T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON OLUŞTURULMUŞ SIÇAN RETİNASINDA APOPTOZİSİN İNCELENMESİ

Ayşe ŞAHABOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2006

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON OLUŞTURULMUŞ SIÇAN RETİNASINDA APOPTOZİSİN İNCELENMESİ

Ayşe ŞAHABOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2006

Prof. Dr. Nihat DİLSİZ' in danışmanlığında, Ayşe ŞAHABOĞLU'nun hazırladığı "Deneysel iskemi-reperfüzyon oluşturulmuş sıçan retinasında apoptozisin incelenmesi" konulu bu çalışma 05.05.2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

Üye : Prof. Dr. Leyla AÇIK

Üye : Prof. Dr. Ziya KARAKILÇIK

Bu tezin Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof.Dr. İbrahim BOLAT
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 539

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

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON OLUŞTURULMUŞ SIÇAN RETİNASINDA APOPTOZİSİN İNCELENMESİ

Ayşe ŞAHABOĞLU

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

Yıl: 2006, Sayfa: 80

Bu çalışma, çeşitli antioksidanların, sıçan retinasında iskemi-reperfüzyon (İ-R) sırasında oluşan serbest oksijen radikallerine karşı muhtemel rolünü göstermektedir. Hayvanlar rast gele seçilerek sekiz gruba ayrıldı. Bunlar 1. grup (kontrol), 2. grup (İ-R), 3. grup (İ-R + *Trigonella foenum-graecum*), 4. grup ((İ-R+ *Cyperus rotundus*), 5. grup (*Thymus longicaulis*), 6. grup (*Fumaria asepala* Boiss.), 7. grup (Lutein) ve 8. grup (Salisilaldimin) olarak adlandırıldı. Deneyde sıçanların sağ gözleri iskemi-reperfüzyon için kullanıldı. 3-8. gruplara iskemi başlamadan 6 saat öncesinden ve reperfüzyonda altışar saat aralıklarla *Trigonella, Cyperus, Thymus, Fumaria* ekstraktı, lutein ve salisilaldimin verildi. 24 saatlik reperfüzyondan sonra hayvanlar kesildi. Daha sonra retinalar, malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) ölçümü için izole edildi. Bu deney sonucunda, tüm grupların lipid peroksidasyonunu, iskemi grubuna göre koruduğu saptanırken, salisilaldimin (2.92 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) grubunun MDA değeri kontrol (2.82 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) grubuna en yakın değere sahip olduğu görüldü. Buna göre, salisilaldiminin (2.92 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) Luteinden (3.55 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), Luteinin, *Fumaria*' dan (4.95 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), *Fumaria'*nın Cyperus'tan (5.59 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), *Cyperus'un Thymus'tan* (9.16nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), *Thymus*'un *Trigonella*'dan (10.46 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) daha iyi koruma sağladığı görülmüştür. GSH miktarları değerlendirildiğinde kontrol grubuna (2.3 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) en yakın değerin *Fumaria* grubunda (2.2 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) olduğu görülmüştür. Buna göre *Fumaria* grubundaki GSH miktarı (2.2 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) salisilaldiminden (2.1 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), salisilaldiminin *Trigonella* ve *Cyperus*'tan'dan (1.9 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), *Trigonella ve Cyperus'un* Luteinden (1.8 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) daha yüksek olarak bulunmuştur. Sonuç olarak kullanılan antioksidanların peroksidasyon ürünü olan MDA oluşumunu engellediği ve bir antioksidan olan GSH miktarını koruduğu tespit edilmiştir.

Buna ilave olarak iskemi-reperfüzyon sonucunda oluşan apoptozisden birinci derecede sorumlu kaspaz-3 proteini SDS-PAGE ve immünoblot teknikleri ile incelenmiştir. İmmunoblot sonuçları Fluor-S-Multi-Imager ile taranarak gruplar arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, kullanılan antioksidanların özellikle de salisilaldiminin gözde oluşan I/R hasarlarına karşı klinik amaçlı kullanılabileceği kanaati ortaya çıkmaktadır.

ANAHTAR KELİMELER : İskemi-reperfüzyon, retina, MDA, GSH, apoptozis, kaspaz 3

ABSTRACT

Master Thesis

THE INVESTIGATIONS OF APOPTOSIS IN ISCHEMIA-REPERFUSION INDUCED RAT RETINA

Ayşe ŞAHABOĞLU

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

Year: 2006, Page: 80

This study shows the possible role of various antioxidants on free oxygen radicals which formed during ischemia-reperfusion (I-R) in rat retina. The animals, randomly selected, were divided into eight groups. These were named as group 1 (control), group 2 (I-R), group 3 (I-R+ *Trigonella*), group 4 (I-R+*Cyperus*), group 5 (I-R+*Thymus*), group 6 (I-R+ *Fumaria*), group 7 (I-R + Lutein), group 8 (I-R + Salisilaldimin). In the experiment, right eyes of rats were used for ischemia-reperfusion. Groups 3-8 received, *Trigonella, Cyperus, Thymus*, *Fumaria* extract, lutein and salisilaldimin before 6 hours of ischemia and after 6 hours of reperfusion respectively. The animals were sacrificed after 24 hours of reperfusion. Then, retina were isolated and processed for the quantification of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels. At the end of this experiment, all groups determined significiant protection aganist formation of MDA when compared to I-R group while MDA level of salisilaldimin (2.92 nmol/100 mg retina tissue wet weight) group was observed as it had the closest level to the control group. According to this, lutein (3.55 nmol/100 mg retina tissue wet weight) provides more protection than *Fumaria* (4.95 nmol/100 mg retina tissue wet weight), *Cyperus* (5.59 nmol/100 mg retina tissue wet weight), *Thymus* (9.16 nmol/100 mg retina tissue wet weight) *Trigonella* (10.46 nmol/100 mg retina tissue wet weight).When quantity of GSH was evaluated, it was observed that lutein group (2.3 nmol/100 mg retina tissue wet weight) had the closest level to the control group. According to this result, the quantity of GSH in group *Fumaria* was found higher than salisilaldimin (2.1nmol/100 mg), *Trigonella* and *Cyperus* (1.9 nmol/100 mg retina tissue wet weight), Lutein (1.8 nmol/100 mg retina tissue wet weight) *Thymus* (1.8 nmol/100 mg retina tissue wet weight). As result, antioxidants which used in this experiment was found to prevent formation of peroxidation substrat MDA and protect quantity of a antioxidant GSH.

In addition, the level of caspase -3 which is a marker of apoptotic damage occured during ischemia-reperfusion was determined by using SDS-PAGE and immunoblot assay. The results of immunoblot assay were scanned to see the differences between groups by Fluor-S-Multi-Imager (Bio-Rad). According to these results, all tested antioxidants particularly lutein may use in patients with different types of ocular I/R injuries.

KEY WORDS : ischemia-reperfusion, retina, MDA, GSH, apoptosis, caspase 3.

TEŞEKKÜR

Bilimsel hayatımda örnek aldığım, çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim, saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Nihat DİLSİZ'e, tezimin her aşamasında moral desteği veren biyoloji bölümü öğretim elemanlarına, Arş. Gör. Nazmiye GÜREL'e, Arş. Gör. Hacer DOLAŞ'a, maddi manevi her türlü destekleriyle her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Anneme…

SİMGELER DİZİNİ

AION	Anterior iskemik optik nöropati
ADP	Adenin difosfat
APAF-1	Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1
CAT	Katalaz
dl	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
GSH	Glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
ICE	İnterlökin-1β konverting enzim
MDA	Malondialdehit
mmol	Milimol
nmol	Nanomol
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Redükte Formu
NMDA	N-methyl-D-aspartat
OH	Hidroksil radikali
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Thiobarbütürik asit reaktif maddeleri
TET	Tetraetoksipropan
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar (10^{-6})

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Retinal tolerans, iskemide geri dönüşümsüz hasar için geçen süre…….. 21
Çizelge 3.1. MDA standart eğrisinin hazırlanması……... 42
Çizelge 3.2. GSH Standart eğrisinin hazırlanması…… 43
Çizelge 4.1. Kontrol grubunda GSH değerleri…….. 46
Çizelge 4.2. İskemi-reperfüzyon grubunda GSH eğerleri……. 46
Çizelge 4.3. İ-R + *Trigonella foenum-graecum* grubunda GSH değerleri..…….. 47
Çizelge 4.4. İ-R + *Cyperus rotundus* grubunda GSH değerleri …….…….. 47
Çizelge 4.5. İ-R + + *Thymus longicaulis* grubunda GSH değerleri.....…….…….. 47
Çizelge 4.6. İ-R + + *Fumaria asepala* grubunda GSH değerleri…….…….. 48
Çizelge 4.7. İ-R + Lutein grubunda GSH değerleri…….…….. 48
Çizelge 4.8. İ-R + salisilaldimin grubunda GSH değerleri…….…….. 48
Çizelge 4.9. Tüm gruplardaki GSH ortalama değerleri…… 49
Çizelge 4.10. Kontrol grubunda MDA değerleri…….....…….. 51
Çizelge 4.11. İskemi-reperfüzyon grubunda MDA eğerleri …… 51
Çizelge 4.12. İ-R + *Trigonella foenum-graecum* grubunda MDA değerleri ……...…….. 51
Çizelge 4.13. İ-R + *Cyperus rotundus* grubunda MDA değerleri ….....……..... 52
Çizelge 4.14. İ-R + *Thymus longicaulis* grubunda MDA değerleri …… 51
Çizelge 4.15. İ-R + *Fumaria asepala* grubunda MDA değerleri ….....……... 52
Çizelge 4.16. İ-R + Lutein grubunda MDA değerleri …….…… 53
Çizelge 4.17. İ-R + salisilaldimin grubunda MDA değerleri …….…… 53
Çizelge 4.18. Tüm gruplardaki MDA ortalama değerleri .....…….. 53
Çizelge 4.19. Sıçan retinasında çeşitli antioksidanların MDA ve GSH üzerindeki etkileri..... 56
Çizelge 4.20. Aktif kaspaz-3 polipeptid yoğunluğunun densitometrik ölçümü…..….…..... 57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Gözün genel yapısı……. 3
Şekil 2.2. Retina hücreleri…… 5
Şekil 2.3. Antioksidan-serbest radikal dengesi……..... 7
Şekil 2.4. İskemideki serbest radikal mekanizması……..... 17
Şekil 2.5. İskemideki iyon akışı.....……..... 22
Şekil 2.6. Glutamat-Laktat mekanizması.....……... 24
Şekil 2.7. İskemideki biyokimyasal süreç.....…….… 26
Şekil 2.8. Embriyonik gelişimde apoptozis.....…… 28
Şekil 2.9. Apoptozis-Nekrozis…….....……..... 29
Şekil 2.10. p53 aktivasyonu.....…… 35
Şekil 2.11. Bcl'nin apoptozisteki rolü .....……..…… 36
Şekil 3.1. Sıçanlarda iskemi modeli.....……. 40
Şekil 4.1. GSH standart kalibrasyoneğrisi.....……. 49
Şekil 4.2. Sıçan retina örneklerinde GSH miktarı.....……..…… 49
Şekil 4.1. MDAstandart kalibrasyon eğrisi.....……. 54
Şekil 4.2. Sıçan retina örneklerinde MDA miktarı.....……..…… 54
Şekil 4.1. Western blot analizi ile aktif kaspaz-3 polipeptidinin belirlenmesi.....… 57
Şekil 4.2. Retina örneklerinde görülen moleküler değişiklikler.....……. 58

.

1. GİRİŞ

İskemi bir dokuyu besleyen arteriyal sistemin belli bir zaman dilimi içinde tıkanması sonucunda ortaya çıkan bir durumdur. İskemik hasarın giderilmesi için bu kritik zaman dilimi içinde dokunun tekrar oksijen ile beslenmesi gerekmektedir. İskemi oluşmuş dokunun kan akışının tekrar sağlanmasına reperfüzyon denilmektedir. İskeminin kritik süresi dolmadan, doku reperfüze edilirse hücreler ölümden kurtulabilir. İskemi süresinin uzaması reperfüzyona rağmen ölüm riski olan hücrelerin sayısını artırır. Bu hücreler geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girdikleri için reperfüze edilseler bile nekroza giderler.

Reperfüzyon hasarının büyük bölümünden serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır. Bir veya daha çok sayıda eşleşmemiş elektron içeren serbest radikaller biyomolekülleri okside edip hücre ölümüne sebep olabilmektedirler (Celebi ve ark., 2002, Baykal ve Kocabalkan, 2000). Gözde özellikle ışığa duyarlı retinanın oksijenle etkileşimi oldukça fazladır. Retinada serbest radikallerin birikimi sonucu lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) birikmeye başlar. MDA proteinler ile birleşir ve onlarda yüksek moleküllü protein oluşumu (agregasyon), disülfit köprülerinin oluşumu, deamidasyon ve nonenzimatik glikozilasyon gibi postsentetik değişimlere neden olmaktadır.

Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Bu sistemin düzenli işlemesi organizmanın sağlıklı yaşamını sürdürmesi bakımından oldukça önemlidir. Ancak, iskemi sonrasında yüksek miktarda oksijenin süratli bir şekilde sisteme dahil olması sonucunda serbest radikal miktarındaki artış doğal savunma sistemini aşmakta ve sonuçta hücre hasarına kadar giden bir çok patolojik durum ortaya çıkmaktadır (Poli ve ark., 1993; Aydemir, 2002). Hücre apoptozisinden sorumlu önemli bir enzim Kaspaz-3 (apopain), 13 farklı üyesi bulunan interlökin β grubundan olup sistein

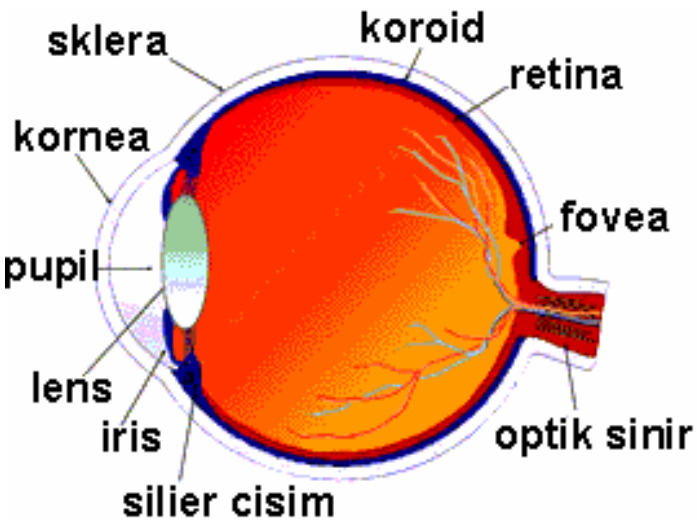
proteaz enzimi olarak bilinir. Kaspaz-3, 17 ve 12 kDa molekül ağırlığına sahip iki alt birimden oluşur. Aktif kaspaz-3 enzimi özellikle DNA tamir ve regülasyonunda görev alan enzimler ve nükleer lamin gibi moleküllerin parçalanması ve sonuçta apoptozis (programlanmış hücre ölümü) olayında önemli rol oynar (Leski ve ark., 2001; Andersson ve ark., 2003).

Retinanın fazla miktarda oksijen kaynağına ve doymamış yağ asitlerine sahip olması nedeni ile retinada oksidatif hasar oldukça önem arz etmektedir. Bitkilerde fazla miktarda bulunan flavonoid ve polifenolik bileşiklerin hücrelerde protein sülfhidril oluşumunu ve DNA oksidasyonlarını inhibe ettiği bilinmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, elde edilen *Fumaria asepala Boiss, Trigonella foenum-graceum, Cyperus rotundus, Thymus longicaulis* ekstraktlarının, luteinin ve salisilaldiminin, iskemi-reperfüzyon oluşturulan sıçanlardaki rolü araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Göz

Göz, kafatasının orbita çukurunda yer alan, ışığa duyarlı (fotosensitif), karmaşık ve oldukça gelişmiş bir duyu organıdır (Junqueire ve ark., 1992; Vural, 1999). Gözün içinde bulunduğu ve kemiklerle çevrili göz çukuru (orbita), üstte kaş ve kaş kemiği, dışta ve altta şakak kemiği, içte burun kökü ile çevrelenmiştir. Göz kapağı, yabancı maddelerden gözü korur. Göz çukurunun hacmi 29 cm^3 kadardır. İçinde göz yuvarlağı, gözü hareket ettiren kaslar, damar ve sinirler ile bunlara yastık vazifesi gören yağ dokusu bulunur. Göz küresi iç içe geçmiş üç tabakadan oluşur (Şekil 2.1.) (Hart, 1992; Arıncı 1997; Vural, 1999).



Şekil 2.1. Gözün genel yapısı (www.ecind.com/glossary/basiceyestructure)

2.1.1. Fibröz tabaka (Tunica fibrosa)

En dış tabakayı oluşturan fibröz tabaka, sağlam bir bağ dokusundan yapılmıştır. Bu tabakanın altıda beşlik opak renkli kısmını sklera; öndeki altıda birlik şeffaf kısmını ise kornea oluşturur. Işık kornea vasıtasıyla göze girer. Fibröz tabaka göz kasları için tutunma yeri olarak ve göz küresinin şeklini almasında önemli role sahiptir (Hart, 1992; Junqueire ve ark., 1992).

2.1.2.Vasküler tabaka (Tunica vasculosa)

Bu tabakada çok sayıda kan damarı ve koyu kahve renginde pigment bulunmaktadır. Orta kısımdaki bu tabakanın büyük kısmını arkada yer alan koroid, öne doğru silyer cisim (corpus ciliare) ve en ön kısımda ise iris oluşturmaktadır. Buradaki kan damarları retinanın beslenmesini sağlamaktadırlar (Hart, 1992; Junqueire ve ark., 1992).

2.1.2.1. Silyer cisim (Corpus ciliare)

Otonom sinirler tarafından innerve edilen ve akomodasyon (gözün uzaktan yakınlaşan bir nesneye karşı uyumu) ile ilgili olan düz kaslar silyer cisim içinde bulunurlar. Bu düz kasların kasılıp gevşemesi ile lens adı verilen göz merceği'nin kalınlığı (kırıcılığı) değişir. Lens, pupillanın tam arkasında yer alır. İki kenarı da konveks olan bir mercektir. Ligamentum suspensorium lentis adı verilen bağlar ile silyer cisme tutunur (Hart, 1992; Junqueire ve ark., 1992).

2.1.2.2. İris

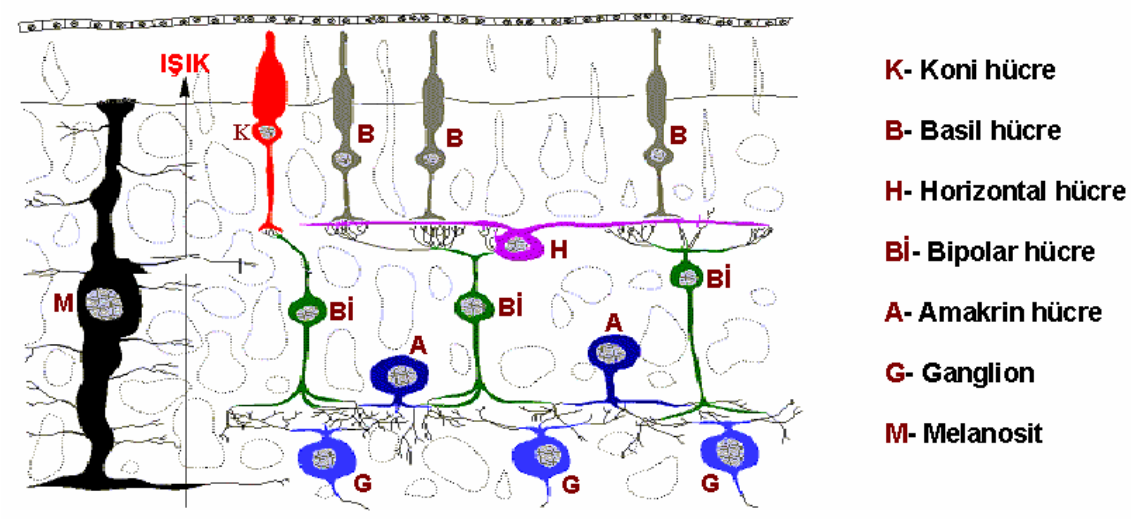
Gözün renkli veya pigmentli kısmı olup iki tip düz kastan meydana gelir. İris'in merkezinde bulunan açıklığa göz bebeği (pupilla) adı verilir. Bu açıklığın daralıp genişlemesi, iris üzerinde bulunan iki kasın hareketi ile gerçekleşir (Hart, 1992; Arıncı 1997).

2.1.3. Sinirsel tabaka (Tunica nervosa)

En iç kısımda bulunan bu tabakayı büyük ölçüde retina oluşturur. Bu kısımda görme ile ilgili fotoreseptör hücreler (koni ve basiller) bulunur. Koni hücreleri renkli görmeye duyarlı reseptörler olup, aydınlıkta görmeyi sağlarlar. Basil hücreleri (rodlar) ise ışığa çok duyarlı hücreler olup karanlıkta görmeyi sağlarlar (Hart, 1992; Arıncı 1997).

2.1.3.1. Retina

Göz küresinin en içteki üçüncü katmanı olan retina, önemli kimyasal ve fiziksel olayların merkezidir. Retina pigmentli retina ve sensoriyal retinadan oluşmakla birlikte renkli görmeden sorumlu olan konileri ve esas olarak karanlıkta görmeden sorumlu olan basilleri içeren, gözün ışığa duyarlı bölümüdür. Basil ve koniler uyarıldıklarında, sinyaller retinadaki ardışık nöronlara ve sonuçta optik sinir liflerine ve buradan da beyin korteksine iletilir (Şekil 2.2.) (Guyton ve Hall, 2001; Hart, 1992; Bengisu, 1998).



Şekil 2.2. Retina hücreleri (http://cas.bellarmine.edu)

Retina optik sinirden ora serrataya kadar uzanır, içte vitreus ve dışta koroid ile çevrelenmiştir. Koroide sıkıca yapışmış olan pigmentli retina, tek katlı hücre tabakasından oluşur ve yapısında melanin bulunur. Pigment epitelindeki melanin, ışığın koroide ve göz dışına geçmesini engellemesi yanında, fotoreseptörlerdeki foto-kimyasal reaksiyonlar sonucu açığa çıkan ısıyı emerek termostat görevi de yapar (Hart, 1992; Guyton ve Hall, 2001).

Sensoriyel retina ise mitozlar sonucu fotoreseptörler (basil ve koni hücreleri), sinyalleri basil ve konilerden bipolar hücre dentritlerine yatay olarak ileten horizontal hücreler, sinyalleri basil, koni ve horizontal hücrelerden gangliyon ve amakrin hücrelere ileten bipolar hücreler, sinyalleri bipolar hücrelerden gangliyon hücrelerine ileten amakrin hücreler ve destek hücreleri olan müller hücrelerinden meydana gelmiştir (Thuman ve Hinton, 1997; Bengisu, 1998; Guyton ve Hall, 2001).

Retinanın iç tabakaları için besleyici kan desteği, göz küresine optik sinir ile birlikte giren ve sonra tüm iç retina yüzeyine dallanan retinal arterden sağlanır. Bununla beraber retinanın dış tabakalarının çoğu, retina ve sklera arasında damarsal bir yapı olan koroidden beslenir (Guyton ve Hall, 2001).

2.2. Serbest radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir (Akkuş, 1995). Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşabilirler. Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler (Hallıwell ve Aruoma, 1991; Hallıwell, 1991):

1. Homolitik bölünme: Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronların birisinin kalması şeklindeki bölünme.

$$X{:}Y \longrightarrow X' + Y'$$

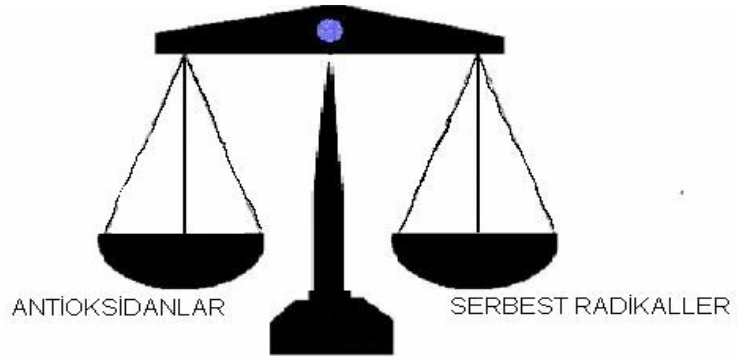
2. **Heterolitik Bölünme:** Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesidir. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektronlar atomlardan birisinde kalır. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.

$$X{:}Y \longrightarrow X{:}^{-} + Y^{-}$$

3. **Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi:**

$$A + e^{-} \longrightarrow A'^{-}$$

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} metallerinde ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Hallıwell, 1991; Akkuş, 1995).



Şekil 2.3. Antioksidan-serbest radikal dengesi

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişlerinin doğal bir sonucudur. Oksidan moleküller organizmada başlıca glikozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırası ve sonrasında sürekli bir oluşum halindedir. Endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından sürekli

etkisizleştirme süreci içerisindedir. Bu oluşum ve etkisizleştirme olayları organizmalarda bir denge halindedir (Şekil 2.3.) (Hallıwell, 1996; Akkuş, 1995).

Serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyöz ajanlara karşı savunmasındaki önemli moleküllerdir. Ancak, serbest radikaller belirli düzeyin üzerinde oluşur ve antioksidanlar yetersiz kalırsa söz konusu serbest radikaller hücrenin yapı elemanları olan protein, lipit, karbohidrat, nükleikasitler ve yararlı enzimlerin yapılarını bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Tamer ve ark., 2000). Bunlardan özellikle lipitler, serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olurlar (Salım, 1993; Bruckdorfer, 1987).

Serbest radikaller iyonların veya uyarılmış moleküllerin ayrılmaları sonucunda oluşan, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Bunların yaklaşık 10^{-5} saniye gibi ömürleri vardır ve son derece reaktiftirler. Yani diğer atom ya da moleküllerle kolayca reaksiyona girerler. Çünkü, eşleşmemiş elektronların, bir başka radikalin aynı durumdaki elektronu ile eşleşme ya da bir elektron transferi reaksiyonu ile eşleşerek kararlı hale gelme eğilimleri vardır. Bu sebeple serbest radikaller, elektron alıcı (oksitleyici) ya da elektron verici (redükleyici) özelliklere sahiptirler (Hallıwell, 1989).

Serbest radikal moleküller; organizmadaki bir çok olağan hücresel tepkimenin (enerji üretimi, lipitlerin ve proteinlerin paçalanması ile inflamatuvar süreçler bunlar arasında yer alır) yan ürünü şeklinde sürekli oluşmaktadır. Hücrelerin çoğunluğu, olağan koşullar altında kendilerini serbest radikallerin hasar verici etkilerine karşı koruyacak hücre içi ve hücre dışı kimyasal mekanizmalarla donatılmışlardır. Radikal moleküller, antioksidan savunma gücü ile dinamik bir denge içinde bulunduğu sürece organizma için yararlıdır. Örneğin; fagositik hücreler tarafından mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikal

üretimidir. Serbest radikaller apoptozisin tetikleyicisi, habercisi ve efektörü olarak görev yaparlar. Bu şekilde; aşırı hücre poliferasyonunu önleyerek homeostaziste yer alırlar. Antioksidan savunmanın çökmesi de apoptozisi tetiklemektedir. Serbest radikaller ikinci haberci olup, transkripsiyon faktörlerini aktive ederler. Hücreler arası haberleşmede görev alırlar. Hücrenin büyümesini sağlayan olayları düzenlerler. Sitozolde ve mitokondride üretilen serbest oksijen radikali, protein sistein kalıntılarının redoksunu düzenleyerek proteinlerin yapı ve işlevinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve antioksidatif savunma mekanizması arasındaki denge bozulduğunda, serbest oksijen radikalleri düzeyi artar. Radyasyon, oksijen toksisitesi, postiskemik reperfüzyon hasarı, enfeksiyonlar, enflamasyonlar yanı sıra yaşlanma ile ilgili hastalıklardan katarakt, ateroskleroz, karsinogenez, diyabet ve nörolojik hastalıklar serbest oksijen radikalleri üretimini arttırır (Hallıwell, 1991; Hallıwell, 1989; Uysal, 1998; Erden, 1992).

Serbest oksijen radikalleri, hücrenin önemli komponentleri olan lipit, karbohidrat, protein ve DNA'yı oksitleyerek biyolojik sistemlerde ağır hücre zedelenmelerine neden olurlar (Hallıwell ve Aruoma, 1991; Hallıwell, 1991; Hallıwell, 1989).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen metabolizmasındaki anahtar maddeler şunlardır.

1. Oksijenin kendisi (O_2)
2. Süperoksit anyonu (O^-_2)
3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)
4. Geçiş metallerinin iyonları (Cu^{+2} Fe^{+3}, Mn^{+2} vb.)
5. Hidroksil radikali (OH^-)

2.2.1. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar

Serbest radikaller aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan savunma sistemi yetersiz kaldığında biyomoleküllere zarar verirler (Hallıwell, 1989). Reaktif

oksijen radikalleri, membran lipidlerinin peroksidasyonuyla, membran permabilitesinin artmasına enzimlerin ve proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmalarına, DNA yapısının bozulmasına ve mukopolisakkaritlerin depolimerizasyonuna neden olarak doku hasarı oluşturur. Serbest radikaller hücre ve dokuda bir çok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir (Halliwell, 1991; Halliwell, 1989; Uysal, 1998).

2.2.1.1. Membran lipidlerine etkileri

Hücre membranı, bol miktarda doymamış yağ asidi içerdiğinden serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır (Hallıwell, 1989). Ortamda bulunan serbest radikaller yağ asitlerinden bir proton koparark "Lipid peroksidasyon" olarak bilinen reaksiyonun başlamasına neden olurlar. Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi maddeler hücrenin bir çok komponentiyle reaksiyona girerek hücresel ve metabolik fonksiyonlar üzerine toksik etki gösterirler (Köse ve Doğan, 1992).

Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (Köse ve Doğan, 1992). Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. MDA, membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey determinantlarının bazı özelliklerini değiştirmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MDA, mutajenik genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (Köse ve Doğan, 1992).

2.2.1.2. Proteinlere etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Protein fonksiyonu için kritik pozisyonda olan amino asitler (örneğin enzimin aktif bölgesindeki amino asitler),

özellikle radikal hasarına duyarlıdırlar. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril (-SH) grubu bulunduran amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler, oksidasyona en fazla maruz kalanlardır. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır. Bunun yanı sıra iskemi-reperfüzyon sürecinde hücre içi enzimlerden olan antioksidan enzimlerin oksidasyonları da bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın nedenlerinden birini oluşturabilmektedir (İşlekel ve ark., 2000).

2.2.1.3. Karbohidratlara etkileri

Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzaloaldehitler meydana gelir. Okzaloaldehitler, DNA, RNA, ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterirler (Akkuş, 1995). Karbohidratların proteinlere bağlanması, proteinleri serbest radikal hasarına daha duyarlı kılmaktadır. Böylece hormonal ve nörotransmitter yanıtlarda rol oynayan hücre reseptör işlevleri değişmektedir (Aybey, et al., 1996; Winrow, et al., 1993). Bir mukopolisakkarit olan hyalüronoik asit gözün vitreusunda bol miktarda bulunur. Hyalüronoik asidin oksidasyonu katarakt oluşumuna katkıda bulunur (Akkuş, 1995).

2.2.1.4. Nükleik asitlere etkileri

Reaktif oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makro molekül nükleik asitlerdir. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asidin (DNA) temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlar ile reaksiyona girerek değişikliklere yol açar (Akkuş, 1995). Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Özekin ve Değer, 2001).

2.3. Antioksidanlar

Aerobik canlılarda serbest oksijen radikalleri, normal metabolik olaylar esnasında oluşmaktadır. Serbest radikaller, aşırı miktarlarda üretildikleri zaman serbest radikallere bağlı hasarlar ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar, dört farklı mekanizma ile serbest radikal hasarını engellerler:

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi
2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilirler

1. Yapılarına göre
    a) Enzimler
    b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller
2. Kaynaklarına göre
    a) Organizmaya ait olanlar (Endojen)
    b) Dışarıdan alınanlar (Eksojen)
3. Çözünürlüklerine göre
    a) Suda çözünenler
    b) Yağda çözünenler
4. Bulundukları yere göre
    a) Hücre içinde bulunanlar
    b) Plazma ve diğer ekstra sıvılarda bulunanlar

2.4. Antioksidan olarak kullanılan maddeler ve bitkiler

2.4.1. Lutein

Daha çok sebze ve meyvelerde bulunan lutein, insanlara bu besinler yoluyla taşınır. Temel bir ksantofil olan lutein, insan plazmasında β-karoten kadar bol bulunur (Thurnham, 1994). Yapısal olarak β-karotene çok benzer fakat ek olarak molekülün tüm β-iyon halkalarında hidroksil grubu bulunur. Bu hidroksil grubu molekülün hidrofilik özelliğini daha da arttırır. β-karoten ile karşılaştırıldığı *in vitro* çalışmalarda, β-karotenden daha fazla antioksidan özelliği olduğu gösterilmiştir (Chopra, 1993). Lutein, zeaxanthin ile birlikte makula bölgesi pigmentini oluşturur ve retinada bol miktarda bulunur. Biyolojik aktivitesi özellikle yaşa bağlı makula dejenerasyonunda ortaya çıkar (Olmedilla, 2003). Yeterli lutein alımı ile makula dejenerasyonu azalır. Normal insan serumunda lutein seviyesi 0.6-1.1 mmol/L arasında değişir ve görme fonksiyonlarına yararlı etkileri vardır. Luteinin dokular arasındaki dağılımı diğer karotenoidler gibidir (Burri ve ark., 2004) Lutein gözde, serbest radikal hasarına neden olabilen görünür mavi ışığı absorplayarak gözde serbest radikal hasarını önleyen, oksitlenmiş bir karotenoittir.

2.4.2. 1-hidroksi-2,6-di-tersiyer bütil fenil-5- metoksisalisilaldimin (I-OH 2,6-Butph-5-OCH3-salisilaldimin-I)

Sterik engelli 2,6-di-tetra butil fenil içeren sentezlenmiş, 1-hidroksi-2,6-di-tersiyer bütil fenil-5- metoksisalisilaldimin bileşiği etkili antioksidan özelliği olan fenoller sınıfına aittir (Foigt, 1972). İri hacimli tersiyer gruplar içeren fenoller polimer malzemelerin, uçak yakıtları ve makine yağlarının oksidasyonunun ve yıpranmasının engellenmesi gibi değişik alanlarda son derece kuvvetli antioksidan olarak kullanılmaktadır (Altwicker, 1967; Altwicker, 1972). Benzer bileşiklerin gıda koruyucuları olarak ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçların hazırlanmasında uygulandığı da bilinmektedir (Altwicker, 1967). 1-hidroksi-2,6-di-tersiyer bütil fenil-5- metoksisalisilaldimin bileşiğine benzer salisil aldiminler ve onların geçiş

metal bileşikleri ($Cu_{(II)}$, $Ni_{(II)}$, $Zn_{(II)}$), polipropilen melzemelerinin terma- ve foto-oksidasyonunun engellenmesinde etkili olduğuna ilişkin patentlerin olduğu literatürlerden bilinmektedir (Kasumov, 2001, Kasumov ve ark., 1980). Bileşiğin yakın benzeri olan 1-OH- 2,6-di- tetrabutilfenil-salisil aldimin bileşiğinin ipek böceklerinin gıdasına eklenmesiyle daha kaliteli ve verimli ipeğin üretildiği bulunmuştur (Bakirov ve ark. 1983). Bu bileşiklerin bütün özelliklerinin temelinde, kolaylıkla radikallerle bağlanarak radikalleri daha etkisiz (reaktivitesi daha az) hale getirmesinden kaynaklanır. Başka bir deyişle, radikallerin oluşumu ile gerçekleşen olayların engellenmesinde bu bileşikler antioksidan olarak kuvvetli etki gösterdikleri bilinmektedir.

2.4.3. *Fumaria asepala Boiss.* (Şahtere otu)

Papaveraceae familyasında bulunan yarı dik, tırmanıcı, bodur, tek yıllık ve otsu bir bitkidir. Yapraklar 2-3 pinnat parçalı, lobları düz, linear-oblang; salkım çiçekli, küçük saplı, sepalleri genellikle yoktur (Davis, 1965)

2.4.4. *Trigonella foenum-graecum L.* (Çemenotu)

Fabaceae familyasına ait olan *Trigonella foenum-graecum L.* yurdumuzda ve Akdeniz havzasında yetişen tek yıllık ve otsu bir bitkidir. Yurdumuzda, Hindistan'da, Güney Afrika'da ve Akdeniz ülkelerinde kültürleri yapılmaktadır (Alhabori ve Raman, 1998). Yaprakları trifoliat, çiçekler tek başına, yaprakların koltuğunda ve sarı renklidir. Meyvesi yay gibi kıvrık, uzun ve uç tarafta sivrilmiştir. Tohumları prizma şeklinde olup müsilaj ve yağ taşır. Baharat karışımında kullanılır ve iştah açıcıdır. Bitkinin kuvvetli ve kalıcı bir kokusu vardır. Koku trigonelin alkoloidinden ileri gelir. Ravikumar ve Anuradha, 1999 yılında yaptıkları çalışmada, kanda lipid peroksidasyonunu engellediği deneylerle gösterilmiştir (Ravikumar ve Anuradha, 1999).

2.4.5. *Cyperus rotundus L.* (Topalak)

Cyperus rotundus L. Topalak, çok yıllık bir bitki olup Cyperaceae familyasındandır. Toprak altında sıkıştırılmış tip (yumru ve tüber) rizomlar ile çoğalır. En çok 30-40 cm boylu olmasına karşılık, genelde birim alandaki yoğunluğu çok fazla olduğundan rekabet gücü yüksektir. Mart sonu veya nisan başında toprak yüzüne çıkar, bu arada toprak altı organlarını çoğaltarak buralardan da çıkışlar yapar. Bu çıkışlar soğuk günlere kadar devam eder (http://www.tagem.gov.tr/YAYINLAR/kitappamuk/topalak.htm).

2.4.6. *Thymus longicaulis* (Kekik, Zahter)

Pembe veya beyaz çiçekli, küçük yapraklı, kuvvetli kokulu, çok yıllık bir bitkidir. Kurak tepe ve sırtlarda kümeler halinde bulunur. Çiçekli gövdeler 10-15 cm boyundadır ve yapraklarının kenarı çok hafif bir şekilde içe dönüktür.

Bileşiminde, uçucu yağ (%0.5-3.5), acı madde ve tanen taşımaktadır. Uçucu yağ içinde timol ve kavrakrol bulunur. Bilhassa baharat olarak da kullanılmaktadır. Bazı Thymus türlerinin çiçekli dallarından su buharı distilasyonu yolu ile elde edilen uçucu yağları kekik yağı olarak bilinir.

Türkiye'de 40 kadar Thymus türü bulunmakta olup bunlar birbirlerinden ayrılmadan tedavi alanında kullanılmaktadır. Mide ağrılarını giderici, kusmayı önleyici, damar tıkanıklıklarını açıcı, soğuk algınlıklarını önleyici, boğaz iltihaplarını geçirici ve idrar söktürücü etkilere sahiptir. Mikrop öldürücü, güç verici, kan dindirici, balgam söktürücü özellikleri de vardır (http://w3.balikesir.edu.tr/~osinan/tez.html).

2.5. Serbest radikallerin iskemideki rolü

Glutamat ve glukoz/oksijen yetersizliğinden kaynaklanan birçok serbest radikal oluşum yolu vardır (Pellegrini Giampietro ve ark., 1990) ve serbest radikaller, retinal iskemideki hasarın önemli nedenidir (Bonne ve ark., 1998). İskemi sonrasındaki

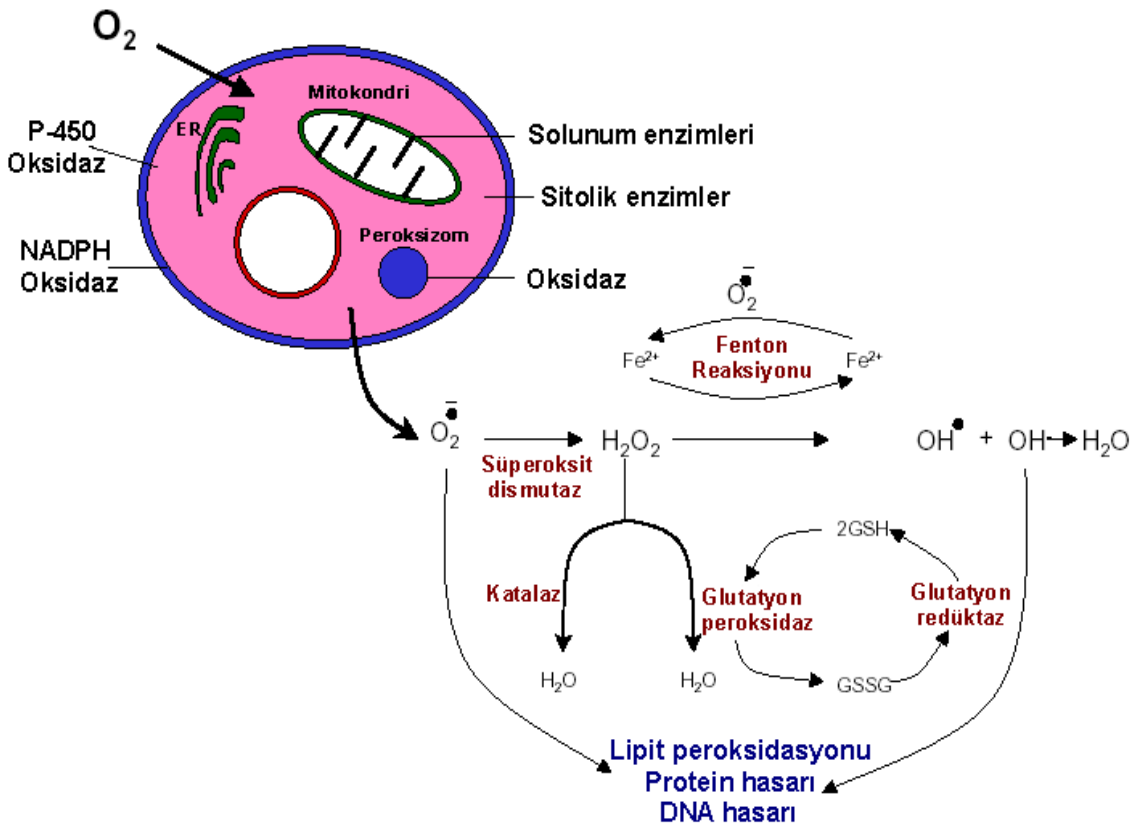
reperfüzyon hasarı düzensiz bir yol izler, fakat iskemi sırasında ortamda mevcut olan bileşikler tükendiğinde, genel olarak oksijenden kaynaklanan veya diğer serbest radikaller oluşur (Şekil 2.4.) (Osborne ve ark., 2004).

Serbest radikaller iskemi-reperfüzyon sırasında birçok yolla oluşabilmektedir. Reperfüzyonun erken safhalarında oluştuğu düşünülen süperoksit radikalleri ($\cdot O^-_2$) ortamda daha baskın bir şekilde bulunur. İskemi sırasındaki ATP degredasyonu, hipoksantin oluşmasına ve sinirlerdeki hücre içi kalsiyum miktarının artmasına neden olur. Böylece Ca^{+2}- bağımsız bir protein olan kalpaini aktive eder. Kalpain, ksantin dehidrogenazı, ksantin oksidaza dönüştürür. Ksantin oksidaz da birikmiş hipoksantini ürik asite okside eder, ürik asit ise $\cdot O^-_2$ serbest kalmasına neden olur. Bu iki molekül Haber-Weiss meknizması ile reaksiyona girerek çok toksik olan hidroksil radikalini ($\cdot$OH) oluşturur (Barry ve Grace, 1997).

İskeminin oluşturduğu düşük pH'da proteinlere bağlı olarak bulunan demir ayrılır, proteinlerden ayrılan demir bu reaksiyonu katalizler. Ayrıca, süperoksit radikali, iskemi sırasında çok fazla miktarda bulunan nitrik oksitle etkileşime girer, bu etkileşim sonucu nitrosil radikali olan peroksinitrit ve sonunda da hidroksil radikali oluşur (Chan, 1996; Gilgun Sherki ve ark., 2002). Glial hücrelerin ve ortama sızan lökositlerin aktivasyonu sonucu, iskemi sonrasındaki radikallerin oluşumunda önemli rolü olan sitokinler, nitrik oksit ve araşidik asit gibi inflamasyon yönlendiricileri serbest kalır (Osborne ve ark., 2004).

Szabo ve arkadaşlarının retinal iskemideki serbest radikallere yönelik yaptıkları bir çalışmada, süperoksit dismutaz (SOD) verilmesinin, iskeminin oluşturduğu dokusal hasara karşı koruyucu etkisi olduğunu diğer bir çalışmalarında da reperfüzyon peryodunda iyonik dengesizliğin meydana geldiğini göstermişlerdir. İskemi-reperfüzyon sırasında süperoksit serbest radikalleri oluşur, bu radikal oluşum miktarı retinadaki endojen süperoksit dismutazın normaldeki seviyesine ulaştığında, dokuda bu radikal tarafından oksidatif hasar meydana gelir. Daha sonraki çalışmalarla retinadaki iskemik hasarın yalnızca süperoksitle olmadığı, aynı zamanda hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin de hasarda etkili olduğu gösterilmiştir (Nayak ve ark., 1993; Ophir ve ark., 1993; Veriac ve ark., 1993; Yamamoto ve ark., 1994; Zhang ve ark., 1995; Lewden ve ark., 1996; Muller ve ark., 1997; Rios ve ark., 1999; Banin ve ark., 2000). İskemi

sırasında endojen serbest radikalleri bastırma mekanizmasının yetersizliğinde, *Ginkgo biloba* (Szabo ve ark., 1991), α-lipoik asit (Block ve Schwarz, 1997; Chidlow vw ark., 2002), vitamin E (Block ve Schwarz, 1997; Çelebi ve ark., 2002), tiredoksin (Shibuki ve ark., 2000), bir askorbik asit türevi (Kuriyama ve ark., 2001) mannitol (Gupta ve Marmor, 1993) ve demir çelator desferiokzamin (Gehlbach ve Purple, 1994; Ophir ve ark., 1994; Ugarte ve Osborne, 2001) gibi serbest radikal önleyicilerinin, iskemi-reperfüzyon hasarında retinayı koruduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.4. İskemideki serbest radikal mekanizması (Osborne ve ark., 2004).

Ksantin oksidaz, iskemi-reperfüzyon hasarlarındaki oksijenden oluşan serbest radikallerin önemli bir kaynağıdır. Marak'ın 1990'da yaptığı bir çalışmada, iskemik sıçan retinasının 10 dakikalık reperfüzyonundaki zamana bağlı incelenmesinde,

ksantinoksidazın, substratı olan hipoksantinin ve ürünü olan ksantin konsantrasyonlarının 10 kat arttığı ve serbest radikal artışının olduğunu gözlemiştir. Ayrıca ksantin oksidaz engelleyici olarak allopürinol ve oksipürinol verildiğinde, iskemi sonrasında yapılan elektroretinogram verilerinde önemli düzelmeler olduğu görülmüştür (Paechey ve ark., 1993; Roth ve ark., 1997). Elde edilen veriler, ksantin oksidazın yönlendirdiği sürecin retinal iskemide fonksiyonel anomalilere yol açtığını göstermektedir (Osborne ve ark., 2004).

Retinada iskemi sonrası oluşan başka bir radikal kaynağı da polimorfnükleer lökositlerdir. Beyinde nötrofiller, fokal iskemi sırasında ve sonrasındaki önemli serbest radikal vericileridirler. Nötrofiller, NADPH'ı süperoksit oluşumu için oksidize ederler (Matsua ve ark., 1995). Retinada reperfüzyonun erken fazında nötrofiller ortama sızarlar. Serbest radikallerin artışının nötrofillerden kaynaklandığına dair direk bir delil bulunmamakla beraber, lökosit birikiminin engellenmesiyle iskemik retinanın korunduğu gözlenmiştir (Tsujikawa ve ark., 1999).

Oksijen kaynaklı serbest radikaller, beyinde aşırı hücresel hasar meydana getirirler. Bu hasarın oluş mekanizmalarından biri, membran lipit peroksidasyonuna neden olan doymamış yağ asitlerinin saldırısı ile meydana gelir. Bunun sonucunda membran akıcılığının azalması, hücre şişmesi, ödem ve daha fazla serbest radikal üretimi gerçekleşecektir. İskemi-reperfüzyon sırasında oluşan serbest radikaller, proteinlerin sülfidril bağlarına bağlanarak, polipeptit zincirlerinin ve aminoasitlerin yıkımına neden olur. DNA'da kırılmalar poly (ADP-riboz) polimerazın aktivasyonuna neden olur, NF- KB ve sitokinleri aktive eder, glumatın serbest kalmasına neden olur ve Ca^{+2} hemostazisini etkiler. Retinadaki iskemi-reperfüzyon sürecindeki sinirsel hücre ölümüyle, serbest radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonu birlikteliği son zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Banin ve ark., 2000; Shibuki ve ark., 2000 Celebi ve ark., 2002). Bütün bu çalışmalarda iskemi-reperfüzyonun neden olduğu serbest radikal oluşumunun, lipit peroksidasyonunun ve sinirsel hasarın, serbest radikal önleyicilerin (Shibuki ve ark., 2000; Celebi ve ark., 2002) ve yeni bir metal çelat ile büyük oranda önlenebildiği gösterilmiştir (Osborne ve ark., 2004).

2.6. Retinada İskemi-Reperfüzyon

İskemi kelimesi ilk defa Yunanca "iskho" (engelleme anlamıyla) ve "hàima" (kan anlamında) olarak kullanılmıştır. İskemi, kan akımının dokuya gitmesinin engellenmesi veya kan basıncındaki düşme sonucu glikoz ve oksijenin dokuya dağıtımındaki ve metabolik artıkların dokudan uzaklaştırılmasındaki zayıflama ile meydana gelen patolojik bir durumdur (Aydemir, 2002). Dokuya tekrar kan akımının sağlanmasına da reperfüzyon denir.

İskemi, anoksi ve hipoksiden ayrılmalıdır, iskemi daima anoksi/hipoksiyi içerir ancak anoksi/hipoksi iskeminin bir göstergesi değildir. Örneğin, yüksek rakımda görme olayının azaldığı hipoksi oluşabilir fakat bu iskemiyi ifade etmez. Benzer bir şekilde anemi (hemoglobin düzeyinde genel bir azalma), daima iskeminin bir bileşenidir ancak, bunun tersi söz konusu değildir (Osborne ve ark., 2004).

İskemi dokuyu 3 gereksinimden, yoksun bırakır; oksijen, metabolik substratlar ve atıkların uzaklaştırılması. Bu üç gereksinimin azlığı, hemostazinin azalmasına ve zamanla da dokunun zarar görmesine neden olacaktır. Eğer bu kısıtlama uzun bir süreyi içerirse doku ölecektir. (Osborne ve ark., 2004).

İskeminin ilk etkisi mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon üzerinedir. Oksijen basıncının azalması sonucu oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi azalır ve hücre içi ATP miktarı belirgin olarak düşer. ATP miktarındaki azalmanın hücre içindeki bir çok sisteme etkisi vardır. Örneğin sitoplazmik serbest kalsiyum normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile hücre içinde oldukça düşük yoğunlukta tutulur. İskemiden kaynaklanan ATP miktarındaki azalma sonucu, ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları görevini yapamaz ve hücre dışı kalsiyum plazma membranından geçerek hücre içinde kalsiyum yoğunluğunun artmasına neden olur. Bunu hücre içi stoklardan kalsiyumun serbest bırakılması izler. Artan sitoplazmik kalsiyum sıra ile fosfolipazları, proteazları, ATPazları ve endonükleazları aktifleştirir. Bu enzimler de lipit, protein, ATP ve nükleik asitleri parçalayarak hücrenin ölümünü (apoptozis) hızlandırır (Osborne ve ark., 2004).

İskemik dokuda en büyük hasar reperfüzyondan sonra meydana gelir (Ishihara ve Nakano, 2000). Çünkü reperfüzyon, hücreye aşırı miktarda Ca^{++} girişine neden olur ve kalsiyuma bağlı litik enzimlerin aktivasyonuyla hücre komponentleri zarar görür. Örneğin; fosfolipaz aktifleşerek hücre membran fosfolipitlerinden araşidonik asidi serbestleştirir. Yine iskemi sırasında ATP' nin yıkımı sonucu hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri birikirken ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin oksidaza çevrilir. Reperfüzyon esnasında sisteme ani O_2 girişi, birikmiş pürinlerin çok süratli bir şekilde oksidlemesine ve sonuç olarak ürat ve süperoksit anyonu oluşumuna neden olur. Oluşan süperoksit anyonu, endotelde demir tarafından katalize edilen reaksiyonlar ile toksisitesi yüksek hidroksil radikali üretimine neden olur (Barry ve Grace, 1997). Retina, oksijen ve doymamış yağ asidi bakımından oldukça zengin olduğu için aşırı miktarda serbest radikal etkisine maruz kalmaktadır. Bu durum retinayı iskemik hasara daha hassas kılar (Osborne ve ark., 2004).

2.6.1. Retinanın iskemiye direnci

Çeşitli hayvan modelleri ve türler arası varyasyon kullanılarak yapılan çalışmalarda iskemik tolerans süreleri tespit edilmiştir (Çizelge 2.1.). Tabloda değerlere dayanılarak retina yaşamının beyinden önemli derecede daha uzun olduğu yönünde ortak karara varılmıştır. Ayrıca retina, iskemiye hassasiyet açısından, retina dış tabakasının iç tabakaya oranla daha az hassasiyet gösterdiği bir bölgesellik sergilemektedir. Önemli bir noktada, miyoglobin ve hemoglobinle uzaktan bağlantılı, sinire has bir solunum proteini olan nöroglobin, retinada bol miktarda bulunmaktadır. Bu tahmini konsantrasyon kısmen

retinal fotoreseptörlerde yoğunlaşmıştır ve beyindekinden yüz kat fazladır (Schmit ve ark., 2003). Rat göz içi basıncının arttırılması gibi retinal ve koroidal tıkanmayla oluşan halongiotik retinal iskemi modelinde, fotoreseptörler retinanın iç bölgesinden daha az yapısal ve fonksiyonel hasar görür. Bunun tersine, merangiotik tavşan retinasında tersi durum meydana gelir (Osborne ve Larsen, 1996; Osborne ve ark., 1996).

Vaskülerize olmuş retinadaki olaylar henüz netlik kazanmamıştır fakat fotoreseptörlerin nadir bir şekilde ortamdaki enerjiden anaerobik olarak

faydalanmalarıyla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Bu açıklama üç durumla bağlantılıdır:

1. Lokal enerji substratlarının bulunması (vitreus önemli miktarda glukoz içermektedir ve retinada türlere bağlı olarak glikojen stoğu bulunmaktadır) (Kuwabara ve Cogan, 1961)
2. Bu enerji substratları retinal iskemi sürecinde tüketilir (Weiss, 1972; Kaskel ve ark., 1973; Wasilewa ve ark., 1976; Johnson, 1977)
3. İzole edilmiş retina, glukozun bol bulunduğu ortamdan etkin bir şekilde glikoliz yoluyla adenozin trifosfat (ATP) elde edebilir

Retinal iskemi modeli	**Türler**	**Tolerans süresi**	**Referanslar**
Hayvan sentrifügasyonu veya asfiksasyon	Rat	< 3 dakika	Turnbull (1948)
Merkezi retinal arter bölgesi	Rat	< 4-5 saat	Turnbull (1948)
Merkezi retinal arter oklüzyonu	Maymun	2-3.5 saat	Hamasaki ve Kroll (1968)
	Maymun	100 dakika	Hayreh ve Weingeist (1980)
Oftalmik damar ligature	Rat	< 30 dakika	Lafuente ve ark. (2002)
Optik sinir demetinin oklüzyonu	Rat	< 60 dakika	Faberowski ve ark. (1989)
Artmış intraoküler basınç (≤ sistolik kan basıncı)	Rat	15 dakika	Smith ve Baird (1952)
	Maymun	30-60 dakika	Hughes (1991)
	Maymun	< 30 dakika	Zhu ve ark. (2002)
	Tavşan	60-90 dakika	Popp (1955); Foulds ve Johnson (1974)
İnvitro iskemi	Kedi	< 90 dakika	Reinecke ve ark. (1962)
	Maymun	60-90 dakika	Fujino ve Hamasaki (1967)
	Tavşan	40 dakika	Shay ve Ames (1976)

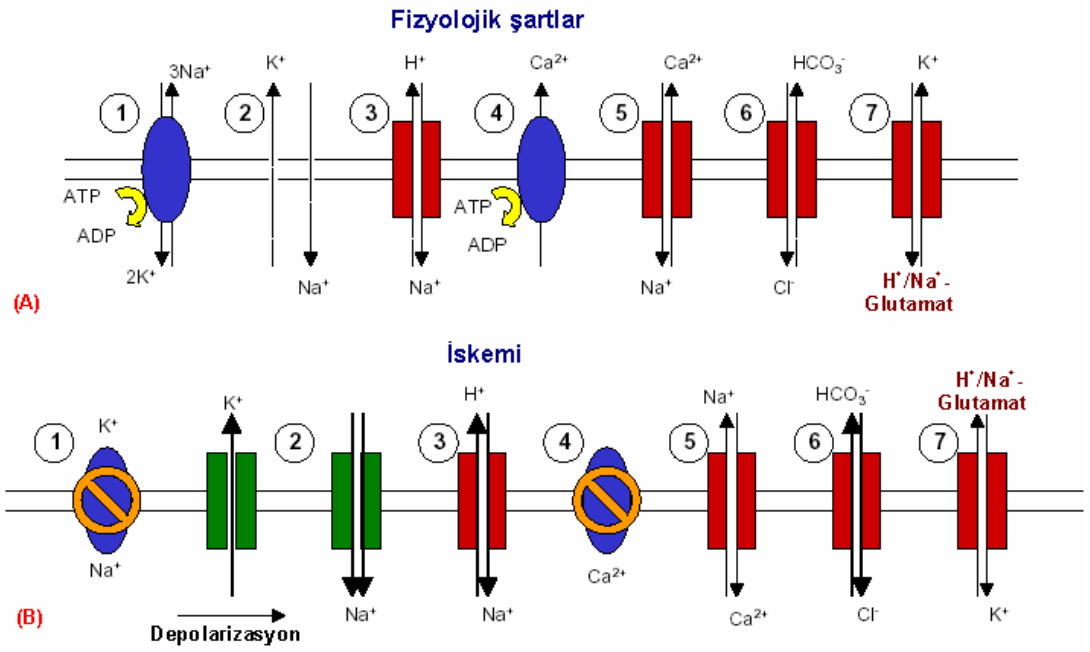
Çizelge 2.1. Retinal tolerans, iskemide geri dönüşümsüz hasar için geçen süre. Hayreh ve Weingeist (1980)'den uyarlandı.

Buchi ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptığı bir çalışmada, basınçla ratlarda oluşturduğu iskemi modelinde, eğer % 0.9 NaCl yerine % 5 dekstroz kullanılırsa retinadaki iskemi sırasındaki hasarın belirgin bir şekilde azaldığını göstermiştir (Osborne ve ark., 2004). Romano ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise, fototromboz kullanarak sıçanlarda oluşturduğu iskemi modelinde yalnızca intravitral glukoz enjekte edilmesinin, tuz enjeksiyonuna göre erken iskemik sonuç oluşturduğunu göstermişlerdir. Benzer bir şekilde, Romano ve arkadaşlarının 1998 yılında, izole edilmiş bir retina modeli kullanarak yaptığı başka bir çalışmada,

glukozun belirgin bir şekilde eksitotoksik hasara neden olan N-methyl-D-aspartat (NMDA)'yı belirgin bir şekilde azalttığını göstermişlerdir (Osborne ve ark., 2004).

2.6.2. Retinal iskemideki nörolojik mekanizmalar

Memelilerdeki retinal iskemide geri dönüşümü olmayan morfolojik ve fonksiyonel değişimler gözlenir. Bu değişimler; ATP stoklarının tükenmesi, glukoz ve ATP'nin olmayışı nedeniyle gerçekleşir, bu substratların azalması hemen ölüme neden olmaz. Hücre ölümü, enerji kaybıyla ortaya çıkan kompleks bir takım biyokimyasal olayların son noktasındadır. Geçici iskemi peryodunu izleyen fonksiyonel zararlar ve doku hasarı, birbiriyle bağlantılı değişik etkileri yansıtır. Bu etkiler iyon hareketinde nörotransmitter ve metabolit düzeylerinde çok ciddi değişimler meydana getirir (Şekil 2.5.).

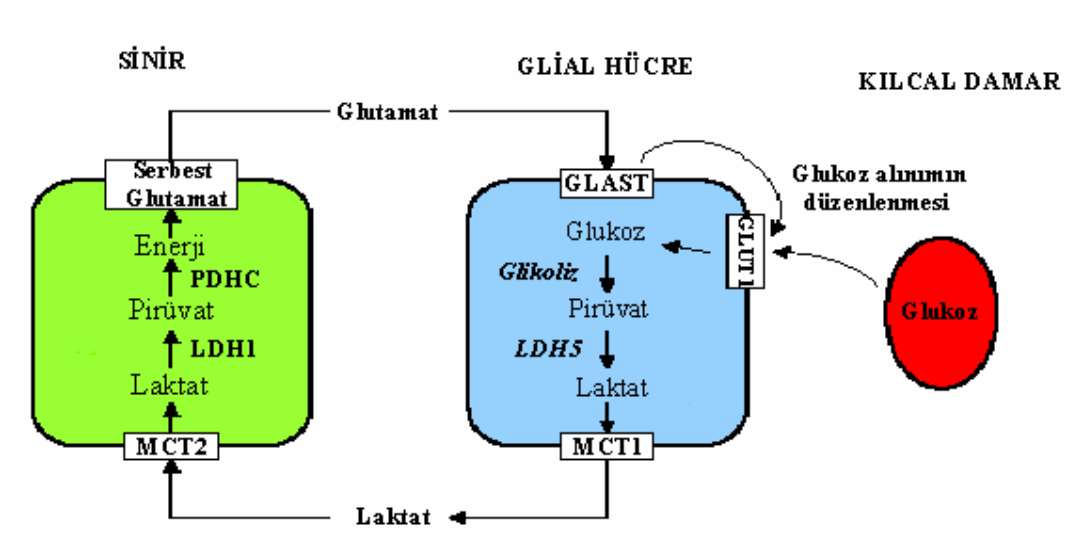


Şekil 2.5. İskemideki iyon akışı (Osborne ve ark., 2004).

Reperfüzyon, iskemi sonrası geri dönüşümlü hasara uğrayıp kurtulan hücreleri de hasara uğratır. 1960'larda yapılan miyokardiyal çalışmalarda iskemik dokuya oksijen girişinin, oksijen eksikliğine dayanma sırasındaki hasarı arttırdığını göstermiştir (Jennings ve ark., 1960).

Geçen on yıl içerisinde yapılan çalışmaların büyük bir kısmı, iskemik nöronal hasarın mekanizmasının aydınlatılmasına yoğunlaşmıştır, ancak hala hasarın oluş süreci hakkında birçok tartışma bulunmaktadır. Bu tartışma konularından birisi, iskemi esnasında belirgin bir şekilde hücre dışı konsantrasyonu artan glutamat ve aspartat üzerinedir (Drejer ve ark., 1985; Hagberg ve ark., 1985; Davalos ve ark., 1997). Beyinde oluşturulan iskeminin erken fazında serbest bırakılan glutamatın, sadece oksijen miktarının kritik olarak azaldığı bölgelerde değil, enerji metabolizmasının daha az bozulduğu bölgelerde de serbest bırakıldığı düşünülmektedir. Bununla birlikte glutamat ve aspartatın, nöronal iskeminin patofizyolojisindeki rolleri hala tartışılmaktadır. Ek olarak, nöronal bölge (gri madde) ve aksonlar (beyaz madde) iskemiden kesinlikle aynı şekilde etkilenmemektedir (Osborne ve ark., 2004).

Retina hücrelerindeki besin/oksijen yetersizliğinin patolojik etkileri hakkında sırasıyla düşünülecek olursa, öncelikle fizyolojik şartlar altındaki bu dokunun metabolik fonksiyonunun düşünülmesi gerekir. Retinadaki bütün hücreler glukozu yüksek derecede kullanırlar, fakat metabolik aktiviteleri yüksek olan fotoreseptörler bu şekeri baskın olarak kullanırlar (Berman, 1991; Harding, 1997). Son zamanlarda yapılan bir çalışmayla, retinadaki farklı hücreler arasında, metabolik sinyalizasyon ve etkileşimle ilgili yeni bilgiler elde edildi. Bu bilgilere göre, retinal müller hücrelerinin öncelikle glukozu, bir monokarboksilik asit olan laktat ve pirüvata metabolize eder. Sinirler için laktat ve pirüvat, glikolize gerek duymadan, monokarboksilat taşıyıcıları tarafından oksidatif metabolizmayı taşır (Şekil 2.6.) (Poitry Yamate ve ark., 1995; Tsacopoulos ve ark., 1997, 1998; Poitry ve ark., 2000).



Şekil 2.6. Glutamat- Laktat mekanizması (Osborne ve ark., 2004).

2.6.3. İskemik tolerans

İskemik tolerans, dokunun iskemiye karşı daha dayanıklı olmasını sağlayan bir uyum sağlama sürecidir. Tolerans, iskeminin hemen öncesinde oluşan bir ön uyarım olarakta isimlendirilebilir. Bu olay ilk olarak kalpte tanımlanmış (Murry ve ark., 1986) olup beyinde ve son zamanlarda retinada dikkat çekmiştir. Retinadaki iskemiye dayanıklılık, iskeminin veya hipoksinin (Zhu ve ark., 2002) kısa bir peryodunda *in vivo* olarak gösterilmiştir (Roth ve ark., 1999; Lin, 1999; Ettaiche ve ark., 2001; Sakamoto ve ark., 2001; Toprak ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2002). Öldürücü olmayan düzeydeki hipoksi *in vitro* şartlarda, retinal ganglion hücre ölümüne neden olan anoksiye karşı koruyucu rol oynar (Caprioli ve ark., 1996). Bu sinirsel koruyucu mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir (Osborne ve ark., 2004).

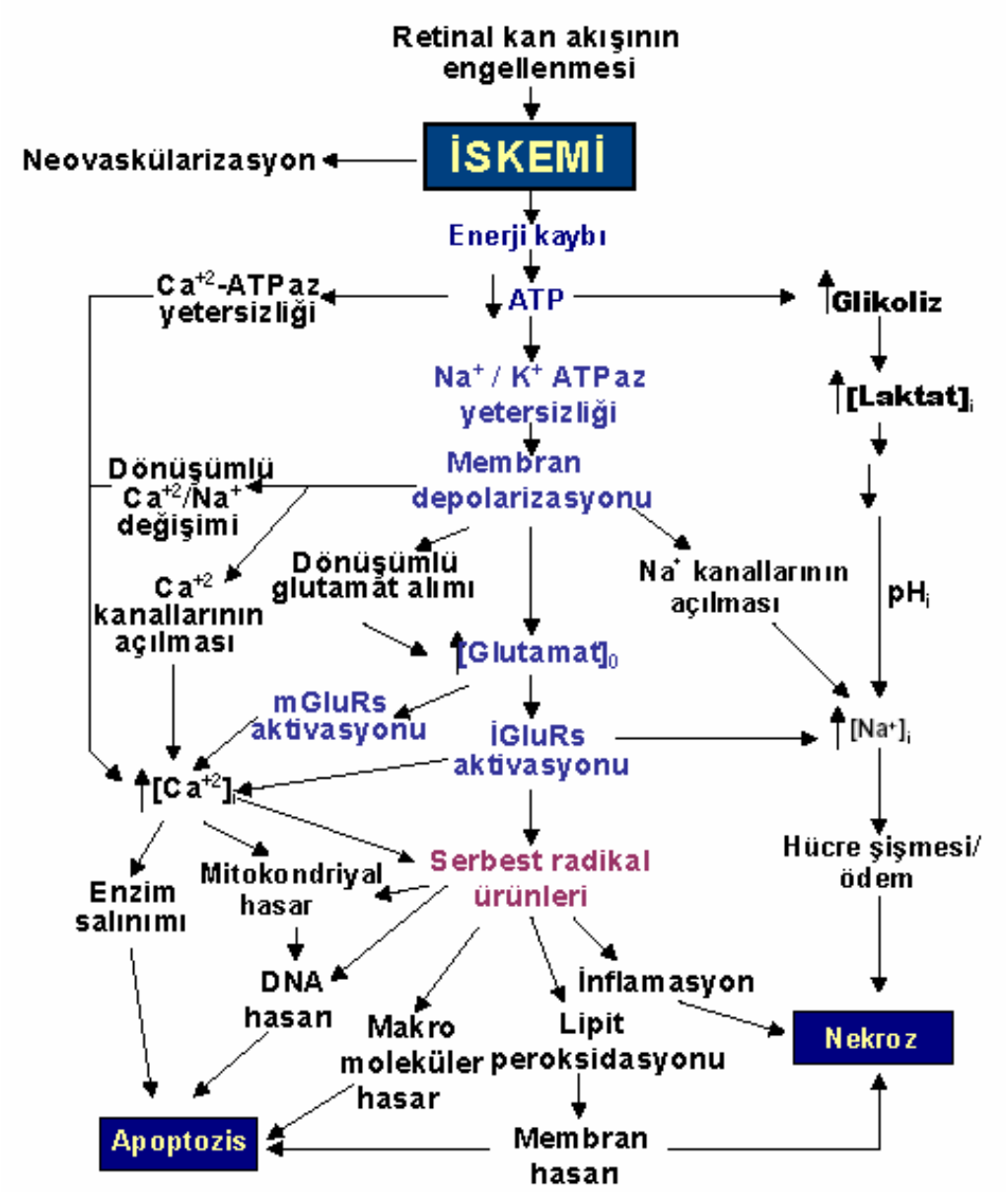
Roth ve arkadaşları 1998 yılında, bu sinirsel koruyucu mekanizmanın, bilinen herhangi bir koruyucudan daha büyük bir derecede koruyucu etki gösterdiğini bildirmiştir (Osborne ve ark., 2004). Daha sonraki araştırmalarla, retinadaki ön uyarımın merkezi sinir sisteminin diğer kısımlarındakinden farklı olmayan bir mekanizma ile meydana geldiğine dair veriler elde edilmiştir (Li ve Roth, 1999; Li ve ark., 2000; Ettaiche ve ark., 2001).

2.6.4. Muhtemel tedavi yöntemleri

Retinal iskeminin patofizyolojisini, retinanın güçlü bağlantıları ve iletim unsurları oluşturur. Kanla bağlantılı koroidal, retinal veya optik sinirdeki azalma aynı zamanda bütün yapıları etkileyen farklı retinal patolojilerine neden olur. Kan akış düzeni bozulduğunda metabolik gereksinimler ve hemodinamiklerle bağlantılı olarak normal homeostatik dinamikler değişir. Hücresel enerji stoklarının tükenmesi, kritik bir noktadan sonra, (her retinal hücre tipine göre değişebilen) depolarizasyonu başlatır ve iskemik (her hücre tipine göre değişebilen) süreç olarak adlandırılan bir takım moleküler olaylar meydana gelir. Trombolitik terapi üzerindeki hipoksik stresin etkisiyle, sınırlandırılmış olan zaman sürecine karşı, sinirlerin toleransının azalmış olmasına rağmen erken perfüzyon daimi retinal hasarı önler. Zamana bağlı iyileştirme süreci, retinal sinirlerde, beyin sinirlerine göre daha geniştir (Osborne ve ark., 2004). Beyin üzerindeki çalışmalardan elde edilen bilgilere göre, iskemik etkileşim süreci hücresel ve moleküler düzeyde, birbirleriyle bağlantılı olarak devam eden patolojik değişimlerdir (Kristian ve Siesjo, 1998; Lee ve ark., 1999; Lipton, 1999; Nishizawa, 2001).

2.6.5. Retinal iskemideki seçici hücre ölümü (Apoptozis)

Retinadaki iskemik sendromların bu dokudaki hücrelerin azalmasına neden olduğu bilinmektedir (Osborne ve ark., 2004). 1993 yılında, tavşan retinasında basınçla oluşturulan iskemik hasarın düzensiz etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Marmor ve Dallal, 1993). Bu etki, oküler iç basıncın düzensiz etkilerinden daha çok retinanın bölgesel olarak farklı duyarlılık göstermesinin bir sonucudur. Bu farklılık, retinadaki lokal hücresel metabolizma seviyesinden veya lokal hücresel iyileşme potansiyelinden meydana gelir, fakat daha çok lokal vaskülatürdeki (vasculature) değişimden kaynaklanmaktadır. Tavşan retinasının tek vasküler sisteme sahip olması (Prince, 1964), basınçla oluşturulan düzensiz hasara duyarlı olmasına neden olur. Bu şartlar altında duyarlılık, kılcal damarlanmayla doğru orantılıdır. Kılcal damarlar bakımından daha zengin olan retinal doku, daha yüksek oranda O_2'li ortama ihtiyaç duyar ve retinal kan akışındaki azalmaya karşı daha duyarlıdır. İnce olan tavşan retinası, artan oküler iç basınç ve bu yapısal sınırlamanın oluşturduğu hasardaki bölgesel farklılık nedeniyle, mekanik hasara daha duyarlıdır (Osborne ve ark., 2004).



Şekil 2.7. İskemideki biyokimyasal süreç

İskemi-reperfüzyonu izleyen hücre ölümündeki apoptozisin önemi büyüktür. Hücrelerin yaşamının devam etmesi, reperfüzyonla yenilenen glukoz ve oksijen stokları ile sağlanır. Bununla birlikte, reperfüzyon aynı zamanda, apoptotik sürecin hızlanabilmesi ve apoptozisin tamamlanabilmesi için gerekli enerjiyi de yeniler (Şekil 2.7) (Eefting ve ark., 2004) .

Sıçanlarda, iskeminin apoptoza ve nekroza neden olduğu görülmüştür. İki saatlik bir iskemi sürecindeki apoptoz ve nekroz oranları ölçülmüş ve apoptoz oranının nekroza oranla çok fazla olduğu bildirilmiştir. Hücre ölümünün %14'ü nekroz olmasına karşılık %86'sı apoptoz olmaktadır. Hücre ölümü başlangıcının farklı olmasına rağmen apoptozdan nekroza geçişler olduğu görülmüştür (Eefting ve ark., 2004).

Diğer çalışmalarda, apoptozun 45 dakikalık iskemiden sonra hız kazandığı gösterilmiştir. İskemide apoptozla bağlantılı, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu neticesinde, sitokrom C'nin serbest bırakıldığı ve kaspaz aktivasyonunun başladığına dair destekleyici birçok delil elde edilmiştir (Borutaite ve ark.,2003; Eefting ve ark., 2004).

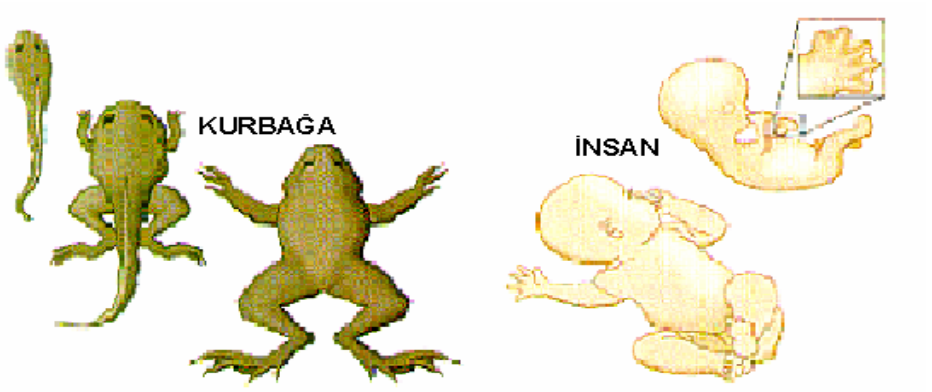
2.7. Apoptozis

Hücre ölümünün, farklı morfolojik özellikli iki tipi vardır; birincisi nekroz diğeri ise apoptozistir. Apoptozis, patolojik ya da çevreden gelen fizyolojik uyaranlara karşı hücresel bir cevap olarak ortaya çıkar. Embriyonik gelişim sürecinde hücrelerin lokal olarak ortadan kaldırılmasından sorumlu olduğu ve normal hücre döngüsünde fizyolojik bir olay olduğu bilinmektedir. Apoptozis dokuda tek tek hücrelerin azalmasıyla gözlenen bir hücre ölümüdür. Bu deyim Yunanca APO (ayrı) ve PZOTİS (düşmek) kelimelerinden oluşmuştur. " Sonbaharda ağaç yapraklarının tek tek düşmesi ve ağacı terk etmesi " anlamındadır (Honig ve Rosenberg, 2000).

Apoptozis uzun yıllardan beri bilinmesine rağmen, nekrozdan farklı özgün ve önemli bir hücre ölüm şekli olarak değerlendirilmesi son yıllara dayanmaktadır. Özellikle 1990'dan sonra apoptozisi pozitif veya negatif yönde düzenleyen proteinlerin belirlenmesindeki hızlı gelişmeler apoptozisi moleküler biyolojinin popüler konularından biri haline getirmiştir (Honig ve Rosenberg, 2000).

Apoptozis vücutta aşağıdaki olaylarda görülür

1. Embriyogenez ve metamorfoz (implantasyon ve organogenez). Örneğin; damağın birleşmesi, parmak arası perdesinin ortadan kalkması (Şekil 2.8.)



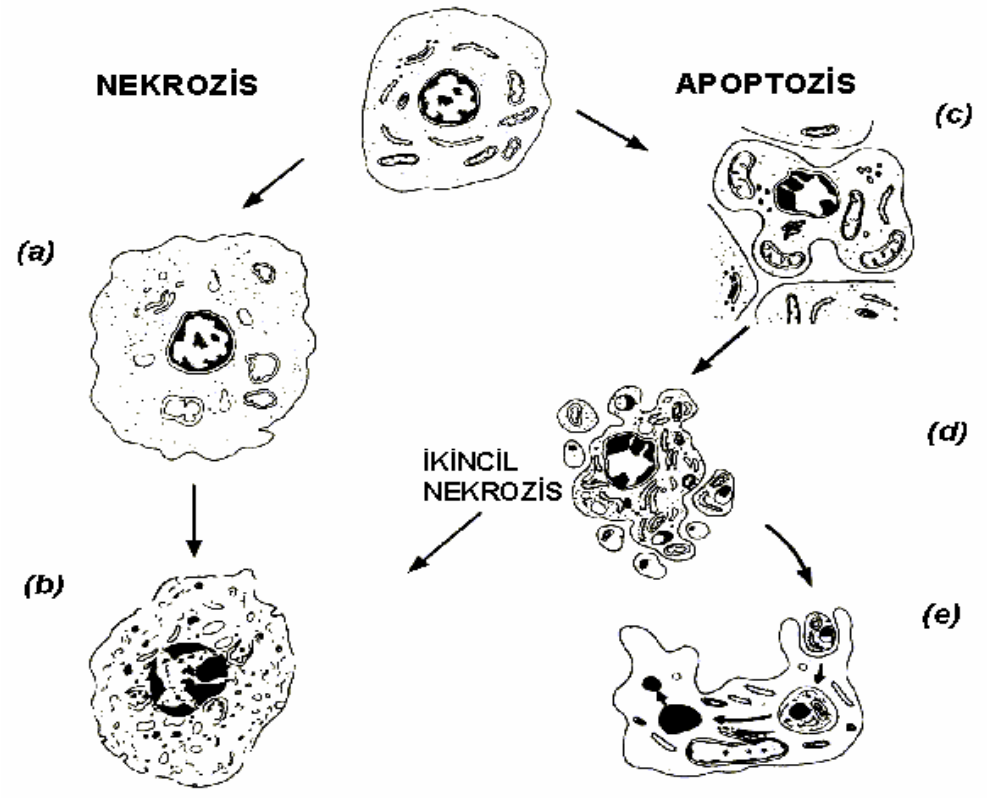
Şekil 2. 8. Embriyonik gelişimde apoptozis (www.critpath.org/aric/library/art006.htm)

2. Bağırsak kripta hücreleri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarında hücrelerin azaltılması
3. İmmün hücrelerin seçimi
4. Tümör hücrelerinin regresyon aşamasındaki ölümü
5. Hormon bağımlı dokularda hormonun kesilmesinden sonra oluşan atrofi
6. Viral hepatit gibi bazı viral hastalıklarda hücre hasarı oluşması
7. T hücresi ile oluşan sitotoksik hücre ölümü
8. Yaşlanma sırasında
9. Radyasyon ve antikanser ilaçların sitotoksik etkisinin gerçekleşmesi (Pole ve ark., 2002; Afford ve ark., 2002).

2.7.1. Apoptozis ve nekrozis

Yaşayan organizmada iki temel hücre ölümü vardır: Apoptozis ve nekrozis. Apoptozis'te çok odaklı, tek tek hücre ölümü vardır. Bu, programlanmış hücre ölümüdür ve geriye dönüşümü yoktur. Fizyolojik ya da patolojik uyaranlar ile düzenlenir. Oluştuğu bölgede diğer hücresel yapılara zarar vermez, herhangi bir inflamasyona neden olmaz. Apoptozis'te çekirdek kromatini yoğunlaşmış, hücre büzülerek küçülmüş, çekirdek içi DNA kırılmıştır. Sitoplazmadaki organellerin bütünlüğü korunurken, bunların bir araya gelerek yoğunlaştıkları gözlenir.

Mitokondrilerin yapısı sağlamdır. Büzülen hücre parçalanır, apoptotik cisimler açığa çıkar. Apoptotik cisimler membranlarla korunmuş DNA parçalarını içerir. Bu cisimler makrofajlarca yada komşu epitel hücrelerince yutulur (Şekil2,9.) (Reme ve ark., 1998).



Şekil 2.9. Apoptozis-Nekrozis (www.critpath.org/aric/library/art006.htm)

Canlı dokuda nekroz, patolojik hücre ölümüdür ve hücre yaralanmalarında ortaya çıkar. Nekroza genel örnek olarak dokuların anoksik kalması ve CCl_2 ile ölümleridir. İlerleyen yapısal ve metabolik değişiklikler görülür, sonuçta hücrelerin membran bütünlüğü bozulur ve hücre parçalanır. Koagülasyon nekrozu, yapısal ve enzimatik proteinlerin koagülasyonu ile karakterlidir. Hücresel proteinlerin denatürasyonuna (iskemi, hipoksi, anoksi, travma, kimyasal etkenler) bağlı gelişir. Kollikuasyon nekrozu ise protein denatürasyonundan önce hidrolitik enzimlerin

etkisi ile dokuda erimenin olduğu nekrozdur. Nekroz geriye dönüşü olmayan bir olaydır. Nekrozda enerji ve madde metabolizmasında düzensizlik vardır. Metabolik değişikliklere yapısal değişiklikler eşlik eder. Nekrozun ortaya çıktığı bölgede inflamatuar olaylar vardır (Reme ve ark., 1998; Searle ve Kerr, 1982).

2.7.2. Apoptozisin özellikleri

Ölümcül bir uyarıdan sonra apotozisin başlama süresi, hücre tiplerine göre değişiklik gösterir. Bununla birlikte bütün hücre tiplerinde, apoptozise ait morfolojik değişiklikler benzer olup oldukça hızlıdır (2-4 saat). Çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde meydana gelen değişiklikler birbiri ile uyumludur. Bu değişiklikler üç aşamada gerçekleşir; birinci aşamada, çekirdek ve hücre yoğunlaşması, ikinci aşamada, hücre tomurcuklanmasını takiben "apoptotik cisimciklerin" oluşumu ve son safha ise bu cisimciklerin fagositozudur (Mountz ve Zhou, 2001).

Apoptotik hücrelerde meydana gelen karakteristik morfolojik değişiklikler en iyi elektron mikroskobunda (EM) belirlenir. Apoptoziste EM incelemede yapısal değişiklikler iki evrede incelenmiştir. Apoptotik cisimlerin oluşması ve bunların makrofajlar ya da diğer komşu hücreler tarafından fagosite edilmesidir. Başlangıçta apoptozise gidecek olan hücreler komşu hücrelerden ayrılır, yüzey organelleri kaybolur. DNA, endonükleaz enzimlerinin aktive olmasıyla 180-200 baz çifti uzunluğunda, internükleozomal bağlantı noktalarından kırılmaya başlar. DNA'nın bu kırılması agar jel elektroforezinde tipik merdiven görünümü verir. Parçalanmaya bağlı olarak çekirdek kromatini dağılır. Çekirdek kromatini, çekirdek zarındaki porları kapatacak şekilde yerleşim gösterir. Çekirdek zarı parçalanır. Sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşması ve hacmin azalmasına bağlı olarak hücrede büzülme ortaya çıkar. Hücre zarında çıkıntılar ve kıvrımlar oluşur. Buna karşılık mitokondrilerin yapısında önemli bir değişiklik görülmez. Endoplazmik Retikulum (ER) genişler ve hücre zarı ile birleşerek yüzeyde kraterler oluşturur. İkinci evrede hücre zarında büzüşmenin artması ve bunu takiben hücre parçalanması görülür. Parçalanmış, zarla çevrili yuvarlak konumdaki bu yapılara "apoptotik cisim" denir (Mountz ve Zhou, 2001).

Apoptotik cisimlerin bir kısmı yoğun olarak hücre organellerini içerirken, bir kısmında çekirdek kalıntıları yer alır. Apoptotik cisimler genellikle hücreler arası alanlarda gözlenirler. Karaciğer ve böbrek üstü bezi korteksinde sinüzoidleri çevreleyen hücrelerde ve parankim hücreler arasında gözlenebilirler. Bazen kan damarlarına girebilirler. Apoptotik cisimler hızlıca makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Fagosite edilmeyen apoptotik cisimler daha sonra şişer ve dejenere olurlar. Bu olay nekroz ile aynıdır. "Sekonder nekroz olarak" olarak isimlendirilir. Apoptotik

işlem oldukça hızlıdır, birkaç saat içinde tamamlanır. Apoptozis sırasında hücre içi makromoleküller dışarı çıkmadığından herhangi bir inflamatuar cevaba neden olmaz ve komşu hücrelerde zarar oluşturmaz (Willingham, 1999).

Apoptozis olan hücrelerde bir gen ya da genlerin aktivasyonu söz konusudur. Apoptotik olayları yöneten genlerdeki mutasyon bir takım hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (Kannan, 2000).

Apoptozisin başlaması için çekirdek onkoproteinlerinin uyarılması gerekmektedir. Onkoproteinlerden c-fos ve c-jun ekspresyonuna bağlı olarak lenfoid hücrelerde apoptozis açığa çıkmaktadır. Normal hücre ölümünde görev yapan iki gen; Ced-3 (interleukin -1β converting enzim) ve Ced-4'ün apoptoziste çok önemli işlevleri olduğu bilinmektedir. Apoptoziste bu genlerin birbirlerinden bağımsız hareket ettiği gözlenmiştir (sgmhs.ac.uk/depts/immunology/rudsh/ apoptosis/intro.html)

Tümör baskılayıcı bir diğer gen 17. kromozomun kısa kolunda yer alan p53 genidir. Kanserli hastaların %80'inde mutasyona uğradığı bilinmektedir. Normal işlev gören p53 geni hücrede apoptozisin açığa çıkmasını kolaylaştırır. p53 protein düzeyinin artmasıyla apoptotik hücre ölümü arasında bir bağlantı vardır. p53, miyeloit lösemik hücrelerde, kolon kanser hücrelerinde apoptozisi uyarır (Mountz ve Zhou, 2001; Ferri ve Kroemer, 2001; Hatton, 2001).

2.7.3. Apoptozis morfolojisi

Aşağıdaki yapısal değişiklikler apoptozise uğrayan hücreler için karakteristiktir:

1. **Hücre büzüşmesi:** Apoptotik hücre diğerlerinden daha küçüktür, sitoplazma yoğundur, organeller normal olmalarına rağmen daha sıkışık bulunur.
2. **Kromatin yoğunlaşması:** Apoptoziste en karakteristik olaydır. Çekirdek zarının altında kromatin yoğunlaşarak, çepere değişik şekil ve büyüklükte yapılar halinde yapışır. Çekirdeğin kendisi parçalanarak iki veya daha çok bölüme ayrılabilir.
3. **Sitoplazmik balonlaşmanın ve apoptotik cisimciklerin oluşumu:** Apoptotik hücre ilk olarak yüzeyde ileri derecede balonlaşma yapar ve ardından sitoplazma, yoğun organel, çekirdek parçası içeren veya içermeyen, apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan parçalara ayrılır (Robins ve Kumar, 1999; Nakano, 1997; Thomson, 1995).
4. **Apoptotik hücreler ve cisimciklerin fagositozu:** Çevredeki parankim hücreleri veya makrofajlar tarafından meydana gelir. Apoptotik cisimcikler hızla lizozom içerisinde parçalanır. Çevredeki hücreler ortadan kaybolan apoptotik hücrenin yerini almak üzere yer değiştirir ve çoğalır (Robins ve Kumar, 1999; Savill, 1999)..
5. Plazma membranı apoptozis sırasında son evrede geçirgen hale gelinceye kadar sağlamdır (Robins ve Kumar, 1999).

Bu yapısal değişiklikler embriyogenez ve immün hücrelerin yok olması sırasındaki apoptozis olayı göz önüne alınarak tanımlanmıştır (Martimbeau ve Tilly, 1997). Uyaranın derecesi hücre ölümünün hangi tipte gerçekleşeceğini belirler. Nekrotik etki baskınsa, erken dönemde plazma membranı hasarı ile sitoplazmada büzüşme yerine şişme görülür (Robins ve Kumar, 1999).

Hematoksilen eozin ile boyanan dokularda yapılan histolojik incelemede apoptozisin tek hücreyi veya hücreler topluluğunu tuttuğu görülür. Apoptotik hücre

eozinofilik sitoplazma ve yoğun çekirdek kromatini parçaları içeren yuvarlak veya oval kitleler halindedir (Dane, 1999).

Hücre büzüşmesi ve apoptotik cisimciklerin oluşumu çabuk geliştiği, parçalar hızla fagosite edildiği, bölündüğü ve lümene atıldığı için, histolojik kesitlerde görülmeyen oranda apoptozis meydana gelmektedir. Ek olarak apoptozis, nekrozdan farklı olarak inflamasyona yol açmaz, bu nedenle tespit edilmesi güçleşir (Robins ve Kumar, 1999).

2.7.4. Hücre döngüsü ve apoptozis

Hücre döngüsü çeşitli fazlara bölünmüştür. Her biri özel bir işlem için ayrılmış zaman dilimini kapsar. Döngünün uzunluğu hücre türüne göre çeşitlilik gösterir. Hücre döngüsünün uzunluğu kemik iliği hücrelerinde 18 saat civarında iken, kolon kripta hücrelerinde 450 saattir (Leake, 1996).

Yeni oluşan hücrelerin önünde dinlenme fazına girme veya tekrar bölünme işlemlerini başlatma yönünde iki seçenek vardır. Gerekli enzimlerin üretilebilmesi ve çekirdekteki tüm DNA'nın replikasyonu için belli bir zaman dönemi gereklidir. Bu faz büyüme fazı olduğu için G_1 olarak adlandırılır. Dinlenme fazı ise G_0 olarak bilinir. G_0 fazındaki hücreler dinlenme halindedir ve DNA sentezi yapmazlar. G_1 fazına giren hücrenin önünde üç seçenek vardır:

1. Hücre döngüsünde ilerleyerek bölünme
2. G_1 fazında kalma
3. Hücre ölümü

Hücre, belli büyüme faktörlerinin varlığında S fazına girer. Sentez fazı olan S fazı tamamlandığında, hücre mitoz öncesi ikinci büyüme dönemine ilerler. Bu faz G_2 olarak adlandırılır. Mitojenler hücre üzerine iki şekilde etkili olabilirler. Birincisi, hücrenin G_0'dan G_1'e girdiği, ikincisi ise G_1'den S fazına girdiği DNA sentezinin olduğu dönemdir. G_1 fazındaki hücreler, S fazına doğru ilerleyebilecekleri gibi, DNA'nın hasar görmüş olduğu durumlarda programlı hücre ölümü, yani apoptozis de gerçekleşebilir (Thomson, 1995; Mountz ve Zhou, 2001).

2.7.5 Apoptozis mekanizması

Apoptozis hücre ölümünü tetikleyen pek çok sinyal tarafından başlatılabilir. Örneğin; büyüme faktörü ve hormon yokluğu, pozitif ligand-reseptör etkileşimi, spesifik hasara yol açan ajanlar bunların içindedir (Mountz ve Zhou, 2001).

Hücre büyümesi ile apoptozis arasında koordinasyonlu, fakat sıklıkla ters bir ilişki mevcuttur. Apoptozis normal hücre sayısının yoğunluğunu düzenlemede önemli rol oynar, hücre ölümünün baskılanması kanser gelişimine yol açabilir. Apoptozis belli uyaranlar sonucu oluşan, enerjiye bağımlı moleküler olaylar döngüsünün son noktasıdır ve dört aşamadan oluşmaktadır (Thomson, 1995).

1. **Apoptozisi başlatan sinyal yolları**
2. **Kontrol ve integrasyon:** İntraselüler pozitif ve negatif düzenleyici moleküller, apptozisi inhibe ve stimüle etmek yoluyla hücrenin akibetini belirler.
3. **Ortak infaz fazı: "caspase"** ailesinden proteazlar tarafından yönetilen ölüm programını içerir (**"caspase": "c"** sistein proteaz mekanizmasını, **"aspase"** aspartik asit amino asitinden ayırma kabiliyetini belirtir).
4. **Ölü hücrenin fagositoz yoluyla ortadan kaldırılması**

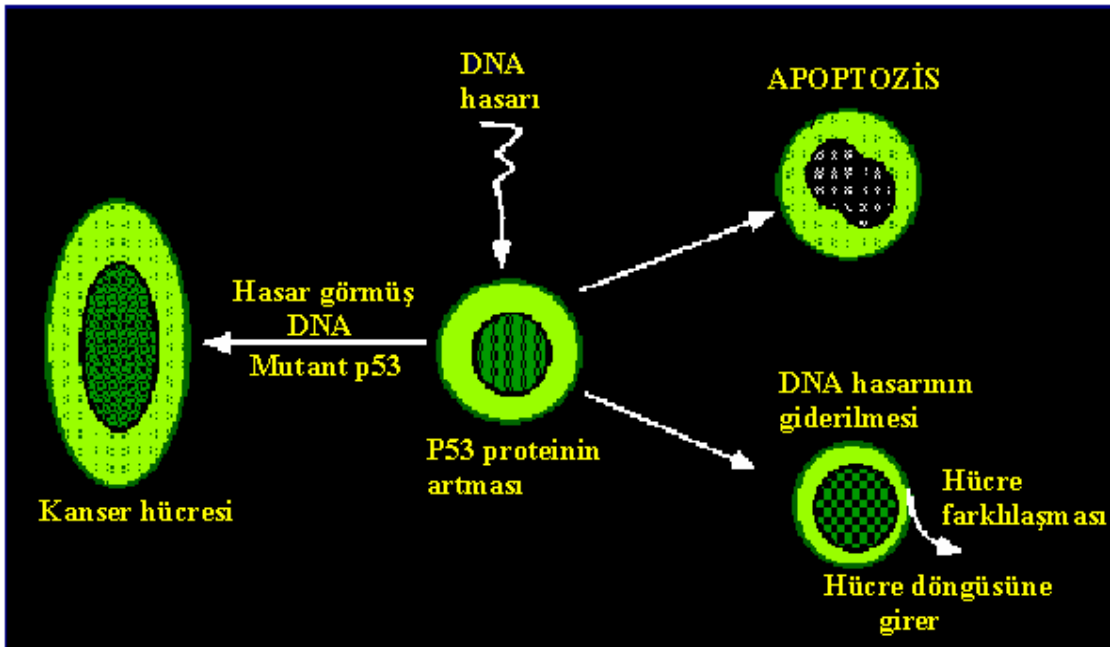
2.7.6. Apoptoziste rol alan proteinler

2.7.6.1. P53

Bir tümör supresör geni olan p53, insan kanserlerinde en fazla mutasyon görülen gendir. p53 geni karsinojen, sitostatik ajan, radyasyon, ultraviyole ışığı, hipoksi veya onkogenler gibi çeşitli uyaranlar ile indüklenebilir. Bunun sonucu olarak, transkripsiyon faktörü olan p53 proteini, hücre siklusunun durdurulmasında ve apoptoziste rol oynayan birtakım genlerin ekspresyonunu arttırır (Lowe ve Lin, 2000) (Şekil 2.10.).

Yapılan çalışmalar, p53'ün spesifik genomik bölgelere tetramer yaparak bağlandığını ve bunun sonucu olarak negatif büyüme etkisi olan genlerin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir.Hücre siklusunun durdurulması veya hücre ölümü, zedelenmiş DNA'nın replike olmasını engelleyerek, genomun bütünlüğünün korunmasını sağlar. Bu olay, p53'ün tümör supresör geni olması açısından önemli olduğu kadar, kemoterapiye bağlı DNA zararı sonucu indüklenen apoptozise yol açmasından dolayı da önem taşır (Lowe ve Lin, 2000).

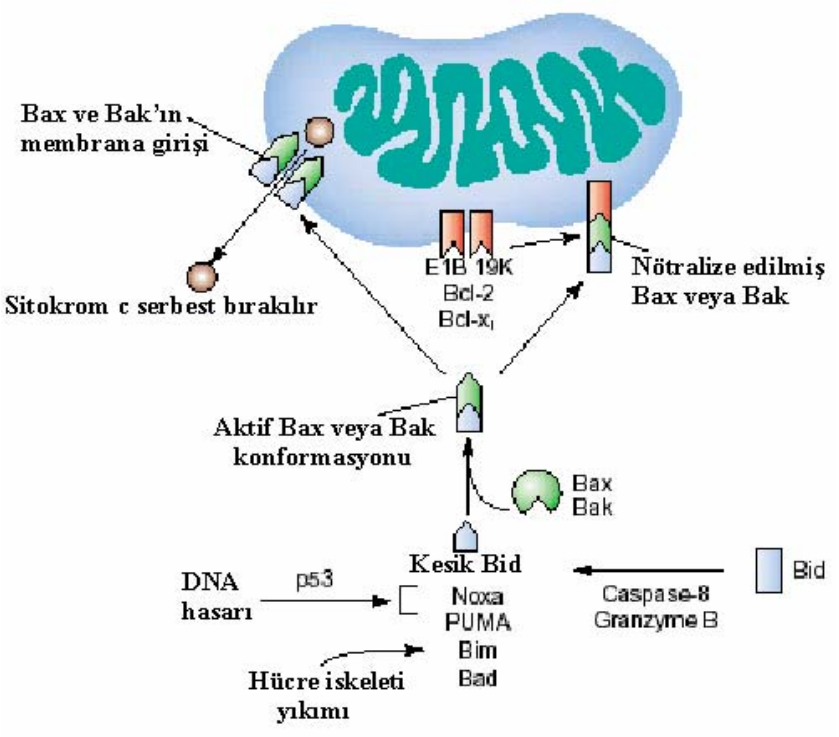
.



Şekil 2.10. p53 aktivasyonu .

2.7.6.2. Bcl-2

Apoptozis döngüsü işlevini iki esas mekanizma ile görür: Birincisi "caspase" yolu, ikincisi ise mitokondrium disfonksiyonu ile tanımlanan organel disfonksiyonu yoludur. Bcl-2 ailesi ve üyeleri, mitokondri düzeyinde işlev gören ve apoptoziste çok önemli rol oynayan moleküllerdendir (Şekil 2.11.) (Gastman, 2001).



Şekil 2.11. Bcl'nin apoptoziteki rolü

Yapılan genetik transfer deneyleri, bcl-2'nin hemapoetik büyüme faktörü verilmeyen hemapoetik hücre kültüründe apoptozisi engellediğini göstermiştir. Daha sonra transgenik fare deneylerinde bcl-2'nin hücre sürvisini uzattığı görülmüştür. Ayrıca, bcl-2 ekspresyonunun "antisense" metodu ile inhibe edilmesi, lösemik hücre büyümesini ve sürvisini kısalttığını göstermiştir. 25 kDa olan bcl-2 proteini hidrofobik COOH-ucu sayesinde translasyon sonrası hücre içi membranına girip sitozole doğru yönelebilmektedir. Yapılan çalışmalar bcl-2'nin çekirdek kılıfında, endoplazmik retikulumun bazı bölümlerinde, mitokondrinin dış membranında ve daha az olmak üzere hücre membranında bulunduğunu göstermiştir.

Son yıllarda bcl-2 ailesine dahil olan ve 3 sınıfa ayrılabilen önemli proteinler izole edilmiştir (Gastman, 2001).

Birinci grupta; bcl-2, bcl-x_L , bcl-w gibi anti-apoptotik proteinler yer almaktadır. Bu proteinler, bcl-2 homoloğu (BH) olan BH1'den BH4'e kadar olan bölgeler içermektedir.

İkinci grupta; Bax, Bak, Bad gibi pro-apoptotik proteinler bulunmaktadır.
Üçüncü grupta ise sadece BH3'ü homolog bölge olarak içeren Bik, Bid, Bim gibi proapoptotik proteinler yer almaktadır.

2.7.6.3. Kaspaz

Kaspazlar apoptozis için gerekli olan bir grup sistein proteaz enzimidir ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Kaynağına yada ölüm uyarısına bakılmaksızın apoptozise giden tüm hücrelerde sistein proteaz aktivitesi mevcuttur. Hücrede inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Kaspazlar, apoptoziste hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler olarak bilinirler. Memelilerde en az 14 kaspaz vardır (Grütter, 2000; Villa ve ark.,1997; Stennicke ve Salvesen,1998; Cai ve ark., 1998).

Kaspazların sınıflandırılması:

Kaspaz-1 (ICE)
Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)
Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)
Kaspaz-4 (ICH-2, TX, $ICEre_{11}$)
Kaspaz-5 ($ICEre_{111}$,TY)
Kaspaz-6 (Mch2)
Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)
Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)
Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)
Kaspaz-10 (Mch4)
Kaspaz-11 (ICH-3)
Kaspaz-12
Kaspaz-13 (ERICE)
Kaspaz-14 (MICE)

2.7.6.4. Kaspazların proenzim yapısı ve aktivasyonu

Kaspazlar bir bağlayıcı peptid ile ayrılmış 2 alt ünite ve bir N-terminal prodomaininden oluşmuş inaktif bir proenzim olarak sentezlenirler. Olgunlaşma sırasında prodomain ve bağlayıcı peptid Asp amino asitinden kesilerek aktif kaspazın 2 alt ünitesi oluşur. Kaspaz aktivasyonu ya hücre ölüm reseptörlerinin ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir (Gobe ve ark., 1999; Rodenburg ve ark., 2000).

Apaf-1'in indüksiyonu, mitokondriden sitokrom c salınmsıyla gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu, kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir. Ayrıca mitokondriden salınan AIF (apoptozis indükleyici faktör)'ler bazı inükleazları aktifleştirir böylece DNA degredasyonuna neden olurlar (Grütter, 2000; Villa ve ark.,1997; Stennicke ve Salvesen,1998; Cai ve ark., 1998).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bu çalışma Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan denekler, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Transgen ve Deney Hayvanları ünitesi ve Leipzig Üniversitesi (Almanya) deney hayvanı üretim ünitesinden temin edilen 250-350 gram ağırlığındaki pigmentli dişi *Long Evans* türü 70 adet sağlıklı sıçandan oluşmuştur. Denekler 8 gruba ayrılarak her gruba standart hazırlık, anestezi ve cerrahi teknik uygulanmıştır. Her grup 8–9 denekten oluşmuştur.

Her grupta bulunan sıçanlar aynı laboratuar ortamında tutuldu. Sıçanlar oda sıcaklığında 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta kalacak şekilde kafeslere konuldu. Tüm gruplara aynı standart sıçan yemi verilerek yiyecek alımları sağlandı ve hayvanların günlük takipleri yapıldı.

1. Grup (Kontrol gurubu) : Bu grup 9 denekten oluşmuştur. Bu gruba herhangi bir işlem yapılmamış olup, sadece normal değerlerin saptanması amaçlanmıştır.

2. Grup (İ-R) : Bu grup 9 denekten oluşmuştur. Bu gruba iskemi-reperfüzyon yapılmış ve plasebo olarak serum fizyolojik verilmiştir. 60 dakikalık iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon gerçekleştirilmiştir.

3. Grup (İ-R + salisilaldimin) : Bu grup 9 denekten oluşmuştur. Bu gruba, 60 dakikalık iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon gerçekleştirildi. I-OH-2,6-Butph-5-OCH3-salisilaldimin-I, iskemi başlamadan 6 saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 72 mg/kg dozunda intraperitonal olarak uygulanmıştır.

4. Grup (İ-R+*Fumaria asepala Boiss.*) : 8 denekten oluşan bu gruba alkol çözünürlüğünde hazırlanan *Fumaria asepala Boiss.* ekstraktı (5 mg/ml), iskemi başlamadan 6 saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 50 mg/kg dozunda intraperitonal olarak uygulanmıştır. Ektraksiyon için *Fumaria asepala Boiss.* bitkisi alkol ortamında 24 saat bekletilmiş ve daha sonra süzülme işlemi yapılmıştır. Elde edilen sıvı kısımdaki alkol ve su, rotary evaporatory cihazı yardımıyla uzaklaştırılarak bitki ekstraktı elde edilmiştir.

5. Grup (İ-R + Lutein) : Bu grup 8 denekten oluşmuştur. Bu grupta, 60 dakikalık iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak temin edilen lutein, iskemi başlamadan 6 saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 72 mg/kg dozunda intraperitonal olarak uygulanmıştır.

6. Grup (İ-R + *Trigonella foenum-graecum L.*) : 9 denekten oluşan bu gruba 60 dakikalık iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon gerçekleştirildi. *Trigonella foenum-graecum* bitkisinin tohumları metanol ortamında 24 saat bekletilmiş ve daha sonra süzülme işlemi yapılmıştır. Elde edilen sıvı kısımdaki metanol ve su, rotary evaporatory cihazı yardımıyla uzaklaştırılarak bitki ekstraktı (5 mg/ml) elde edilmiştir. Elde edilen bu ekstrakt iskemi başlamadan 6 saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 50 mg/kg dozunda intraperitonal olarak uygulanmıştır.

7. Grup (İ-R + *Cyperus rotundus L.*) : 9 denekten oluşan bu gruba alkol çözünürlüğünde hazırlanan. *Cyperus rotundus L.* ekstraktı (5 mg/ml), iskemi başlamadan 6 saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 50 mg/kg dozunda intraperitonal olarak uygulanmıştır. Ektraksiyon için *Cyperus rotundus L.* bitkisi alkol ortamında 24 saat bekletilmiş ve daha sonra süzülme işlemi yapılmıştır. Elde edilen sıvı kısımdaki alkol ve su, rotary evaporatory cihazı yardımıyla uzaklaştırılarak bitki ekstraktı elde edilmiştir.

8. Grup (İ-R + *Thymus longicaulis*) : 9 denekten oluşan bu gruba alkol çözünürlüğünde hazırlanan. *Thymus longicaulis* ekstraktı (5 mg/ml), iskemi başlamadan 6 saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 50 mg/kg dozunda

intraperitonal olarak uygulanmıştır. Ektraksiyon için *Thymus longicaulis* bitkisi alkol ortamında 24 saat bekletilmiş ve daha sonra süzülme işlemi yapılmıştır. Elde edilen sıvı kısımdaki alkol ve su, rotary evaporatory cihazı yardımıyla uzaklaştırılarak bitki ekstraktı elde edilmiştir.

3.2. Bitki Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan bitkilerden *Fumaria* Kayseri'deki, diğer bitkiler ise Şanlıurfa'daki aktarlardan alınmıştır. *Trigonella foenum-graecum L*. bitkisinin tohumları, diğer bitkilerin tamamı kullanılmıştır. Bitkiler porselen havanda iyice dövülüp toz haline getirilerek 500gr / 500ml methanol eklenek 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda süzülüp sıvı kısım rotary evaporatory cihazı ile uzaklaştırılarak bitki ekstraktı elde edilmiştir.

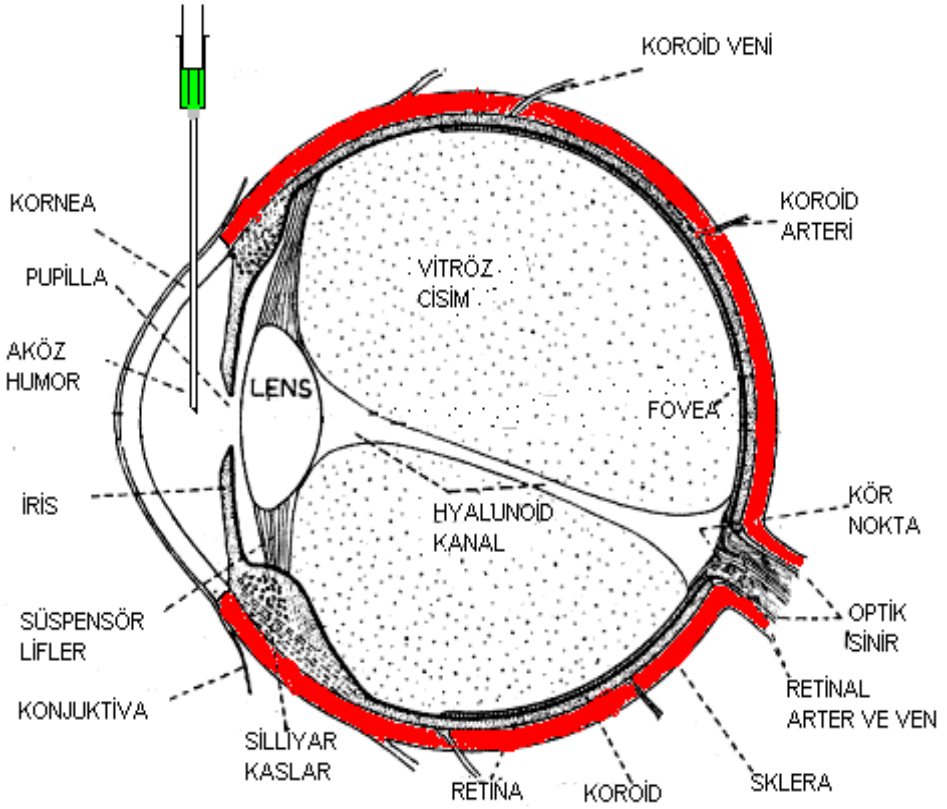
3.3. Anestezi Tekniği

İntramuskular olarak, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompon, Bayer, Türkiye) kombinasyonu ile anestezi ve analjezi sağlandı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına %0,5' lik proparakain hidroklorid damlatılmış olup, hiçbir denekte solunum ve kan basıncı desteği sağlanmamıştır.

3.4. İskemi-Reperfüzyon Oluşturulması

Denekler yüzüstü pozisyonda laboratuar masasına yatırılarak anestezi ve analjezi uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı. Plasebo, salisilaldimin, lutein, *Thymus, Trigonella, Cyperus, Fumaria* grubundaki deneklerde retinal iskemi oluşturmak amacıyla, serum fizyolojik şişesine, ucunda insülin iğnesi (27 Gauge) bulunan serum seti takıldı ve bu insülin iğnesi ile temporal limbustan ön kameraya girildi (Şekil 3.1.). Göz içi basıncı 110 mm Hg olacak şekilde serum şişesi 150 cm yüksekliğe çıkartılarak tespit edildi ve bu yükseklikte 60 dakika süreyle

tutuldu. İskeminin başlamasıyla birlikte plasebo grubuna 1 ml serum fizyolojik subkutan olarak verildi.



Şekil 3.1 Sıçanlarda iskemi modeli.

60 dakikalık iskemiden sonra serum şişesi göz seviyesine indirilerek, göz içi basınç normal seviyeye düşürüldü ve takiben iğne ön kameradan çekildi. Denekler 24 saat süreyle reperfüzyon ortamında bekletilmiştir. İskemiden 6 saat öncesinde ve reperfüzyonun başlamasından 6 saat sonrasında 3. gruba salisilaldimin, 4. gruba *Fumaria asepala Boiss* ekstraktı, 5. gruba lutein, 6. gruba *Trigonella foenum-graecum* ekstraktı, 7. gruba *Cyperus rotundus* ekstraktı, 8. gruba *Thymus longicaulis* ekstraktı uygulanmıştır.

3.5. Retina Örneklerinin Hazırlanması

60 dakikalık iskemi ve takiben 24 saatlik reperfüzyon ortamında bekletilen sıçanlar daha sonra desikatörde CO_2 gazı verilerek öldürülmüş ve gözler enükle edilmiştir. Her gruptaki enükle edilen gözler enüklasyon sonrası süratle buz kabı üzerine konup, bisturi yardımıyla pars plana bölgesinden ikiye ayrıldı. Vitreus dokusu uzaklaştırıldıktan sonra binoküler mikroskop yardımıyla retina dokusu koroidden ayrıldı. Örnekler hassas terazi ile tartıldıktan sonra ependorf tüplere aktarıldı ve analiz edilinceye kadar – 80 ºC' de bekletildi.

3.6. Biyokimyasal İncelemeler

1. Doku örnekleri 1/9 oranında %6'lık perklorik asit içerisinde ultrasonikatör yardımıyla buz ortamında homojenize edildi.

2. Elde edilen homojenatlar vorteks ile karıştırıldı. Ardından 20 dakika süreyle + 4 ºC 'de bekletildi. Daha sonra mikrosantrifüj yardımıyla 4000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi.

3. Süpernatantlar yeni bir tüpe aktarılarak GSH ve MDA analizleri peletler ise protein çalışmalarında kullanılmak üzere -80 ºC'de bekletildi.

3.6.1 Retina örneklerinde MDA analizi

Thiobarbütirik asit reaktif maddeleri (TBARS) genellikle doymamış yağ asit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ile tespit edilmektedir. Buna ilave olarak DNA, protein ve karbonhidratların oksidatif hasarları sırasında da MDA oluşmaktadır (Jo ve Ahn, 1998).

3.6.1.1. Stok standardın hazırlanması

Birinci çalışma solusyonu: 4.05 M konsantrasyonlu orijinal stok tetraetoksipropan (TET, Sigma) solüsyonundan 24.7 µl alınarak 10 ml suda

seyreltildi. Böylece konsantrasyonu 10 mM olan birinci çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu.

İkinci çalışma solusyonu : Birinci çalışma solüsyonundan 10 µl alınıp üzerine 990 µl saf su ilave edilerek 100 µM konsantrasyonlu TET hazırlanmış oldu.

Üçüncü çalışma solusyonu : İkinci çalışma solüsyonundan 100 µl alınıp üzerine 900 µl saf su ilave edilerek 10 µM konsantrasyonlu TET hazırlandı (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. MDA standart eğrisinin hazırlanması

Standart No	Saf Su (µl)	3. Çalışma Solüsyonu (µl)	Konsantrasyon (nmol)
0	100	0	0
1	90	10	0.1
2	80	20	0.2
3	60	40	0.4
4	20	80	0.8
5	--	100	1.0

Örnek ve standartların her birinden 100'er µl alınarak üzerlerine sırasıyla aşağıdaki solusyonlar ilave edilmiştir.

- Örnek ve standartların her birinden 100 µl
- %10 Sodium dodecyl sulfate (SDS) 162 µl
- Asetik asit (pH: 3.5) 200 µl
- %0.8 TBA (12 mg TBA 1.5 ml metanolde çözüldü) 200 µl
- nH2O 338 µl

1. Karışımlar iyice vortekslendi. Örnekleri içeren ependorf tüpler 95 ºC' ye ayarlanmış sıcak su banyosunda 45 dakika bekletildikten sonra musluk suyu altında soğutuldu.

2. Örneklerin olduğu tüpler 3 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

3. Üst fazdan 800 µl alınıp spektroflorometre yardımıyla (Jasco FP- 6300) eksitasyon 520 nm ve emisyon 555 nm' de absorbans değerleri okundu.

4. Konsantrasyonları bilinen standartlardan okunan absorbans değerlerinden bir standart eğri oluşturuldu. Excel programı yardımıyla yapılan standart eğri sonucunda bir formül elde edildi. Okunan örnek absorbansları, Standart eğri formülünde örnek olarak ifade edilen X yerine konularak gerçek değerleri nmol cinsinden tespit edilmiştir.

3.6.2. Retina örneklerinde glutatyon analizi (Obrosova and Stevens, 1998)

Glutatyon, dokularda yüksek düzeylerde bulunan ve glutamat, sistein, ve glisinden oluşan, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptittir. Glutatyon serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (Frei, 1994; Yalçın, 1998). Antioksidan olarak hücre savunmasında rol oynaması dışında DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonlarda da önemli rolü vardır (Meister, 1983).

Glutatyonun peroksitlerle ve disülfitlerle reaksiyonu sonucu okside glutatyon (GSSG) oluşur. GSSG konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin bir göstergesidir. GSSG tiyol içeren proteinlerin konformasyon ve aktivitesi üzerinde etkili olan maddedir. Canlıların yaşayabilmesi için yüksek miktarda glutatyona ve düşük miktarda okside glutatyona ihtiyaç vardır. Reaksiyonlar sonucu oluşan GSSG, NADPH'nin de kullanıldığı bir reaksiyonla tekrar GSH'a çevrilir (Seven ve Candan, 1996). Retina örneklerinde glutatyon miktarının tespiti için aşağıda belirtildiği üzere 100 mM konsantrasyonlu bir çalışma solüsyonu hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. GSH standart eğrisinin hazırlanması

Standart No	nH2O (µM)	Çalışma solüsyonu (µl)	Konsantrasyon (nmol)	Diğer solüsyonlar(µl)
0	100	0	0	900
1	99	1	0.1	900
2	98	2	0.2	900
3	96	4	0.4	900
4	92	8	0.8	900
5	84	16	1.6	900
6	68	32	3.2	900

1. Stok solüsyonu: 3.073 mg indirgenmiş GSH (Sigma) 10 ml saf suda çözüldü. Böylelikle 1 mM'lık stok solüsyon hazırlanmış oldu.

2. Çalışma solüsyonu: Stok solüsyonundan 100 µl alındı. Buna 900 µl saf su ilave edilerek 100 µM konsantrasyonlu çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu

3. Örnek ve standartların her birinden 100 µl alındı. Bunlara 890 µl GSH solüsyonu (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH: 8.1) ve 10 µl oftaldialdehit (10 mg Ophthaldialdehit/1 ml metanol) ilave edilerek vortekslenmiştir.

4. Örnekler oda sıcaklığında ışıktan korunabilecek bir yerde reaksiyonun oluşması için 6-7 dakika bekletildi. Daha sonra absorbans değerleri spektroflorometre yardımıyla eksitasyon 345 nm ve emisyon 425 nm'de okunarak, standartlardan elde edilen eğrideki formüle uygulanarak nmol cinsinden hesaplandı ve elde edilen sonuçlar 100 mg doku yaş ağırlığına göre değerlendirilmiştir.

3.7. Kaspaz -3 Proteinin İmmunoblot Analizleri

Çalışmamızın bir bölümü olarak iskemi-reperfüzyon sonucunda oluşan apoptozisden birinci derecede sorumlu kaspaz-3 proteini (öncül formu 32 kDa) SDS-PAGE ve immünoblot teknikleri ile incelenmiştir.

Homojenizasyondan sonra santrifüjlenme ile elde edilen örnek peletleri lizis solüsyonunda (Tris-NaCl-EDTA-Protease inhibitör karışımı) glass-dounce homogenizatörü yardımı ile tekrar homojenize edildikten sonra 13,000 rpm/4 ºC'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen sıvı faz (protein fazı) SDS-PAGE (Mini Protean II system; Bio-Rad, USA) ortamında yüzdürülmüştür. Jel üzerinde ayrılan protein bantları daha sonra Trans-Blot Semi-Dry systemi (Bio-Rad) yardımı ile PVDF membranına transfer edildi. Membran bir seri işlemlerden geçtikten sonra aktif kaspaz-3 (17 kDa polipeptid) monoklonal antikoru (Chemicon, AB3623) ile 2 saat süre ile reaksiyona tabi tutulmuştur. Membran 3 kez TBS-T (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05%Tween 20) ile yıkandıktan sonra alkalin fosfataz bağlı

ikincil antikor ile 1 saat kadar süre inkübe edildi. Reaksiyon ürünleri karanlık bir ortamda NBT/BCIP alkaline phosphatase substrate tabletleri (Sigma Fast tablet) kullanılarak (1 tablet/ 10ml nH_2O) görünür hale getirilmiştir. Membran üzerinde görünür hale getirilen bantların optikal yoğunlukları Fluor-S-Multi-Imager (Bio-Rad) yardımı ile ölçülmüştür. Sonuçlar mm^2 üzerinden arbitrary birimleri (AU) olarak verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Retinada GSH Ölçüm Sonuçları

Retina örneklerinde bulunan GSH konsantrasyonları spektroflorometre yardımıyla ölçüldü. Ölçümler yapılmadan önce konsantrasyonları bilinen standartlar spektroflorometre ile ölçülerek standart eğri ve formülü elde edildi. GSH miktarını saptamak için GSH'ın ophthaldialdehit ile oluşturduğu renkli kompleksin spektroflorometre ile absorbansının ölçülmesi prensibi kullanıldı. Örneklerden okunan absorbans değerleri formüldeki yerine konarak GSH miktarları belirlendi ve daha sonra ortalama değerler hesaplandı. Gruplardan elde edilen ortalama değerler aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol grubunda GSH değerleri

Grup Kontrol	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer ± SD
1	2.3	2.26 ± 0.25
2	2	
3	2.3	
4	1.9	
5	2.5	
6	2.6	
7	2.5	
8	2	
9	2.3	

Çizelge 4.2. İskemi-reperfüzyon grubunda GSH değerleri

Grup İ-R	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer ± SD
1	1.4	1.44 ± 0.22
2	1.7	
3	1.8	
4	1.5	
5	1.3	
6	1.3	
7	1.6	
8	1.1	
9	1.3	

Çizelge 4.3. İ-R+ *Trigonella foenum-graecum* grubunda GSH değerleri

Grup İ-R + *Trigonella*	**Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)**	**Ortalama değer ± SD**
1	1.9	1.90 ± 0.13
2	2.2	
3	1.8	
4	1.8	
5	1.8	
6	2	
7	1.9	
8	1.8	
9	1.9	

Çizelge 4.4. I-R+ *Cyperus rotundus* grubunda GSH değerleri

Grup İ-R + *Cyperus*	**Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)**	**Ortalama değer ± SD**
1	1.7	1.92 ± 0.17
2	1.8	
3	1.8	
4	1.9	
5	2.3	
6	1.9	
7	2.1	
8	1.9	
9	1.9	

Çizelge 4.5. İ-R+ *Thymus longicaulis* grubunda GSH değerleri

Grup İ-R + *Thymus*	**Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)**	**Ortalama değer ± SD**
1	1.7	1.70 ± 0.14
2	1.6	
3	1.8	
4	1.7	
5	1.6	
6	1.5	
7	1.6	
8	1.9	
9	1.9	

Çizelge 4.6. İ-R+ *Fumaria asepala* grubunda GSH değerleri

Grup İ-R + *Fumaria*	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer ± SD
1	1.8	2.30 ± 0.15
2	2.5	
3	2.6	
4	2.3	
5	2.5	
6	2.4	
7	2.1	
8	2.2	

Çizelge 4.7. İ-R + Lutein grubunda GSH değerleri

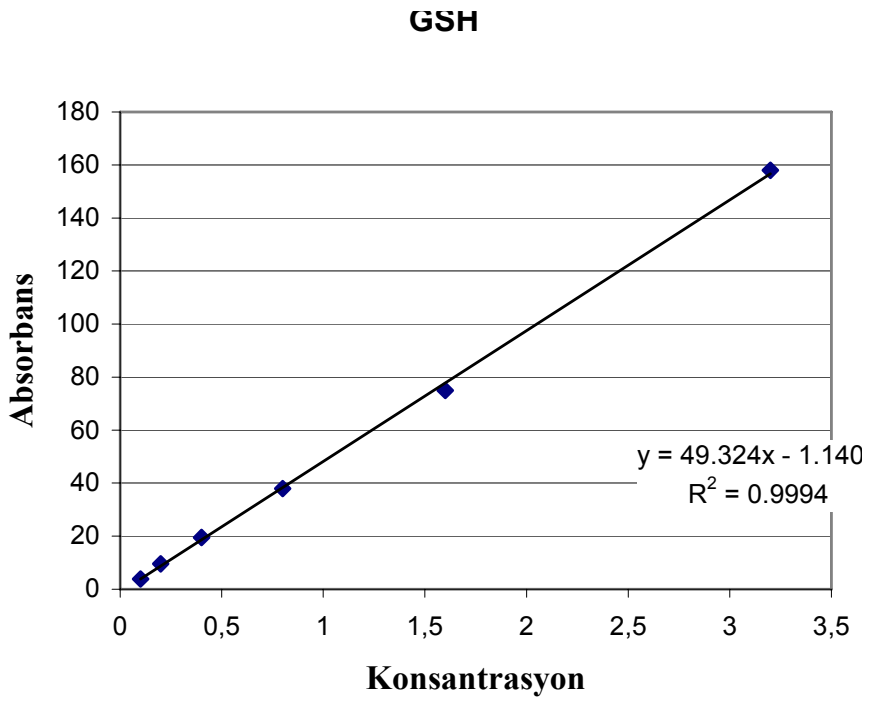
Grup İ-R + Lutein	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı	Ortalama değer ± SD
1	2.1	1.85 ± 0.25
2	1.9	
3	2.1	
4	1.7	
5	1.4	
6	1.7	
7	2.1	
8	1.8	

Çizelge 4.8. İ-R+ salisilaldimin grubunda GSH değerleri

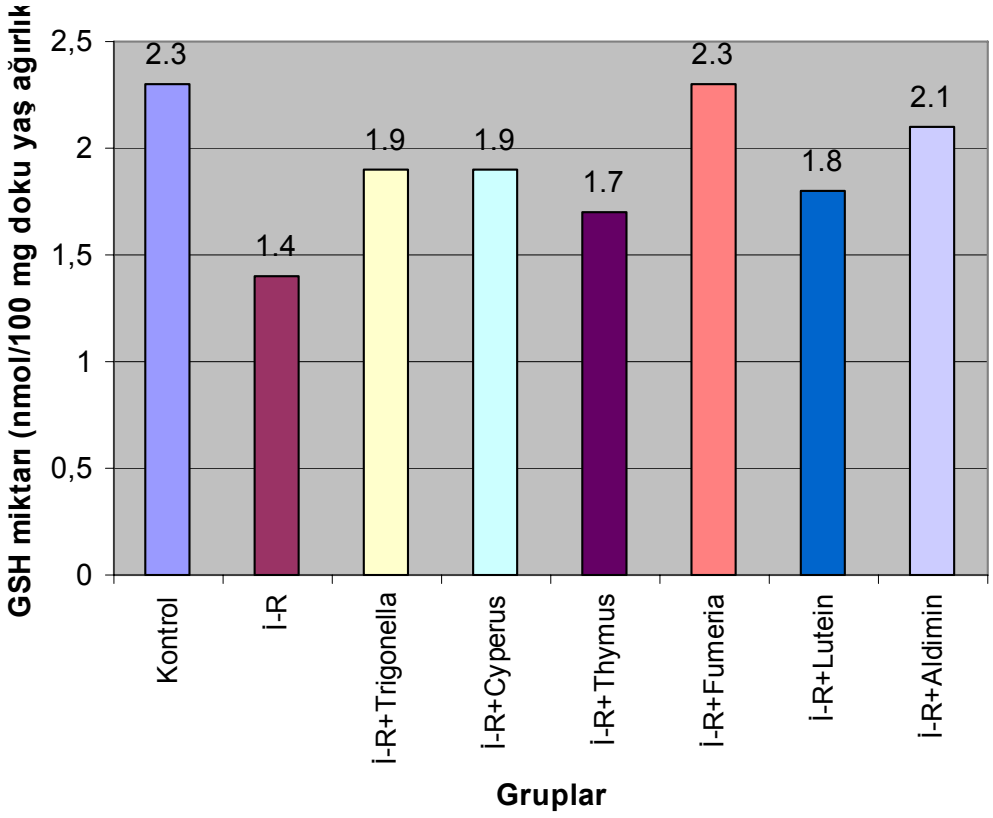
Grup İ-R + Aldimin	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer ± SD
1	1.8	2.18 ± 0.29
2	2.7	
3	2.4	
4	2.1	
5	2.2	
6	1.9	
7	1.9	
8	2.3	
9	2.4	

Çizelge 4.9. Tüm gruplardaki GSH ortalama değerleri

Gruplar	**Ortalama Konsantrasyon Değerleri (nmol GSH/ 100mg retina yaş ağırlığı) ± SD**
Kontrol	2.26 ± 0.25
İskemi-reperfüzyon	1.44 ± 0.22
İskemi-reperfüzyon + *Trigonella foenum-graecum*	1.90 ± 0.13
İskemi-reperfüzyon + *Cyperus rotundus*	1.92 ± 0.17
İskemi-reperfüzyon + *Thymus longicaulis*	1.70 ± 0.14
İskemi-reperfüzyon + *Fumaria asepala*	2.30 ± 0.15
İskemi-reperfüzyon + Lutein	1.85 ± 0.25
İskemi-reperfüzyon + salisilaldimin	2.18 ± 0.29



Şekil 4.1. GSH standartlarından elde edilen değerler ve kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.2. Sıçan retina örneklerinde GSH miktarı.

4.2 Retinada MDA Ölçüm Sonuçları

Retina örneklerinde bulunan MDA konsantrasyonları spektroflorimetre yardımıyla ölçüldü. MDA miktarının saptanması için, MDA ile Thiobarbütirik asit reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleksin spektroflorimetre ile absorbansının ölçülmesi prensibi kullanıldı. Ölçümler yapılmadan önce konsantrasyonları bilinen standartlar spektroflorimetre ile ölçülerek standart eğri ve formülü elde edildi. Örneklerden okunan absorbans değerleri formüldeki yerlerine konarak MDA miktarları belirlendi ve daha sonra ortalama değerler hesaplandı. Gruplardan elde edilen ortalamalar aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Çizelge 4.10. Kontrol grubunda MDA değerleri

Kontrol	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer ± SD
1	1.26	2.81 ± 3.13
2	11.00	
3	2.25	
4	1.23	
5	1.07	
6	1.45	
7	2.08	
8	1.91	
9	3.07	

Çizelge 4.11. İskemi-reperfüzyon grubunda MDA değerleri

Grup İ-R	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer ± SD
1	14.86	12.17 ± 1.88
2	10.80	
3	11.68	
4	13.54	
5	13.57	
6	10.60	
7	14.20	
8	9.60	
9	10.76	

Çizelge 4.12. İ-R+ *Trigonella foenum-graecum* grubunda MDA değerleri

Grup İ-R + *Trigonella*	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer ± SD
1	9.30	10.46 ± 3.16
2	14.43	
3	10.91	
4	8.38	
5	7.17	
6	12.50	
7	13.40	
8	5.10	
9	12.96	

Çizelge 4.13. İ-R+ *Cyperus rotundus* grubunda MDA değerleri

Grup İ-R + *Cyperus*	**Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı**	**Ortalama değer ± SD**
1	6.43	5.60 ± 1.53
2	5.06	
3	2.61	
4	6.43	
5	5.30	
6	7.20	
7	4.40	
8	7.62	
9	5.36	

Çizelge 4.14. İ-R *Thymus longicaulis* grubunda MDA değerleri

Grup İ-R + *Thymus*	**Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)**	**Ortalama değer ± SD**
1	5.75	9.16 ± 2.32
2	11.60	
3	9.81	
4	10.70	
5	8.62	
6	10.55	
7	7.61	
8	11.91	
9	5.90	

Çizelge 4.15. İ-R+ *Fumaria asepala* grubunda MDA değerleri

Grup İ-R + *Fumaria*	**Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)**	**Ortalama değer ± SD**
1	4.82	4.95 ± 1.52
2	5.51	
3	3.66	
4	5.30	
5	2.54	
6	7.40	
7	4.11	
8	6.27	

Çizelge 4.16. İ-R + Lutein grubunda MDA değerleri

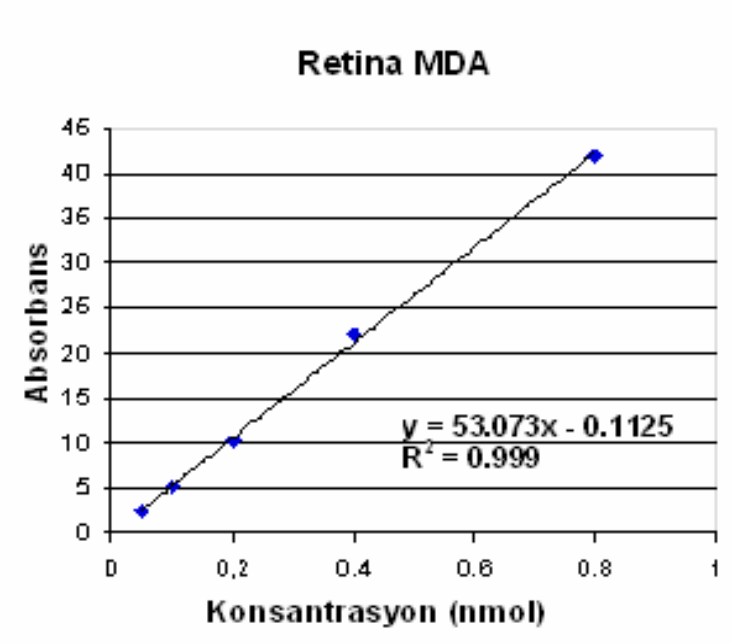
Grup İ-R + Lutein	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı	Ortalama değer ± SD
1	2.12	3.55 ± 1.29
2	5.90	
3	2.41	
4	3.73	
5	2.52	
6	4.75	
7	3.15	
8	3.86	

Çizelge 4.17. İ-R+ salisilaldimin grubunda MDA değerleri

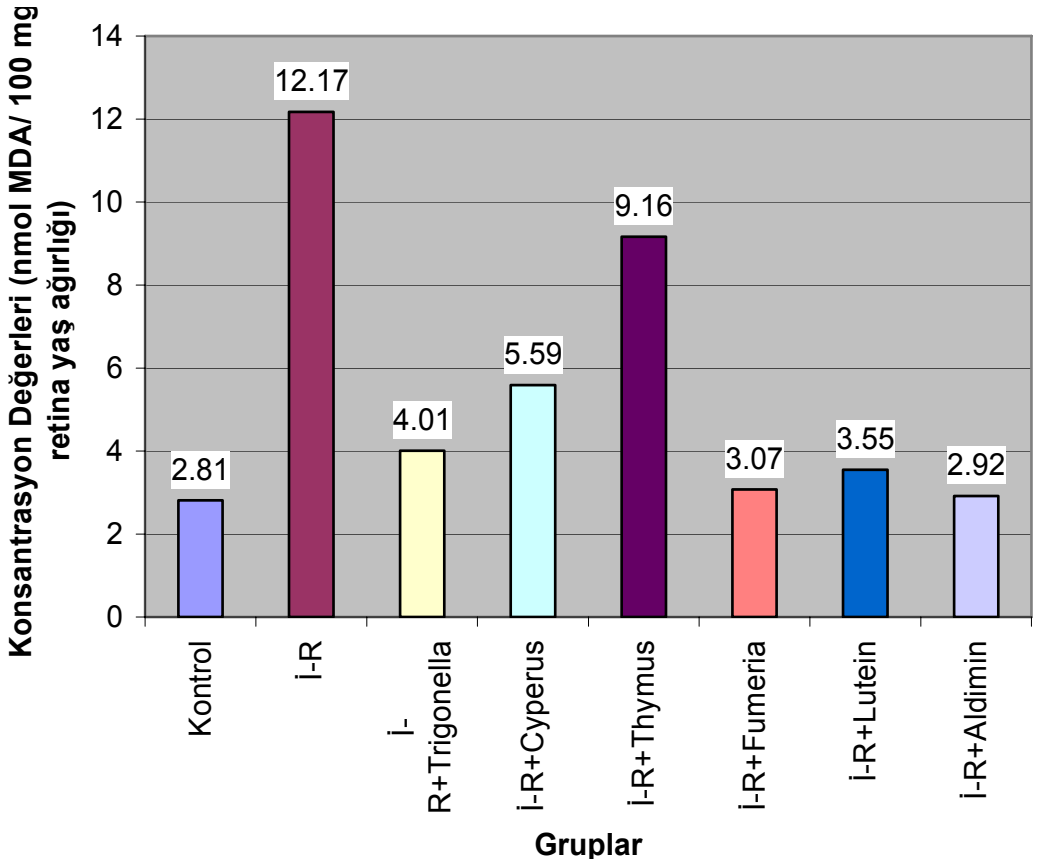
Grup İ-R + Aldimin	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer ± SD
1	3.85	2.92 ± 0.71
2	2.72	
3	2.42	
4	3.71	
5	2.56	
6	3.84	
7	1.90	
8	2.37	
9	2.93	

Çizelge 4.18. Tüm gruplardaki MDA ortalama değerleri

Gruplar	Ortalama Konsantrasyon Değerleri (nmol MDA/ 100mg retina yaş ağırlığı) ± SD
Kontrol	2.81 ± 3.13
İskemi-reperfüzyon	12.17 ± 1.88
İskemi-reperfüzyon + *Trigonella foenum-graecum*	10.46 ± 3.16
İskemi-reperfüzyon + *Cyperus rotundus*	5.60 ± 1.53
İskemi-reperfüzyon + *Thymus longicaulis*	9.16 ± 2.32
İskemi-reperfüzyon + *Fumaria asepala*	4.95 ± 1.52
İskemi-reperfüzyon + Lutein	3.55 ± 1.29
İskemi-reperfüzyon + salisilaldimin	2.92 ± 0.71



Şekil 4.3. MDA standartlarından elde edilen değerler ve kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.4. Sıçan retina örneklerinde MDA miktarı.

4.3. Uygulanan İstatistiksel Metot ve Analizler

Deneysel çalışma için oluşturulan kontrol, iskemi-reperfüzyon, *Trigonella, Cyperus, Thymus, Fumaria,* lutein ve salisilaldimin gruplarında bulunan örneklerden elde edilen GSH ve MDA değerleri SPSS programında Bağımsız T testi, gruplar arasındaki farklılıklar ise Varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen "p" değerleri "0.05, 0.01 ve 0.001" sabitlerine göre değerlendirilerek anlamlılık düzeyleri saptanmıştır. $p<0.05$ ise "karşılaştırılan gruplar arasında anlamlı bir fark vardır", $p>0.05$ ise "karşılaştırılan gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur", $p<0.01$ ise "karşılaştırılan gruplar arasında çok önemli farklılıklar vardır", $p<0.001$ ise "karşılaştırılan gruplar arasında ileri düzeyde önemli farklılıklar vardır" şeklinde ifade edilmektedir.

4.3.1 Glutatyonun İstatistiksel Analizi

Gruplar arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p<0.05$).
Kontrol ile İ-R grupları arasında ileri düzeyde önemli farklılık görülmüştür ($p<0.001$)
Kontrol ile *Trigonella* grupları arasında çok önemli farklılık görülmüştür ($p<0.01$)
Kontrol ile *Cyperus* grupları arasında anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0.05$)
Kontrol ile *Thymus* grupları ileri düzeyde önemli farklılık görülmüştür ($p<0.001$)
Kontrol ile *Fumaria* grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$)..
Kontrol ile lutein grupları arasında anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0.05$).
Kontrol ile *Aldimin* grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

4.3.2 Malondialdehitin İstatiksel Analizi

Gruplar arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p<0.05$).
Kontrol ile İ-R grupları arasında ileri düzeyde önemli farklılık görülmüştür ($p<0.001$)
Kontrol ile *Trigonella* grupları arasında ileri düzeyde önemli farklılık görülmüştür ($p<0,001$)

Kontrol ile *Cyperus* grupları arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.05$).
Kontrol ile *Thymus* grupları arasında ileri düzeyde önemli farklılık görülmüştür ($p<0.001$)
Kontrol ile *Fumaria* grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).
Kontrol ile Lutein grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).
Kontrol ile Aldimin grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.19. Deneysel iskemi-reperfüzyon (I/R) oluşturulmuş sıçan retinasında çeşitli antioksidanların MDA ve GSH üzerindeki etkileri.

Gruplar	**MDA (nmol/100 mg doku yaş aşırlık**	**GSH (nmol/100 mg doku yaş ağırlık)**
Kontrol (n:9)	2.81 ± 3.13	2.3
İskemi-Reperfüzyon (I/R) (n:9)	12.17 ± 1.88***	1.4***
I-R- *Trigonella* (n:9)	10.46 ± 3.16***	1.9**
I-R-*Cyperus* (n:9)	5.60 ± 1.53*	1.9**
I-R-*Thymus* (n:9)	9.16 ± 2.32***	1.7***
I-R- *Fumaria* (n:8)	4.95 ± 1.52[a.d]	2.2 [a.d]
I-R- Lutein (n:8)	3.55 ± 1.29[a.d]	1.8 *
I-R- Aldimin (n:9)	2.92 ± 0.71[a.d]	2.1 [a.d]

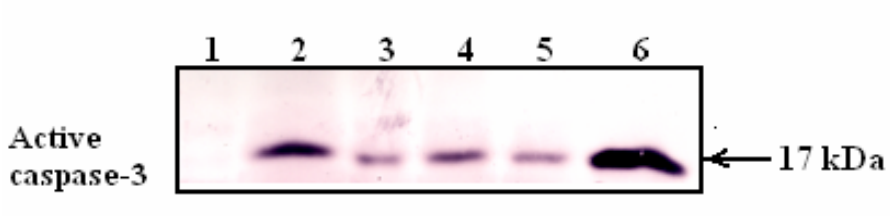
Tabloda görüldüğü gibi kontrol, lutein, aldimin ve *fumaria* uygulanmış I/R gruplarından elde edilen MDA değerleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. MDA miktarı herhangi bir antioksidan verilmemiş I/R grubunda kontrol ve I/R-lutein, I/R- Aldimin ve I/R- *Fumaria* gruplarına göre yaklaşık 4-6 kat artış göstermiştir. MDA miktarı I/R-*Trigonella,* I/R- *Cyperus* ve I/R- *Thymus* gruplarında kontrol, I/R-lutein, I/R- Aldimin ve I/R- *Fumaria* gruplarına göre yüksek fakat antioksidan verilmemiş I/R grubundan düşük görülmüştür.

Benzer şekilde kontrol ve lutein uygulanmış I/R gruplarına ait GSH değerleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. GSH miktarı I/R grubunda belirgin bir şekilde düşmüştür. GSH miktarı I/R-*Trigonella,* I/R- *Cyperus* ve I/R- *Thymus* gruplarında kontrol, I/R- Aldimin ve I/R- *Fumaria* gruplarına göre azalma

göstermiştir. Gruplardan elde edilen değerlerin kontrole karşı istatistik bakımından anlamlı farklılıkları *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, a.d. = anlamlı olmayan şeklinde ifade edilmiştir.

4.4. Kaspaz 3 Proteinin Immünoblot Sonuçları

İmmunoblot sonuçları Fluor-S-Multi-Imager ile taranarak gruplar arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir. Apoptozis göstergesi olarak kabul edilen kaspaz-3 proteini ile ilgili olarak önemli sonuçlar elde edilmiştir.



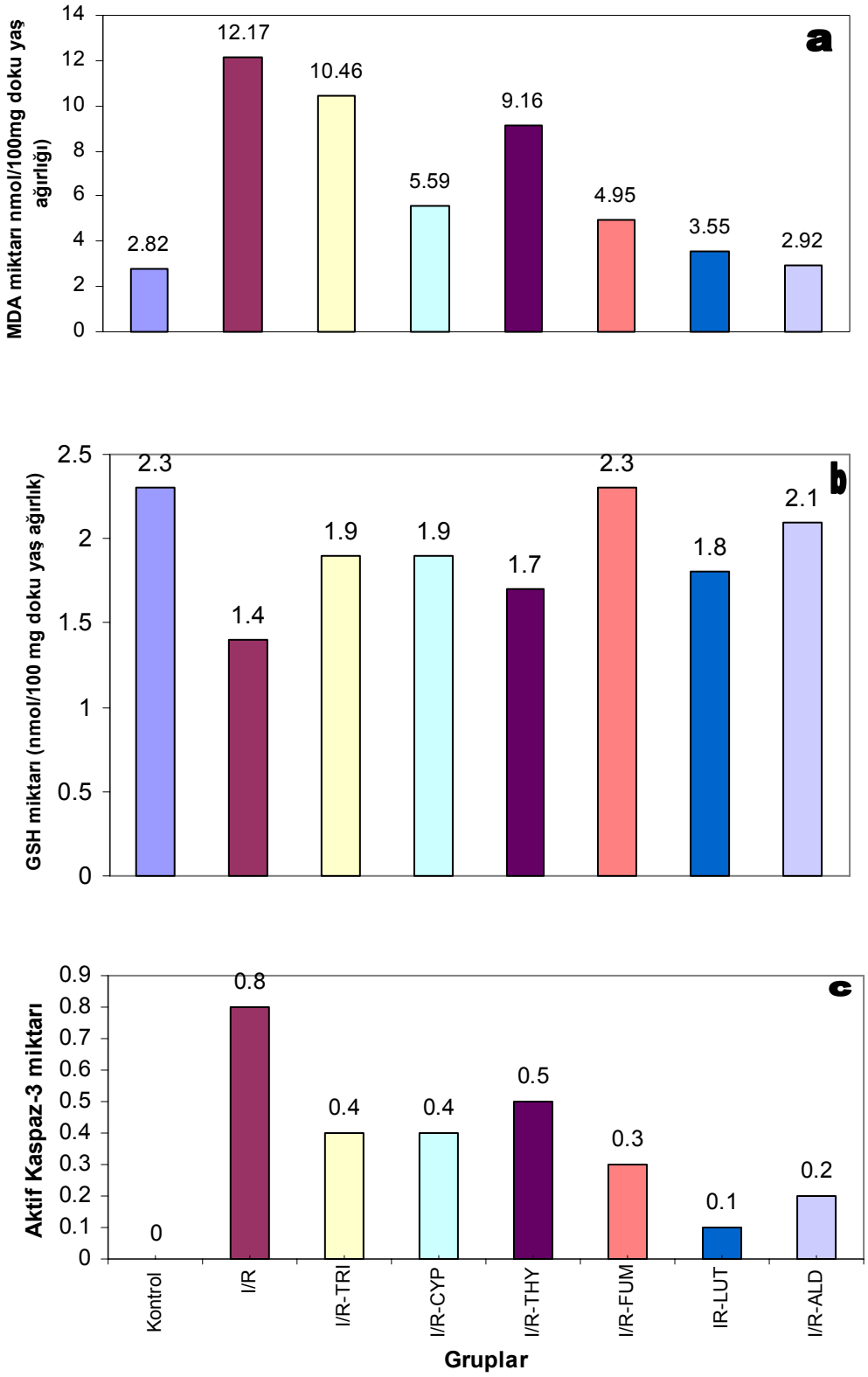
Şekil 4.5. Retina protein örneklerinde Western blot analizi ile aktif kaspaz-3 polipeptidinin belirlenmesi. 1, Kontrol retina; 2, I/R- *Trigonella*; 3, I/R-*Fumaria*; 4, I/R-*Cyperus*; 5, I/R-lutein; 6, I/R.

Çizelge 4.20. Western Blot analizi sonucu elde edilen ve apoptozisin bir göstergesi olan aktif kaspaz 3 polipeptid (17 kDa) yoğunluğunun densitometrik ölçümü.

Gruplar	**Bantların yoğunluk miktarı**
Kontrol (n:9)	0.0 ± 0.01
İskemi-Reperfüzyon (I/R) (n:9)	0.8 ± 0.05***
I-R- *Trigonella* (n:9)	0.2 ± 0.02**
I-R- *Fumaria* (n:8)	0.1 ± 0.01*
I-R-*Cyperus* (n:9)	0. ± 0.01**
I-R- Lutein (n:8)	0.4± 0.01*

Aktif kaspaz-3 molekülüne ait bant yoğunluğu özellikle antioksidan uygulanmamış iskemi-reperfüzyon grubunda artış gösterdiği (0.8 AU) tespit edilmiştir. Bu yoğunluk antioksidan uygulanan gruplardan özellikle lutein grubunda önemli derecede azaldığı (0.1 AU) görülmüştür. Grupların istatistiksel olarak kontrol

ile karşılaştırılması, *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05, n.s. = belirgin olmama.



Şekil 4.6. Retina örneklerinde görülen moleküler değişiklikler (a) Lipit peroksidasyon ürünü MDA miktarı, (b) antioksidan glutatyon (GSH) miktarı, ve (c) Western blot ile analiz edilen aktif kaspaz-3 proteinin optikal densitometrik ölçümü.

SDS-PAGE ve İmmünoblot analizlerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre iskemi-reperfüzyon oluşturulan sıçanlarda apoptozisin göstergesi olan kaspaz 3 enziminin miktarında artma olduğu dolayısıyla bu hayvanlarda hücre intiharının teşvik edilmiş olduğu gerçeği ortaya çıkmıştır. Antioksidan uygulanan hayvanlarda ise genel olarak aktif kaspaz miktarının hasta gruplara oranla az olduğu görülmüştür.

4.5. Tartışma

İskemi ve reperfüzyon sonucu dokuda meydana gelen hasar, bu hasarda serbest oksijen radikallerinin rolü ve antioksidanların bu hasarı gidermede etkileri konusunda son yıllarda bir çok araştırmalar yapılmıştır. İnsan retinası; diabetik retinopati, orak hücre anemisi, glokom, prematüre retinopati ve retinal arter ve ven tıkanıklığı gibi durumlarda iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalmaktadır (Yoon ve Marfor, 1989). İskemi süresi arttıkça doku hasarının büyüklüğü de artar. Dokulara göre farklılık göstermekle beraber iskeminin belirli bir süresine kadar doku, geri dönüşebilen doku hasarı fazına, iskemi süresi arttıkça doku geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girer. Bu aşamadaki doku reperfüzyon edilse dahi doku hasarı geri dönmez (Cotran ve ark., 1989). Retina için bu süre 30-90 dk olarak kabul edilir (Aydemir, 2002; Yoneda ve ark., 2001). Dokuya tekrar oksijen desteğinin sağlanmasıyla sisteme aniden aşırı miktarda giren oksijen, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Böylece doku hasarı daha da artar (Bozkurt,1997; Matsubara, ve ark., 2000). Reperfüzyonla birlikte dokuya gelen lökositlerin serbest radikal oluşumuna neden olarak oksidatif hasarı arttırdığı bilinmektedir. Lökosit toplanmasının inhibe edildiği bir çalışmada hasarın azaltıldığı gösterilmiştir (Matsubara, ve ark., 2000).

İskemi-reperfüzyon hasarından sorumlu olan mekanizmalar; aspartat ve glutamat gibi uyarıcı amino asitlerin açığa çıkması, enerjiye bağlı taşıma sistemlerindeki bozulmalar, özellikle hücre içi kalsiyum miktarının artması, bunun sonucu olarak kalsiyum tarafından yürütülen bazı süreçlerin başlaması ve serbest radikallerin oluşmasıdır (Cotran, ve ark., 1989; Aydemir, 2002). Serbest radikaller;

membran lipitlerini peroksidasyona uğratarak, hücrede proteinlerin, karbohidratların, nükleik asitlerin yapısını değiştirerek, kalsiyum dengesini bozarak, aspartat ve glutamat gibi uyarıcı amino asitleri uyararak doku hasarına yol açmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak ve önlemek için bir çok farmakolojik ajanla değişik çalışmalar yapılmıştır (Ishihara ve Nakano, 2000; Ekin, 2002; Bozkurt, 1997; Aydemir, 2002; Yoneda ve ark., 2001). Muller ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, toksik etki yaparak nöronların ölümüne neden olan glutamatın, H_2O_2 tarafından geri emiliminin azaltıldığı deneyler ile gösterilmiştir (Muller, 1997). İskemi-reperfüzyon çalışmalarında, iskemi oluşturmak amacıyla genellikle göz içi basıncın (GİB) artırılması veya retinal arterin bağlanarak kan akımının durdurulması metotları kullanılmıştır. Kullanılan en güncel metot GİB artırılarak sistolik basıncın üzerine çıkarılması metodudur. Bu metot kolay uygulanabilir ve reperfüzyon evresinin kolaylıkla başlatılabilir olması tercih sebebidir. Bizde çalışmamızda retinal iskemiyi GİB arttırarak gerçekleştirdik. GİB sistolik basıncın üzerine çıkarılması ile hem koroidal hem de arteriyal kan akımı durdurulmaktadır.

Retinanın iskemiye olan toleransı bazı dokulara göre çok fazladır. Bu farkın nedeni retina ve vitreusun büyük glikoz rezervine sahip olmasının yanın da, uzun süreli anaerobik glikoliz yapabilme yeteneğine sahip olmasıdır. Retina serbest radikallerin oluşturabileceği hasara karşı oldukça gelişmiş bir savunma sistemine sahiptir. Retinada bol miktarda bulunan vitamin E, superoksit dismutaz (SOD), glutatyon perksidaz, vitamin C ve glutatyon (GSH) retinayı oksidatif strese karşı korur. Bozkurt ve arkadaşlarının tavşan retinasında 60 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon sonucunda belirli patolojik değişiklikler gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada katalaz ve SOD'ın birlikte intravenöz olarak uygulandığı grupta fotoreseptör dış segmentinin oldukça iyi bir şekilde korunduğu tespit edilmiştir (Bozkurt, 1997). Yoneda ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada antiepileptik bir ilaç olarak kullanılan topiramatın retinal iskemi modelinde ve retinal hücre kültüründe koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sıçanlarda yapılan çalışmada, göz içi basınç 130 mm Hg'ya çıkarılmış ve 45 dk iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon uygulanmıştır. İskemi öncesi ve sonrası topiramat uygulanmıştır. Histolojik incelemelerde iç pleksiform tabakasının kalınlığı ve elektroretinogram a ve b

dalgaları kullanılmıştır. Yapılan incelemelerde topiramatın iskeminin neden olduğu ganglion hücre tabakası ve iç pleksiform tabakasındaki incelmeyi engelleyerek kalınlığını koruduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada yeni doğmuş sıçan embriyolarından hazırlanan retinal nöron kültürü ve saflaştırılan ganglion hücre kültüründe de topiramatın, toksisiteyi engelleyerek hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Yoneda ve ark., 2001).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bazı bitkilerin halk tarafından tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. *Cyperus rotundus, Trigonella foenum-graecum, Fumaria asepala* Boiss, *Thymus longicaulis* tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerdendir. Bu nedenle bu bitkilerin hangi hastalıklarda ne kadar etkili oldukları çeşitli araştırıcılar tarafından araştırılmaktadır. *Trigonella foenum-graecum'* un tip I ve tip II diyabette kan glikoz seviyesini düşürdüğü (Bordia ve ark., 1997; Sharma, ve ark., 1990; Madar, ve ark., 1997; Al-Habori ve Raman, 1998), kandaki lipid seviyesini (LDL, VLDL, trigliseritler vb.) düşürdüğü (Bordia, ve ark., 1997; Alarcon-Aguilaria ve ark., 1998), yapısında bulunan 4-hidroxyisoleucine etkisile insülün salgılanmasını arttırdığı (Sauvaire ve ark., 1998), kanda lipid peroksidasyon oluşumunu engellediği ve antioksidanların miktarını arttırdığı (Ravikumar ve Anuradha, 1999) yapılan deneyler sonucu gösterilmiştir.

Sonuç olarak kullanılan antioksidanların genel anlamda peroksidasyon ürünü olan MDA oluşumunu engellediği ve bir antioksidan olan GSH miktarını koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca retinada apoptozis göstergesi olan kaspaz 3 aktivitesinin iskemi-reperfüzyon grubunda yüksek, kontrol ve genel olarak antioksidan uygulanan gruplarda düşük seviyede görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, kullanılan antioksidanların klinik amaçlı olarak herhangi bir nedenle gözde oluşan serbest radikallere karşı koruyucu özelliğe sahip olabilecekleri görüşünü ortaya çıkarmıştır.

Çalışmada kullandığımız metodun retina gibi küçük doku parçalarında 3 ayrı analizin yapılması için oldukça kullanışlı olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

ABDEL-BARRY, J.A., ABDEL-HASSAN, I.A., and AL-HAKIEM, M.H., 1997. Hypoglycaemic and Antihyperglycaemic Effects of *Trigonella foenum-graecum L.* Leaf in Normal and Alloxan Induced Diabetic Rats. J Ethnophar, 58: 126-129.

AFFORD, S., RANDHAWA, and DEMYSTIFIED, S., 2000. Apoptosis. Mol Pathol 53(2): 55-63.

AKIN, C., 2001. http://med.ege.edu.tr/~ophthal/anatomi.html.

AKKUŞ, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Patolojik Etkileri. Konya Mimoza Yayınları, 157s.

AL-HABORI, M., and RAMAN, A., 1998. Antidiabetic and Hypocholesterolamic Affects of Fenugreek. Phytother. Res, 12: 233-242.

AL-HABORI, M., and RAMAN, A., 1998. Antidiabetic and Hypocholesterolamic Affects of Fenugreek. Phytother Res, 12: 233-242.

ALI, L., AZADKHAN, A.K., HASSAN, Z., and MOSIHUZZAM, M., 1995. Charecterization of Hypoglycemic Effects of *Trigonella foenum-graecum* Seed. Planta Med., 61: 358-360.

ALP, H., ve MOLVALILAR, S., 1987. Endokrin Hastalıklar. Bayda Basım Yayın, 220s.

ALTWICKER, E.R., 1967. The Chemistry of Satable Fenoxy Radicals, Chem.Rev., 67 (5): 475-531.

ANONYMOUS, 1999. Monograph: Gymnema slyvestre. Alternative Med Rev, 4:46-47.

APAYDIN, C., 2001. Temel Göz Hastalıkları, Editörler: Apaydın, C., Akova, Y. Güneş Kitabevi, 25s.

ARINCI, K., ve ELHAN, A., 1997. Anatomi. Gümüş Kitabevi, 20s.

AYBEY, B., TUFAN, H., ve ERGENEKON, G., 1996. Serbest Radikaller. Türkderm, 30: 116-122.

AYDEMİR, O., ve ÇELEBİ, S., 2002. Deneysel retinal iskemi ve reperfüzyon oluşturulan kobaylarda vitamin E türevlerinin glutatyon düzeyine etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 16(3-4): 257-261.

BAKIROV, M.A., İSMAİLOVA, ve R.S., ŞÜKÜROV, Y.H., 1983., KASUMOV, V.T., İpek Böcekleri veretiminin artırılması aracı, Patent USSR, No.1069745.

BANIN, E., BERNSHTEIN, E., KITROSSKY, N., PE'ER, J., and CHEVION, M., 2000. Gallium-desferrioxamine protects the cat retina against injury after ischemia and reperfusion. Free Radical Biol. Med. 28: 315-323.

BARRY, M.C., and GRACE, P.A., 1997. Ischemia-reperfusion injury. Surgery, 11: 68-72.

BARRY, M.C., and GRACE, P, A., 1997. Ischemia-Reperfusion Injury. Surgery, 11: 68-72.

BASAGA, H.S., 1990. Biochemical aspects of free radicals. Biochem Cell Biol., 68(7-8): 989-998.

BAYKAL, Y., GÖK, F., ve EREKÇİ, S., 2002. Demir, Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar. Sendrom, s.94-100.

BAYKAL, Y., ve KOCABALKAN, F., 2000. Serbest radikaller ve hücre hasarı yapma mekanizmaları. Sendrom, s.31-38.

BENGİSU, Ü. 1998. Göz Hastalıkları, 5. Baskı. Beta Basım Yayın Dağıtım A.Ş. 561s.

BERMAN, E.R., 1991. Biochemistry of the eye. Plenum Press, New York.

BLOCK, F., and SCHWARZ, M., 1997. Effect of antioxidant on ischemic retinal dysfunction. Exp. Eye Res. 64: 559-564.

BONNE, C., MULLER, VILLAIN, M., 1998. Free radicals in retinal ischemia. Gen. Pharcol. 30: 275-280.

BORDIA, A., VERMA, S.K., and SRIVASTAVA, K.C., 1997. Effect of ginger (Zingiber Officinale Rosc.) and Fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) on blood lipids and platellet agregation in patients with coronary artery disease. Prostaglandins leukot essent faty acids. 56: 379-384.

BORUTAITE, V., JEKABSONE, A., MORKUNIENE, and R., BROWN, G.C., 2003. Inhibition of mitocondrial permeability transition prevents mitocondrial dysfonction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. J. Mol. Cell Cardiol. 35: 357-366.

BOSCIA, F., GRATTAGLIANO, I., VENDEMIALE, G., MICELLI- FERRARI, T., and ALTOMARE, E., 2000. Protein oxidation and lens opacity in humans. Invest. Opht.& Vis. Sci. 41: 2461-2465.

BOZKURT, N., 1997. Tavşan retinasının İskemi Reperfüzyon hasarından süperoksit dismutaz ve katalaz ile koruması. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 54s.

BRUCKDORFER, K.R., 1987. Lipids and Cancer. Procx. Roy. Soc. Med. 80: 713-714.

BURRI, B.J., and CLIFFORD, A.J., 2004. Carotenoid and Retinoid Metabolism: Insight From Isotopes Studies. Arch. Biochem. Biophys.

CAI, J., YANG, J., and JONES, D.P., 1998. Mitokondrial kontrol of apoptosis.: the role of cytochrome c. Biochimica et Biophysica Acta. 1366: 139-149.

CAPRIOLI, J., KITANO, S., and MORGAN, J.E., 1996. Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37: 2376-2381.

CHAN, P.H., 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke 27: 1124-1129.

CHIDLOW, G., SCHMIDT, K.G., WOOD, J.P., MELENA, J., and OSBORNE, N.N., 2002. Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. Neuropharmacology 43: 1015-1025.

CHOPRA, M., WILSON, R., THURNHAM, D.I., 1993. Free Radical Scavenging ağabeylity of Lutein in Vitro. Ann Acad Sci, New York. p61.

COSTAGLIOLA, C., LULONA, G., MENZIONA, A., NESTI, A., SIMONELLI, F., and RINOLDI, E., 1998. Systematic human disease as oxidative risk factor in cataractogenesis. Ophtalmic Res. 20: 308-316.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., and ROBINS, S.L., 1989. Cellular injury and adaptasion In: robins pathologic basis of desease. WB Saundes Company, p38.

ÇELEBİ, S., DİLSİZ, N., YILMAZ, T., ve KUKNER, A.S., 2002. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia- reperfusion in the guinea pig retina. Eur J. Ophthalmol, 12(2): 77-83.

ÇELİK, S. ve YILMAZ, O., 1999. Diabetik Ratlarda Vitamin E'nin Serum Lipidleri ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi. TÜBİTAK. 23: 39-46.

DANE, P.B.K., 1999. İntrauterin gelişme geriliği olan bebeklerin plasentalarında programlı hücre ölümü (Apoptozis). Uzmanlık tezi. İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Kadın Hast.ve Doğum A.B.D. İstanbul.

DAVALOS, A., CASTİLLO, J., SERENA, J., NOYA, M., 1997. Duration of glutamate relase after acute ischemic stroke. Stroke. 28: 708-710.

DAVID, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol.1. Edinburg University pres, Edinburg. p417.

DREJER, J., BENVENİSTE, H., DIEMER, N.H., SCHOUSBOE, A., 1985. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue *in vivo* and *in vitro*. J. Neurochem. 45; 145-151.

DURAK, İ., YURTASİAN, Z., CANBOLAT, O., ve AKYOL, Ö.A., 1993.Methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium reduction Clin. Chim.Acta., 214: 103-104.

EEFTING, F., RENSING, B., WIGMAN, J., PANNEKOEK, W.J., LIU, W.M., CRAMER, M.J., LIPS, D.J., and DOEVENDANS, P.A., 2004. Role of apoptosis in reperfusion injury. Cardiovascular Research 61: 414-426.

EKİN, İ., 2002. Çeşitli antioksidanların kobaylarda oluşturulan retinal iskemi-reperfüzyon üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Elazığ, 42s.

EMRE, İ., 2002. Senil kataraktlı lens ve ön kamara sıvısında meydana gelen değişimlerin moleküler biyolojisi. Yüksek Lisans Tezi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Elazığ, 42s.

ERDEM, M., 2001. Deneysel akut pakreatitte apoptozis ve octreotidin apoptosis üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi. Cumhuriyet Üniv. Tıp fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı,. Sivas.

ERDEN, M., 1992. Serbest Radikaller. Temel Klinik Tıp Bilimleri, 12: 201-206.

ETTAICHE, M., HEURTEAUX, C., BLODEAU, N., BORSOTTO, M., TINEL, N., and LAZDUNSKI, M., 2001. ATP-sensitive potassium channel in retina: a key role for delate ischemic tolerance. Brain Res. 890: 118-129.

FACCHINETTI, F., DAWSON, V.L., and DAWSON, T.M., 1998. Free radicals as mediators of neuronal injury. Cell. Mol. Neurobiol., Böl.:18, 687s.

FERRI, K.F., KROEMER, G.,2001. Mitochondria-the suicide organelles. BioEssays. 23:111-115.

FOIGT, I., 1972. Polimerlerin ısı ve ışının etkisine karşı kararlığı. Khimiya, Leningrad, USSR, 540p.

FREEMAN, B.A. and CRAPO, J.D., 1982. Biology of disease free radical and tissue injury. Lab Invest; 47: 26-412.

FREI, B., 1994. Natural Antioxidants in Human Health and Disease. Academic Press. Seven, A. ve Candan, G., 1996. Antioksidan savunma sistemleri. Cerrahpaşa Med., 27: 41-51.

FULBERT, J.C., SUCCARI, M., and CALS, M.J., 1992. Serni- automated assay of erythrocyte Cu-Zn Superoxide dismutase activity. Clin. Biochem., 25: 115-119.

GASSEN, M., and YOIDIM, M.B., 1999. Free radical scavengers: Chemical concept and clinical relevance. J Neural Trans, p193-210.

GASTMAN, B.R., Apoptosis and its clinical impact. Head Neck. 23: 409-25.
GEHLBACH, P., and PURPLE, R.L., 1994. Enhancement of retinal recovery by conjugated deferoxamine after ischemia-reperfusion. Invest. Ophthalmol .Vis.Sci. 35: 669-676.
GILGUN, S.Y., ROSENBAUM, Z., MELAMED, E., and OFFEN, D., 2002. Antioxidant therapy in acute central nervous systeminjury: current state. Pharmacol. Rev. 54: 271-284.
GOBE, G., ZHANG, X.J., and CUTTLE, L., 1999. Bcl-2 genes and growth factors in the pathology of ischemic acute renal failure. Immunol Cell Biol 77(3): 279-86.
GRATTAGLIANO, I., VENDEMIALE, G., and BOSCIA, F., 1998. Free Radical Biology and Medicine. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients, pp.369-372.
GRUTTER, M.G.,2000. Caspases: key players in programmed cell death. Current Opinion in Structural Biology. 10: 649-655.
GUPTA, L.Y., and MARMOR, M.F., 1993. Mannitol, Dextromethorphan, and catalase minimize ischemic damage to retinal pigment epithelium and retina. Arch Ophthalmol 111: 384-388.
GURR, M.I., and HARWOOD, J.L., 1991. Lipid Biochemistry an introduction. London: Chapman & Hal, p: 406.
GUTTERIDGE, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem; 41: 1819-1828.
GUYTON, A.C., and HALL, J.E., 2001. Tıbbi Fiyoloji. 10. Baskı. Editör: Çavuşoğlu, H., Nobel Tıp Kitabevi. 50: 578-588.
HAGBERG, H., LEHMANN, A., SANDERG, M., NYSTROM, B., JACOBSON, I., and HAMBERGER, A., 1985. Ischemia-induced shift of inhibitory and exitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. J. Cereb. Blood Flow Metab. 5: 413-419.
HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, JMC,1989: Free radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Pres; pp.177-178.
HALLIWELL, B., 1996. Oksidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant in take in humans. Free Radical Res. 25: 57-74.
HALLIWELL, B., 1991. Reactive Oxigen Species in Living System: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. The Am. J. Med. 91: 145-215.
HALLIWELL, B., and ARUOMA, O.I., 1999. DNA Damage by Oxigen-Derived Species. Its Mechanisms of of Action and Measurements in Mammalian System. FEBS Lettu. 281: 9-19.
HARDING, J.J., 1991. Cataract: Biochemistry, Epidemiology and Pharmacology. Chapman and Hall, London.
HARDING, J.J., 1997. Biochemistry of the eye. Chapman & Hall Medical, London.
HARRIS, A. BINGMAN, D.P.,CIULLA, T.A., and MARTIN, B.J., 1997. Retinal and Choroidal blood Flow in Health and Desease. Basic Science, inherited retinal disease, and tumors. p. 89.
HART, W.M., 1992. Physiology of the eye. Mosby Year Book. USA. p348.
HATTON, 2001. J. Pharmacological treatment of traumatic brain injury: A rewiew of agents in Development CNS Drugs, 15(7): 553-81.

HATUNGİL, R., 2002. Serbest radikallerin yol açtığı doku hasarları. Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi. 3: 460-469.

HAYASHI, D., and SHIMIZU, T., 1982. Metabolic and functional significance of prostaglandins in lipid peroxide research. In lipid peroxides and Medicine (Yagi K. Ed) New York Academic Pres, pp. 41-53.

HAYREH. S.S., and WEINGEIST, T.A., 1980. Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: retinal tolerance time to acute ischemia. Br. J. Ophthalmol. 64: 818-825.

HONIG, S.L., and ROSENBERG, R.N., 2000. Apoptosis and neurologic disease.The American J. of Medicine.180:317-330.

http://cas.bellarmine.edu

http://w3.balikesir.edu.tr/~osinan/tez.html

http://www. sgmhs.ac.uk/depts/immunology/rudsh/apoptosis/intro.html

http://www.tagem.gov.tr/YAYINLAR/kitappamuk/topalak.htm.

ISHIHARA, M., and NACANO, T., 2000. Postischemic reperfusion in the eye of young anda aged rats. Jpn J Physiol, 50; 125-132.

İŞLEKEL, H., İŞLEKEL, S., ve GÜNER, G., 2000. Biochemical Mechanism and Tissue Injury of Cerebral Ischemia and Reperfusion. J Nuero Sci, 17: 45-49.

JACOB, R.A., and BURR, B.J., 1996. Oxidative damage and defence. Am J Clin Nutr; 63: 985-990.

JENNINGS, R.B., SOMMERS, H.M., SMYTH, G.A., FLACK, H.A., and LINN, H., 1960. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. Arch. Pathol. 70: 68-78.

JO, C., and AHN, D.U., 1998. Fluoremetric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in Turkey. Poultry, 77: 475-480.

JOHNSON, N., 1977. Retinal glycogen content during ischemia. Albrecht. Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol. 283: 271-282.

JUNGUEIRA, L.C., 1998. Temel Histoloji. Barış kitapçılık, 503s, İstanbul.

KANNAN, K., and JAIN, S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology. 7:153-163.

KAREL, F., 2001.Temel Göz Hastalıkları, Editörler: Aydın, P., Akova, Y. Güneş Kitabevi. Böl.: 9, 204s.

KASKEL, D., HOCKWIN, O., METZLER, U., SCHEDTLER, C.-M., 1973. Glycogen content in the rabbit retina in relation to blood circulation. Ophthalmol. Res. 5: 177-185.

KASUMOV, V. T., 2001 "Synthesis, Spectroscopic Characterization and ESR Studies on Electron Transfer Reactions of Bis[N-(2,6-Di-*Tert*-Butyl-1-Hydroxyphenyl)Salicylaldiminato]Cu(II) Complexes With PbO_2 And PPh_3" Spectrochimica Acta Part A, 57: 1649-1662.

KASUMOV, V.T., 1980. Aliev B. S. , Medjidov A.A. ve Canibekov N. "Sterik engelli fenoller içeren metallerin şelat bileşiklerinin polipropilen stabilizatoru," Patent SSCB, No. 755786.

KILIÇALP, A.Ş., 1996. Multipl Myelom ve Reaktif Plazmasitozda Patogenez ve Prognostic Bulgular. Uzmanlık tezi. Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak. Patoloji A.B.D.İzmir.

KILINÇ, K., ve KILINÇ, A., 2002. Oksijenin Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacetepe Tıp Dergisi, 33: 100-118.

KIRHGESSNER, M., HARTMANN, S., and EDER, K., 1995. The effect of selenium deficiency on the fatty acid composition of various tissues and the osmotic fragility of erythrocytes in the growing pig. J. Ann. Physiol. Ann Nutr. 73: 76-85.

KÖSE, K., ve DOĞAN, P., 1992. Lipid Peroksidasyonu. Erciyes Tıp Dergisi, 1: 340-350.

KRISTIAN, T., SIESJO, B.K., 1998. Calcium in cell deaths. Stroke. 29: 705-718.

KURIYAMA, H., WAKI, M., NAKAGAWA, M., and TSUDA, M., 2001. Involvement of oxygen free radicals in experimental retinal ischemia and the selective vulnerability of retinal damage. Ophthalmic Res. 33: 196-202.

KUWABARA, T., COGAN, D., 1961. Retinal glycogen. Arch. Ophthalmol. 66: 96-104.

LEAKE, 1996. Cell Cycle. Basic Sciences.Chapter 3: 26-31.

LEE, J.M., ZIPFEL, G.J., CHOI, D,W., 1999. The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. Nature 399: A7-14.

LEWDEN, O., GARCHER, C., MORALES, C., JAVOUHEY, A., ROCHETTE, L. and BRON, A.M., 1996. Changes of catalase activity after ischemia-reperfusion in rat retina. Ophthalmic. Res. 28: 331-335.

LI, B., ROTH, S., 1999. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetetive induction. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 1200-1216.

LI, B., YANG, C., ROSENBAUM, D.M., and ROTH, S., 2000. Signal transduction mechanisims involvet in ischemic preconditioning in the rat retina *in vivo.* Exp. Eye Res. 70: 755-765.

LIN, J., and ROTH, S., 1999. Ischemic preconditioning attenuates hypoperfusion after retinal ischemia in rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 2925-2931.

LIPTON, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. Physiol. Rev. 79: 1431-1568.

LOWE, S.W., and LIN, A.W., 2000. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 21(3): 485-495.

MARMOR, N.F., and DALAL, R., 1993. Irregular retinal and RPE damage after pressure-induced ischemia rabbit. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34: 2570-2575.

MARTIMBEAU, S., and TILLY, J., 1997. Physiological cell death in endocrine dependent tissues: an ovarian perspective. Clin. Endocrinol. 46: 241-254.

MATES, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology, 153: 83-104.

MATSUBARA, A., TOMIDA,K., MATSUDA, Y., and et al., 2000. Protective effect of selectin ligands/inhibitor (SKK 60060) against retinal ischemia-repurfuzyon injury. Academic pres. Exp. Eye Res. 71: 283-293.

MATSUO, Y., KIHARA, T., IKEDA, M., NINOMIYA, M., ONODERA, H., and KOGURE, K., 1995. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. J. Cereb. Blood Flow Metab. 15: 941-947.

MEISTER, A., 1983. Selective modification of glutathione metobolism, 220: 472-477.

MILLER, S.J.H., 1989. Parson's Temel Göz hastalıkları Teşhis ve Tedavi. Editör: Özçetin, H., Atlas Tıp Kitapçılık Tic. Ltd. Şti. Yayınları, Böl.:1, s.3-15.

MOUNTZ, J.D., and ZHOU, T., 2001. Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams &Wilkins.

MULLER, A., PIETRI, S., VILLAIN, M., FREJAVILLE, C.,BONNE, C., and CULCAS, M., 1997. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. Exp. Eye Res. 64: 637-643.

MURRY, C.E., JENNINGS, R.B., and REIMER, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 74: 1124-1136.

NAKANO, R., 1997. Apoptosis: Gene-Directed Cell Death. Horm. Res. 48: 2-4.

NAYAK, M.S., KITA, M., and MARMOR, M.F., 1993. Protection of Rabbit Retina from Ischemic Injury by Superoxide Dismutase and Catalase. Invest Ophtholmol Vis Sci, 34: 2018-2022.

NIELSIN, J.C., NAASH, M.I., and ANDERSON, R.E., 1987. The Regional Distribition of Vitamin E and C in Mature and Prematüre Human Retinas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 29: 22-26.

NISHIZAWA, Y., 2001. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. Life Sci. 69: 369-381.

OBROSOVA, I.G., and STEVENS, M., 1998. Effect of dietary taurine suplementation on GSH and NAD(P)-redoks status lipid peroxidation, and energy metabolism in diabetic precataractous lens. Invest Opht Vis Sci, 40: 680-688.

OLMEDILLA, B., GRANADO, F., BLANCO, I., and VAGUERO, M., 2003. Lutein, but not α- tocopherol, Suplementation Improves Visual Function in Patients With Age Related Catarcts: Double Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. Nutrition, 19: 21-24.

OPHIR, A., BERENSTEIN, E., KITROSSKY, N., BERMAN, E.R., PHOTIOU, S., ROTHMAN, Z., and CHEVION, M., 2003. Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. Exp. Eye Res. 57: 351-357.

OPHİR, A., BERENSHTEİN, E., KITROSSKY, N., and AVERBUKH, E., 1994. Protection of the transiently ischemic cat retina by zinc-desferriooxamine . Invest. Ophthalmol. Ophthalmol. Vis. Sci. 35: 1212-1222.

OSBORNE, N.N., and LARSEN, A.K., 1996. Antigens associated with spesific retinal cells are effected by ischemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamat antagonists. Neurochem. Int. 29: 263-270.

OSBORNE, N.N., CASSON, R.J., WOOD, J.P.M., CHIDLOW, G., GRAHAM, M., and MELENA, J., 2004.Retinal ischemia: mechanism of damage and potantial therapeutic strategies. Prog.in Retinal and Eye Research 23: 91-147.

OSBORNE, N.N., SCHWARZ, M., and PERGANDE, G., 1996. Protection of rabbit retina from ischemic injury by flupirtine. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37: 274-280.

OVALI, T., 2001. Temel Göz Hastalıkları, Editörler: Aydın, P., Akova, Y. Güneş Kitabevi. Böl.: 3, 51s.

ÖZALPAN, A., 2001. Radyobiyoloji. Haliç Üniversitesi Yayınları: İstanbul, 35s.

PAOLISSO, G., and GIUGLIANO, D., 1996. Oxidative stres and insülin action: Is there a relationship? Diabetologia, 39: 357-363.

PEACHEY, N.S., GREEN, D.J., and RIPPS, H., 1993. Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34: 58-65.

PELLEGRINI GIAMPIETRO, D.E, CHERICI, G., ALESIANI, M., CARLA, V., and MORONI, F., 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia –induced neuronal damage. J. Neurosci. 10: 1035-1041.

POITRY YAMATE, C.L., POITRY, S., and TSACOPOULOS, M., 1995. Lactate release by muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. J. Neurosci. 15: 5179-5191.

POITRY, S., POITRY YAMATE, C., UEBERFELD, J., MACLEISH, P.R., and TSACOPOULOS, M., 2000. Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial cells. J. Neurosci. 20: 1809-1821.

POLE, R.J., QI, B.Q., and BEASLEY, S.W. 2002. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. J Urol 167(1):269-71.

POLI, G., ALBANO, E., and DIANZANI, M.U., 1993. Free Radicals: From Basic Sicence to Medicine. Birkhauser, Basel (Switzerland), p.47.

PRACTIDO, D., PASIN, M., and BARRY, O.P., 1999. Irion dependet human platelet activation and hydroxil radikal formation: involvement of protein. Circulation, 99: 3118-24.

PRINCE, J.H., 1964. The rabbit in eye resource. C. C. Thomas, Springfield, IL.

RAVIKUMAR, P., and ANURADHA, C.V., 1999. Effect of Fenugreek Seeds on Blood Lipid Peroxidation and Antioxidants in Diabetic Rats. Phytother Res, 13; 197-201.

RAVIKUMAR, P., and ANURADHA, C.V., 1999. Effects of Fenugreek Seeds on Blood Lipid Peroxidation and Antioxidants in Diabetic Rats. Phytother. Res, 13: 197-201.

READY, V.N. 1990. Glutathione and its function in the lens an overview. Exp. Eye Res., 50: 771-778.

REME, C.E., GRIMM, C., HAFEZI, F., MARTI, A., and WENZEL, A., 1998. Apoptotic Cell Death in Retinal Degenerations. Progress in Retinal and Eye Research. 17: 443-464.

RIOS, L., CLUZEL, J., VENNAT, J.C., MENERATH, J.M., and DOLLY, M., 1999. Comparison of intraocular treatment of DMTU and SOD following retinal ischemia in rats. J. Ocul. Pharmacol.Ther. 15: 547-556.

ROBINS, S.L., and KUMAR, V., 1999. Cell injury and cell death. Pathologic Basisi of Disease. Chapter 1; 18-25.

ROBINSON, J., and BADWEY, J., 1998. The NSDPH oxidase complex of phagocytic leukocytes: Biochemical and cytochemical view. Histochem., 103:163-180.

RODENBURG, R.J.T., RAATS, J.M.H., PRUIJN, G.J.M., and VENROOIJ, W.J., 2000. Cell death: a triger of autoimmunity? Bioessays 22: 627-36.

ROTH, S., PARK, S.S., SIKORSKI, C.W., OSINSKI, J., CHAN, R., LOOMIS, K., 1997. Concentrations of adenosine and its metabolites in the rat

retina/choroid during reperfosion after ischemia. Curr. Eye Res. 16: 875-885.

SAKAMOTO, K., KUWAGATA, M., NAKAHARA, T., and ISHII, K., 2001. Late preconditioning in rat retina: involvoment in adenosine and ATP sensitive K channel. Eur. J. Pharmacol. 418: 89-93.

SALIM, A.S., 1993. The permissive role of oxigen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat. A new theory for carcinogenesis. Int. J. Cancer. 53: 1031-1035.

SAUVAIRE, Y., PETIT, B., BARCO, C., MANTEGHETTI, M., and et al., 1998. 4-Hydoxyisoleucine: A novel amino asid potentiator of insulin secretion. Diabetes. 27: 41-51.

SAVILL, J., 1998. Apoptosis: Phatocytic docking without shocking. Nature. 392: 442-443.

SCHMİDT, M., GIESSEL, A., LAUFS, T., HANKELN, T., WOLFRUM, U., and BURMESTER, T., 2003. How deos the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. J. Biol. Chem. 278: 1932-1935.

SEARLE, J., and KERR, J.F.R., 1982. Necrosis and apoptosis. Bishop. CJ. Pathology Annual, 17: 229-59.

SERİN, E., YILMAZ, E., YILMAZ, S., ÜNSALDI, E., ve DURMUŞ, AS., 1998. İskemi-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri. Artroplasti Artroskopik Cerrahi. 9: 36-39.

SEVEN, A., ve CANDAN, G., 1996. Antioksidan savunma sistemleri. Cerrahpaşa Med. 27: 41-50.

SHIBUKI, H., KATAI, N., YODOI, J., UCHIDA, K., YOSHIMURA, N., 2000. Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.41: 3607-3614.

SIMONELLI, F., NESTI, A., and PENSA, M., 1989. Lipid peroxidation and human cataractogenesis and severe myopia-exp. Exe Res. s181-187

STENNICKE, H.R. and SALVESEN, G.S., 1998. Properties of caspases. Biochimica et Biophysica Acta. 1387: 17-31.

STRINGER, M.D., GOROG, P.G., FREEMAN, A., and KASKAR, V.V., 1989. Lipid peroxides and atherosclerosis. BMJ; 298: 281-284.

SZABO, M.E., DROY LEFAIX, M.T., DOLY, M., CARRE, C., BRAQUET, P., 1991. Ischemia and reperfusion induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical mediated mechanism Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:1471-1478.

TAMER, L., POLAT, G., ESKANDARİ, G., ERCAN, B., ve ATİK, U., 2000. Serbest radikaller. Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi, 1: 52-58.

THOMPSON, C.B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 267: 1456-1462.

THUMAN, G., and HINTON, D.R., 1997. Cell Biology of the retinal pigment Epithelium. Basic Science, inherited retinal disease and tumors. pp.104-112.

THURNHAM, D.I., 1994. Carotenids: Function and Fallacies. Poc Nutr soc, 53: 77-87.

TOSUN, H., ve DEMİR, S., 1999. Serbest radikallerin ve antioksidanların yaşlanmadaki rolü. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Öğrenci Bülteni. s.12-22.

TSACOPOULOS, M., POITRY YAMATE, C.L., MACLEISH, P.R., and POITRY, S., 1997. Tracficking of molecules and metabolic signals in the retina. Prog. Retin. Eye Res. 17: 429-442.

TSUJIKAWA, A., OGURA,Y., HIROSHIBA,N., MIYAMOTA, K., KIRYU, J., TOJO, S.J., MIYASAKA, M., and HONDA, Y., 1999. Retinal ischemia –reperfusion injury attenuated by blocking of adhesion molecules of vascular endothelium. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 1183-1190.

UGARTE,M., and OSBORNE, N.N., 2001. Zinc in the retina. Prog. Neurobil. 64: 219-249.

ULUKAYA, E., 2003. Apoptozis ders notları.

UYSAL, M., 1998. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim, 11: 336-341.

ÜÇKUYU, A., 2000. Menapozun ve hormon replasman tedavisinin endometriumda estrojen ve progesterone reseptörleri ile bcl-2 ve c-myc proto-onkogen proteinlerine etkilerinin immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi. Ankara Üniv. Tıp Fak. Kadın Hast. A.B.D. Ankara.

ÜNAL, D., 1999. Serbest Radikaller. Sendrom , 11(3): 68-80.

VERIAC, S., TISSIE, G., and BONNE, C., 1993. Oxygen free radicals adversely affect the regulation of vascular tone by nitric oxide in the rabbit retina under high intraocular pressure. Exp. Eye Res. 56: 85-88.

VILLA, P., KAUFMANN, S.C., EARNSHAW, W.C. 1997. Caspases and Caspase inhibitors. TIBS.22.

VURAL, F., 1997. Anatomi Atlası. Birol Yayınları, 260, İstanbul.

WASILEWA, P., HOCKWİN, O., and KORTE, I., 1976. Glycogen concentration changes in retina, vireous boy and other eye tissues caused by disturbances of blood circulation. Albrecht. Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol. 199: 115-120.

WEISS, H., 1972. The carbohydrate reserve in the vitreous body and retina of the rabbit's eye during and after pressure ischaemia and insulin hypoglycaemia. Ophthalmol. Res. 1: 360-371.

WILLINGHAM, M.C., 1999. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. The Journal of Histochemistry&Cytochemistry. 47(9):1101-1109.

WOLFF SP., 1993. Diabetes mellitus and free radicals. Br. Med. Bulletin., 49(3): 642-652.

WYLLIE, A.H., and Duvall, E., 1992. Cell death. In: McGee JO'D, Issacson PG, Wright N, eds.Oxford Textbook of Pathology, vol 1. USA, Oxford University Press. 142-147.

YALÇIN, AS., 1998. Antioksidanlar. Klinik Gelişim, 11: 409-411.

YAMAMOTO, F., HIROI, K., HONDA, Y., 1994. Effects of intravenous superoxide dismutase and catalase on electroretinogram in the cat postischemic retina. Ophthalmic. Res. 26: 163-168.

YILDIRIM, M., 1996. İnsan Anatomisi. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., s. 252-256.

YILDIZ, Z., 2004. Deneysel iskemi-reperfüzyon oluşturulmuş sıçan retinasında çeşitli antioksidanların koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

YONEDA, S., TANIHARA, H., KIDO, N., HONDA, Y., GOTO, W., HARA, H., and MIYAWAKI, N., 2001. Interleukin-1 beta mediates ischemic injury in the rat retina. Exp. Eye Res. 73: 661-667.

YOON, Y.H., MARMOR, M.F., 1989. Dextromethorphan protects retina against ischemic injury *in vivo.* Arch. Ophthalmol. 107: 409-411.

YU, B.P., 1994. Cellular defences against damage from reactive species. Physiol Rev., 74: 139-162.

ZELENKA, S., 1984. Lens lipids. Current Eye Research. 311: 1337-1359.

ZHANG, C., ROSENBAUM, D.M., SHAIKH, A.R., LI, Q., ROSENBAUM, P.S., PELHAM, D.J., and ROTH, S., 2002. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43: 3059-3066.

ZHANG, H., AGARD, C.D., and AGARD, E., 1995. Increased catalase levels and hypoxanthine- enhanced nitro-blue tetrazolium staining in rat retina after ischemia followed by recirculation. Curr. Eye Res. 14: 47-54.

ZHU, Y., OHLEMILLER, K.K., MCMAHAN, B.K., and GIDDAY, J.M., 2002. Mouse models of retinal ischemic tolerance. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43: 1903-1911.

ÖZGEÇMİŞ

Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimimi Adana'da tamamladı. 1997 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2001 yılı bahar döneminde Biyoloji lisansımı tamamlayarak 2001 güz döneminde Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde yüksek lisansa başladı. 2003 yılı bahar döneminde Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümüne yatay geçiş yaptı. 2004 yılı bahar döneminde Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde araştırma görevlisi olarak göreve başladı.

ÖZET

Retinal iskemi, görme kaybına ve körlüğe neden olan bir etkendir. Glukoz/ oksijen ve glutamat eksikliği nedeniyle oluşan serbest radikaller, retinal iskemideki hasarın önemli bir nedenidir.

İskemi-reperfüzyon, serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyon oluşumu ve nöronal hasara neden olmaktadır. Oksijenden kaynaklanan serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri hücrede, protein yapısının bozulmasına, lipid peroksidasyonuna ve nükleik asitlerin parçalanmasına neden olur. Hücreler, serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı, çeşitli enzimleri (katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz) ve çeşitli bileşikleri (askorbat, ürik asit, α-tokoferol, glutatyon) kullanarak doğal savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Rektif oksijen türevlerinin hücre için hem faydalı hem zararlı etkileri vardır. Çok düşük konsantrasyonda, bazı sinyal olaylarında ikinci mesajcı gibi hareket ederler. Bunula beraber, ortamda aşırı derecede fazla bulunduklarında, hücrenin birçok hayati organellerinin oksidatif hasara uğramasına neden olabilirler. Reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikaller apoptozis oluşumunda önemli rolleri vardır.

Bu çalışma, çeşitli antioksidanların, sıçan retinasında iskemi-reperfüzyon (İ-R) sırasında oluşan serbest oksijen radikallerine karşı muhtemel rolünü göstermektedir. Hayvanlar rast gele seçilerek altı gruba ayrıldı. Bunlar 1. grup (kontrol), 2. grup (İ-R), 3. grup (İ-R + *Trigonella foenum-graecum*), 4. grup ((İ-R+ *Cyperus rotundus*), 5. grup (*Thymus longicaulis*), 6. grup (*Fumaria asepala* Boiss.), 7. grup (Lutein) ve 8. grup (Salisilaldimin) olarak adlandırıldı. Deneyde sıçanların sağ gözleri iskemi-reperfüzyon için kullanıldı. 3, 4, 5 ve 6. gruplara iskemi başlamadan 6 saat öncesinden ve reperfüzyonda altışar saat aralıklarla *Trigonella, Cyperus, Thymus, Fumaria* ekstraktı, lutein ve salisilaldimin verildi. 24 saatlik reperfüzyondan sonra hayvanlar kesildi. Daha sonra retinalar, malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) ölçümü için izole edildi. Bu deney sonucunda, tüm grupların lipid peroksidasyonunu, iskemi grubuna göre koruduğu saptanırken, salisilaldimin (2.92 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) grubunun MDA değeri kontrol (2.82 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) grubuna en yakın değere sahip olduğu görüldü. Buna göre, salisilaldiminin (2.92 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı)

Luteinden (3.55 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), Luteinin, *Fumaria*' dan (4.95 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), *Fumaria'*nın Cyperus'tan (5.59 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), *Cyperus'un Thymus'tan* (9.16nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), *Thymus*'un *Trigonella*'dan (10.46 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) daha iyi koruma sağladığı görülmüştür. GSH miktarları değerlendirildiğinde kontrol grubuna (2.3 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) en yakın değerin *Fumaria* grubunda (2.2 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) olduğu görülmüştür. Buna göre *Fumaria* grubundaki GSH miktarı (2.2 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) salisilaldiminden (2.1 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), salisilaldiminin *Trigonella* ve *Cyperus*'tan'dan (1.9 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı), *Trigonella ve Cyperus'un* Luteinden (1.8 nmol/100 mg retina doku yaş ağırlığı) daha yüksek olarak bulunmuştur. Sonuç olarak kullanılan antioksidanların peroksidasyon ürünü olan MDA oluşumunu engellediği ve bir antioksidan olan GSH miktarını koruduğu tespit edilmiştir.

Buna ilave olarak iskemi-reperfüzyon sonucunda oluşan apoptozisden birinci derecede sorumlu kaspaz-3 proteini SDS-PAGE ve immünoblot teknikleri ile incelenmiştir. İmmunoblot sonuçları Fluor-S-Multi-Imager ile taranarak gruplar arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, kullanılan antioksidanların özellikle de salisilaldiminin gözde oluşan I/R hasarlarına karşı klinik amaçlı kullanılabileceği kanaati ortaya çıkmaktadır.

SUMMARY

Retinal ischemia is a common cause of visual impairmant and blindness. Many cascades generated by glutamate and glucose/ oxygen deprivation result in the formation of free radicals and it has been proposed that free radicals are impotant mediators in demage caused by retinal ischemia.

Ischemia-reperfusion induced free radical formation, lipid peroxidation and neuronal injury. Oxygen free radicals and other reactive oxygen species can react detrimentally with most macromolecular consistuents of the cell and lead to protein modification, lipid peroxidation and nucleic acid breakdown. It is for this reason that cells have devoloped natural antioxidant defence mechanisms, which include the use of enzymes (catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase) and other compounds (ascorbate, uric acid, α-tocopherol, glutathione). Reactive oxygen species has been shown to play both beneficial as well as deleterious roles. At very low concentration , it may act as a second messenger in some of the signal transduction pathways. However, when produced in exess, it can cause oxidative damage to many vital components of the cells. Reactive oxygen species and other free radicals play a pivotal role in apoptosis.

This study shows the possible role of various antioxidants on free oxygen radicals which formed during ischemia-reperfusion (I-R) in rat retina. The animals, randomly selected, were divided into six groups. These were named as group 1 (control), group 2 (I-R), group 3 (I-R+ *Trigonella*), group 4 (I-R+*Cyperus*), group 5 (I-R+*Thymus*), group 6 (I-R+ *Fumaria*), group 7 (I-R + Lutein), group 8 (I-R + Salisilaldimin). In the experiment, right eyes of rats were used for ischemia-reperfusion. Group 3, 4, 5, 6, 7 and 8 received, *Trigonella, Cyperus, Thymus*, *Fumaria* extract, lutein and salisilaldimin before 6 hours of ischemia and after 6 hours of reperfusion respectively. The animals were sacrificed after 24 hours of reperfusion. Then, retina were isolated and processed for the quantification of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels. At the end of this experiment, all groups determined significiant protection aganist formation of MDA when compared to I-R group while MDA level of salisilaldimin (2.92 nmol/100 mg retina tissue wet weight) group was observed as it had the closest level to the control group. According to this, lutein (3.55 nmol/100 mg retina tissue wet weight)

provides more protection than *Fumaria* (4.95 nmol/100 mg retina tissue wet weight), *Cyperus* (5.59 nmol/100 mg retina tissue wet weight), *Thymus* (9.16 nmol/100 mg retina tissue wet weight) *Trigonella* (10.46 nmol/100 mg retina tissue wet weight).When quantity of GSH was evaluated, it was observed that lutein group (2.3 nmol/100 mg retina tissue wet weight) had the closest level to the control group. According to this result, the quantity of GSH in group *Fumaria* was found higher than salisilaldimin (2.1nmol/100 mg), *Trigonella* and *Cyperus* (1.9 nmol/100 mg retina tissue wet weight), Lutein (1.8 nmol/100 mg retina tissue wet weight) *Thymus* (1.8 nmol/100 mg retina tissue wet weight). As result antioxidants which used to experimental prevent formation of peroxidation substrat MDA and protect quantity of a antioxidant GSH.

In addition, the level of caspase -3 which is a marker of apoptotic damage occured during ischemia-reperfusion was determined by using SDS-PAGE ve immunoblot assay. The results of immunoblot assay were scanned to see the differences between groups by Fluor-S-Multi-Imager (Bio-Rad). According to these results, all tested antioxidants particularly lutein may use in patients with different types of ocular I/R injuries.