gibi sadece mitokondriden tek başına da olabilir (99). Hücre içerisindeki kalsiyum konsantrasyonu, eş zamanlı birçok ters yönlü (counteract) etkileşim neticesinde artabilmekte veya azalabilmektedir. Ca^{+2} konsantrasyonu artış mekanizmaları hücre dışından hücre içerisine yönelik, hücre zarına yerleşik vaziyetteki iyon kanalları ile ve ER ve SR yüzeyindeki iyon kanalları vasıtası ile olmaktadır (100). Buna zıt olarak Ca^{+2} konsantrasyonu da hücre zarında ve ER/SR deki istihdam edilen Ca^{+2} ATPaz'lar, yoğunluk farklılığından kaynaklanan ve enerji harcanması ile neticelenen bir takım değiş-tokuş mekanizmaları ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$) tarafından sağlanır. $[\text{Ca}^{+2}]_i$ seviyesinin düzenlenmesinde mitokondri önemli rol oynar.

2.8. Hücre İçerisine Ca^{+2} Giriş Kanalları

Hücre içerisine Ca^{+2} un girişi büyük bir elektrokimyasal konsantrasyon farklılığının olması durumunda gerçekleşir (96). Hücreler bu dış kaynağı farklı özellikteki kanallar vasıtasıyla kullanırlar. Hücreler Ca^{+2} 'un hücre içerisine girmesine neden olabilecek aktivasyon mekanizmalarına göre gruplandırılmış farklı tipte kanallardan faydalanırlar. Bu kanallar;

1. Voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları (Voltage operated Ca^{+2} channels / VOCCs)

2. Reseptöre duyarlı Ca^{+2} kanalları (Receptor operated Ca^{2+} channels / ROCCs)
3. Mekanik olarak aktive olan Ca^{+2} kanalları (Mechanically activated Ca^{2+} channels)
4. Depolanmış Ca^{+2} miktarına duyarlı (Store operated Ca^{2+} channels / SOCCs)

başlıkları altında sınıflandırılabilirler.

2.8.1. Hücre içi Depolardan Ca^{+2} SALINIMI

Herhangi bir zamanda intrasellüler kalsiyum miktarı artış mekanizmaları olarak bilinen ve sitoplazmaya Ca^{+2} girişini temin eden reaksiyonlar ile bufferlar, pompalar ve değiş-tokuşcular ile Ca^{+2} un sitoplazmadan uzaklaşmasına yardımcı olan olayların denge halinde olması sonucu gerçekleşir. Hücre içerisinde kalsiyum salınımı birçok çeşit, haberci ile aktive olan kanallar vasıtası ile ve mitokondrial geçirgenliğin arttığı durumlarda gerçekleşir. Hücre içerisinde Ca^{+2} salınımı genellikle ER' den (ama bunun kas dokusundaki karşılığı olan SR' den de olabilir) kendisi aracılığı ile ya da;

a) $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$

b) siklik ADP ribose (cADPR)

c) nikotinik asid adenin dinükleotid fosfat (NAADP) ve

d) sphingosine-1-phosphate (SIP) gibi hücre içi depoların üzerine yerleştirilmiş Ca^{+2} salınım kanallarını uyarması sonucu gerçekleşir (101, 102).

RyRs aracılı

Hücre zarında bulunan reseptöre has birçok hormon ve büyüme faktörü ile Phospholipase C (PLC) nin aktive olmasına neden olur. PLC' de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ın hidrolizini katalize ederek hücre içi haberci olan inositol 1,4,5-triphosphate (InsP_3) ve diacylglicerolun oluşmasına neden olur. InsP_3 sitoplazma içerisinde çok hareketli bir durumdadır ve ER/SR üzerindeki özel reseptör bölgelerine karşılaştığı yerde bağlanır. Bu bağlanma olayı InsP_3Rs nin konformasyonunda değişikliğe neden olur. Bu da ER/SR içerisindeki yüksek

konsantrasyonda depolanmış Ca^{+2} un sitoplazma içerisine salınmasına neden olur (moleküler ağırlığı ~1200 kDa).

Sphingolipid aracılı

Sphingosylphosphorylcholine (SPC) ve sphingosine-1-phosphate (S-1-P) gibi endoplazmik retikulumdaki (SCaMPER) Ca^{+2} salınım kanallarını aktive eden bir sphingolipid türevi proteindir. Kalp kası, pankreas ve karaciğer gibi farklı dokularda bulunabilen, InsP3Rs veya RyRs den daha düşük molekül ağırlığına sahiptirler (~20 kDa) (103).

2.8.2. Hücre içi Ca^{+2} Salınım Habercileri

Inositol-1,4,5-triphosphate

Hormon veya büyüme faktörlerinden herhangi birisi hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlandığında PIP_2 den PLC vasıtası ile InsP_3 sentezlenir (100). PLC hem diaçilgliserol hem de InsP_3 düzeylerinde yükselmelere neden olur ve bu yükselmeye protekin kinase C nin aktive olmasına neden olur. InsP_3 hücre zarında üretilmesiyle birlikte yayılabilme özelliği yüksek olan bir maddedir. Bu özelliği ile hücre sitoplazmasından hızla geçebilir.

cADPR ve NAADP

Bu iki molekül aynı enzimatik yolak tarafından üretilmelerine rağmen, farklı mekanizmalarla hücre içi Ca^{+2} salınımına neden olmaktadır (83).

Cyclic ADP ribose (cADPR) RyRs aracılığı ile Ca^{+2} salınımına neden olmaktadır. cADPR nin bu etkisi NAD^+ türlerinin denizkestanesi yumurtaları üzerinde Ca^{+2} salınım metabolizmasına etkisinin araştırıldığı dönemlerde bulunmuştur. cADPR $\beta\text{-NAD}^+$ den ADP-ribosyl siklaz tarafından sentezlenmektedir (83). Memeli hücreleri ADP ribosyl siklazın hem sentez hem de hidrolizinde görev alan CD-38 maddesini içerirler. CD-38 bileşiğinde de $\beta\text{-NAD}^+$ dan cADPR sentezlenmesini veya NADP den NAADP sentezlenmesini sağlar. Ancak bu olay ekstrasellüler olarak gerçekleşmektedir.

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 3173-TU 2-12 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Materyal

ARPE-19 hücreleri American Type Cell Culture (ATCC) firmasından DATEKS Teknik Sistemler, Ankara, Türkiye aracılığı ile alındı. Biyofizik A.D. hücre kültürü laboratuvarında HAM's F12 ve DMEM hücre kültürü mediumları %50 oranında eşit oranda karıştırılarak, hücreler steril inkübatörlerde üretildiler. Amfenak, Alcon® firmasından temin edildi.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)
2. Laminar Flow Kabini: Jouan B4I (Fransa)
3. Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
9. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
10. Floresan spektrofotometre:(Cary Eclipse, Varian Firması, Avustralya)
11. CO₂ inkubator: (Heal Force, Smart Cell, Japonya)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tris, Merck (Almanya)
2. Sodium Chloride, Merck (Almanya)
3. Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)
4. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Solusyonu

5. HAM's F12 medium
6. EDTA, Merck (Almanya)
7. EGTA, Merck (Almanya)
8. Triton X-100, Sigma (Almanya)
9. Metanol, Merck (Almanya)
10. Hydrochloric Acid, Merck (Almanya)
11. Bakır Sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Merck (Almanya)
12. Folin-Ciocalteu's Phenol, Merck (Almanya)
13. Potassium Tartarat, Merck (Almanya)
14. Sodium Carbonate (Na_2CO_3), Merck (Almanya)
15. Fura-2-AM, Invitrogen (ABD)
16. DMSO (Dimethyl sulphoxide) Hybri-Max, Sigma (Almanya)
17. CHPO (Cumene hydroperoxide), Merck (Almanya)
18. 5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid) (DTNB), Sigma (Almanya)
19. Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Biochrom (Almanya)
20. Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de H  en (Almanya)
21. TCA (trichloroaceticacid), Merck (Almanya)
22. Sodyum Selenit, Sigma (Almanya)
23. Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Sigma (Almanya)
24. Caspaz-3, Sigma (Almanya)
25. Caspaz-9, Bachem (  svi  re)
26. Dihydrorhodamine-123 (DHR-123), Sigma (Almanya)

Gruplar

Grup I (kontrol): Bu gruptaki hücreler herhangi ilave bir uygulama yapılmayacaktır.

Grup II (ışık): Bu gruptaki hücrelere 24 saat boyunca 405 nm dalga boyunda ($1\text{mW}/\text{cm}^2$) ışığa maruz bırakılacaktır.

Grup III (amfenak): Bu gruptaki hücreler 1 μM Amfenak ile 24 saat süre ile inkübe edildiler.

Grup IV (melatonin): Bu gruptaki hücreler 200 μM doz ve 3 gün süre ile melatoninle inkübe edildiler.

Grup V (ışık + amfenak): Bu gruptaki hücelere 24 saat boyunca 405 nm dalga boyunda ($1\text{mW}/\text{cm}^2$) ışığa maruz bırakılacaktır ve ışık uygulamasından önce 1 μM Amfenak ile 24 saat süre ile inkübe edildiler.

Grup VI (ışık + melatonin): Bu gruptaki hücelere 24 saat boyunca 405 nm dalga boyunda ($1\text{mW}/\text{cm}^2$) ışığa maruz bırakılacaktır ve ışık uygulamasından önce 200 μM doz ve 3 gün süre ile melatoninle inkübe edilecektir.

Grup VII (ışık + amfenak + melatonin): Bu gruptaki hücelere 24 saat boyunca 405 nm dalga boyunda ($1\text{mW}/\text{cm}^2$) ışığa maruz bırakılacaktır ve ışık uygulamasından önce 1 μM Amfenak ile 24 saat ile amfenak ve 200 μM doz ve 3 gün süre ile melatoninle inkübe edilecektir (104, 105).

3.1.3. Hücre Canlılığı (MTT Analizi)

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] analizi ilk olarak Mosmann tarafından kullanıma girmiştir (106). MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrojenaz aktivitesine bağımlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Reaksiyon ürünü uygun karışımda çözüldükten sonra spektrofotometrik yöntemle ölçülür (107). Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır (108). Hücre canlılığı ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması, radyoaktif izotop kullanmaya gerek olmaması avantaj olarak kabul edilir (109, 110).

3.1.4. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü

3.1.4.1. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) ve Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in (111) bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

1- %10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu

2- Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48,46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH: 8,9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

Deneyin yapılışı: 0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. 0,1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (112) tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan Solusyonlar:

1- Tris (1) HCl tampon solusyonu (50 mM) pH:7,6

2- GSH solüsyonu

3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu

4- %10 TCA solüsyonu

5- Tris (2) tampon 0,4 M pH: 8,9

6- DTNB solüsyonu

Tablo 1. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi.		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı.		
Üzerine Tris tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

Deneyin Yapılışı

- Hücre homojenatı 0.5 ml
- Tris HCl tamponu eklendi. 0.3 ml
- CHPO ilave edildi. - 0.1 ml
- GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu) 0.1 ml
- Oda ısısında tam 10 dakika beklendi
- TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu) 1.0 ml
- 2500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi
- Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı
- Üzerine Tris tampon eklendi. 2.0 ml
- DTNB eklendi. 0.1 ml
- Oda ısısında 5 dakika beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

3.1.5. Hücre İçi Ca^{+2} Salınımının Ölçülmesi

Hücre içi Ca^{+2} salınım miktarının ölçümü için arka kök gangliyon hücreleri 37 °C de 45 dakika boyunca 4µM Fura-2-AM floresan boyası ile boyandı (Bejarano and Terron 2007). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na^+ -HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl_2 , 1,2; MgCl_2 , 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometredeki (Varian Cary Eclipse, Sydney, Avustralya) haznesine yerleştirildi. Fura-2-AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm de floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile daha önceki yayınlarda (113) belirtildiği şekilde kaydedildi ve Grynkiewicz ve ark. metoduna göre hesaplandı (114).

3.1.6. Lipit Peroksidasyon Analizi

ARPE-19 hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının (115) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV- 1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: Tüm ARPE-19 hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C'lik su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.

3.1.7. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi

Her bir ependorf tüpü içerisinde 10^6 hücre olacak şekilde hücreler konuldu. Her bir ependorfa 15 mikrolitre MTT kimyasalı ilave edildi. MTT kimyasalı ilavesinden sonra bütün ependorflar 5-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37 °C’de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında bütün ependorflar 500 g de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Her bir ependorfa 400’er mikrolitre DMSO ilave edildi. Pelet DMSO içerisinde resuspense edildi, sonra her bir küvete 250 mikrolitre bu örnekten konuldu. Spektrofotometrede 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı (Abs490 nm – Abs650 nm: x) (113).

3.1.8. Kaspaz -3 ve -9 aktivitelerinin Tayini

Öncesinde bir saat süre ile 37 C de 2 mL substrat solüsyonu (20 mM HEPES, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1% CHAPS, 5 mM dithiothreitol (DTT), ve 8.25 μ M kaspaz substratı; pH 7.4 olacak şekilde ayarlanacak) içerisinde inkube edilecek hücreler sonrasında ultrasonik parçalama işlemine tabi tutuldu (3,4). Sonrasında açığa çıkan enzimler spektrofloreometre (Tecan Infinite M200, Austria) cihazında 360 nm uyarılma ve 460 nm emilme dalga boylarında okundu. Kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri floresan boylara ile boyanarak değerlendirildi (AC-DEVD-AMC Kaspaz-3 ve AC-LEHD-AMC Kaspaz-9 için). Elde edilen veriler floresan birimi / miligram protein olarak değerlendirildi.

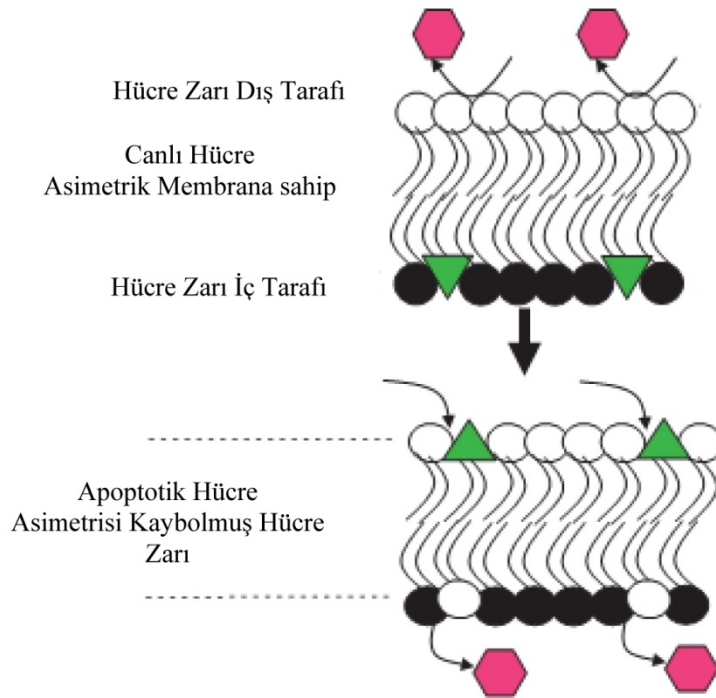
3.1.9. Apoptosis

Uzun süren internal ve eksternal kontrol ve ikinci bir kontrol safhasından sonra hücrenin kendi-kendini imha sürecine girmesine izin verilir. Bir hücrenin erimesi (melt-down) kendi içerisinde oluşan bir durumdur. Bütünlüğü bozulmamış, sağlam bir hücre zarı içerisindeki interior bileşenler ve yapısal elementlerin parçalanmasıyla hücre erimesi süreci başlatılır. Apoptotik hücre membranları çoğunlukla fosfolipit içeren bilayer yapılarını hemen kaybetmezler. Bu korumalı birim bazı yangısal cevaplara sebep olabilecek hücre bileşenlerinin salınmasının

önüne geçer. Bu son safhada bütün geri kalan atıklar ve son ürünler bilayer zar ile etrafları kaplanır. Minik boyutlarda paketçikler haline dönüşen apoptotik artıklar fagositoz ve yutma yeteneğine sahip komşu hücreler tarafından toplanır ve sindirilir. Bu nedenle apoptoz diğer hücreler için zararsız bir süreç halini alır. Bu aynı zamanda daimi bir homeostazisin devam ettirilmesi için gereklidir.

Apoptoz esasen fizyolojik bir süreçtir. Özellikle embriyonik gelişim ve erken büyüme sürecinde görevini tamamlamış, hücrelerin bertaraf edilmesinde önemli bir rolü vardır. Aynı zamanda yetişkin hayvanlarda bu süreç onarılması olanaksız, hücrelerin yok edilmesi için de işletilmektedir.

Bunun yanı sıra apoptotik süreç kanser gibi birçok hastalığın oluşmasına da yol açmaktadır. Yapısı değişmiş tümör hücreleri kendi apoptotik süreçlerini engellemekte ve hücrenin kontrolsüz bir biçimde faaliyetini sürdürmesine izin vermektedir. Ya da bunun tersine bazı nöronal hücrelerin aşırı apoptotik faaliyet göstermesi bunama (demans) ile sonuçlanabilmektedir.



Şekil 5. Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellemesi
(Biocolor, APOPercentage apoptoz kitinden)

3.1.10. ROT Üretimi

ARPE-19 hücreleri 2 μ M dihydrorhodamine-123 (DHR-123) ile sallamalı su banyosunda 37°C de 30 dakika boyunca inkübe edildiler, daha önce anlatıldığı gibi (116). Bu kimyasal normalde, hücre dışında herhangi bir floresan özellik göstermemektedir. Hücre içerisine girdiğinde rhodamine-123 (Rh-123) bölümü, hücre içerisinde meydana gelen oksidasyon ile aktive olmakta ve floresan özellik göstermektedir. Rh-123 maddesinin oluşturduğu floresan ışık tam otomatik mikropate okuyucu (Tecan Infinite M200) ile gerçekleştirildi. Bu işlem yapılırken eksitasyon dalga boyu 488 nm ve emisyon 543 nm ye ayarlandı. Elde edilen veriler kontrol grubuna kıyasla misli artış/azalış şeklinde ifade edildi (Fold Increase).

3.1.11. Protein Tayini

Çalışmamızda yapılan protein tayini deneyleri tüm örneklerde Lowry ve arkadaşlarının (117) tanımladığı yöntemle göre yapıldı.

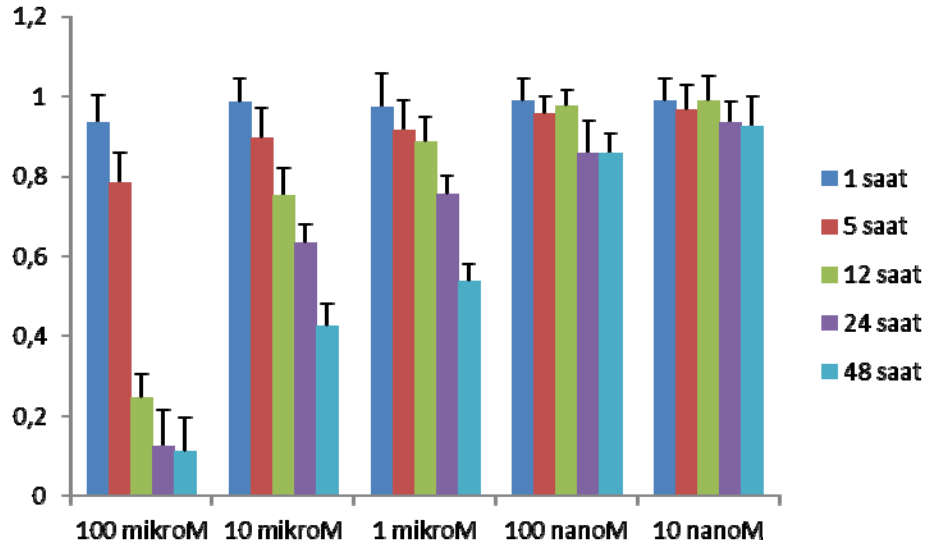
3.1.12. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama $\pm$ standart sapma [mean $\pm$ standard deviation (SD)] olarak verildi. Arka kök gangliyon hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 9.05 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı ANOVA Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Daha sonra gruplardaki istatistiksel önemler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. ARPE-19 Hücrelerinde Amfenak'ın Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

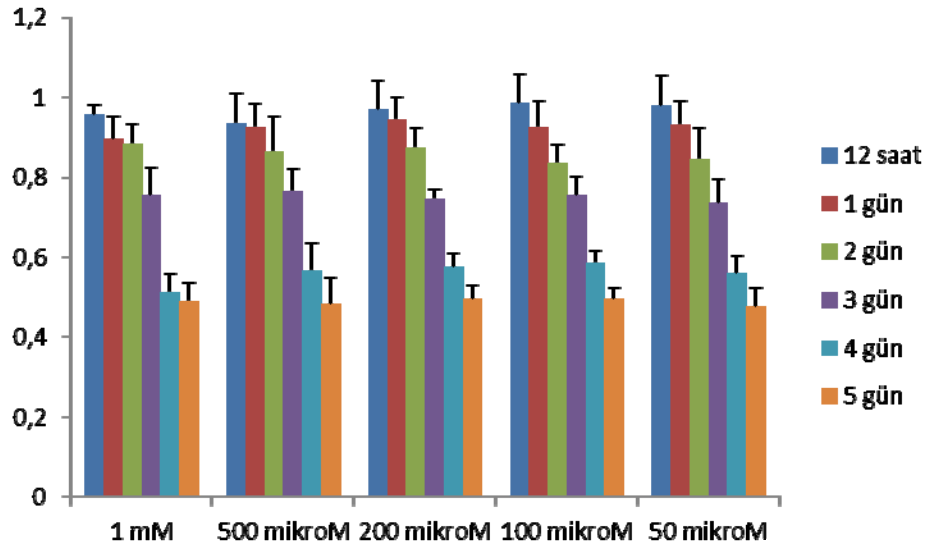
ARPE-19 hücrelerinde Amfenak'ın hücre canlılığı üzerine etkisi grafik 1'de gösterilmiştir. Hücreler artan konsantrasyonlarda (10 nanoM, 100 nanoM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) Amfenak ile 5 farklı zamanda (1, 2, 5, 10, 24, 48 saat) inkübe edildi. Amfenak'ın 1 μ M dozda ve inkübasyondan 24 saat süre ile inkübe edilmesine karar verildi.



Grafik 1. ARPE-19 hücrelerinde Amfenak'ın hücre canlılığı üzerine etkisi.

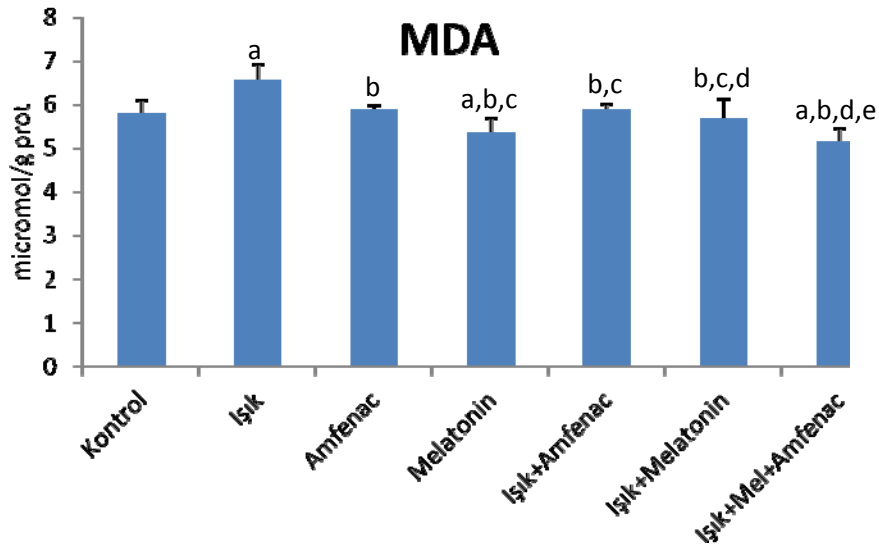
4.2. ARPE-19 Hücrelerinde Melaton'ın Hücre Canlılığı Üzerine Terapötik Dozunun Tayini

ARPE-19 hücrelerinde Melaton'ın hücre canlılığı üzerine etkisi grafik 1'de gösterilmiştir. Hücreler artan konsantrasyonlarda (1 mM, 500 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M) Amfenak ile 5 farklı zamanda (12 saat, 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün) inkübe edildi. Melaton'ın 200 μ M dozda ve inkübasyondan üç gün süre ile inkübe edilmesine karar verildi.



Grafik 2. ARPE-19 hücrelerinde Melatonin'in hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.3. ARPE-19 Hücrelerinde Lipid Peroksidasyon Düzeyleri

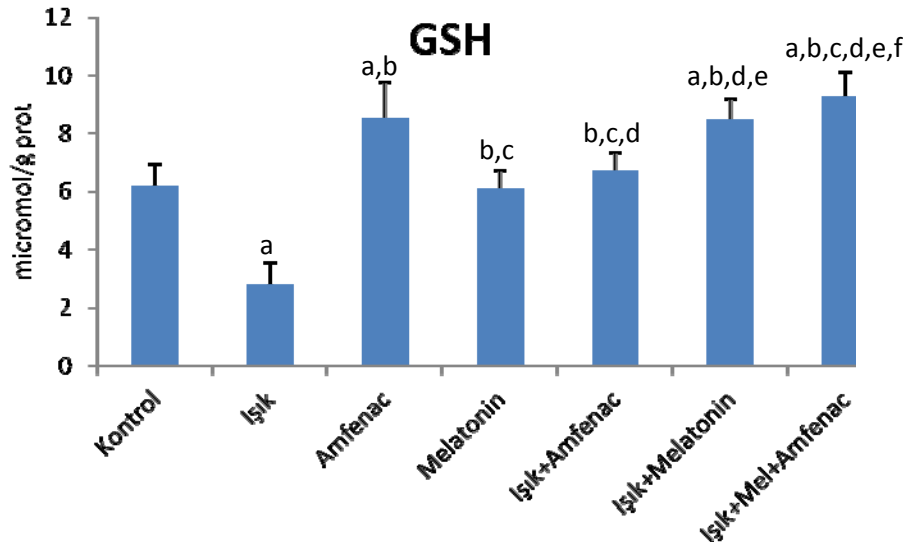


Grafik 1. Mavi dalga boyundaki ışığın, Amfenak ve Melatoninin ARPE-19 hücrelerindeki lipid peroksidasyon düzeylerine etkileri

- ^a $p < 0,05$ Kontrol grubuna kıyasla
- ^b $p < 0,05$ Işık grubuna kıyasla
- ^c $p < 0,05$ Amfenak grubuna kıyasla
- ^d $p < 0,05$ Işık+Amfenak grubuna kıyasla
- ^e $p < 0,05$ Işık+Melatonin grubuna kıyasla

Lipid peroksidasyon düzeyleri Grafik.1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde lipid peroksidasyon düzeylerinin mavi dalga boyundaki ışık grubuna kıyasla, ışık+amfenak grubu hariç diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma gösterdiği tespit edilmiştir.

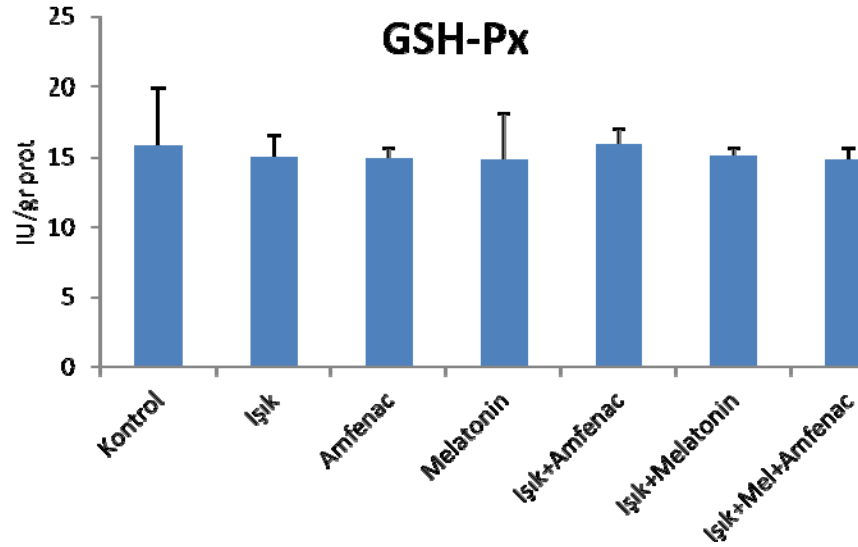
4.4. ARPE-19 Hücrelerinde GSH ve GSH-Px Düzeyleri



Grafik 2. ARPE-19 hücre gruplarında GSH düzeyleri

- ^a p< 0,05 Kontrol grubuna kıyasla
- ^b p< 0,05 Işık grubuna kıyasla
- ^c p< 0,05 Amfenak grubuna kıyasla
- ^d p< 0,05 Melatonin grubuna kıyasla
- ^e p< 0,05 Işık+Amfenak grubuna kıyasla
- ^f p< 0,05 Işık+Melatonin grubuna kıyasla

GSH düzeyleri Grafik 2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde GSH düzeylerinin ışık grubuna kıyasla kontrol, amfenak, melatonin gruplarında önemli düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). ARPE-19 hücreleri mavi ışıkla birlikte Amfenak ve melatonin ile inkübe edildiğinde Amfenak ve melatoninin hem birlikte hemde ayrı ayrı verilmelerinde GSH düzeyleri üzerinde koruyucu etkisi gözlemlendi. Başka bir ifade ile ışık grubuna kıyasla Işık+Amfenak, Işık+Melatonin ve Işık+Amfenak+Melatonin gruplarında GSH düzeyleri yüksek bulundu ($p<0.05$).

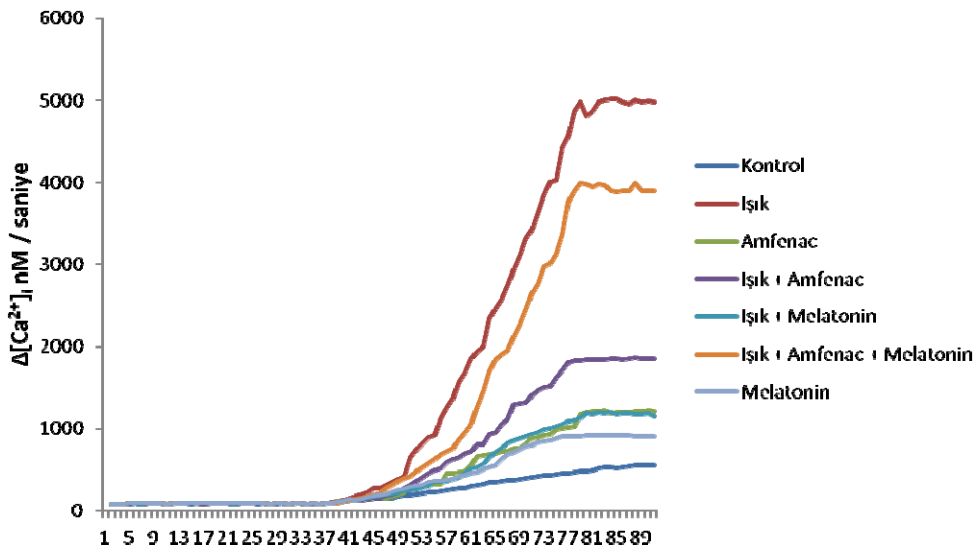


Grafik 3. ARPE-19 hücre gruplarında GSH-Px düzeyleri

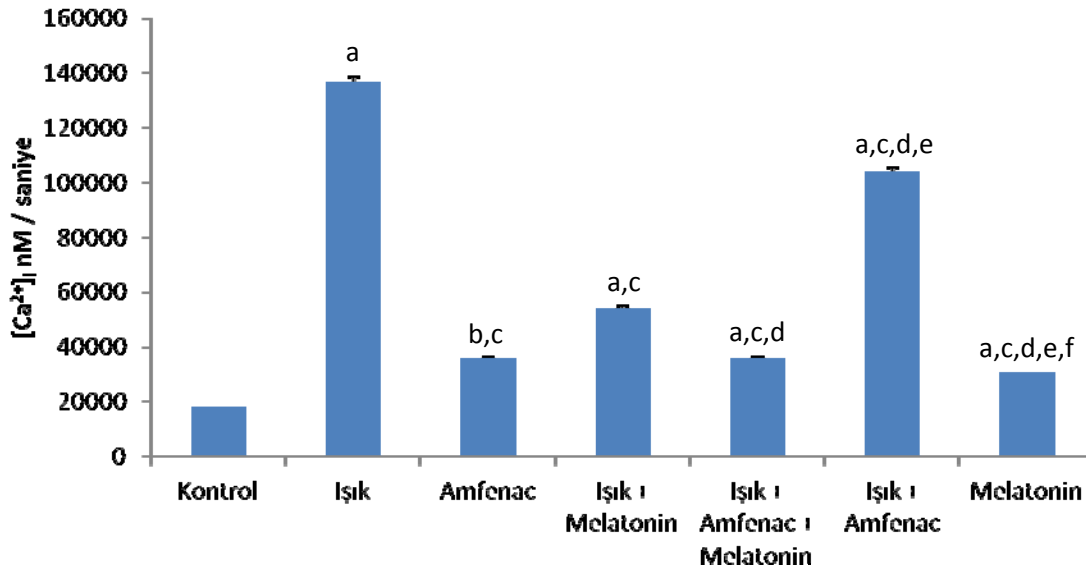
GSH-Px düzeyleri Grafik 3’de gösterilmiştir. Yapılan istatistiki analizler sonucunda ARPE-19 hücrelerinin mavi ışığa maruziyeti, Amfenak ve melatonin ilavesinin GSH-Px aktivitesinde herhangi bir değişiklik yapmadığı tespit edildi.

4.5. ARPE-19 Hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu (Ca^{+2})_i Salınımı Düzeyleri

Sitozole Ca^{+2} salınımının zaman akım grafikleri gruplara spesifik ve tüm gruplar birlikte olarak aşağıda gösterilmiştir.



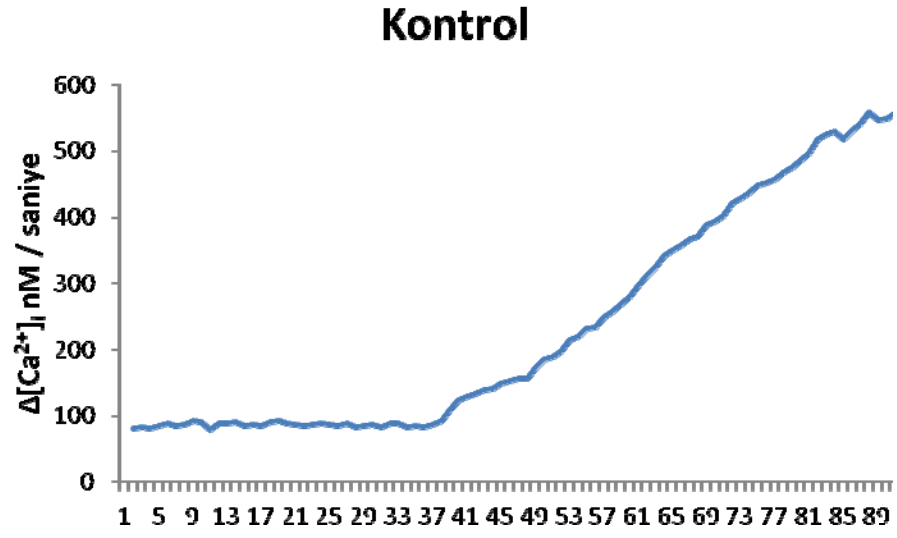
Grafik 4. ARPE-19 hücre gruplarında sitozole Ca^{+2} salınımının zaman akım grafiği



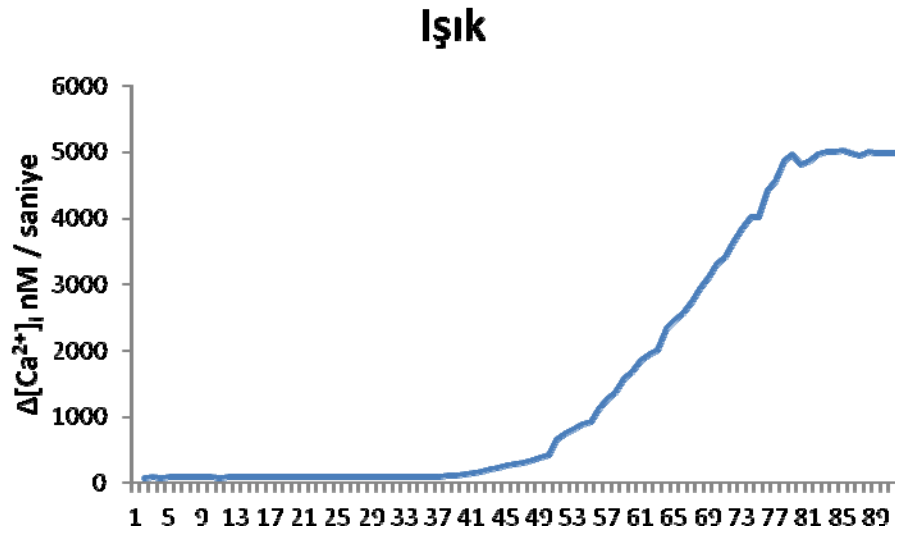
Grafik 5. ARPE-19 hücre gruplarında oksidatif stresin neden olduğu sitozole Ca²⁺ salınımı üzerindeki etkileri

- ^a p< 0,001 Kontrol grubuna kıyasla
- ^b p< 0,05 Kontrol grubuna kıyasla
- ^c p< 0,001 Işık grubuna kıyasla
- ^d p< 0,05 Işık+Melatonin grubuna kıyasla
- ^e p< 0,001 Melatonin grubuna kıyasla
- ^f p< 0,001 Işık+Amfenak grubuna kıyasla

Hücre içi Ca²⁺ düzeyleri Grafik 4 ve 5’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde [Ca²⁺]_i düzeylerinin ışık grubuna kıyasla kontrol, amfenak, melatonin gruplarında önemli düzeyde az olduğu gözlemlendi (p<0.001 ve p<0.05). ARPE-19 hücreleri mavi ışıkla birlikte Amfenak ve melatonin ile inkübe edildiğinde Amfenak ve melatoninin hem birlikte hemde ayrı ayrı verilmelerinde [Ca²⁺]_i salınım düzeyleri üzerinde koruyucu etkisi gözlemlendi. Başka bir ifade ile ışık grubuna kıyasla Işık+Amfenak, Işık+Melatonin ve Işık+Amfenak+Melatonin gruplarında [Ca²⁺]_i düzeyleri düşük bulundu (p<0.05).

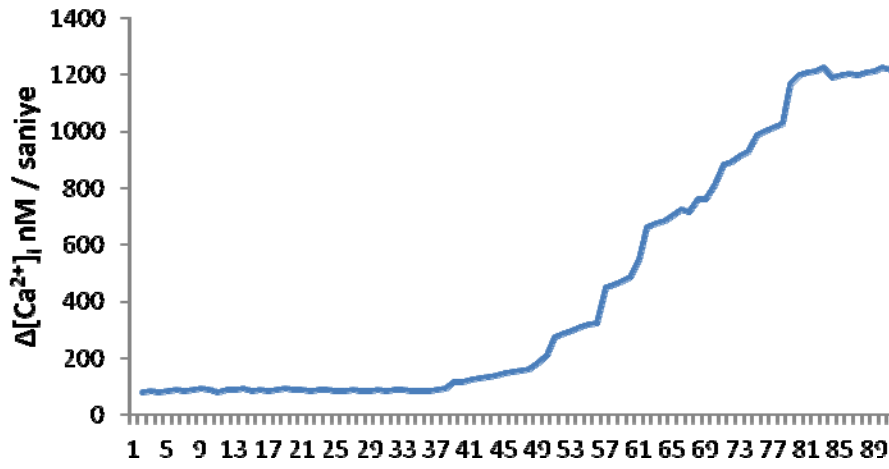


Grafik 6. Kontrol grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği



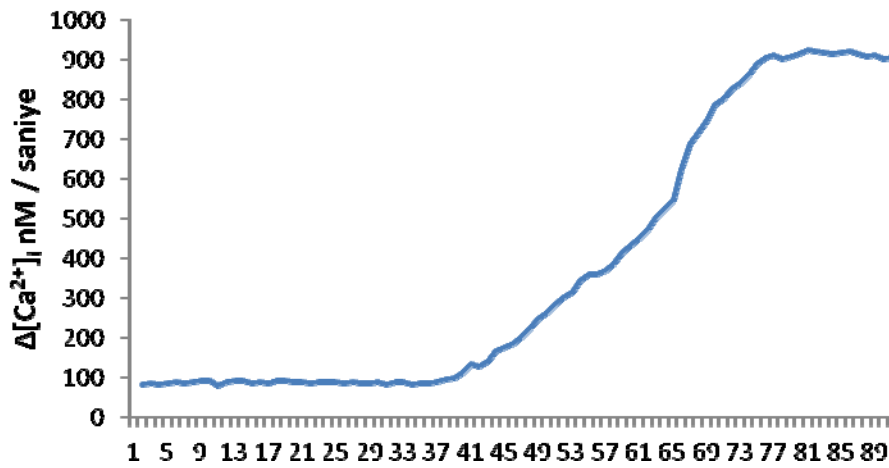
Grafik 7. Işık grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği

Amfenac



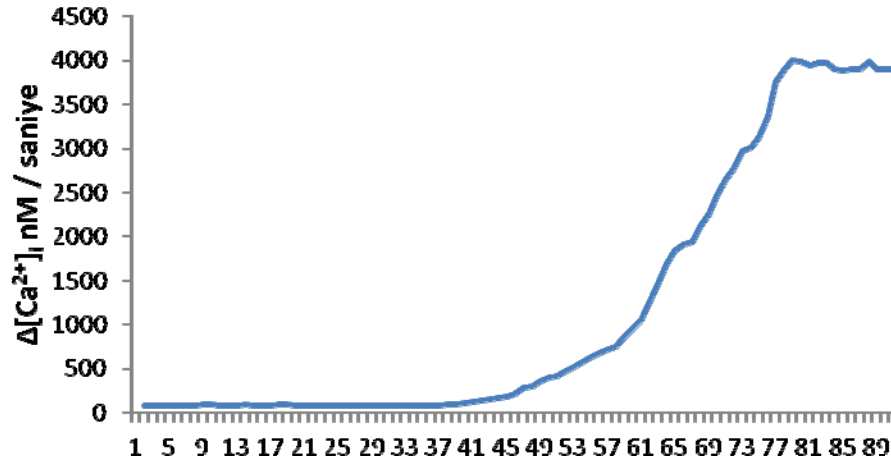
Grafik 8. Amfenac grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği

Melatonin



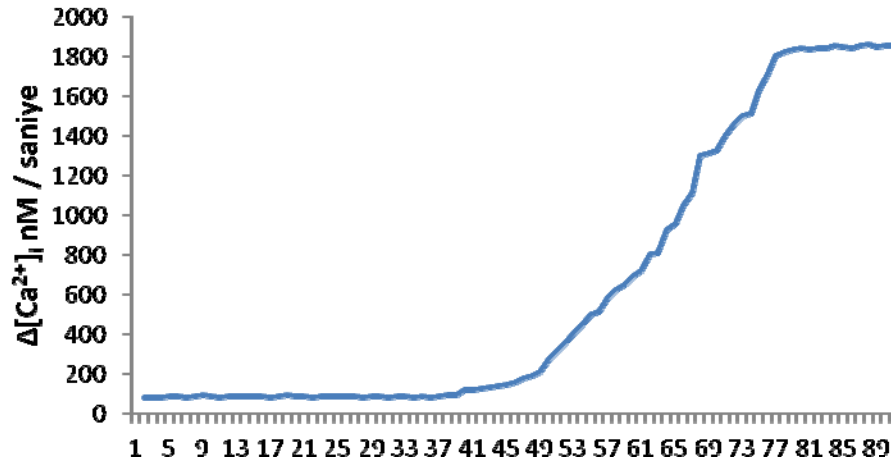
Grafik 9. Melatonin grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği

Işık + Amfenac

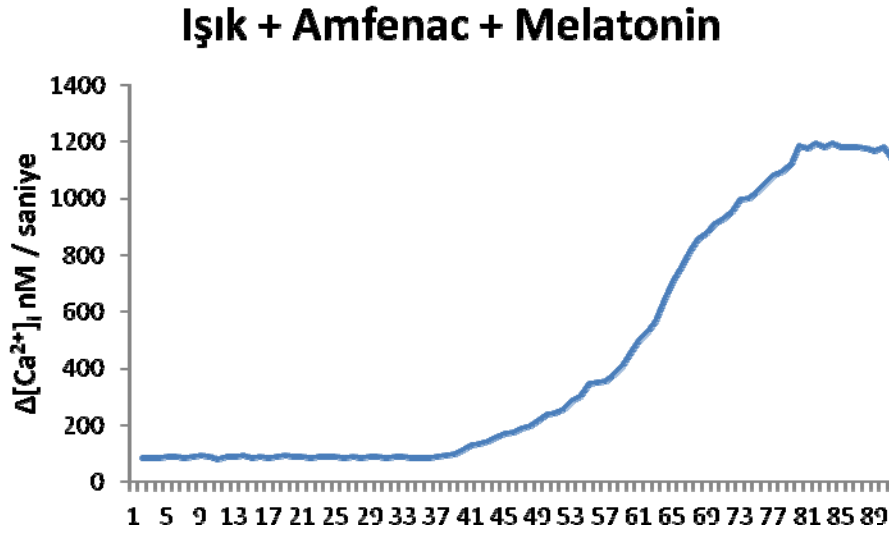


Grafik 10. Işık+Amfenac grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği

Işık + Melatonin

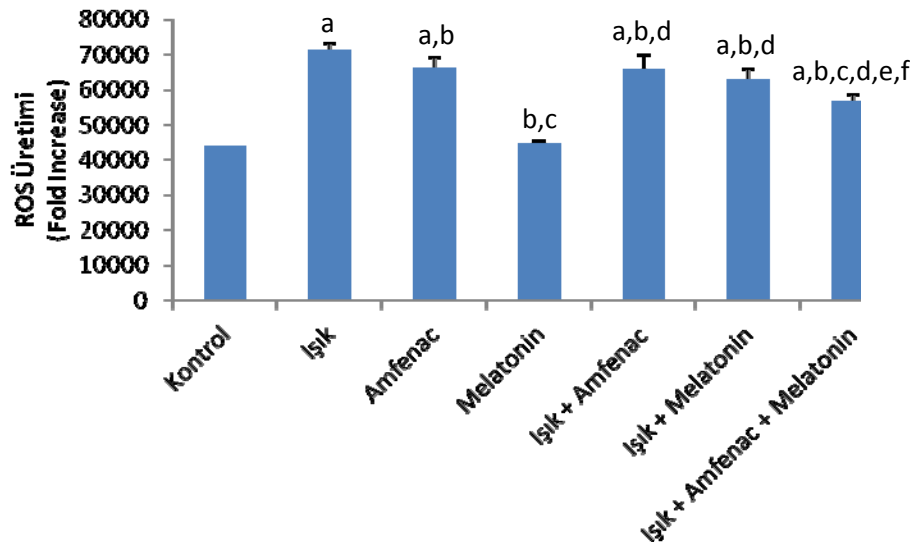


Grafik 11. Işık+Melatonin grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği



Grafik 12. Işık+Amfenac+Melatonin grubunda sitozole Ca^{+2} salınışının zaman akım grafiği

4.6. ROT Üretimi



Grafik 13. ARPE-19 hücre gruplarında ROT üretim miktarı

^a $p < 0,05$ Kontrol grubuna kıyasla

^b $p < 0,05$ Işık grubuna kıyasla

^c $p < 0,05$ Amfenac grubuna kıyasla

^d $p < 0,05$ Melatonin grubuna kıyasla

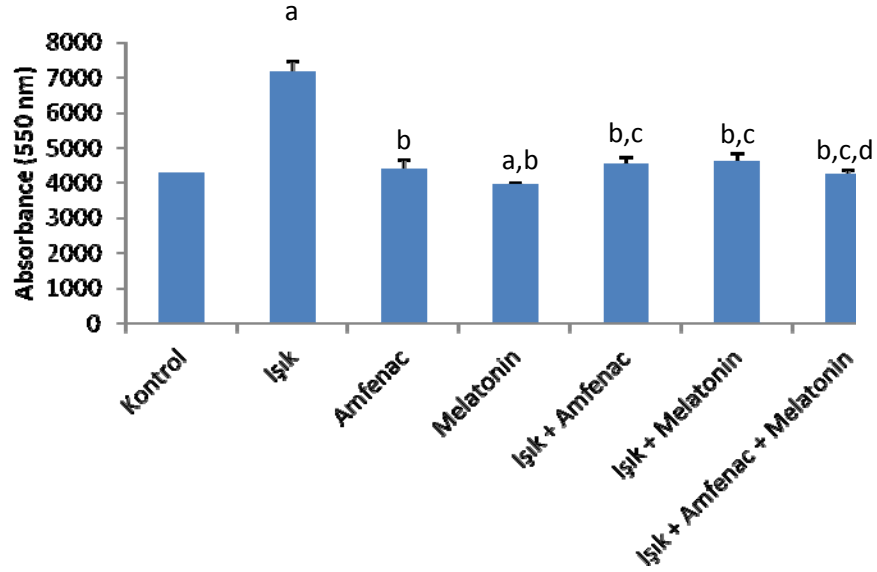
^e $p < 0,05$ Işık+Amfenac grubuna kıyasla

^f $p < 0,05$ Işık+Melatonin grubuna kıyasla

Reaktif oksijen türleri düzeyleri Grafik 13’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde ROT düzeylerinin ışık grubuna kıyasla kontrol, amfenac, melatonin gruplarında önemli düzeyde az olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). ARPE-19 hücreleri mavi

ışıkla birlikte Amfenak ve melatonin ile inkübe edildiğinde Amfenak ve melatoninin hem birlikte hemde ayrı ayrı verilmelerinde ROT düzeyleri üzerinde koruyucu etkisi olduğu gözlemlendi. Başka bir ifade ile ışık grubuna kıyasla Işık+Amfenak, Işık+Melatonin ve Işık+Amfenak+Melatonin gruplarında ROT düzeyleri düşük bulundu ($p<0.05$).

4.7. Apoptozis Düzeyleri



Grafik 14. ARPE-19 hücre gruplarında apoptozis düzeyleri.

- ^a $p<0,05$ Kontrol grubuna kıyasla
^b $p<0,05$ Işık grubuna kıyasla
^c $p<0,05$ Melatonin grubuna kıyasla
^d $p<0,05$ Işık+Melatonin grubuna kıyasla

Apoptozis düzeyleri Grafik 14’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde apoptozis düzeylerinin ışık grubuna kıyasla kontrol, amfenak, melatonin gruplarında önemli düzeyde az olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). ARPE-19 hücreleri mavi ışıkla birlikte Amfenak ve melatonin ile inkübe edildiğinde Amfenak ve melatoninin hem birlikte hemde ayrı ayrı verilmelerinde apoptozis düzeyleri üzerinde koruyucu etkisi gözlemlendi. Başka bir ifade ile ışık grubuna kıyasla Işık+Amfenak, Işık+Melatonin ve Işık+Amfenak+Melatonin gruplarında apoptozis düşük bulundu ($p<0.05$). melatonin grubuna kıyasla Amfenak uygulanan grupta apoptozis düzeylerinin daha düşük olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda ARPE-19 hücrelerine mavi dalga boyundaki ışığa maruz bırakarak oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde amfenak ve melatonin'in antioksidan emzimler üzerine, sitozole Ca^{+2} salınımı üzerine etkilerini araştırmak, alınan sonuçlarda Amfenak'ın etki mekanizmasını aydınlatarak melatonin ile birlikte verilmesinin fayda veya zararlarının araştırılması amaçlandı. Çalışmamız Amfenak'ın ARPE-19 hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır.

Yaşlılık sonucu YBMD sebeplerinden birisi olan artan oksidatif stres sonucu makulada RPE ve fotoreseptör hücrelerinde progresif dejenerasyon oluşur (16, 118). YBMD' de ışık tarafından uyarılan oksidatif strese bağlı oluşan RPE dejenerasyonu önemli bir faktör olabilmekte ve apoptozisi tetiklemektedir. (2, 8, 119, 120). Yaşam boyu görülebilir ışığa maruziyet dışında göz ameliyatlarında ve biomikroskopik muayene esnasında retina görülebilir ışığa maruz kalmaktadır. Görülebilir ışık spektrumunun bileşenleri RPE hücrelerindeki biyolojik kromoforlar tarafından absorbe olabilir, bu da hücrel disfonksiyona ve hücrel ölüme neden olabilir (7).

Mavi ışık spektrumu (400-500 nm) nispeten yüksek enerjiye sahiptir ve dokulardaki hücre ve organellere penetre olabilir. Mavi spektrumlu ışığın retina dokusuna zarar verdiği bilinmektedir (8-12). Mavi ışığın mitokondriyal sitokrom ve flavin oksidaz etkileşimi ile ROS yükseltmesine neden olabileceği konusunda kanıtlar vardır (121, 122). Bizim çalışmamızda mavi ışığa maruz bırakılan grupla, kontrol, amfenak ve melatonin gruplarına göre lipid peroksidasyon sonuçlarında anlamlı artma ve GSH düzeylerinde anlamlı azalma saptandı ($p<0.05$). Ancak mavi dalga boyundaki ışığa maruz bırakılan grupla, kontrol melatonin ve amfenak grubu karşılaştırıldığında, GSH-Px düzeyinde herhangi bir değişme saptanmadı. Bu bulgular, diğer çalışmalarla tutarlı olarak mavi ışığın intrasellüler ROT üretimini tetikleyebileceğini gösterdi (14, 122, 123). Oluşan oksidatif strese bağlı aşırı serbest radikal üretimi başta voltaja duyarlı kalsiyum kanalları olmak üzere birçok iyon kanalını uyararak sitozole kalsiyum akışını daha da artırmaktadır (124). Bunun sonucunda, mitokondrinin daha fazla depolarize olması sonucu serbest radikallerin üretimi daha da artmaktadır. Bu olay apoptozise kadar gitmektedir (125).

Çalışmamızda, mavi dalga boyundaki ışığa maruz bırakılan grupta, sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımı diğer gruplara göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$). ARPE-19 hücrelerinin Amfenak, melatonin ve bu iki kimyasalın kombinasyonu ile inkübe edilmelerinden sonra hücre kalsiyum miktarının istatistiki ($p<0.05$) olarak azalmış olduğu tespit edildi. Yuda ve ark. (126) nötrofil granüositlerinde yaptıkları çalışmalarında 0.1 mM dozunda kullandıkları Amfenak'ın superoksit oluşumunu önemli düzeyde azalttığını vurgulamışlardır. Bu etkinliğini nötrofil granüositlerde NADPH-NADPHoxidase sistemini inhibe ederek gerçekleştirdiğini iddia etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

NSAİİ'lerin hücre içerisinde O_2^- oluşumu üzerine etkileri ile ilgili birçok çalışma vardır. Fakat NSAİİ'lerin etkinliğine dair sonuçlar çalışmalarda kullanılmış olan hücre ve oluşan stres durumuna göre farklılık arz etmektedir. Hücrelerde O_2^- üretimi ile ilgili olarak Kitagawa ve arkadaşları kimotripsin benzeri serin proteazlar uyarılara cevaben bu hücrelerde O_2^- üretimine başlamasında ve bu üretimi sürdürmesinde gerekli olduğu görüşünü savunmuşlardır (127). Bu proteazlar aynı zamanda O_2^- üretiminin primer enzimi olan NADPH oksidaz aktivasyonunda da görevlidir. Bu çalışmamızda amfenak sodium, gibi antiinflamatuvar ilaçların oluşan stres ürünlerini inhibe ettiğini göstermiş olduk. Dale ve ark. yaptıkları çalışmalarında 0.1 mM konsantrasyonundaki Amfenak'ın koruyucu etkinliğinin olduğunu, ancak 1 mM dozunda kullanılırsa hücre içi NADPH sistemi tarafından başlatılan O_2^- üretimini yeteri kadar inhibe edemediğini bildirmişlerdir (128).

Melatonin içerdiği triptofan sayesinde hücre içi GSH-Px enziminin yapısına ko-faktör olarak girmektedir. GSH-Px enziminin sentezlenmesinde GSH substrat olarak kullanılmaktadır (80, 129). Şayet serbest radikal üretimi ile doğru orantılı GSH-Px enzim tüketimi artarsa, GSH düzeyleri de azalmaktadır. Çalışmamızda mavi dalga boyundaki ışığa maruz bırakılan grupta GSH düzeyleri diğer gruplara göre anlamlı şekilde azalmıştır. Aynı zamanda ROT üretimi bu grupta anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0.05$). Kontrol, amfenak ve melatonin grubunda ise GSH düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Bu durum melatoninin doğrudan serbest radikalleri temizleme özelliğinin yanı sıra, ekzojen melatonin verilmesinin, önemli bir antioksidan substrat olan GSH düzeylerini de artırmasıyla (130) uyumlu olarak bizim

çalışmamızı desteklemektedir. Amfenak'ın serbest radikal oluşumunu önleyici etkisi (126) daha önce gösterilmiş olmakla birlikte bizim çalışmamızda da koruyucu olarak Amfenak verilen grupta sadece mavi dalga boyu ışığa maruz bırakılan gruba göre ROT'de anlamlı azalma mevcuttur.

Melatoninin değişik Ca^{+2} kanalları üzerinde olumlu etkileri rapor edilmiştir (131). Bu konuda, Ayar ve arkadaşları, melatoninin arka kök gangliyon hücrelerinde voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları üzerinde düzenleyici etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir(132). Buna rağmen insan ve sıçanlara ait enterositlerde yapılan bir çalışmada, artan dozlarda (0,1-100 nM) uygulanan melatoninin $[Ca^{+2}]_i$ seviyesini çok hızlı bir şekilde artırabileceği ve kısa bir sürede $[Ca^{+2}]_i$ nin bazal seviyeye indiği de rapor edilmiştir (133). Yakın zamanlarda tavuk hücre serilerinde yapılan çalışmalarda melatonin voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları üzerinde düzenleyici etkisiyle hücre içi Ca^{+2} seviyesini düzenlediği gözlemlenmiştir (134-136). Liang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada melatonin ile inkübe ettikleri ARPE-19 hücrelerine, oksidatif stres modelinde H_2O_2 ile oluşturulan hücre ölümü ve mitokondrial DNA hasarına karşı ciddi korumanın olduğunu gözlemlemişlerdi (137). Çalışmamızda mavi dalga boyundaki ışığa maruz bırakılan ARPE-19 hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin istatistiki olarak anlamlı ($p<0,001$) bir artış gösterdiği, ancak bu hücrelerin amfenak ve melatonin ile inkübasyonundan sonra bu düzeylerin azaldığı gözlemlenmiştir. Hücre içi artmış $[Ca^{+2}]_i$ düzeylerinin hücre apoptozisini tetiklediği ve apoptozis düzeylerinin artan $[Ca^{+2}]_i$ miktarı ile orantılı olduğu bildirilmiştir (138). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilerde bu bilgileri destekler niteliktedir. Mavi ışığa maruz bırakılan grupta, artmış $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri ve apoptozis seviyeleri tespit edilmiş ve ARPE-19 hücrelerinde ışığa maruziyetin amfenak ve melatonin ile desteklenmeye çalışıldığı gruplarda bu düzeylerin diğer gruplara kıyasla istatistiki olarak azaldığı tespit edilmiştir. Artmış $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, mitokondriyal ve hücreysel fonksiyon bozukluğuna yol açar (139). Yapılan çalışmalarda oksidatif stresin mitokondri hacmini artırdığı ve oksidatif strese bağlı mega mitokondri olduğu belirtilmiştir (140, 141). Yapılan çalışmalarda mitokondrial büyümenin, mavi ışıkla inkübe edilmesinin 72 saat sonrasında maksimum düzeyde olduğu belirtilmiştir (142). Modelimizde mavi ışıktan kaynaklanan hücre içi artmış ROT üretimi apoptozisin başlaması için yeterli düzeyde olduğu belirlendi. Jiang Cai ve

arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada da stres sinyalizasyonu mavi ışığa maruziyetin 24 saatten sonra mitokondriyal sinyal depolarizasyonuna yol açabildiği gösterilmiştir (118). MMP (mitokondriyal membran potansiyel)'yi azaltan pek çok apoptozis sistemleri bulunmaktadır. Düşük bir MMP mitokondriyal enerji metabolizmasında azalma ile sonuçlanabilir. Buda mavi ışığa maruziyetin mitokondriyal aktiviteyi etkilediğini ve daha düşük metabolik aktiviteye yol açtığını göstermektedir.

Ca^{+2} , canlıda homeostazisi sağlayan sıvı kompartmanlarında farklı dağılım göstermektedir. Örneğin ekstraselüler sıvıdaki konsantrasyonu 1,2 mM iken sitoplazma ve çekirdekte 100 nM, endoplazmik retikulum ve sarkoplazmik retikulumdaki konsantrasyonu ise 100-1000 μ M arasındadır. Hücrelerarası sıvıdan ve hücre içi depolardan ritmik ve kontrollü bir şekilde sitozole Ca^{+2} salınımının; fertilizasyon, ekzositoz, hormon salınımı, gen transkripsiyonu gibi faaliyetlerin yürütülmesinde çok önemli işlevleri vardır (138). Ancak bu salınım kontrolden çıkmaya başladığı zaman hücre için ölüm gibi telafisi mümkün olmayan sonuçlar doğurmaktadır. Hücre içi ikincil haberci sisteminin en önemli elemanlarından biri olan Ca^{+2} hücresel birçok hayati fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli bir rol üstlenirse de, hücre içi Ca^{+2} miktarındaki artış, ya apoptozis ve proliferasyon mekanizmalarının bozularak hücrelerin birer tümör hücresine dönüşmesine ya da hücrede nekrotik veya apoptotik ölümün başlamasına sebep olabilmektedir (138). Hücre içine kalsiyum giriş yollarından biri olan TRPM2 katyon kanalları, oksidatif stres nedeniyle aktive olabilmektedir. TRPM2 kanallarının geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz bir şekilde hasara uğraması; hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ seviyesinin düzensiz ve çok hızlı bir şekilde artmasına sebep olmaktadır (143, 144). Mitokondriler, sadece ATP ve endojen ROT'un ana kaynağı değil, aynı zamanda hücre içi kalsiyum sinyalinin gelişiminde de çok önemli bir role sahiptir. Mitokondri çift katlı bir zar ile sitoplazmadan ayrılmış durumdadır. Hücrede olması gerektiğinden fazla ROT oluşmuş ve bunlar antioksidan mekanizmalar tarafından bertaraf edilememişse, bozulan TRPM2 katyon kanalları vasıtasıyla dışarıdan ve hücre içi kalsiyum depolarından sitoplazmaya Ca^{+2} akışı meydana gelmektedir ve mega mitokondri oluşabilmektedir. Bu durumda; bir yandan hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ miktarı artarken diğer yandan da mitokondri zarları hasar görmeye başlar. Mitokondrinin iç zarının iyon

geçirgenliği çok zayıf olmasına rağmen artan hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu, mitokondri iç zarı üzerinde bulunan kanallardan içeriye Ca^{+2} girmesine sebep olabilmektedir. Böylece; hücrede $[Ca^{+2}]_i$ nin aşırı miktarda artması hücrenin enerji üretim merkezi olan mitokondri matriksinde de Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasına sebep olmaktadır. Bunun bir sonucu olarak mitokondrideki enerji üretim mekanizmalarını hasara uğramakta ve aşırı miktarda ROT meydana gelmektedir (145). Mitokondride aşırı miktarda üretilen ROT, mitokondrinin iç ve dış membranlarına zarar vermektedir. Böylece apoptozis mekanizması başlatılarak hücre hızlı bir biçimde programlı ölüme gidebilmektedir (146).

Melatoninin hücresel oksidatif strese karşı en etkin antioksidanlardan biri olduğu Pieri ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (147). Tarafımızdan yapılan literatür taramalarında TRPM2 kanallarının aktivasyon veya inaktivasyon mekanizmaları üzerine melatoninin etkisinin olup olmadığına dair bir bildirim rastlanmamıştır. Fakat yukarıda bahsedildiği gibi, TRPM2 ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının oksidatif strese bağlı bozulmaları, sitozole Ca^{+2} akışını aşırı artırmakta ve mitokondrial depolarizasyon, complex I, II ve III inhibisyonları ile apoptozu tetiklediği iyi bilinmektedir (78, 131). Bu tez çalışmasında, melatoninin apoptozis üzerinde önemli düzeyde koruyucu etkisinin olduğu gözlemlendi. Bu sonucumuz, melatoninin hücre içersine Ca^{+2} akışını düzenleyerek, mitokondrinin depolarizasyonunu ve complex I ve III üzerinden apoptozu önlediği bildirimlerini doğrulamaktadır (148, 149).

Melatonin verilen deney hayvanlarında ve insanlarda GSH ve GSH-Px aktivitesi düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (26). Bizim çalışmamızda, mavi dalga spektrumundaki ışığa maruz bırakılan grupta; kontrol, amfenak, melatonin ve melatonin+amfenak gruplarıyla karşılaştırıldığında, lipid peroksidasyon ürününe anlamlı artma, GSH düzeyinde anlamlı azalma belirlendi. Mavi dalga spektrumundaki ışığa maruz bırakılan grupta, amfenak, melatonin ve melatonin+amfenak gruplarıyla karşılaştırıldığında, GSH-Px aktivitesi düzeyinde anlamlı değişiklik saptanmadı. Çalışmamızda mavi dalga spektrumundaki ışığa maruz bırakılan grupta, sitozole kalsiyum iyonu $[Ca^{+2}]_i$ salınımı amfenak, melatonin ve melatonin+amfenak gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu durum, yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak mavi dalga boyundaki ışık spektrumuna

maruz kalmanın apoptozis yollarını tetiklediğini ve bu apoptotik yollarda amfenak ve melatoninin antioksidan rolüyle koruyucu rol oynadığını düşündürdü (150-152). Ancak bu antioksidan etkiler, melatoninin gece ulaştığı doruk değerlerin çok üstündeki değerlerde görülür. Melatoninin bu bağlamda başka bir üstünlüğü, diğer bazı antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve uzun süre (5 yıl) kullanımda bile toksik etkisinin görülmemesidir (153).

Çalışmamızda, mavi ışığa maruz kalan hücrelerde ROT ve MDA düzeylerinin belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Apoptosis, hücre içi birçok sinyal mekanizmasının birbirini tetiklediği ve sonuç olarak hücrenin programlı bir şekilde ölüme gittiği fizyolojik bir süreçtir. ARPE-19 hücrelerinde mavi ışığın tetiklediği fototoksisite, apoptozisi tetiklediği ancak amfenak, melatonin ve bu iki maddenin kombinasyonunun hücrel apoptozisi istatistiksel olarak düşürdüğü tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda mavi ışıkla uyarılan ARPE-19 hücreleri düşük dozda bir stres yanıtı sergilediler. Stres proteinlerinin ekspresyonu oksidatif strese karşı bilinen bir koruyucu yanıtıdır (154, 155). Hücrelerde stresle ilişkili proteinlerin FACS analizi ARPE-19 hücrelerinde mavi ışık sonrası HO-1, osteopontin, HSP-27, SOD-Mn ve katepsin D ekspresyonunu artmış gösterdi. Bu sonuçlar bizim tezimiz olan düşük doz mavi ışığın RPE hücrelerinde stres sinyali reaksiyonunun bir parçası olduğunu göstermektedir. Sistemimizde mavi ışığa maruz kalmak ARPE 19 hücrelerinde ROT üretimine neden olmaktadır. Bu bulgular, diğer çalışmalarla tutarlı olarak mavi ışığın intraselüler ROT üretimini tetikleyebileceğini gösterdi (14, 122, 123).

Roehlecke ve ark. ARPE-19 hücrelerinin düşük dozlarda mavi ışık uyarılarına adapte olduğunu ileri sürmüşler ve yaptıkları gözlemlerinde elektron mikroskopi görüntüleri ile mitokondriyal şekil ve dağılımın mavi ışığa maruziyetten 72 saat sonra değişebileceğini ispat etmişlerdir (142). Bu büyük olasılıkla uygulanan strese karşı adaptasyon mekanizmasını temsil etmektedir ve böylece dış hasara karşı daha iyi bir direnç olmasını sağlamaktadır. Yüksek seviyede solunum ve enerji transferi ile bu yapılar geniş mitokondri membranı boyunca kapsamlı enerji aktarma yeteneğine sahiptir(156).

NSAİİ'lar oküler ağrı ve anterior segmentteki inflamasyonun yönetiminde değerli terapötik ajanlardır. Aynı zamanda posterior segmentin diğer oküler

durumlarının tedavisi için de kullanılır. Bu kullanım alanlarından biri de pseudofakik kistoid maküla ödemi. Kistoid maküla ödemi patogeneğinde iki temel nedenden bahsedilmektedir. Bunlardan ilki oküler inflamasyondur (157). Karşılaştırmalı bir çalışmada bilateral katarakt operasyonu olan hastalarda inflamasyonun şiddetli olduğu gözlerde daha sık ve şiddetli kistoid maküla ödemi saptanmıştır (158). Katarakt cerrahisi uygulanan hastalarda hüner aköz (159) ve vitreusta (160) prostaglandin artışı saptanması enflamasyonun varlığını desteklemektedir. Başka bir çalışmada da PG seviyelerinin topikal NSİİ ile azaltıldığı gösterilmiştir (161). İkinci mekanizma olarak bazı hastalarda vitreomaküler traksiyona bağı kan retina bariyerindeki değışikliğı kistoid maküla ödemine yol açtığı gösterilmiştir (162). Ameliyat mikroskobunun ışığı tarafından oluşturulan subklinik maküla hasarının KMÖ gelişiminde etkili olacağını gösteren çalışmalar da vardır. Prospektif bir çalışmada ultraviole bloke edici GİL kullanımının katarakt cerrahisi sonrası KMÖ gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (163). Ameliyat mikroskobunun ışığı tarafından oluşturulan maküla hasarı, bizim çalışmamızda olduğu gibi oksidatif stres sonucu gelişen hücre hasarına bağı olabilir. Topikal amfenak kullanımının KMÖ gelişimini azalttığını gösteren çalışmalar vardır. Bunlardan Wolk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada katarakt ameliyatı sonrası topikal prednizolon ile birlikte topikal amfenak uygulamasının tek başına prednizolona göre kistoid maküla ödemi anlamli şekilde azalttığı gösterilmiştir (164). Bu etki amfenak'ın retina ve koroid'de PGE₂ sentezini anlamli şekilde azalttığı görüşünü desteklemektedir (94). Topikal amfenak uygulaması PG aracılıklı kan retina bariyeri yıkımını ve vitroz dokuda eşzamanlı protein ekstravazasyonunu anlamli şekilde inhibe etmektedir (94). Amfenak'a bağı kistoid maküla ödemindeki gerileme PG sentezini azaltılmasına bağı olduğu yukarıda belirtilmekle birlikte amfenak'ın oksidatif stresi azaltıcı etkisinde buna katkı sağlayabilir. Nitekim bizim çalışmamızda mavi dalga boyu ışığa maruz bırakılan ARPE-19 hücreleri amfenak ile inkübe edildiğinde ROT üretimi daha az olmakta ve buna paralel olarak apoptozis ile hücre ölümü de azalmaktadır. Bu durumda KMÖ ödemi gelişimini önlemeye yönelik enflamatuvar süreci baskılamanın yanında ameliyat mikroskobu tarafından oluşturulan oksidatif hücre hasarında engellenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda mavi ışığa

maruz bırakılan ve güçlü bir antioksidan olan melatonin ile amfenak verilmesinin sadece melatonine göre ROT üretimini anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak ARPE-19 hücrelerine mavi dalga boyunda ışık vererek oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde Amfenak ve melatoninin hem birlikte hem de ayrı ayrı verilmeleriyle oksidatif stresten koruyucu etkilerinin olduğu görüldü. Koruyucu etkinliğinin Amfenak ve Melatonin kombinasyonunda daha etkin olduğu tespit edildi.

ÖZET

Hücre Kültürü Ortamında Kalsiyum Sinyali, Apoptosis ve Oksidatif Stres Değerleri Üzerine Mavi Işık (405 nm), Amfenak ve Melatoninin Etkilerinin Araştırılması

Yaşa bağlı maküla dejeneresansı (YBMD) gelişmiş ülkelerde yaşlılarda en önemli körlük nedenidir. YBMD patogenezi tam olarak anlaşılamamış bir hastalık olup günümüzde etkin bir tedavi ve önlemi yoktur. Yaşlılık sonucu YBMD sebeplerinden birisi olan artan oksidatif stres sonucu maküladaki RPE ve progresif dejenerasyon oluşmaktadır. Güneş ışığına maruziyet, yoğun ilüminasyon veya sigara içimi gibi çevresel faktörler serbast radikal oluşumu aracılığı ile YBMD'den sorumlu olduğu düşünülmüştür. Melatonin yapısında bulundurduğu pirol halkası nedeni ile vücutta normal fizyolojik süreçte oluşan oksidan ajanlara karşı antioksidan özellik göstermektedir. Amfenak siklooksijenaz yolağını inhibe eden ve inflamasyon, maküla ödemi gibi önem arz eden durumlarda kullanılan bir antiinflamatuvar ajandır.

Bu çalışmanın amacı ARPE-19 hücrelerinde kültür ortamında, mavi ışıkla oluşturulan oksidatif stres modeline karşı Amfenak ve melatoninin LP, GSH, GSH-Px, hücre içi Ca^{+2} salınımı, ROT düzeyleri ve apoptozis düzeyleri üzerine muhtemel koruyucu etkilerini araştırmaktır.

ARPE-19 hücreleri; Kontrol, Işık, Amfenak, Melatonin, Işık+Amfenak, Işık+Melatonin, Işık+Amfenak+Melatonin olmak üzere yedi ana gruba ayrıldı.

LP düzeyleri; Kontrol, Amfenak, Melatonin, Işık+Amfenak, Işık+ Melatonin, Işık+Amfenak+Melatonin gruplarında Işık grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p<0.05$).

GSH-Px aktivitesi değerlendirildiğinde gruplar arasında herhangi bir fark tespit edilmedi.

GSH seviyeleri; Kontrol, Amfenak, Melatonin, Işık+Amfenak, Işık+Melatonin, Işık+Amfenak+Melatonin gruplarında Işık grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p<0.05$).

Hücre içi Ca^{+2} salınımı ve apoptozis düzeyleri; Kontrol, Amfenak, Melatonin, Işık+Amfenak, Işık+ Melatonin, Işık+Amfenak+Melatonin gruplarında Işık grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p<0.05$).

ROT düzeyleri; Kontrol, Amfenak, Melatonin, Işık+Amfenak, Işık+Melatonin, Işık+Amfenak+Melatonin gruplarında Işık grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p<0.05$).

Sonuç olarak bu çalışmada Amfenak ve melatoninin ARPE-19 hücrelerinde oksidatif stres üzerine koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmektedir.

Anahtar Kelimeler: ARPE-19 Hücreleri, Amfenak, Melatonin, Oksidatif stres, Ca^{+2} salınım mekanizması

ABSTRACT

Investigation of Effects of Blue Light-Irradiation (405 nm), Amfenac and Melatonin on Calcium Signaling, Apoptosis and Oxidative Stress Parameters in Cell Culture Medium

The most important cause of blindness in elderly people living in developed countries is Age-Related Macular Degeneration (AMD). AMD, the pathogenesis is not fully elucidated; today still an effective treatment and prophylaxis aren't known against it. Increased Oxidative stress status which is one of the most important actors of AMD formation induces a progressive Retinal Pigment Epithelium (RPE) degeneration in Macula. Environmental factors such as long-term daylight exposure, intensive illumination and smoking are thought to be responsible from oxidative stress mediated AMD development. Because of containing pirol chains in its structure, melatonin has a very strong antioxidant effect against the oxidative molecules occurring during the physiological process in human body. Amfenac is an anti-inflammatory drug, which inhibits cyclooxygenase pathway, is used for treatment of serious cases such as inflammation and macular edema.

The aim of this study is to investigate possible protective effects of Amfenac and Melatonin on LP, GSH, GSH-Px, intracellular Ca^{2+} release, ROS and apoptosis levels in cultured ARPE-19 cells in a blue light (405 nm) induced oxidative stress model.

ARPE cells were divided into seven groups as defined; Control, Light, Amfenac, Melatonin, Light + Melatonin, Light + Amfenac and Light + Amfenac + Melatonin

Statistically, LP levels; in Control, Amfenac, Melatonin, Light + Amfenac, Light + Melatonin and Light + Amfenac + Melatonin groups were significantly lower than Light group ($p < 0.05$).

In the terms of GSH-Px activity, there was no significant difference between all groups.

GSH levels; in Control, Amfenac, Melatonin, Light + Amfenac, Light + Melatonin and Light + Amfenac + Melatonin groups were significantly higher than Light group ($p < 0.05$).

Intracellular Ca^{2+} release and apoptosis levels; in Control, Amfenac, Melatonin, Light + Amfenac, Light + Melatonin and Light + Amfenac + Melatonin were significantly lower than Light group ($p < 0.05$).

ROS levels; in Control, Amfenac, Melatonin, Light + Amfenac, Light + Melatonin and Light + Amfenac + Melatonin groups were lower than Light group ($p < 0.05$).

As a result; in this study it is showed that Amfenac and Melatonin have a protective effect against oxidative stress in ARPE-19 cells.

Keywords: ARPE-19 cells, Amfenac, Melatonin, Oxidative stress, Intracellular Ca^{2+} release

KAYNAKLAR

1. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. the beaver dam eye study. *Ophthalmology*. 1992; 99: 933-43.
2. Mainster MA. Light and macular degeneration: A biophysical and clinical perspective. *Eye (Lond)*. 1987; 1 (Pt 2): 304-10.
3. Taylor HR, West S, Munoz B, Rosenthal FS, Bressler SB, Bressler NM. The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110: 99-104.
4. Margrain TH, Boulton M, Marshall J, Sliney DH. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Prog Retin Eye Res*. 2004; 23: 523-31.
5. Klein R, Meuer SM, Knudtson MD, Iyengar SK, Klein BE. The epidemiology of retinal reticular drusen. *Am J Ophthalmol*. 2008; 145: 317-26.
6. Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B. Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol B*. 2001; 64: 144-61.
7. Godley BF, Shamsi FA, Liang FQ, Jarrett SG, Davies S, Boulton M. Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2005; 280: 21061-6.
8. Smith BT, Belani S, Ho AC. Ultraviolet and near-blue light effects on the eye. *Int Ophthalmol Clin*. 2005; 45: 107-15.
9. Putting BJ, Zweyffening RC, Vrensen GF, Oosterhuis JA, van Best JA. Blood-retinal barrier dysfunction at the pigment epithelium induced by blue light. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992; 33: 3385-93.
10. Grimm C, Wenzel A, Williams T, Rol P, Hafezi F, Reme C. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: Effect of photoreversal of bleaching. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 497-505.
11. Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Reme CE. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2005; 24: 275-306.
12. Algvere PV, Marshall J, Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006; 84: 4-15.
13. Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadras S, *et al*. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 6255-60.
14. King A, Gottlieb E, Brooks DG, Murphy MP, Dunaief JL. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol*. 2004; 79: 470-5.
15. Rezai KA, Gasyna E, Seagle BL, Norris JR, Jr, Rezaei KA. AcrySof natural filter decreases blue light-induced apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008; 246: 671-6.
16. Liang FQ, Godley BF. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: A possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2003; 76: 397-403.

17. Seagle BL, Rezai KA, Kobori Y, Gasyna EM, Rezaei KA, Norris JR, Jr. Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 8978-83.
18. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, *et al*. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*. 2001; 108: 697-704.
19. Tosini G. Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. *Chronobiol Int*. 2000; 17: 599-612.
20. Kennaway DJ, Wright H. Melatonin and circadian rhythms. *Curr Top Med Chem*. 2002; 2: 199-209.
21. Wurtman RJ. Age-related decreases in melatonin secretion--clinical consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 2135-6.
22. Karasek M, Reiter RJ. Melatonin and aging. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002; 23 Suppl 1: 14-6.
23. Wiechmann AF. Melatonin: Parallels in pineal gland and retina. *Exp Eye Res*. 1986; 42: 507-27.
24. Besharse JC, Dunis DA. Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: Activation of rod shedding. *Science*. 1983; 219: 1341-3.
25. Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*. 1983; 306: 782-4.
26. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*. 2000; 7: 444-58.
27. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, *et al*. Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J*. 1996; 10: 882-90.
28. Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, *et al*. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27: 838-47.
29. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging*. 2002; 23: 639-44.
30. Garcia JJ, Reiter RJ, Pie J, Ortiz GG, Cabrera J, Sainz RM, *et al*. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr*. 1999; 31: 609-16.
31. Marchiafava PL, Longoni B. Melatonin as an antioxidant in retinal photoreceptors. *J Pineal Res*. 1999; 26: 184-9.
32. Siu AW, Reiter RJ, To CH. Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res*. 1999; 27: 122-8.
33. Osborne NN, Nash MS, Wood JP. Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39: 2374-83.
34. McColgin AZ, Heier JS. Control of intraocular inflammation associated with cataract surgery. *Curr Opin Ophthalmol*. 2000; 11: 3-6.

35. Yuda Y, Tanaka J, Suzuki K, Igarashi K, Satoh T. Inhibitory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on superoxide generation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1991; 39: 1075-7.
36. FINE BS. Limiting membranes of the sensory retina and pigment epithelium. an electron microscopic study. *Arch Ophthalmol*. 1961; 66: 847-60.
37. Hudspeth AJ, Yee AG. The intercellular junctional complexes of retinal pigment epithelia. *Invest Ophthalmol*. 1973; 12: 354-65.
38. Alam S, Zawadzki RJ, Choi S, Gerth C, Park SS, Morse L, *et al*. Clinical application of rapid serial fourier-domain optical coherence tomography for macular imaging. *Ophthalmology*. 2006; 113: 1425-31.
39. Fatt I, Shantinath K. Flow conductivity of retina and its role in retinal adhesion. *Exp Eye Res*. 1971; 12: 218-26.
40. Simo R, Villarroel M, Corraliza L, Hernandez C, Garcia-Ramirez M. The retinal pigment epithelium: Something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 190724.
41. Hamann S. Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol*. 2002; 215: 395-431.
42. Stamer WD, Bok D, Hu J, Jaffe GJ, McKay BS. Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: Role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 2803-8.
43. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005; 85: 845-81.
44. Baehr W, Wu SM, Bird AC, Palczewski K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res*. 2003; 43: 2957-8.
45. Hargrave PA. Rhodopsin structure, function, and topography the friedewald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 3-9.
46. Bosch E, Horwitz J, Bok D. Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: Phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem*. 1993; 41: 253-63.
47. Steinberg RH. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol*. 1985; 60: 327-46.
48. Nguyen-Legros J, Hicks D. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol*. 2000; 196: 245-313.
49. Bibb C, Young RW. Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments. *J Cell Biol*. 1974; 61: 327-43.
50. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000; 45: 115-34.
51. Li CM, Clark ME, Chimento MF, Curcio CA. Apolipoprotein localization in isolated drusen and retinal apolipoprotein gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47: 3119-28.

52. Hayes KC, Lindsey S, Stephan ZF, Brecker D. Retinal pigment epithelium possesses both LDL and scavenger receptor activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30: 225-32.
53. Ishida BY, Duncan KG, Bailey KR, Kane JP, Schwartz DM. High density lipoprotein mediated lipid efflux from retinal pigment epithelial cells in culture. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90: 616-20.
54. Curcio CA, Millican CL, Bailey T, Kruth HS. Accumulation of cholesterol with age in human bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 265-74.
55. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc.* 1987; 46: 13-26.
56. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49: 481-93.
57. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992; 119: 598-620.
58. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41: 1819-28.
59. Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem.* 2000; 35: 1-62.
60. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 1161-208.
61. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.
62. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
63. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the haber-weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 12365-7.
64. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 2007; 18: 567-79.
65. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, *et al.* The isoprostanes: Unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev.* 1999; 31: 117-39.
66. Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9: 1471-83.
67. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 287-96.
68. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci.* 2000; 30: 145-58.
69. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med.* 1988; 5: 341-8.
70. Juranek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: Reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys.* 2005; 24: 263-78.

71. Mason RP, Stolze K, Flitter WD. Free radical reactions with DNA and its nucleotides. *Basic Life Sci.* 1990; 52: 119-25.
72. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: A review. *J Reconstr Microsurg.* 1989; 5: 79-84.
73. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 1-14.
74. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Bot.* 2003; 91 Spec No: 179-94.
75. Peskin AV. Cu, zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: A review. *Biosci Rep.* 1997; 17: 85-9.
76. Peskin AV. Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry (Mosc).* 1997; 62: 1341-7.
77. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 2002; 65: 305-11.
78. Naziroglu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res.* 2007; 32: 1990-2001.
79. Gutteridge JM, Maidt L, Poyer L. Superoxide dismutase and fenton chemistry. reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem J.* 1990; 269: 169-74.
80. Naziroglu M, Kutluhan S, Uguz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ. Topiramate and vitamin e modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylentetrazol-induced seizure of rats. *J Membr Biol.* 2009; 229: 131-40.
81. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8: 201-9.
82. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res.* 2001; 34: 325-36.
83. Lee HC. A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: Cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol Chem.* 1999; 380: 785-93.
84. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004; 25: 177-95.
85. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev.* 1980; 1: 109-31.
86. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 1991; 79: C153-8.
87. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF, Jr. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett.* 1996; 386: 219-24.
88. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: Molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002; 309: 151-62.
89. Yang XF, Miao Y, Ping Y, Wu HJ, Yang XL, Wang Z. Melatonin inhibits tetraethylammonium-sensitive potassium channels of rod ON type bipolar cells via MT2 receptors in rat retina. *Neuroscience.* 2011; 173: 19-29.

90. Turek FW, Gillette MU. Melatonin, sleep, and circadian rhythms: Rationale for development of specific melatonin agonists. *Sleep Med.* 2004; 5: 523-32.
91. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 1994; 55: PL455-60.
92. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1996; 21: 307-15.
93. Ke TL, Graff G, Spellman JM, Yanni JM. Nepafenac, a unique nonsteroidal prodrug with potential utility in the treatment of trauma-induced ocular inflammation: II. in vitro bioactivation and permeation of external ocular barriers. *Inflammation.* 2000; 24: 371-84.
94. Lindstrom R, Kim T. Ocular permeation and inhibition of retinal inflammation: An examination of data and expert opinion on the clinical utility of nepafenac. *Curr Med Res Opin.* 2006; 22: 397-404.
95. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 1998; 21: 13-26.
96. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 517-29.
97. Petersen CC, Petersen OH, Berridge MJ. The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 1993; 268: 22262-4.
98. Petersen CC, Berridge MJ. The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in xenopus oocytes. *J Biol Chem.* 1994; 269: 32246-53.
99. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, *et al.* Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 57-61.
100. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1: 11-21.
101. Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. Calcium signalling: More messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol.* 2002; 12: R563-5.
102. Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 7320-2.
103. Betto R, Teresi A, Turcato F, Salviati G, Sabbadini RA, Krown K, *et al.* Sphingosylphosphocholine modulates the ryanodine receptor/calcium-release channel of cardiac sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem J.* 1997; 322 (Pt 1): 327-33.
104. Holtkamp GM, Van Rossem M, de Vos AF, Willekens B, Peek R, Kijlstra A. Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1998; 112: 34-43.
105. Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 1981-9.
106. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.

107. Bank U, Reinhold D, Ansorge S. Measurement of cellular activity with the MTT test. optimization of the method. *Allerg Immunol (Leipz)*. 1991; 37: 119-23.
108. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res*. 2000; 38: 325-9.
109. Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med*. 2009; 9: 1-7.
110. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44: 1957-62.
111. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 25: 192-205.
112. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 71: 952-8.
113. Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB, *et al*. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol*. 2009; 232: 15-23.
114. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985; 260: 3440-50.
115. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*. 1966; 16: 359-64.
116. Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodriguez AB. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: Relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011; 108: 14-20.
117. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
118. Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P, Jr, Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res*. 2000; 19: 205-21.
119. Wang RJ. Lethal effect of "daylight" fluorescent light on human cells in tissue-culture medium. *Photochem Photobiol*. 1975; 21: 373-5.
120. Wu J, Seregard S, Spangberg B, Oskarsson M, Chen E. Blue light induced apoptosis in rat retina. *Eye (Lond)*. 1999; 13 (Pt 4): 577-83.
121. Osborne NN, Lascaratos G, Bron AJ, Chidlow G, Wood JP. A hypothesis to suggest that light is a risk factor in glaucoma and the mitochondrial optic neuropathies. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90: 237-41.
122. Osborne NN, Li GY, Ji D, Mortiboys HJ, Jackson S. Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: Possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies. *J Neurochem*. 2008; 105: 2013-28.
123. Wood JP, Lascaratos G, Bron AJ, Osborne NN. The influence of visible light exposure on cultured RGC-5 cells. *Mol Vis*. 2007; 14: 334-44.
124. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: An overview. *Cell Signal*. 1999; 11: 77-85.

125. Crompton M. Mitochondria and aging: A role for the permeability transition? *Aging Cell*. 2004; 3: 3-6.
126. Yuda Y, Tanaka J, Suzuki K, Igarashi K, Satoh T. Inhibitory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on superoxide generation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1991; 39: 1075-7.
127. Kitagawa S, Takaku F, Sakamoto S. Evidence that proteases are involved in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Clin Invest*. 1980; 65: 74-81.
128. Dale MM, Penfield A. Comparison of the effects of indomethacin, RHC80267 and R59022 on superoxide production by 1,oleoyl-2,acetyl glycerol and A23187 in human neutrophils. *Br J Pharmacol*. 1987; 92: 63-8.
129. Naziroglu M, Uguz AC, Kocak A, Bal R. Acetaminophen at different doses protects brain microsomal Ca^{2+} -ATPase and the antioxidant redox system in rats. *J Membr Biol*. 2009; 231: 57-64.
130. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*. 1997; 29: 363-72.
131. de Faria Poloni J, Feltes BC, Bonatto D. Melatonin as a central molecule connecting neural development and calcium signaling. *Funct Integr Genomics*. 2011; 11: 383-8.
132. Ayar A, Martin DJ, Ozcan M, Kelestimur H. Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett*. 2001; 313: 73-7.
133. Sjoblom M, Safsten B, Flemstrom G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 284: G1034-44.
134. Harrison NL, Zatz M. Voltage-dependent calcium channels regulate melatonin output from cultured chick pineal cells. *J Neurosci*. 1989; 9: 2462-7.
135. Mei YA, Lee PP, Wei H, Zhang ZH, Pang SF. Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells. *J Pineal Res*. 2001; 30: 13-21.
136. Wronka M, Maleszewska M, Stepinska U, Markowska M. Diurnal differences in melatonin effect on intracellular Ca^{2+} concentration in chicken spleen leukocytes in vitro. *J Pineal Res*. 2008; 44: 134-40.
137. Liang FQ, Green L, Wang C, Alssadi R, Godley BF. Melatonin protects human retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress. *Exp Eye Res*. 2004; 78: 1069-75.
138. Hajnoczky G, Csordas G. Calcium signalling: Fishing out molecules of mitochondrial calcium transport. *Curr Biol*. 2010; 20: R888-91.
139. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: An introduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 304: 433-5.
140. Manteifel V, Bakeeva L, Karu T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with he-ne laser: Appearance of giant mitochondria. *J Photochem Photobiol B*. 1997; 38: 25-30.

141. Karbowski M, Kurono C, Wozniak M, Ostrowski M, Teranishi M, Nishizawa Y, *et al.* Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 396-409.
142. Roehlecke C, Schaller A, Knels L, Funk RH. The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells. *Mol Vis.* 2009; 15: 1929-38.
143. Miller BA, Zhang W. TRP channels as mediators of oxidative stress. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 704: 531-44.
144. Naziroglu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: Where are we now? *Neurochem Res.* 2011; 36: 355-66.
145. Pacher P, Csordas G, Hajnoczky G. Mitochondrial Ca^{2+} signaling and cardiac apoptosis. *Biol Signals Recept.* 2001; 10: 200-23.
146. Roy SS, Hajnoczky G. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods.* 2008; 46: 213-23.
147. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: A peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994; 55: PL271-6.
148. Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, *et al.* Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res.* 2000; 28: 242-8.
149. Petrosillo G, Moro N, Ruggiero FM, Paradies G. Melatonin inhibits cardiolipin peroxidation in mitochondria and prevents the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47: 969-74.
150. Koistinaho J, Alho H, Hervonen A. Effect of vitamin E and selenium supplement on the aging peripheral neurons of the male sprague-dawley rat. *Mech Ageing Dev.* 1990; 51: 63-72.
151. Yuan H, Lan T, Lin J. Modulation of nano-selenium on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2005; 5: 4846-9.
152. Yuan H, Lin J, Lan T. Effects of nano red elemental selenium on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2006; 1: 896-9.
153. Jacob S, Poeggeler B, Weishaupt JH, Siren AL, Hardeland R, Bahr M, *et al.* Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): High tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *J Pineal Res.* 2002; 33: 186-7.
154. Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med.* 1999; 31: 261-71.
155. Milbury PE, Graf B, Curran-Celentano JM, Blumberg JB. Bilberry (vaccinium myrtillus) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 2343-9.
156. Skulachev VP. Integrating functions of biomembranes. problems of lateral transport of energy, metabolites and electrons. *Biochim Biophys Acta.* 1980; 604: 297-310.
157. IRVINE SR. A newly defined vitreous syndrome following cataract surgery. *Am J Ophthalmol.* 1953; 36: 599-619.
158. Flach AJ. The incidence, pathogenesis and treatment of cystoid macular edema following cataract surgery. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1998; 96: 557-634.

159. Kremer M, Baikoff G, Charbonnel B. The release of prostaglandins in human aqueous humour following intraocular surgery. effect of indomethacin. *Prostaglandins*. 1982; 23: 695-702.
160. Thomas MA, O'Grady GE, Swartz SL. Prostaglandin levels in human vitreous. *Br J Ophthalmol*. 1985; 69: 275-9.
161. Arcieri ES, Santana A, Rocha FN, Guapo GL, Costa VP. Blood-aqueous barrier changes after the use of prostaglandin analogues in patients with pseudophakia and aphakia: A 6-month randomized trial. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123: 186-92.
162. Schepens CL, Avila MP, Jalkh AE, Trempe CL. Role of the vitreous in cystoid macular edema. *Surv Ophthalmol*. 1984; 28 Suppl: 499-504.
163. Benitah NR, Arroyo JG. Pseudophakic cystoid macular edema. *Int Ophthalmol Clin*. 2010; 50: 139-53.
164. Wolf EJ, Braunstein A, Shih C, Braunstein RE. Incidence of visually significant pseudophakic macular edema after uneventful phacoemulsification in patients treated with nepafenac. *J Cataract Refract Surg*. 2007; 33: 1546-9.