

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PRİMER KERATOKONUSLU KORNEA HÜCRELERİNDE
UV A VE UV B'NİN ETKİSİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Rukiye KIRIK

ŞUBAT 2017

Biyoloji Anabilim Dalında Rukiye KIRIK tarafından hazırlanan **PRİMER KERATOKONUSLU KORNEA HÜCRELERİNDE UV A VE UV B'NİN ETKİSİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI** adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. MUSTAFA TÜRK

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan: Doç. Dr. Nurullah ÇAĞIL

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Üye: Yar. Doç.Dr. Fatma Azize BUDAK YILDIRAN

10 / 02 / 2017

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof.Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen BilimleriEnstitüsü Müdürü

ANNEME...



ÖZET

PRİMER KERATOKONUSLU KORNEA HÜCRELERİNDE UV A VE UV B'NİN ETKİSİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

KIRIK, Rukiye

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Şubat 2017, 78 sayfa

Keratokonus, çoğunlukla gençlerde görülen sebebi henüz bulunamamış, korneanın zayıflaması ve incilmesi ile oluşan, genetik ve çevresel etkilerin ortak sebep olduğu bir göz hastalığıdır. Korneanın epitel ve stroma hücrelerinde yüksek seviyede UV ışınlarına maruzat sebebiyle oksidatif stres yoğun olarak yaşanır. Bu hücreler güçlü bir antioksidan sisteme sahiptir. Ancak keratokonus hastalığında oksidatif hasara karşı antioksidan ve tamir mekanizmalarının bozuk olduğuna dair bulgular vardır. Güneş ışınlarıdaki yüksek enerjili UV ışınları gözde ciddi etkiler oluşturur. UV-C atmosferde soğurularak yeryüzüne neredeyse hiç ulaşmaz. UV-B çoğunlukla kornea epitel ve stroma hücrelerinde, UV-A ve kalan UV-B'nin de tamamı lens tarafından soğurur.

Çalışmalarımızda öncelikle keratokonuslu kornea epitel hücreleri ve normal kornea hücrelerindeki apoptoz, nekroz oranları ve sitotoksite değerleri belirlendi. Daha sonra bu hücreler belirlenen sürelerde UV-A UV-B ışınlarına maruz bırakıldı. Apoptoz ve nekroz oranları incelendi. WST-1 (Water-Soluble Tetrazolium Salts-1) testi ile de hücre canlılığı değerleri ölçüldü.

Sonuç olarak keratokonuslu kornea epitel hücrelerinin, normal kornea epitel hücrelerine göre daha çok apoptoz nekroza uğradığı ve canlılık sonuç oranlarının daha düşük olduğu gözlendi.

Anahtar kelimeler: Keratokonus, kornea, UV-A, UV-B, apoptoz, nekroz, sitotoksisite.



ABSTRACT

İNVESTİGATİNG THE İN VİTRO EFECT OF UV A AND UV B İN PRİMER KERATOCONUS CORNEAL CELLS

KIRIK, Rukiye

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biologi, Postgraduate Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa TÜRK

February 2017, 78 pages

Keratoconus, mostly seen in young people, the reason of which has not yet been found, formed by weakening and thinning of the cornea, caused by genetic and environmental influences is an eye disease.

By the exposing of the UV lights effectively on the epithelial and stromal cells, high oxidative stress occurs. These cells have powerful degree of anti-oxidant system. However, in the keratoconus disease against oxidative damage, there are symptoms related with the destroyed antioxidant and repair mechanisms. High-energy UV radiation in sunlight has serious effects on cornea cells. UV-C is absorbed in the atmosphere and does not arrive hardly ever at the earth. UV-B is mostly absorbed in the corneal epithelium and stroma cells UV-A and the remaning UV-B is totally absorbed by the lenses.

In our study, firstly, the epithelial cells of keratoconus corneal and the normal corneal cells, the values of the apoptosis, necrosis rates and cytotoxicity were found. Then these cells were exposed with the UV-A and UV-B radiation. It has been examined whether the deterioration in the rates of apoptosis and necrosis then occurred. With WST-1 test, the values of the cell viability were measured.

Consequently, the keratoconus corneal epithelial cells by compared with normal corneal epithelial cells are effected more than apoptosis necrosis and the rates of viability results were found to be lower.

Key words: Keratoconus, corneal, UV-A, UV-B, apoptosis, necrosis, cytotoxicity.



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımcı esirgemeyen ve sabırla biz araştırmacılara büyük destek olan, bilimsel deney imkânlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarında büyük fedakarlıklarla destek olan Doç. Dr. Nurullah ÇAĞIL'a sayın Yar. Doç. Dr. Fatma Azize BUDAK YILDIRAN'a, arkadaşlarım Şükran AKDAĞ'a ve Sema TUNCER'e çok teşekkür ederim. Ayrıca, zaman zaman ihmal ettiğim eşim ve çocuklarıma da gösterdikleri sabır için teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesinde 113S906 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Gözün Anatomisi ve Fizyolojisi.....	3
1.1.1. Kornea.....	4
1.1.1.1. Epitel Tabakası.....	5
1.1.1.2. Bowman Membranı.....	6
1.1.1.3. Stroma.....	6
1.1.1.4. Dessement Membranı.....	6
1.1.1.5. Endotel.....	6
1.2. Keratokonus(KC).....	7
1.2.1. Keratokonusun Etyopatolojisi.....	8
1.2.1.1. Genetik.....	8
1.2.1.2. Ekstrasellüler Matriks Anormallikleri.....	8
1.2.1.3. Enzim Anormallikleri.....	9
1.2.1.4. Apopitoz.....	9
1.2.1.5. Sinyal İlerim Anormallikleri.....	10
1.2.1.6. Oksidatif Hasar.....	10
1.2.2. Keratokonusun Tedavisi.....	11
1.3. Serbest Radikaller.....	11
1.3.1. Radikaller Nasıl Oluşur?.....	13

1.3.2. Serbest Radikal Oluşma Yolları.....	13
1.3.3. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Oluşumu.....	15
1.3.4. Nitrozatif Stres.....	16
1.3.5. Serbest Radikallerin Hücre ve Dokularda Yol Açtığı Zararlar.....	18
1.4. Elektromanyetik Spektrum Bölgeleri.....	19
1.4.1. Ultraviyole(UV).....	20
1.4.1.1. UV-A Işını.....	21
1.4.1.2. UV-B Işını.....	21
1.4.1.3. UV-C Işını	22
1.5. Hücre Kültürü.....	23
1.5.1. Hücre Kültürünün Tarihçesi.....	23
1.5.2. Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması.....	24
1.5.2.1. Primer Hücre Kültürü.....	25
1.5.2.2. Diploid Hücre Kültürleri.....	27
1.5.2.3. Hücre Soyları.....	27
1.5.3. Hücre Kültürlerinin Yapılması.....	29
1.5.3.1. Kültürdeki Hücrelerin Gelişme Fazlası.....	29
1.5.3.1.1. Ayrılma Fazı (Dispersiyon).....	29
1.5.3.1.2. Yapışma Fazı.....	29
1.5.3.1.3. Çoğalma Fazı (Eksponansiyel).....	29
1.5.3.1.4. Dejenerasyon Fazı.....	30
1.5.4. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....	30
1.5.5. Dondurularak saklama.....	31
1.5.6. Dondurulmuş Hücrelerin Çözünmesi.....	31
1.6. Sitotoksite ve Değerlendirilmesi.....	32
1.7. Apoptoz.....	33
1.7.1. Apoptoz Ne İşe Yarar?.....	33
1.7.2. Apoptozun Morfolojisi.....	34
1.7.3. Apoptozisin Aşamaları.....	34
1.7.4. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	34

2.MATERYAL VE YÖNTEM	36
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	36
2.1.1. Hücre UV Maruzat Cihazı Geliştirilmesi.....	37
2.2. Kornea epiteli hücre örneklerinin toplanması.....	37
2.3. Kornea epiteli hücre kültürünün gerçekleştirilmesi.....	38
2.4. Hücre Sayımı	40
2.5. Kornea epitelinde hücre canlılık ve sitotoksosite testinin uygulanması.....	41
2.6. Kornea epitelinde ikili boyama metodu ile apoptoz/nekrozun tayin	42
edilmesi	42
2.6.1. İkili Boyama Stok Solüsyonunun Hazırlanması	42
2.7. UV Işıklarının Uygulanması	43
2.8. UV Uygulanmış Kornea Epitelinde Canlılık ve Apoptoz – Nekroz	
Tayini	44
2.8.1. WST1 ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	44
2.8.2. İkili Boyama İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi	44
3.ARAŞTIRMA BULGULARI	45
3.1. Kornea epitel hücrelerinin morfolojik görüntülerinin kaydedilmesi	45
3.2. Kornea Epitelinde Canlılık ve Sitotoksosite Testinin Sonuçları.....	49
3.3. İkili Boyama İle Belirlenen Apoptotik ve Nekrotik Sonuçları.....	51
3.4. Kornea Epitelyum Hücrelerinde İn Vitro Çalışmalar.....	53
3.5. UV'nin Optimal Dozlarının Ayarlanması.....	54
3.5.1. UV-B'nin Optimal Dozunun Ayarlanması.....	55
3.5.2. UV-A'nın Optimal Dozunun Ayarlanması.....	57
3.6. UV Uygulanmış Kornea Epitel Hücrelerinde Sitotoksitenin	
Belirlenmesi.....	58
3.7. UV Uygulanmış Kornea Epitelyum Hücrelerinde Apoptoz - Nekroz	
Sonuçları	61
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	64
KAYNAKLAR	67
EK-1	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİLLER

Sayfa

1.1. Gözün şematik kesiti.....	3
1.2. Korneanın tabakaları	5
1.3. Normal ve keratokonuslu kornea	8
1.4. Serbest Radikallerin Oluşumu.....	14
1.5. Elektromanyetik spektrum bölgeleri.	19
1.6. UV Çeşitlerinin Gözdeki Hasarı.....	23
1.7. Apoptotik süreç.....	35
2.1. UV Maruzat Cihazı.....	37
3.1. Keratokonus epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Corneal epithelial cell basal medium, ATCC).....	45
3.2. Normal epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Corneal cell basal medum, ATCC).....	46
3.3. Keratokonus epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Keratinocyte-SFM serum free medium).....	46
3.4. Normal epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Keratinocyte-SFM serum free medium).....	47
3.5. Keratokonus epitel hücrelerin inmorfolojik görüntüsü (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM).....	47
3.6. Keratokonus epitel hücrelerinin Tip IV kollajen modifikasyonlu yüzeyde elde edilen morfolojik görünüşleri.....	48
3.7. Keratokonus hücrelerinin atipik görüntüsü	48
3.8. Yukarıdaki Çizelge 3.3.'de verilen değerlerin görsel grafiği.....	50
3.9. Kornea epitel primer kültür hücrelerine uygulanan ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik hücre görüntüleri.....	51

3.10. Kornea epitel primer kültür hücrelerine ikili boyama yöntemiyle elde edilen nekrotik hücreler.....	52
3.11. Korneal epitel hücrelerinin kültür ortamına yayılıp 24 saat bekletildikten sonraki morfolojik görünüşleri.....	54
3.12. 50 mJ/cm ² dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	55
3.13. 150 mJ/cm ² dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	56
3.14. 200 mJ/cm ² dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	56
3.15. 1000 mJ/cm ² dozunda UV-A uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	57
3.16. 2000 mJ/cm ² dozunda UV-A uygulanan örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	58
3.17. 150 mJ/cm ² dozunda UV-B uygulanan keratokonus epitel hücrelerinde % canlılık (WST-1) değerleri.....	59
3.18. 150 mJ/cm ² dozunda UV-B uygulanan kontrol grubu hücrelerinde % canlılık (WST-1) değerleri.....	59
3.19. 2000 mJ/cm ² dozunda UV-A uygulanan keratokonus epitel hücrelerinde % canlılık (WST-1) değerleri.....	60
3.20. 2000 mJ/cm ² dozunda UV-A uygulanan kontrol grubu hücrelerinde % canlılık (WST-1) değerleri.....	60
3.21. 150 mJ/cm ² dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	61
3.22. 150 mJ/cm ² dozunda UV-B uygulanan kontrol grubu hücrelerinde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	62
3.23. 2000 mJ/cm ² dozunda UV-A uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	63
3.24. 2000 mJ/cm ² dozunda UV-A uygulanan kontrol grubu hücrelerinde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

	<u>Sayfa</u>
1.1. Organizmada serbest radikal oluşma yolları.....	14
1.2. Patolojik olarak önemli oksijen türevleri.....	16
1.3. Biyolojik sistemlerde majör reaktif nitrojen türleri.....	17
1.4. Serbest radikallerin neden olduğu başlıca hastalıklar.....	18
1.5. Elektromanyetik spektrumdaki ışınlar ve dalga boyları.....	20
1.6. Hücre serileri ve kökenleri.....	28
2.1. Çalışma grupları.....	43
3.1. Keratokonuslu kornea epiteli primer hücre kültüründe, WST-1 testi ile hücre canlılığı seviyesi absorbands değerleri.....	49
3.2. Normal kornea epiteli primer hücre kültüründe, WST-1 testi ile hücre canlılığı seviyesi absorbands değerleri.....	49
3.3. Keratokonus hastalarından alınan epitel dokuların primer kültür hücrelerinin WST-1 testi ile ölçülen % canlılık değerleri.....	50
3.4. 20 farklı keratokonus hastası bireylerin epitel doku primer kültür hücrelerinin apoptotik/nekrotik hücre miktarı oranları.....	52

SİMGELER DİZİNİ

µm	Mikrometre
nm	Nanometre
mm	Milimetre
mg	Miligram
%	Yüzde
°C	Santigrat
ml	Mililitre
µL	Mikrolitre
cm ²	Santimetrekare
A ⁰	Armstrong
rpm	Dakikadaki devir sayısı
mj	Milijoul
dk	Dakika

KISALTMALAR DİZİNİ

CFC	Kloroflorokarbon
Ca+2	Kalsiyum iyonunu
CCL	Corneal Cross Linking
ROS	Serbest Oksijen Radikalleri
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagles Medium/F-12
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
PBS	Fosfat Buffer Saline
EDTA	Etilen Daimin Tetra Asetat
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
WST-1	Water-Soluble Tetrazolium Salts-1
SOD1	Superoxide Dismutase 1

FBS	Fetal Bovin Serum
O2	Oksijen molekülü
PI	Propidyum İyodür
UV	Ultraviyole
UV-A	Ultraviyole-A
UV-B	Ultraviyole-B
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
pH	Hidrojenin gücü
RPMI	Raswall Park Memorial Institute
HEPES	Hikroksietil Piperazin EtaneSülfonik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
CaCl2	Kalsiyum Klorür
TIMP	Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitörü
MMP	Matriks metalloproteinaz
LAR	Leucocyte common antigen related protein
RNaz	Ribonükleaz
DAPI	Di Aminido Phenyl İndol
FITC	Fluoresin İso Tiyo Siyanat
NO2	Azot Di Oksit
SO2	Kükürt Di
NO	Azot Oksit
Sp1	Specificity Protein1

1. GİRİŞ

Keratokonus (KC), dünya çapında çoğunlukla gençlerde rastlanan, görme rahatsızlığından kornea nakline kadar varan şiddetlerde görülebilen, korneanın zayıflaması ve incilmesi ile oluşan, genetik ve çevresel etkilerin ortak sebep olduğu bir hastalıktır [1]. Keratokonus hasarının kornea epitel bazal membranından başladığı düşünülmektedir. Keratokonusun etiopatogenezinde Cristina Kenney ve Brown Cascade ‘Şelale’ hipotezini savunmuşlardır. Lipit peroksidasyonunda ve/veya nitrik oksit yolunda anormal veya hasarlı enzimlerin oksidatif hasara yola açacağını belirtmişlerdir. Oksidatif, sitotoksik yan ürünlerin birikimi farklı kornea proteinlerinin değişimine ve olayların birbirini tetikleyerek akmaya başlamasına (şelale) neden olurlar. Patogeneizde keratokonuslu kornealarda serbest radikallerin ve süperoksidazların işlevlerinin değiştiği, hasar yapıcı aldehitlerin arttığı düşünülmektedir. Total protein miktarının da azaldığı görülmüştür [2, 3]. Bunların sonucunda geri dönüşsüz hasara uğrayan hücrelerin apoptozise, geri dönüşlü hasara uğrayan hücrelerin ise yara iyileşmesi ve tamirinde rol oynadığı düşünülmektedir [4,5]. Keratokonus hastalığında özellikle Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) artışı ile birlikte genetik yatkınlığın, keratokonus patogenezinde etkili olduğu üzerine çalışmalar olmakla birlikte henüz net bir sonuç ortaya konulamamıştır [1].

Bu sebeple, bazı genetik etmenlerin de etkili olduğu fikri ortaya çıkmaktadır. Bu genetik etkiler antioksidan enzimlerde veya bu enzimlerin dâhil olduğu yollarda kendini gösteriyor olabilir. SOD1 (Superoxide Dismutase 1) geninde, çok yaygın olmasa da, bulunan bir delesyon mutasyonu Keratokonus ile ilişkilendirilmiştir [6]. Çevresel koşullarla genetik etkilerin Keratokonus oluşumuna etkisini karşılaştırmak için yapılmış birkaç araştırma mevcuttur. Kornea stroması fibroblast hücreleri üzerinde yapılan bir araştırmaya göre, oksidatif strese daha çok duyarlı olan hücrelerde mitokondri DNA hasarı tespit edilmiştir [7].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda oksidatif hasara karşı antioksidan ve tamir mekanizmalarının keratokonus hastalığında bozuk olduğuna dair bulgular yayınlanmıştır [1,8].

Podskochy'nin tez araştırmasına göre kornea tabakaları UV-C ışınlarına 24 saat maruz kaldıklarında ancak apoptoz görülmektedir fakat daha az sürede veya daha yüksek dalgalıboylarındaki ışınlarda bu etki görülmemektedir [9]. Bu bulgu, kornea tabakalarının normalde UV-A ve UV-B'ye karşı ne kadar dayanıklı olduğunu göstermektedir.

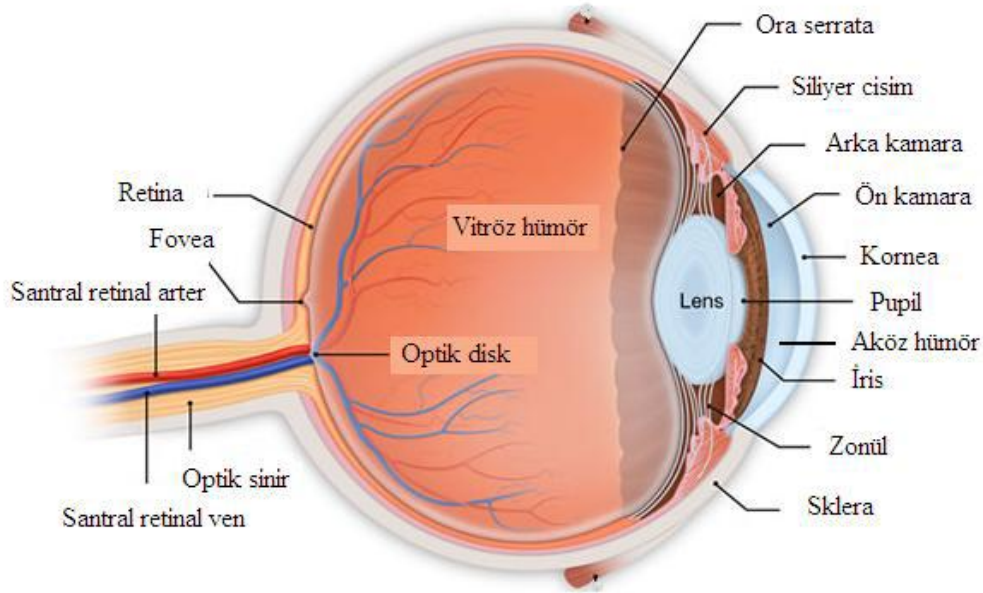
Kornea tabakası güneş ışınlarına doğrudan maruz kalması ile gözün i kısımlarını UV'ye karşı korumak amacıyla özel korunma mekanizmalarına sahiptir. Kornea, maruz kaldığı UV-B ışınlarının tümünü, lens ile birlikte de UV-A ışınlarının %99'unu soğurur ve bu etkiyle ciddi miktarda, yükseltgenmiş molekül, ROS ve serbest radikaller oluşur. Dolayısıyla artan NO (azot oksit) seviyesi, hücre ölümüne sebep olur [1,10].

Keratokonuslu kornealarda oluşan oksidatif strese bağlı hasarın erken yaşlarda görülmeye başlamasının sebebi gözün ultraviyole (UV) ışınlarına maruz kalmasının veya kontakt lens veya gözü çok ovuşturma gibi etkenlerin etkili olduğu düşünülse de bu etki kendi başına yeterli olmayabilir [11].

Çalışmamızda keratokonuslu kornea epitelinin, oksidatif hasar oluşmamış normal kornea epiteline göre UV-A ve UV-B 'nin oluşturacağı oksidatif stresten nasıl etkilendiği incelenip karşılaştırıldı. UV-A ve UV-B nin etkisiyle apoptoz, nekroz ve sitotoksisite seviyelerinde oluşan değişimler araştırıldı.

1.1. Gözün Anatomisi ve Fizyolojisi

Göz küresi yüz kemiklerinin oluşturduğu iki ayrı boşlukta yerleşmiş olan kısmen izole bir doku kompartmanıdır. Genel olarak üç tabakadan oluşur. Bu tabakalar dıştan içe doğru sklera, uvea ve retina olarak isimlendirilir [12]. Göz küresinin şematik gösterimi Şekil 1.1' de verilmiştir.



Şekil 1. 1. Gözün şematik kesiti [13]

Göz yuvarlağını en dıştan saran opak, fibröz tabaka sklera olarak isimlendirilir. Sklera kan damarı içermez, beslenmesi hücreler arasında akan sıvı ile olur. Bu tabaka fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gözün mekanik dayanıklılığını ve korunmasını sağlar.

Orta tabaka olan uvea, gözün pigmentli damar tabakasıdır. Önden arkaya doğru iris, siliyer cisim ve koroidden oluşur. İris, ince ve pigmentli bir diyafram olup kasılabilme özelliğine sahiptir. Siliyer cisimciğin iç yüzeyinden itibaren başlar ve merkezinde pupil yer alır. Esas olarak dilatör (gevşetici) ve sfinkter (kasıcı) kaslardan oluşan bir dokudur. İrise gelen herhangi bir sempatik uyarı dilatör kasların çalışmasına ve dolayısıyla pupilin genişlemesine (midriyazis) neden olurken, parasempatik bir uyarı sfinkter kasların çalışmasına, dolayısıyla pupilindaralmasına(miyozis) neden olur. Siliyer cisim, parasempatik sinirler taşıyan

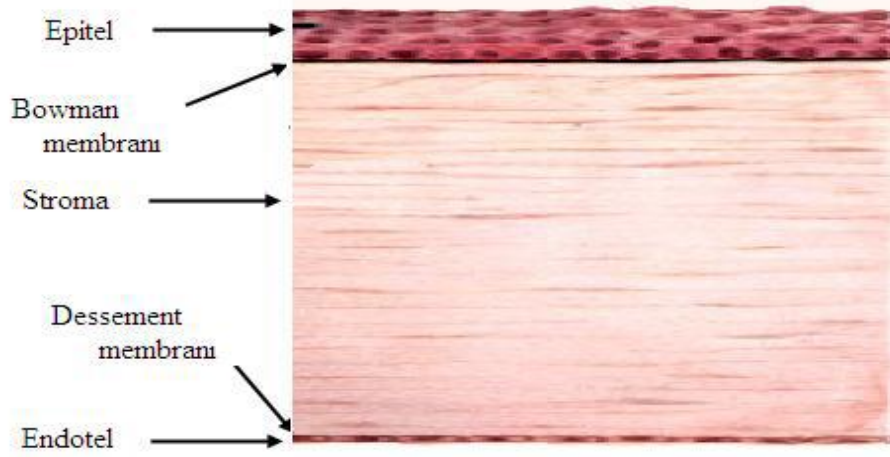
yumuşak bir kastır. Gözün ön bölümünü dolduran aköz hümörünü salgılamaktadır. Koroid, skleranın iç yüzeyindeki ince, yumuşak, kahverengi tabakadır. Oldukça yoğun damar yapısına sahiptir. Temel görevi yapısındaki kan damarlar ile retinanın tabakalarını beslemektir. Gözün en iç tabakası olan retina optik sinirleri içerir. Retinada çubuk ve koni olarak isimlendirilen fotoreseptör hücreleri yer alır. Koni hücreleri optik duyarlılığı ve renk ayırımını sağlarken, çubuk hücreleri çevresel görüntünün oluşmasını sağlar. Retinada bulunan optik sinirler retinada oluşan görüntünün beyne ulaştırılmasını sağlar. Göz küresinde lens ile ayrılmış iki adet odacık bulunmaktadır. Öndeki bölmede bulunan aköz hümör siliyer cisimden salgılanmakta olup göz içi basıncının ayarlanmasından sorumludur. Aköz hümör, lens ve kornea gibi damarsız dokulara oksijen ve çeşitli besinlerin taşınmasında önemli role sahiptir. Vitröz hümör, arka odacıkta yer alan viskoz bir jel yapısında olup lens ile retina arasında bulunur ve yüksek oranda su içeriğine sahiptir [12,14].

1.1.1. Kornea

Göz küresinin dışarıya bakan ön kısmını saydam özellikte ve damarsız olan kornea tabakası oluşturur. Kornea gözün en önemli kırıcı ortamı olup önden bakıldığında dış bükey ve hafif eliptik görünümlüdür [14,15].

Korneanın ön yüzü gözyaşı ile yıkanırken arka yüzü aköz hümör ile temastadır. Metabolizması için gerekli olan materyal ve oksijenin bir kısmını limbal bölgede (korneanın sklera ile birleşme hattı) bulunan kan damarlarından, bir kısmını ise aköz hümör ve gözyaşından difüzyon suretiyle sağlar [12].

Kornea genel olarak beş tabakadan oluşur. Bu tabakalar dıştan içe doğru epitel, “bowman” membranı, stroma, dessement membranı ve endotel olarak isimlendirilir.



Şekil 1. 2. Korneanın tabakaları [16]

1.1.1.1.Epitel Tabakası:

Kornea epiteli yaklaşık 50 mikrometre kalınlığında olup kornea kalınlığının %10'unu oluşturmaktadır. İlaçlar da dahil olmak üzere tüm yabancı cisimlerin geçişi için en önemli engeli oluşturur. En önemli görevlerinden biri de UV ışınlarını filtrelemesidir. Kornea epiteli konjunktiva epitelyumunun devamı şeklinde olarak beş veya altı tabaka epitelyum hücrelerinden oluşur. Buradaki hücreler çok tabakalı, yassı ve keratinsizdir. Dıştaki hücrelerin yüzeyi gözyaşı filminin gözün önündeki kısmında kalmasını sağlayarak korneanın ıslanmasına yardımcı mikrovillus ve mikropililerle genişlemiştir.

Yüzey tabakadaki epitelyum hücrelerinde çokça sıkı kavşak bulunması nedeniyle kornea epiteli hücrelerarası geçirgenliği az olan bir dokudur. Epitel tabakası, metabolizması için gerekli oksijeni atmosferden, aminoasitleri ve glikozu gözyaşı aracılığıyla kornea ile konjunktiva arasında sınır olan limbus çevresindeki kapiller ağdan ve aköz hümörden difüzyon yoluyla sağlar. Hidrofobik özelliğe sahip olan iyonize olmamış bir ilaç kornea epitelinden kolaylıkla geçerken, hidrofilik ve iyonize ilaçların geçişi için epitel önemli bir engel oluşturur.

1.1.1.2. Bowman Membranı:

Korneanın ikinci tabakası olup kolajen liflerden ve bu liflerin arasında yer alan dolgu malzemesinden meydana gelmiştir. Hücresel içeriği ve çoğalma yeteneği olmayan bir tabakadır. Epitelde meydana gelebilecek iltihabi durumların stromaya geçişini engelleyen önemli bir bariyerdir.

1.1.1.3. Stroma:

Kornea kalınlığının % 90' ını oluşturur ve modifiye bağ dokusundan meydana gelir. Stroma, korneanın iskeletini oluşturan en önemli tabakadır. Birbirine dik açı ile yerleşmiş tip I kolajen lamelleri içerir. Yapısındaki glikozaminglikanlar kolajen lamellerinin düzgün bir tabaka oluşturmaya katkıda bulunur. Korneanın saydamlığını sağlar. Stromanın yaklaşık % 78'' ini su oluşturur, dolayısıyla hidrofilik ilaçların stromadan geçişi kolaydır.

1.1.1.4. Dessement Membranı:

10 -15 µm kalınlığında, stroma ile endotel arasında olup oldukça elastik bir dokudur.

1.1.1.5. Endotel:

Korneanın en arka tabakasıdır. Tek katlı epitel benzeri hücrelerden oluşur. Bu hücreler birbirlerinden hücre içi boşluklarla ayrılmıştır. Endotelin üç temel fonksiyonu vardır, bunlar aköz hümöre karşı engel görevi, metabolik pompa fonksiyonu ve korneanın saydamlığını sağlamaktır. Endotel fonksiyonları bozulursa kornea ödemi gelişir [12,17 -21].

Kornea, göze uygulanan ilaçların oküler yararlanımı açısından en önemli absorpsiyon membranıdır. Korneadan ilaç absorpsiyonu esas olarak bu membranı oluşturan tabakaların ilaca karşı geçirgenliğine bağlı olarak değişir. Epitel membranı sıkı kavşaklar nedeniyle hücreler arası geçişe dirençlidir. Dolayısıyla ilacın büyük kısmı hücre membranında geçmek zorundadır. Epitel, hidrofilik ve iyonize maddelerin geçişine engel olurken, hidrofobik ve yağda çözünen maddeler bu

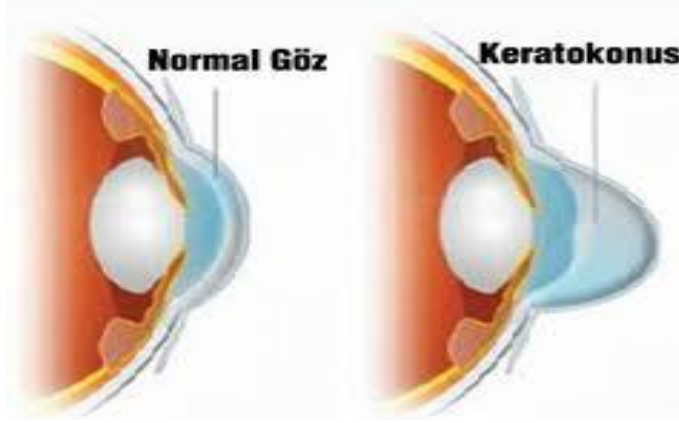
tabakadan kolayca absorplanır. Hidrofobik, iyonize olmamış bir ilaç epitelyumden kolaylıkla geçer, epitelin pH'ı ile iyonize, suda çözünen forma dönüşür ve bu şekilde stromaya geçebilir. Stroma hücre dışı bir matriks olduğu için 500 kD a kadar büyüklükteki moleküllerin geçişine izin verebilir. Hidrofil bileşikler stromadan geçerken lipofilik maddeler için stroma bir engel oluşturur. Endotel ise ilaçların geçişine molekül büyüklüğüne bağlı olarak direnç gösterir [14,15].

Korneada damar yapısı olmadığından sistemik uygulanan ilaçlar korneaya ulaşamazlar. Bu nedenle de korneal hastalıkların tedavisinde daha çok topikal uygulamalar tercih edilir.

1.2. Keratokonus (KC);

Dünya çapında genellikle gençlerde rastlanan, kornea hastalığıdır. Görme rahatsızlığı kornea nakline kadar varan şiddetlerde olabilmektedir. Keratokonus korneanın zayıflaması ve incilmesi ile oluşan, genetik ve çevresel etkilerin ortak sebep olduğu bir hastalıktır [1].

Keratokonus, gözün saydam tabakasının yani korneanın, incelme ve sivrileşmesiyle başlar. İlerleyici miyop ve astigmat görülür. Keratokonus hastalarında kornea şekli bozuktur. Kornea önce öne doğru sivrileşir, sonra bombeliği artar ve dikleşir. Yerçekimi etkisiyle zamanla bu bombelik aşağı doğru sarkarak kornea merkezinde aşağı yer değiştirme ile sonuçlanır. Bu şekil bozukluğu da hastada giderek artan miyopa, astigmata ve gözlük ile düzeltilemeyen görme bozukluğuna yol açar. Keratokonus korneanın asimetrik bilateral ve non-inflamatuvar ilerleyici bir dejenerasyonudur. İnsidansı, genel populasyonda 1/2000'dir. Genellikle ergenlik çağında başlar ve gözlerin % 20'sinde penetran keratoplasti endikasyonu seviyesinde ilerleme gösterir [8].



Şekil 1.3. Normal ve keratokonuslu kornea [22]

1.2.1. Keratokonusun Etyopatogenezi

Keratokonusun bugün biyokimyasal ve etiyolojik temelleri çok az anlaşılabilmiş olup birçok faktörün rol aldığı düşünülmektedir. Bunlardan bazıları şunlardır:

1.2.1.1. Genetik

Kalıtımın keratokonus etiyolojisindeki rolü net bir şekilde ortaya konulamamıştır. Olguların sadece % 10'unda keratokonusun çocuklara aktarıldığı görülmüştür. Bu durumda genetik geçişin, değişen penetrasyonla birlikte otozomal dominant olarak ortaya çıktığı öne sürülmektedir [23]. Keratokonusun ikiz kardeşlerde gösterilmesi etiyolojisinde hereditenin rolünü desteklemektedir [24]. Wang ve ark. [25] yaptığı çalışmada keratokonus olgularının birinci derece akrabalarındaki keratokonus prevalansının normal popülasyona göre daha fazla olduğu bulunmuş, bu artışın da genetik etkiye bağlı olduğu düşünülmüştür.

1.2.1.2. Ekstrasellüler Matriks Anormallikleri

Yapılan çalışmalarda, keratokonuslu kornealarda çeşitli yapısal anormalliklerin var olduğu saptanmıştır. Çalışmalarda total protein miktarının düştüğü, total kollajen içeriğinin değişiklik gösterdiği, keratan sülfat içeriğinin arttığı kondritin sülfat

içeriğinin azaldığı gösterilmiştir [26,27]. Epitelyal bazal membranında entactin/nidogenin, fibronektin, alfa3-alfa5 tip IV kolajenin zincirleri ve laminin-1 zincirinin azaldığı, vimentin gibi yara iyileşmesiyle ilgili proteinlerin tenascin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin, transforming growth faktör beta, interlokin-1, ısı-şok protein 27 ve ubiquitin arttığı da çalışmalarda gösterilmiştir [28,29]. Keratan sülfat proteoglikan çeşitlerinden biri olan keratokanın artması keratokonusa özgü olup, aşırı ekspresyon ile stromada fibrillogenesis oluşmasına yol açar [30]. Korneal kurvaturdeki değişim, kolajenin lamellalar arası ve lamellalar içinde yanlış yerleşimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [31].

1.2.1.3. Enzim Anormallikleri

Keratokonuslu kornealarda ekstrasellüler matriksin değişik yapıları yıkıma uğrar, stroma incelik ve bowman tabakasında yarıklanmalar ortaya çıkar. Bunun, inhibitör enzimlerin aktivitelerindeki azalma ve yıkım enzimlerinin aktivitelerinde artış sonucu oluşan yıkım enzimi ve enzim inhibitörü arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda keratokonusta, normal korneaya göre ciddi ölçüde daha fazla kollajenaz aktivitesinin mevcut olduğu görülmüştür [32]. Keratokonuslu kornealarda asit fosfataz, asit lipaz, asit esteraz, katepsin G ve B, jelatinaz A (MMP-2) enzimlerinde artış görülmüştür [33-36]. Tripsin, kimotripsin, elastaz ve plazmini bloke eden α 1 – proteinaz inhibitörü, tripsin, kimotripsin, elastaz, papain, kollajenaz, trombin, plazmin ve kallikreini bloke eden α 2- makroglobulin ve matriks metalloproteinazı ile apoptozisi inhibe eden TIMP-1 enzim inhibitörlerinde de azalma görülmüştür [37,38].

1.2.1.4. Apoptoz

Apoptozis, normal gelişimde, hastalıklarda ve yara iyileşmesinde ortaya çıkan programlanmış hücre ölümüdür [39]. Yapılan hayvan çalışmalarında kornea epitelinin kronik, tekrarlayan biçimde kaldırılmasının stromal apoptozisi uyardığı

gösterilmiştir [40,41]. Bu da keratokonus olgularında, sert gaz geçirgen kontakt lens kullanımına bağlı ya da atopi durumunda olduğu gibi yoğun göz ovuşturmaya ikincil kronik irritasyonun apoptozise yol açabileceğini düşündürmektedir [42]. Yapılan çalışmalar bu iki mekanizmanın apoptozisi uyarabileceği belirtilmiştir. Bir transmembran fosfotirozin fosfatazi olan LAR'ın (Leucocyte common antigen related protein) apoptozisi uyardığı belirtilmiştir [37]. Diğer mekanizmanın ise apoptozisi inhibe eden TIMP 1'in (matriks metalloproteinazların doku inhibitörü) keratokonuslu kornealarda düşük düzeylerde bulunmasıdır [37].

1.2.1.5. Sinyal İletim Anormallikleri

Proteinaz inhibitorunun (α 1) promotor aktivitesini baskılayan, bunun sonucunda bu enzimin düzeyini düşüren bir transkripsiyon faktörü olan Sp1'in (Specificity Protein1) keratokonuslu kornealarda arttığı gösterilmiştir [44]. Ayrıca bir fosfotirozin fosfataz enzimi ve LAR'ın keratokonuslu kornealarda arttığı gösterilmiştir. Fosfotirozin fosfatazların görevleri tirozin molekülünden bir fosfatı uzaklaştırmaktır [45]. Tirozinin, bu defosforilasyonu ile LAR hücre içi sinyalizasyonu etkilemekte ve apoptozisi uyarmaktadır [37].

1.2.1.6. Oksidatif Hasar

Keratokonuslu kornealarda, lipid peroksidasyonu ve nitrik oksid yolu sonucunda oluşan sitotoksik ürünlerin biriktiği gösterilmiştir [43]. Ayrıca ultraviyole ışık (UV), yoğun göz ovuşturma veya kontakt lenslerin neden olduğu mekanik travma, oksijen radikallerinin kaynağı olabilmektedir [37]. Keratokonuslu kornealarda oluşan reaktif aldehydlerin uzaklaştırılmasında görev alacak olan aldehyd dehidrojenaz sınıfı 3 enziminin düzeyi düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir [46]. Keratokonuslu kornealarda serbest radikaller ve superoksidler gibi reaktif oksijenlerin uzaklaştırılmasında rol oynayan superoksid dismutaz düzeyinin de düşük olduğu gösterilmiştir [47,48]. Ayrıca Keratokonuslu kornealarda sitotoksik bir aldehyd olan

malondialdehid ve sitotoksik peroksinitrit olan nitrotirozin miktarının da arttığı gösterilmiştir.[43].

1.2.2. Keratokonus Tedavisi

İlerleyen bir seyre sahip olan Keratokonus'un yol açtığı görme kaybını azaltmak ve hastalarda görme düzeyinin artırılmasını sağlamak için günümüzde farklı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Tedavisi çeşitli aşamalardan oluşmaktadır. Buna göre öncelikle lens kullanamayan görme seviyesi düşük hastalarda görme keskinliğini artırmak için kornea içi halkalar yerleştirilir, hastalığı durdurmak amaçlı Korneal Kollajen Çapraz Bağlama (CCL – Corneal Cross Linking) ameliyatı yapılır. Tüm bunlara rağmen hastalık ilerler, görme keskinliği çok düşerse kornea nakli gerekebilir. Keratokonusta, kollajen fibriller arasındaki çapraz bağların önemli ölçüde azaldığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kollajen fibriller korneanın mekanik stabilitesini sağlar. Kollajen fibriller arasındaki çapraz bağların azalması, korneanın santral, parasantral alanlarında incelmeye neden olurken korneayı giderek destabilize eder ve bu da düzensiz astigmatizma, miyopi ve görme keskinliğinde azalmaya neden olur. Korneal Çapraz Bağlama, kollajen fibriller arasında uzanan kimyasal bağların güçlendirilmesi ve hastalıklı korneanın sabitleştirilmiş edilmesi prensibine dayanır. Aynı zamanda vitamin B2 (riboflavin) ve UV-A ışınları ile birlikte kullanılarak, kornea stromasında kollajen fibriller arasındaki çapraz bağların oluşumunu kolaylaştırırken, korneal sertleşme etkisi de sağlar. Son yıllarda kullanımda olan korneal kollajen crosslinking (CCL) tedavisi ile keratokonustaki penetran keratoplasti ihtiyacının önemli ölçüde azaltılabildiği kaydedilmiştir. Keratokonusta diğer tedavi seçenekleri ise; gözlük, sert kontakt lens kullanımı, termokeratoplasti, intrakorneal ring segment uygulaması, epikeratoplasti ve lameller keratoplastidir [49].

1.3. Serbest Radikaller

Serbest radikal, dış yörüngesinde, bir veya birden fazla çiftlenmemiş elektron içeren atom veya organik ya da inorganik moleküllere verilen isimdir. Bu moleküllere

serbest radikaller, oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri de denir. Serbest radikallerin elektron yapılanmaları onları yüksek derecede kararsız ve kimyasal olarak fazla reaktif hale getirir. Bulabildikleri herhangi bir molekül ile etkileşime girer ve bu molekülden ya bir elektron alır ya da ona bir elektron vererek yapısını bozarlar [50]. Serbest radikaller; organizmanın yapı elemanları olan lipidler, proteinler, karbonhidrat ve nükleikasitler gibi temel hücresel bileşenlerde hasara yol açabilme ve enzimlerin yapısını bozabilme özelliğine sahiptir [51]. Oluşan bu hasar kanser, romatoit artrit, katarakt, parkinson, diabetes mellitus, ya da bağlı immün yetmezlik ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynamaktadır. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir [52].

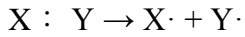
Serbest radikaller vücuttaki hürelere saldırır ve tahrip eder. İlk saldırıda öncelikli olarak yeni bir serbest radikal oluşur ve kontrol edilemeyen zincirleme bir reaksiyon başlar. Biyolojik hasarla karakterize radikal reaksiyonlar arasında en belirgin olanı lipid peroksidasyonudur. Serbest radikaller, hücre zarındaki yağlardan birine saldırdığında yağ molekülü değişime uğrar. Yağların değişimi sonucunda; hücre zarının yapısı ve fonksiyonları zarara uğrar, hücre zarı gıdaların, oksijenin ve suyun uzun süreli olarak transferini yapamaz, harcanan ürünlerin atılmasını düzenleyemez. Serbest radikal saldırısının devamı; hücre zarı yapısında bulunan yağların parçalanmasına, zarının yırtılmasına ve hücre bileşenlerinin dağılmasına sebep olur. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına çıkması etraftaki dokulara da zarar verir. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı yağların oksidasyonu veya oksidatif hasar olarak adlandırılır [53]. Serbest radikallerdeki aşırı yüklenme vücut için tehlike oluşturur. Ancak vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidirler. Serbest radikaller vücudun hastalıklara karşı direncini vücudu saran mikroorganizmaları yok ederek artırır [51].

Radikal moleküller ve antioksidan savunma gücü dinamik bir denge içinde kaldıkları sürece organizma için oldukça yararlıdır. Örneğin; lökositlerle mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikallerdir [58-60].

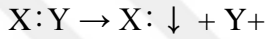
1.3.1 Radikaller Nasıl Oluşur?

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücrenel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir. Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir:

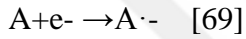
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar. (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.

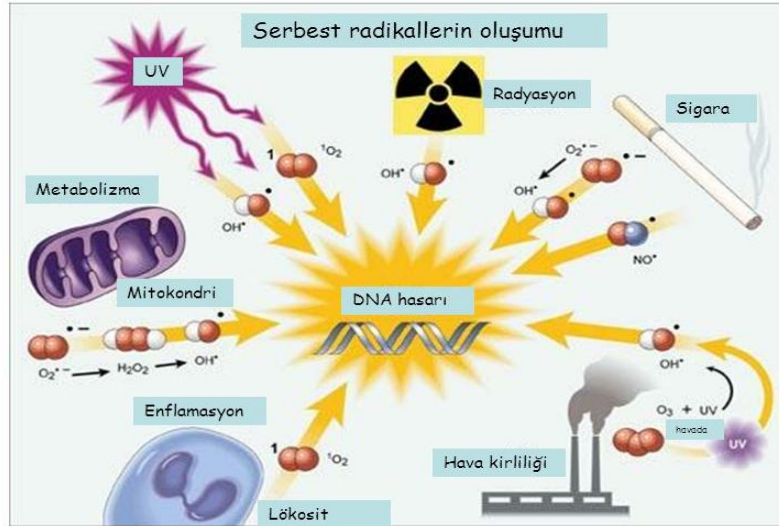


3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



1.3.2 Serbest Radikal Oluşma Yolları

Serbest radikaller, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine de saldıran moleküllerdir [55]. Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri insan vücudunda sürekli meydana gelmektedir [56]. Bu radikaller normal hücrenel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Kirli havada, sigara dumanında, radyasyonda, bitki koruma ilaçlarında, bozulmuş gıdalarda ve egzoz dumanında bulunurlar [53,54]. Serbest radikal oluşumuna ayrıca, pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, güneş ışınları, X-ışınları, hatta yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler neden olur. Yoğun egzersiz sırasında oksijen kullanımındaki artışla serbest radikal oluşumuna neden olur [55]. Serbest radikallerin oluşma yolları ve yapmış olduğu DNA hasarı şekil 1.4.'de şematize edilmiştir.



Şekil 1. 4. Serbest Radikallerin Oluşumu [57]

Çizelge 1.1. Organizmada serbest radikal oluşma yolları [61]

Organizmada Serbest Radikal Oluşuma Yolları
A. Ekzojen Faktörler:
1. DiyetSEL
a. Çok doymamış yağ asitlerince zengin beslenme
b. Alkol alımı
c. Fazla kalorili beslenme (obezite)
d. Hayvansal proteinlerce zengin beslenme
e. Aşırı demir ve bakır alınması
f. Yiyeceklerin uygun olmayan koşullarda hazırlanması ve saklanması
g. Yemek pişirme yöntemlerindeki hatalar
2. Çevresel
a. Sigara dumanı
b. Hava kirliliği (O_2 , NO_2 , SO_2 , hidrokarbonlar)
c. Diğer kirleticiler
d. Radyasyon
3. İlaçlar
a. Antikanser ilaçlar (adriamisin vs.)
b. Glutatyon tüketen ilaçlar (asetaminofen, kokain vs.)
B. Endojen Faktörler:
1. Fiziksel egzersizsiz/ sedanter yaşam
2. Stres
3. Yaşlılık
4. Doku hasarı ve kronik hastalıklar(ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon vs.)
5. DiyetSEL antioksidanların sağlaymasını etkileyen koşullar(iştahsızlık, kolestaz ,malabsorbsiyon vs.)

1.3.3. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Oluşumu

Serbest radikaller çoğunlukla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. Bu radikallerin en çok rastlanan kaynağı, iki tane çift olmayan (tek) dış elektrona sahip olan oksijendir [55]. Mitokondride aerobik solunumda kullanılan oksijenin % 2 - 5' i serbest oksijen radikallerine (ROS) dönüştürülür [63]. Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller süperoksit ve hidroksil radikalleridir (OH•) [62]. Canlı sistemlerde oksijen radikalının zararlı etkilerinin uzaklaştırılması gerekir. Çünkü süperoksit radikali sulu çözeltilerde H₂O₂ oluşturmakta ve oluşan hidrojen peroksit veya süperoksit radikali, Fe⁺² ve Cu⁺² gibi geçiş metalleri ile tepkimeye girmesi sonucu daha etkili bir serbest radikal olan hidroksil radikalini (OH•) oluştururlar [64]. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss tepkimeleri olarak isimlendirilir:



Fenton Reaksiyonu.



Haber-Weiss Reaksiyonu [65].

OH• radikali, canlı sistemlere çok zararlı olabilecek çok güçlü bir radikaldir. Birçok patolojiye neden olan biyokimyasal değişimleri oluşturulabilir [65]. Oksijenin diğer bir metaboliti singlet oksijendir ('O₂). Bu molekül oksijenin enerji yakalamasıyla şekillenir. Singlet oksijen serbest radikal değildir [66]. Ancak biyokimyasal olaylarda önemlidir ve doku hasarlarına yol açabilir. Bu zararlarının ortadan kalkışı vitamin A ve diğer retinoitler veya β-karoten ve diğer karotenoitler gibi antioksidanların singlet oksijeni organizmaya zarar vermeden O₂'ye dönüştürmesiyle olur [67].

Bütün bu açıklamalara göre oksidanlar, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alışverişi yapabilenler (radikaller) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde bileşenler olarak (non radikaller) 2 grupta toplanırlar [68]. Bunlar çizelge 1. 2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. 2. Patolojik olarak önemli oksijen türevleri [61,68]

Patolojik olarak önemli oksijen radikalleri:	
Adı	Moleküler Formülü
Süperoksit radikali	O ₂ ⁻
Hidroksil radikali	.OH
Nitrik oksit	NO.
Ferril iyonu	FeO. ⁺²
Perferril iyonu	FeO ₂ . ⁺²
Allil	R.
Aloksil	RO.
Peroksil	ROO.
Radikal olmayan oksijen türevi bileşikler:	
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Singlet Oksijen	¹ O ₂
Ozon	O ₃
Hipoklorit asit	HOCl
Lipit hidroperoksit	LOOH
Peroksinitrit	ONOO.

1.3.4 Nitrozatif Stres

Nitrozatif stres, biyomoleküllerin uğradığı nitrozasyon tepkimeleridir. Nitrozasyon, reaktif nitrojen oksit türleri tarafından nükleofil bir gruba nitrozonyum (NO⁺) grubunun aktarılmasıyla nitrozil türevinin oluşturulmasıdır. Proteinler, nükleik asitler ve glutasyon gibi antioksidanların oluşan reaktif türlerle modifikasyonu nitrozatif stresin temelini oluşturur. Terim olarak oksidatif stres ilk anda oksijen radikallerinin üretimindeki artıştan kaynaklanan etkileri hatırlatır. Ancak nitrik oksitten kaynaklanan reaktif türler de oksijen radikallerine benzer şekilde biyolojik moleküllerle tepkimeye girerler. Örneğin reaktif nitrojen oksit türleride oksijen radikalleri gibi lipid peroksidasyonunu başlatabilir, DNA'da zincir kırılmalarına artı baz modifikasyonlarına neden olabilir, metal iyonlarının oksidasyon durumlarını

değiştirebilir, proteinleri oksitleyebilir ve antioksidanların tüketimine neden olabilirler. Vücutta oksijen radikallerinin sentezinin artmadığı durumlarda, indüksiyonlar sonucu artmış nitrik oksit (NO) sentezi kendi başına oksidatif strese neden olabilir. Bu nedenle in vivo koşullarda gelişen oksidatif stresi sadece oksijen radikallerinin yapımındaki artışa bağlamak doğru değildir. Genel bir kural olarak, patolojik durumlarda nitrik oksit ve oksijen radikallerinin yapımı eş zamanlı olarak gerçekleşir; ya da bir radikal türünün neden olduğu etkiler diğer radikal türün yapımını da hızlandırır [70].

Çizelge 1. 3. Biyolojik sistemlerde majör nitrojen türleri [71]

Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	Formül
Nitrik oksit (nitrojen monooksit)	•NO
Nitrojen dioksit	•NO ₂
Peroksinitrit	ONOO ⁻
Peroksinitrik asit	ONOOH
Dinitrojen trioksit	N ₂ O ₃
Nitril klorid	NO ₂ Cl
Nitronium ion	NO ⁺ ₂
Alkilperoksinitrit	ROONO
Nitrozotiol	RSNO

1.3.5 Serbest Radikallerin Hücre ve Dokularda Yol Açtığı Zararlar

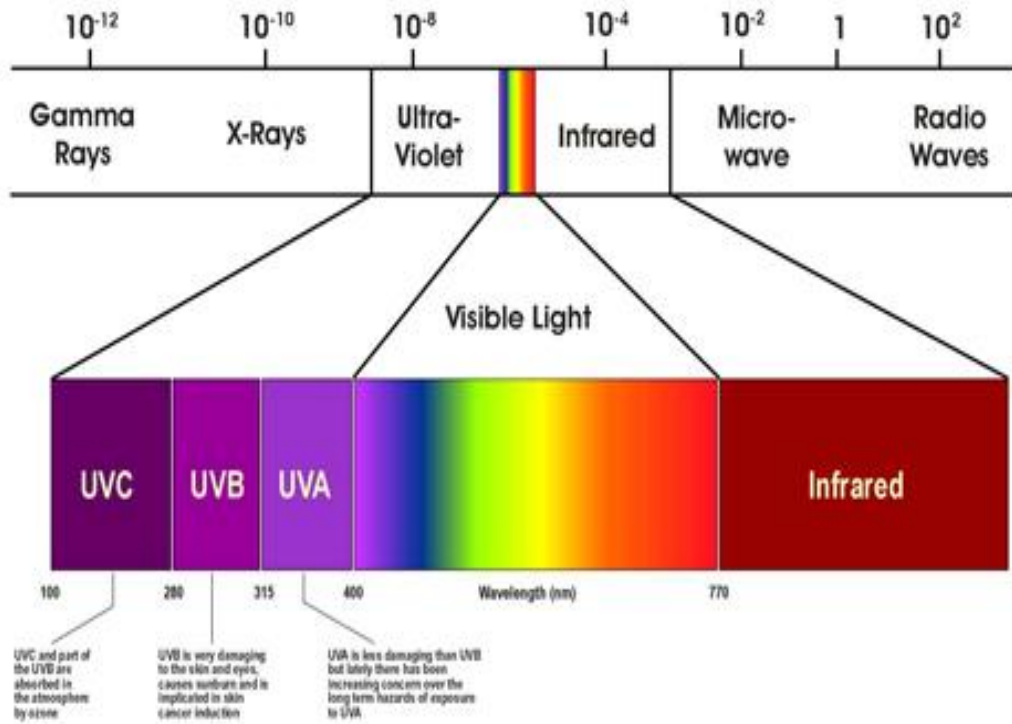
- 1- DNA'nın hasar görmesi
- 2- Nükleotid içeren koenzimlerin yıkımı
- 3- Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değişmesi
- 4- Protein ve lipitlerle kovalan bağlanması
- 5- Enzim aktivasyonu ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler
- 6- Mukopolisakkaritlerin yıkımı
- 7- Protein yapısının bozulması
- 8- Lipit peroksidasyonu, hücre zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi
- 9- Zar proteinlerinin hasarı sonucu taşıma sistemlerinin bozulması
- 10- Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- 11- Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü bileşiklerdeki indirgenme ve yükseltgenme olaylarının bozulması kapillerde aterosklerotik değişikliklerin oluşması [61].

Çizelge 1. 4. Serbest radikallerin neden olduğu başlıca hastalıklar [61]

Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hastalıklar:
1. Ateroskleroz
2. Kanser
3. Alzheimer hastalığı
4. Parkinson hastalığı
5. Esansiyel hipertansiyon
6. Katarakt
7. Fankoni anemisi
8. Bloom sendromu
9. Amiloidoz
10. Diabetes melitus
11. Lanek sirozu
12. Amiyotrofik lateral skleroz

1.4. Elektromanyetik Spektrum Bölgeleri

Güneş, canlılar için vazgeçilmez yaşam kaynaklarından biridir. Yeryüzüne ulaşan ışığın büyük kısmı görünür ve infrared ışıklardan, geri kalan %5'den az kısmı ise ultraviyole ışıklardan oluşur [72,73]. Güneş, elektromanyetik spektrumdaki tüm dalga boylarından ışın yaymaktadır. Güneşten gelen bazı UV dalgaları yerküre atmosferini geçmekte, ancak ozon tabakası gibi bazı gazlar tarafından tutulmaktadır. Bazı günler daha fazla UV radyasyonu dünyaya ulaşmaktadır. Bilim adamları UV radyasyonunun zararlı etkilerinden insanların korunmasında, yardımcı olacak UV indeksini geliştirdiler [75]. Elektromanyetik dalgalar, dalga boylarına veya enerjilerine göre çok geniş bir alana yayılırlar. Elektromanyetik spektrum bölgeleri Şekil 1. 5. deki gibi gösterilebilir.



Şekil 1. 5. Elektromanyetik spektrum bölgeleri [76]

Çizelge 1. 5.'de ise elektromanyetik spektrumdaki ışınlar ve dalga boyları ayrıntılı bir şekilde belirtilmektedir.

Çizelge 1. 5. Elektromanyetik spektrumdaki ışınlar ve dalga boyları [77]

IŞINLAR	DALGA BOYLARI
Gama Işınları	$<0,1\text{Å}^0$
X Işınları	$0,1-100\text{Å}^0$
Vakum	10-200 nanometre (nm)
UV-C(far-UV)	200-280 nanometre (nm)
UV-B(mid-UV)	280-320 nanometre (nm)
UV-A(near-UV)	320-400 nanometre (nm)
Görünür Işınlar	400-700 nanometre (nm)
IR Cıvarı	0,74-1,5 mikrometre (μm)
IR	1,5-5,6 mikrometre (μm)
IR Ötesi	5,6-1000 mikrometre (μm)
Mikrodalgalar	1-5 milimetre (mm)
Radyo Dalgaları	>5 milimetre (mm)

1.4.1. Ultraviyole (UV)

Ultraviyole radyasyon, tüm hayatımız boyunca maruz kaldığımız bir tür görünmez iyonize olmayan radyasyon şeklidir. UV, solar radyasyonun doğal düşük yoğunluklu bir bileşenidir [74]. Ultraviyole ışınlarının, fotosentez, D vitamini sentezi, patojenleri öldürmek, ısı sağlamak, bazı deri hastalıklarını iyileştirmek (fototerapi) gibi yararlı etkileri vardır. UV' nin aynı zamanda ciltte güneş yanığı, fotoallerjik ve fototoksik reaksiyonlar, fotoimmünojenik değişiklikler, mutasyonu uyarma, deri yaşlanması ve deri kanserleri ayrıca göz kapakları ve gözlere de zararlı etkileri vardır [72].

UV radyasyonu derinliğine nüfuz edemediği için derin dokuları etkilemez. UV'den etkilenen organlar göz ve deridir [74]. Ultraviyole ışınları, dalga boylarına göre 200-280 nm UV-C, 280-320 nm UV-B, 320-400 nm UV-A olmak üzere 3 gruba ayrılır. Yeryüzüne ulaşan UV ışınlarının %90-95'i UV-A, %5-10'u UV-B'den oluşur. UV-B'nin büyük kısmı ozon tabakası tarafından tutulduğu için güneş ışığında az miktarda bulunur. UV-C ise dünyaya ulaşmadan ozon tabakası ve nem tarafından tutulduğu için güneş ışığında yoktur.

Stratosferdeki ozon tabakası son yirmi yılda incelmeye hatta yok olmaya başlamıştır. Ozon tabakasının bozulmasının başta gelen nedenlerinden biri (CFC) kloroflorokarbon bileşenlerinin kullanımının artmasıdır. Ozon tabakasındaki incelmeye sonucu yeryüzüne ulaşan UV-B'nin miktarı artar. Ayrıca normalde yeryüzüne ulaşamayan ve güçlü kanserojen olan UV-C'de yeryüzüne doğrudan ulaşır [72].

1.4.1.1. UV-A Işını

Dalga boyu 320-400 nm arasındadır. UV ışınları içinde dalga boyu en fazla ve enerjisi en az olan ışınlardır. Güneş kaynaklı UV-A ışınları atmosfer tarafından tutulmamakta, camdan geçebilmektedir. Dermis olarak bilinen iç deriye kadar nüfuz edebilmektedir. Bu yüzden erken yaşlanmaya ve deride kırışıklıklara, deri kanserinin ilerlemesine neden olmaktadır [75]. Deride var olan pigmentlerin oksidasyonunu sağlayarak hızlı bir pigmentasyona sebep olur, ancak bu çabuk kaybolan geçici bir pigmentasyondur. UV-A, deri hastalıklarının tedavisi amacı ile de kullanılmaktadır [72]. Göze gelen UV-A lens tarafından soğurulur [10].

1.4.1.2. UV-B Işını

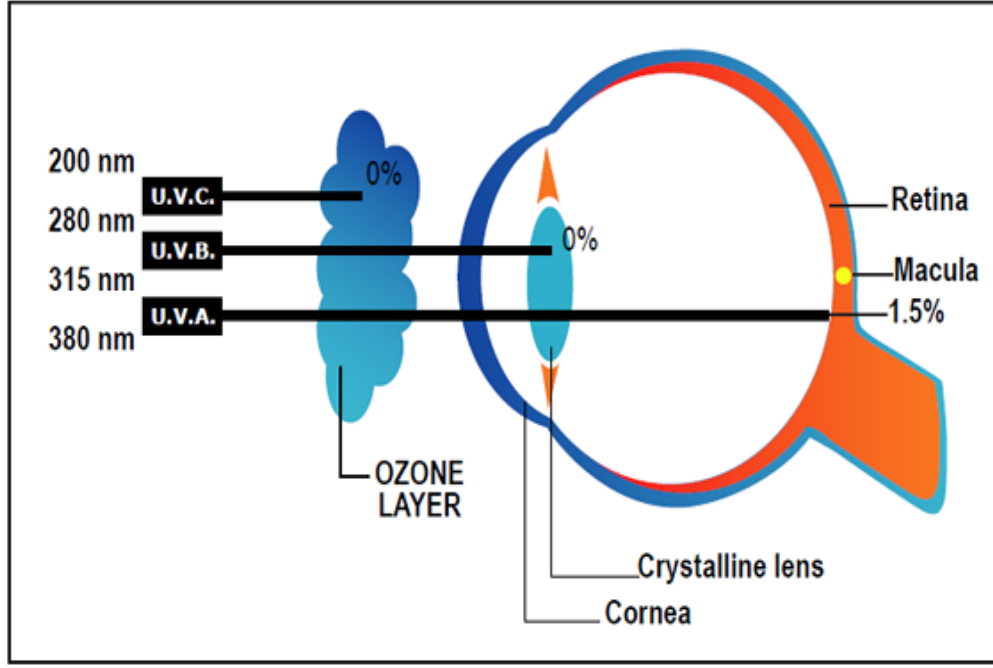
Dalga boyu 280-320 nm arasında olan ve hem enerji hem de dalga boyu açısından UV bandının ortasında yer alan ışınlardır. UV-A'dan yaklaşık 1000 kez daha güçlüdür [75]. Biyolojik olarak zararlı olan UV-B radyasyonu stratosferik ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak yer yüzeyine ulaşmaktadır. UV-B'yi absorbe ederek yeryüzeyine ulaşmasını engelleyecek sadece stratosferik ozon tabakası değildir. UV

ışınlarının büyük bir kısmı da bulutlar tarafından absorbe edilmektedir. Atmosferik kirlilik, UV ışınlarına maruz kalmayı yerel ve küresel olarak etkileyebilmektedir. En önemli etkisi insanların bağışıklık sistemini zayıflatmasıdır. Diğer bir önemli etkisi, insanlarda geçici körlük, korneanın zedelenmesi ve ileri yaşlarda katarakta sebep olmasıdır. UV-B ışınlarının insanlar üzerine bir başka zararlı etkisi de deri kanseridir. Uzun süreli UV-B ışınları altında kalındığı takdirde önce deri hücrelerinde bozulma, 40 yaşlarında tümör oluşumu ve 50 yaşlarında da ileri safhada kanser oluşumu görülebilmektedir [75]. Deride kalıcı pigmentasyona neden olur. UV-B ışınları pencere camından geçmez. Güneş yanığınınin büyük sorumlusudur[72].

Göze ulaşan UV-B'nin çoğunluğu korneanın epiteli ve stroma hücrelerinde soğurulur. Kalan UV-B' nin de tamamı lens tarafından soğurulur. Kornea epiteli hücreleri UV- B'ye doğrudan maruz kalan ilk hücre tabakasıdır[10].

1.4.1.3. UV-C Işını

Dalga boyu 200-280 nm arasında UV'nin C bandında, dalga boyu en kısa, enerjisi en yüksek olan ışınlardır. Deri veya göz ile teması sonucunda kansere yol açmaktadır. Koruma önlemi almadan hiçbir şekilde UV-C radyasyonuna maruz kalınmamalıdır. Güneş kaynaklı UV-C ışınları ozon tabakası tarafından filtre edilir ya da atmosferdeki gazlar tarafından tutulmaktadır [75].



Şekil 1. 6. UV Çeşitlerinin Gözdeki Hasarı [78]

1.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürü tanımı canlı dokuların vücut dışında yaşatılmasını, sürekli üretimini ve gelişimini ifade etmektedir. Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısısında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik konumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadır [79]. Hücre kültürleri, günümüzde sitogenetik biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarda, tanı veya araştırma ve üretim amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Hücre kültürünün amacı, bir grup hücreyi yaşatmak, ileri çalışmalar için çoğaltmak, gerektiğinde kullanmak için dondurarak saklamaktır [80].

1.5.1. Hücre Kültürünün Tarihçesi

Hücre kültürünün tarihçesi 1800'li yıllara kadar uzanır. İlk olarak 1866 yılında in vitro doku kültürü çalışılmış ve amfibi kan hücrelerinin 35 gün canlı kalabilmesi sağlanmıştır. 1885'te Wilhelm Roux, tavuk embriyosunun medüller tabakasını alarak, ılık salin solüsyon içinde günlerce canlı tutarak doku kültürünün temellerini

atmıştır. 1903 yılında Jolly, in vitro koşullarda hücre bölünmesi ve yaşamı ile ilgili ilk detaylı gözlemleri yapmıştır. Semenderlerden bir ay boyunca asılı damlalar şeklinde lökosit elde etmiştir. Bu çalışma 1906 yılında, Ewing ve Beebe tarafından takip edilmiş ve doku kültürü kavramına ilk gerçek girişimi oluşturmuştur [81].

1910-1914 yılları arasında temel hücre, doku ve organ kültürlerinde önemli adımlar atılmıştır. Aseptik koşullarda çalışmalar yapılmış ve 1914 yılında da gerçek anlamda ilk doku kültürü yapılmıştır. 1913 yılında Burrows ve Carrell, hayvan hücrelerinin aseptik koşullar altında düzenli beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süre büyüebileceğini göstermişlerdir. 1952'de insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli (continuous) serisini ortaya konmuştur ki, bu bugün iyi bilinen Hela hücre serisi olmuştur. 1955–1960 yılları arasında Eagle, bugün de kullanılmakta olan temel hücre kültürü vasatlarını hazırlamıştır. 1979 yılında Green ve arkadaşları epidermal hücre kültürleri hazırlamışlardır. Dünya genelinde süregelen çalışmaların devamında 1986'da Martin ve Evans ile arkadaşları fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini izole ederek kültürünü yapmışlar 1992'de Rosenfield ve arkadaşları genetik olarak modifiye edilmiş hücreleri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmaya başlamışlardır. 1998'de de Thomson ve Gearhart ve yardımcıları insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır [81].

1.5.2. Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması

Hücre kültürleri primer doku eksplantlarından, sürekli hücre serilerinden veya kök hücrelerinden türetilir. Primer hücre kültürleri tipik olarak sınırlı bir yaşam süresine sahipken (belli bir bölünme sayısından sonra çoğalma durur), sürekli hücre serileri (hücre soyları) anormal (kanser hücreleri gibi) ya da transformasyona uğratılmış hücre serileridir. Kök hücreler ise vücudumuzda bütün dokuları ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir [80]. Günümüzde kültürler çoğunlukla dokudan ayrıştırılmış olarak hücre süspansiyonlarında yapılmaktadır. Ancak çoğu doku hücreleri süspansiyon ortamda yaşamaya uyumlu değildir ve bölünmek ve çoğalmak için katı bir yüzeye

gereksinim duyarlar. Hücre kültürleri için bu gereksinim plastik doku kültür kaplarının yüzeyi ile karşılanır. Kandan türemiş hücre serileri (lösemi ve lenfoma hücre serileri gibi) süspansiyon besiyerlerinde üremeye eğilimliyken, akciğer ve böbrek gibi solid dokulardan türemiş hücre serileri tutunarak tabaka şeklinde üreme eğilimindedirler. Hücrelerin türlerine göre gereksinimleri farklılıklar göstermekle birlikte çoğu hücreler, kültür kapları kollajen ya da laminin gibi özel ekstrasellüler matriks yapılarıyla kaplanmazsa çoğalmaz ve farklılaşmazlar [82, 83, 84].

Hücre Kültürler: primer hücre kültürleri, diploid hücre kültürü ve hücre soyları olmak üzere üçe ayrılır.

1.5.2.1 Primer Hücre Kültürü

Bir organizmanın dokularından doğrudan hazırlanan kültüre ‘primer kültür’ denir. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücreler, genotip ve fenotip olarak orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içerir. Primer kültürlerin kromozomal anomalileri olmadığından daha normal fenotipleri vardır. Ancak bu hücrelerin deneysel çoğalma imkânları sınırlıdır [85]. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınırlar. Bu işleme subkültür denir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluştururlar. Hücre hatları, hücrelerin orijinali olan dokunun özelliklerine göre değişmek şartıyla çeşitli sayılarda subkültürlere izin verirler [86,87].

Bu hücrelerin kültür kabından alınıp çoğaltılmasıyla elde edilen kültürlere de ‘sekonder kültür’ denir. Böylece elde edilen hücreler asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmayı sürdürürler. Örneğin, fibroblastlar kollajen salgılamaya, embriyonik kas hücrelerinden üretilen hücreler kültür ortamında kas lifleri oluşturarak kendiliğinden kasılmaya, sinir hücreleri aksonlarını uzatarak diğer sinir hücreleriyle sinapslar yapmaya, epitel hücreleri de sağlam bir epitelin özelliklerini taşıyan tabakalar oluşturmaya devam ederler. Primer hücre kültürleri “sonlu” (finite) dir. Yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle, primer hücrelerle belirli sayılarda pasajlama yapılabileceği için deneylerin bu dönemde yapılması çok önemlidir. Primer hücrelerle çalışabilecek pasaj sayısı hücre tipine göre

değişmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonucunda ölümsüz (immortalize) olabilirler, bu durumda, bir hücre soyu (cell line) elde edilmiş olur. Bir dokudan mekanik ya da enzimatik yöntemlerle izole edilen primer hücreler için 4 farklı gelişme aşaması belirlenmiştir:

- a- Hücrelerin dokunun dışındaki in vitro ortama alışmaları
- b- Eksponansiyel çoğalma aşaması
- c- Hücrelerin giderek çoğalma hızının yavaşladığı durum
- d- Hücrelerin yaşlandığı, çok zor bölündüğü ve ölmeye başladıkları aşamadır.

Deneyle eksponansiyel büyüme döneminde planlanmalı, bu hücrelerin bir kısmı dondurularak, ilerideki çalışmalar için saklanmalıdır. Primer hücre kültürlerinde tek bir hücre tipi hakkında elde edilebilecek en iyi bilgiyi edinmek için o hücrenin dokudan diğer hücre tiplerinden ayrılarak izole edilmesi gerekir. Bunun sonucunda oluşan homojen hücre popülasyonu ya doğrudan ya da kültür ortamında (besiyeri, medium) çoğaltıldıktan sonra analiz edilebilir. Farklı hücre türlerini içeren doku süspansiyonundan değişik yöntemlerle ayrılarak (izole edilerek) tipleri belirlenebilir.

Değişik hücre türlerinden oluşan bir dokudan tek bir (uniform) tip hücreleri ayırmak için yapılması gereken ilk işlem, tüm hücreleri bir arada tutan ekstrasellüler matriksi ayırmaktır. Bunun için doku örneği, proteinleri parçalayan tripsin ve kollajenaz gibi proteolitik enzimler ve hücre adezyonunda rol oynayan kalsiyum iyonunu (Ca^{+2}) bağlayan EDTA gibi ajanlarla muamele edilir. Çoğu omurgalı hücreler kültürde sınırlı sayıda bölünmeden sonra hücre ölümü (cell senescence) denilen bir sürece girere bölünmeyi durdururlar. Örneğin, insan fibroblastları kültürde sadece 25-40 kez kadar bölünürler. Bu olay telomerlerin kısalmasına bağlıdır. İnsan somatik hücreleri telomeraz enziminin yapımını durdurdukları için telomerler kısalmakta ve hücrelerin yaşamı da sınırlı olmaktadır. Bu hücrelere telomeraz enziminin katalitik altbirimini kodlayan bir gen katılmasıyla sonsuz çoğalmaları sağlanabilir ve böylece ölümsüz (immortalized) hücre serisi olarak kullanılabilirler [80].

1.5.2.2. Diploid Hücre Kùltürleri

Primer kùltürlerin subkùltürlerinden elde edilir. Tekrarlanan pasajlar sonucu orijinal dokunun karyotipini kaybetmemiş olan hücre dizileri olarak tanımlanır [84,88]. Bu kùltürlerdeki bütün hücreler orijinal olan dokunun % 85 karyotipine sahiptir. Diploid kùltürlerde bazı hücrelerde kromozom tipleri kaybolabilir ve yerine başka bir tip yerleşir. Bu hücrelere pseudodiploid hücreler adı verilir [89].

1.5.2.3. Hücre Soyları

Primer kùltürlerden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar yada virüsler eklenerek oluşturulurlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Primer kùltürden farkları; kùltürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim göstermeleri, çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin az olması, sonsuz çoğalma yetenekleri olarak sıralanabilir. Örnek olarak 3T3 fibroblastlar, L929, CHO, HL60, verilebilir. Hücre soyları, araştırmacılardan, Türkiye de Şap Enstitüsü Hücre Kùltür Koleksiyonu'ndan, Amerika hücre kùltür koleksiyonundan veya National Institute of Health servislerinden elde edilebilir [90].

Araştırmalar herhangi bir kùltürün, devamlı doku kùltürü olabilmesi için en az 70 defa subkùltürünün yapılmış olması gerektiğini göstermiştir [89] .

Yaygın olarak kullanılmakta olan hücre serileri ve köken aldıkları dokular Çizelge 1.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 1. 6 Hücre serileri ve kökenleri [91]

Hücre serisi	Hücre tipi ve kökeni
L 929	fibroblast hücresi (fare)
3T3	fibroblast hücresi (fare)
BHK21	fibroblast hücresi (hamster)
MDCK	epitel hücresi (köpek)
HeLa	epitel hücresi (insan)
PtK1	epitel hücresi (rat)
L6	miyoblast hücresi (rat)
SP2	plazma hücresi (fare)
COS	böbrek hücresi (maymun)
DT40	lenfoma hücresi (civciv)
R1	embriyonik kök hücreler (fare)
HepG2	karaciğer epitel hücresi (insan)
HEK293	böbrek epitel hücresi (insan)
HL60	lösemi (lenfoblastik hücre) (insan)
SH-SY5Y	nöroblastoma hücresi (insan)
H1, H9	embriyonik kök hücresi (insan)
PC 12	kromaffin hücresi (rat)
293	böbrek hücresi (insan), adenovirüsle transforme edilmiş
CHO	over hücresi (hamster)
E14	embriyonik kök hücresi (fare)
T24	mesane epitel hücresi (insan)
S2	makrofaj benzeri hücresi (drosophila)
BY2	farklılaşmamış meristematik hücreler (tütün)

1.5.3. Hücre Kültürlerinin Yapılması

1.5.3.1. Kültürdeki Hücrelerin Gelişme Fazları

İn vitro kültürü yapılan hücrenin morfolojisi in vivo ortamdakine göre oldukça farklıdır. İn vitro olarak çoğaltılmak istenen hücre bu esnada 4 fazdan geçer [92,93].

1.5.3.1.1 Ayrılma Fazı (Dispersiyon)

Direkt olarak insan, hayvan veya kültürde alınan hücreler, normal şekilleri nasıl olursa olsun süspansiyon halinde iken tek tek ya da çok sayıda bir araya toplamış kümeler halinde serbest durumda görünürler [92]. Hücreler protoplazmalarının kontraksiyonu sonucu orijinal şekillerinden farklı olarak yuvarlak hale gelirler. Bu aşama dispersiyon veya ayrılma fazı olarak adlandırılır [92,93].

1.5.3.1.2. Yapışma Fazı

Süspand halde serbest olan yuvarlak hücreler bir katı yüzey ile temas ettiklerinde bu katı yüzeye yapışırlar. Süspand halde olan hücreler, katı yüzeye 37 °C' de 2 saat içerisinde yapışırlar. 24 saat içerisinde hücreler artık yüzeye tamamen yapışmış ve yapısal şekillerini oluşturmuşlardır [92].

1.5.3.1.3. Çoğalma Fazı (Ekspansiyon)

Hücreler, katı bir yüzeye yapıştıktan birkaç saat sonra çoğalma fazına girerler [92]. Çoğalma fazında istisnai durumlar dışında her bir hücreden iki hücre meydana gelir. Kromozom formasyonu olmadan nukleusun ve bunun hemen ardından sitoplazmanın ikiye bölünmesi "amitoz çoğalma" olarak adlandırılır. Bu tip çoğalma, genellikle, az olmakla beraber in vitro çoğalan hücrelerde oldukça sık görülür [92,93]. Deneyler ekspansiyon büyüme döneminde (çoğalma fazı) planlanmalıdır. Bu hücrelerin bir kısmı da dondurulmalıdır. İlerideki çalışmalar için saklanmalıdır [90,94].

1.5.3.1.4. Dejenerasyon Fazı

İn vitro kültürü yapılan ve çoğaltılan hücreler, besiyeri içerisindeki gerekli maddelerin kullanılması sonucunda azalması ya da ortamda aşırı toksik katobolitlerin birikmesi sonucunda bir süre sonra dejenere olurlar [92,93].

1.5.4. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Hücrelerin in vitro şartlarda üretilmeleri ve subkültürlerinin yapılabilmelerinin bulunmasıyla bu alanda geliştirilen çalışmalar hücrelerin üretilmesi daha uygun besiyerlerinin sağlanması ve embriyo ekstraktları, protein hidrolizatları lenfe benzer besiyerlerinin hazırlanmasına yönelmiştir [95,96].

Hücre kültür laboratuvarında en çok kullanılan sentetik besiyeri Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) „dur. EMEM'un bir modifikasyonu olan Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM) kullanılan daha zengin diğer bir besiyeridir. Basit bir besiyeri; dengeli tuz solüsyonu, temel aminoasitler, vitaminler ve diğer besleyici maddelerden oluşur. Besiyeri içerisine hücrelerin gelişmeleri ve çoğalmaları için %5-10, hücrelerinin en düşük seviyede aktivitelerini sürdürüp canlılıklarının devamı için ise %2 oranında hayvan serumu ilave etmek yeterli olmaktadır [95,96]. Medium 199 (M199) ve Raswall Park Memorial Institute (RPMI) hücre kültür laboratuvarlarında kullanılan diğer önemli besiyerleridir [95,96].

Hücrelerin gelişimleri için besiyerlerine % 7,5-10 FBS (Fetal Bovin Serum) eklenirken, metabolik aktivitelerinin devamı için ise % 2 oranında FBS yeterlidir. Genellikle kullanılan serumlar insan veya hayvan serumu olmakla birlikte tercih edilen FBS' dur. Kültür ortamındaki bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek için besiyerine antibiyotikler ilave edilir. Sıklıkla geniş spektrumlu antibiyotiklerin streptomisin, penisilin ve amfoterisin B (fungizone) ya da gentamisin, ampoterisin B ve Nystatin kombinasyonları kullanılmaktadır [95,97]. Kültür ortamı Optimum pH koşulları 7.2 - 7.4 arasında olmalıdır. Hepes genellikle hücre kültürü besiyerinde kullanılmakta olan organik pH tamponudur. Sodyum bikarbonatın pH'yı tamponlama

kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı içerisinde hem HEPES, hem de sodyum bikarbonat bulunduran besiyerleri sadece HEPES bulunan besiyerlerinden daha etkili olarak tamponlanmışlardır [95, 96, 97]. Besiyerleri ve besiyerlerine eklenecek olan bütün maddeler sterilize edilmiş iyonize su ile hazırlanır. Başarılı bir kültür sistemi için kültürde kullanılacak suda minerallerin olmaması gerekir [97]. Hücre kültürü besiyeri çalışma ortamında inorganik tuzların birçok görevi vardır, sodyum, kalsiyum ve potasyum iyonları ile hücrenin osmotik basıncını sağlarlar [80].

İnsan doku ve hücreleri 37°C'de kültüre edilir. Buna karşın canlı vücudunda deri gibi daha düşük ısılarda varlığını sürdüren hücre veya doku kültürleri için 1-2°C daha düşük ısılar kullanılabilir [98, 99, 100]. Genellikle istenen nem oranı %97' dir [98]. Hücrelerin büyümesi için gerekli olan O₂ miktarı bir hayli azdır. Hücre kültürü çalışmalarındaki; O₂ miktarı %1-10 arasında olduğu koşullarda, hücre büyümesi belirgin olarak artmaktadır [98].

1.5.5. Dondurularak saklama

Hücreler sıvı azot içinde -196 °C'de, bu düşük sıcaklığa dayanacak özel plastik tüplerya da cam vialler içinde saklanır. Hücreler, büyüme çözeltileri % 10–20 serum ve % 5-10 gliserol ya da DMSO içeren bir çözelti içine alınarak dondurulurlar [91,95]. DMSO çok etkin bir kriyoprotektan madde olup, özellikle fibroblast benzeri hücreler ve lenfositler başarılı bir şekilde dondurulmaktadır. Gerekirse kriyoprotektan maddeler dondurma ve çözme işlemleri sırasında suyu bağlayarak hücre içerisindeki elektrolit miktarını ve mevcut suyun buz kristallerine dönüşmesini azaltır [95,97].

1.5.6. Dondurulmuş Hücrelerin Çözünmesi

Sıvı azot tankından çıkarılan kriyötüpler daha önceden hazırlanmış olan 37 °C de su banyosuna direk olarak daldırılır ve kolayca erimesi için çalkalanır. Çözünme olayı yaklaşık olarak 40- 60 saniye içerisinde gerçekleşir. Su banyosundan çıkarılan kriyötüplerin etrafı %70'lik alkol ile iyice silinir. Kriyötüplerin kapağı açılır. Sonra

içindeki çözülmüş hücre süspansiyonu, pastör pipeti veya bir şırınga yardımıyla alınarak Ph'sı 7, 2 olan besiyerine konulur. Kriyoprotektan maddenin ortamdaki atılması için kültürün besiyeri ertesi gün değiştirilmelidir. Ya da kriyotüpteki hücre süspansiyonu bir santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine hücre canlılığı açısından oldukça önemli olduğu için bekletmeden 10 ml kadar üretim besiyeri konulur ve santrifüj edilir. Üstteki sıvı uzaklaştırılır. Altta kalan hücre çökeltisi hücre besiyeri ile süspansiyon edilerek inkübasyona bırakılır [95,97].

1.6. Sitotoksikite ve Değerlendirilmesi

Hücre canlılığı, bir örnekteki canlı hücrelerin sayısı olarak, hücre proliferasyonu ise, bir kültürde bölünen hücrelerin sayısının belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Canlı hücre sayısı ve hücre proliferasyonunun doğru ve hızlı tesbiti, in vitro ve in vivo çalışmaların deneysel aşamalarında önemlidir. Canlı hücre sayısını belirlemede en çok tercih edilen yöntem, tripan mavisi ile otomatik hücre sayım cihazında sayım yapılmasıdır. Hücre proliferasyon yöntemleri genellikle hücre biyolojisinde çoğalma faktörlerini, sitokinleri ve ortam bileşenlerini çalışmak için sitotoksik ajanları ve lenfosit aktivasyonlarını gözlemlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Proliferasyonu ölçmek için kullanılan yöntemler genellikle plazma membranı permeabilitesindeki değişimler üzerine kurulmuştur. Bu yöntemlerde, hücreler irreversibl olarak hasara uğrattırılır, plazma membranı ise hasar görmeden kalır. Bundan dolayı bu yöntemler, hücre hasarının tesbitinde önemli bir yer oluşturmaktadır. Ölü hücreler çeşitli tetrozolyum tuzlarını metabolize etme yeteneğine sahip değildirler. Hücrelerin metabolik aktiviteleri azaldığında hücre hasar ve ölümün çok geç basamaklarında, MTT, XTT, WST-1 gibi çeşitli kolorimetrik yöntemler kullanılmaktadır. Kolorimetrik yöntemlerin hücre kültüründe herhangi bir faktöre bağlı indüklenmiş sitotoksikite kantitasyonunda 24-96 saatlik döngüde çok hassas oldukları bilinmektedir. Hücre aracılı sitotoksikiteyi ölçmede efektör ajanlar, hedef hücrelere bağlanarak aktive olmaktadır. Bu aktivasyon, efektör hücre tarafından oluşturulan formazan kristallerindeki üretim miktarındaki artış ile sonuçlanmaktadır. Bu da, hedef hücre ölümünden kaynaklanan, azalmış

formazanı maskeleyemeyi hedeflemektedir. MTT, XTT, WST-1 genel olarak metabolik aktiviteyi ölçen testlerdir.

Canlı yani metabolik olarak aktif hücreler, tetrazolyum tuzlarını formazan bileşiklerine indirgemektedirler. Bundan dolayı tetrazolyum bazlı kolorimetrik yöntemlerle, hücre canlılığı ölçülebilmektedir [101].

1.7. Apoptoz

Apoptoz pek çok fizyolojik ve patolojik durumda görülen, fizyolojik hücre fonksiyonlarının geri dönüşümsüz kaybı olarak da tanımlanabilen programlanmış hücre ölümüdür [102]. 1920 yılında hücre ölümüyle ilgili ilk olarak nekroz tanımlanmıştır ve ilk kez Kerry, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında iskemiye (oksijen eksikliği) maruz kalmış dokunun çevresinde nekrozdaki farklı bir hücre ölümü gözlenmiştir ve bu ölüm çeşidine ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamında kullanılan 'apoptozis' adı verilmiştir [103]. Apoptoz embriyonik gelişim sırasında parmakların ayrılmasından sindirim sisteminin yapılına ve immün sistem düzenlenmesine kadar bireyin yaşam sürecinde karşılaşılan bir olaydır.

1.7.1. Apoptoz Ne İşe Yarar?

Apoptotik hücreler organizmada bazı doku ve hücrelerde sürekli oluşmakta ve bu süreç ömür boyu devam etmektedir. Böylece apoptozis ve yeniden yapım anlamına gelen mitozis dokularda doku iç dengesini oluşturmak üzere dinamik bir denge şeklinde devam etmektedir. Bu doku ve hücrelere örnek olarak ince bağırsaklar, deri, timus, uterus, beyin ve göz gösterilebilir [104, 105, 106, 107].

Apoptoz çok hücreli canlıların gelişimi esnasında görülür. Kurbağaların metamorfozisi sırasında kuyruklarının kaybolup yetişkin forma geçmesi ve kuyruktaki hücrelerin apoptozisle ölümlerine örnek olarak verilebilir. Yine insan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelere, buradaki hücrelerin apoptozisle ölmesine paralel olarak kaybolduğu düşünülmektedir [108,109].

1.7.2. Apoptozun Morfolojisi

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoziste asıl morfolojik olay nükleusların (çekirdekçik) yoğunlaşması ve sonra parçalara ayrılmasıdır [110]. Normalde bir hücrede ard arda gerçekleşen yedi kırılma tamir edilirken, apoptozis sırasında 300000 kırılma olur ve hücre onarımı yapılamaz [111,112]. Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücre küçülmeye başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı erimeye başlar. Bu olayları takiben çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır [103,113]. Apoptotik hücrelerin DNA'sı agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağına (ladder fosmasyonu) benzer ve bu apoptoz için karakteristik bir görünüm sağlar [103, 114, 115].

1.7.3. Apoptozisin Aşamaları

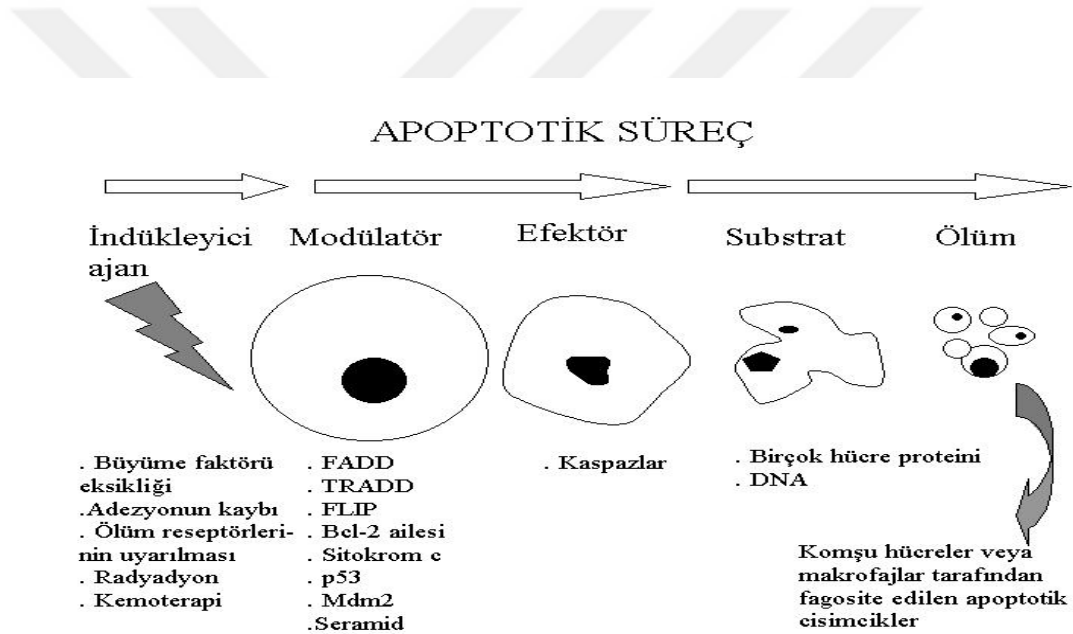
- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin saptanması
- Sitokrom c' nin saliverilmesi
- Apoptozom oluşması (Sitokrom c + Apaf-1+ kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelin değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfotidilserinin hücre mebranın iç yüzeyinden dış yüze transloke olması
- DNAaz' ın aktivasyonu sonucu DNA' nın fragmentasyonu
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi [116].

1.7.4. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptozu iyi anlamak için klasik hücre ölümü olarak da bilinen nekrozu iyi anlamak ve bunun için iki ölüm şeklinin karşılaştırılması gerekmektedir. Apoptozis hem hastalıkta hem de sağlıkta görülen, hücrelerin proliferasyonlarını kontrol altında tutulmasını sağlayan programlı hücre ölümüdür. Aynı zamanda apoptoz pek çok hastalık prosesinin patogenezinde ve neoplastik hücrelerinde sistemik terapiye cevapta merkezi bir elementtir [117].

Apoptoz, nekroz, otofaji, anoikis ve mitotik katastrof gibi programlı veya indüklenen hücre ölümleri tanımlanmış olmasına rağmen, içlerinde sistematik olarak en iyi çalışılanı, apoptozisin moleküler çalışabilirliği olmuştur. Apoptoziste hücre küçülür, yoğunlaşır, çevreyle olan ilişkisini kaybeder. Mitokondri veya diğer organellerde şişme olmaz, lizozomlar (intihar kesecikleri) sağlam kalır [102].

Nekrozisde hücre içine fazla sıvı girmesi sebebiyle hücre şişer ve plazma membranı bütünlüğü kaybolur. Dolayısıyla plazma membranı hasar gördüğü için, hücre içeriği dış ortama verilmesi sonucu inflamasyon uyarılır. Buna karşın apoptotik hücre membranı intak olduğu için, membranlar hasarlanmadan komşu hücre ve makrofajlar tarafından fagosite edilir ve inflamasyon riski oluşmaz [116].



Şekil 1. 7. Apoptotik süreç [116]

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi bünyesinde bulunan Keratokonus ve Refraktif Cerrahi Merkezi'nde Keratokonus tanısı konulan ve korneal çapraz bağlama (CCL) tedavisi kararı verilen hastalardan, tedavi esnasında rutin olarak soyulan ve atılan kornea epitel dokusu kullanılmıştır. Yine aynı merkezde kırma kusuru tedavisi (excimer lazer tedavisi) olmak üzere başvuran hastalardan rutin olarak soyulan ve atılan kornea epitel dokusu kullanılmıştır.

UV Maruzat Cihazı (Nehir Biyoteknoloji UV-Exposer UVX-290-400), Laminar flow kabin(ESCO class II BSCLaminar Flow Cabinet, Labor İdam, Türkiye), soğutmalı santrifüj (ROTINA 380R Hettich, Almanya), inverted mikroskop (Leica DM6000B, İsveç), DAPI filtresi, FITC floresan filtresi_vorteks, elisa plate okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader Power Wave XS2), karbondioksitli etüv (Binder CB150), hassas terazi (Mettler toledo MS204), 24 well plate (BD, USA), 12 well plate (BD USA),25 cm²'lik hücre kültür flasksı (BD, USA),0,2 µm filtre (Sartorius),15 ml santrifüj tüpü (Nunc, Almanya), mikropipet (20µm-100µm-1000µm Scaltec, Almanya), disposable pipet (2ml, 5ml,10ml) çeşitli cam malzemeler kullanılmıştır.

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail), fetal bovin serum (FBS, Biological industries, İsrail), penicillin-streptomycin (antibiyotik, Biological Industries, İsrail), tripsin-EDTA Solution (Biological Industries, İsrail), PBS (fosfat buffer saline) (Sigma, ABD), 'Corneal Cell Epithelium with Growth Supplement-GIBCO', 'Corneal Epithelial Cell Basal Medium-ATCC', 'Keratinocyte-SFM serum-free medium' besiyerleri amniyotik membran, Tip IV - Tip I Kollajen ve Hiyaluronik asit gibi yüzey modifiye edici ajanlar, kollajenaz, CaCl₂, "Hanks "Balanced Salt Solution", WST-1 (Roche, Almanya), Hoechst 33342(Serva, İsrail) and propidium iodide (PI, Serva, İsrail), Etanol (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

2.1.1. Hücre UV Maruzat Cihazı Geliştirilmesi

Nehir Biyoteknoloji firması cihaz tasarımında geniş spektrumlu iki UV ampülü üzerine bir UV-A filtresi ve bir UV-B filtresi yerleştirmiştir. Kullanıcının UV ışınımdan korunması için ve cihaz içerisinde UV ışığın i duvarlardan yansımalarını engellemek için eloksallı kaplı alüminyum plakalar ile cihazı oluşturmuştur. Eloksallı kaplama ile cihazın elektrik kaçaklarının da önüne geçilmiştir. Hücrelerin UV ışığa olan uzaklığı değiştirilerek farklı uzaklıklardan farklı Şiddetlerde ışık sağlanacaktır.



Şekil 2. 1. UV Maruzat Cihazı, Nehir Biyoteknoloji UV-Exposer UVX-290-400

2.2. Kornea epitel hücre örneklerinin toplanması

Projenin ilk dönemi sürecinde keratokonuslu epitel dokusu ve normal epitel dokusu toplanarak primer hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. Korneaya ait primer epitel hücre kültürünün gerçekleştirilebilmesi amacıyla, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi bünyesinde bulunan Keratokonus ve Refraktif Cerrahi Merkezi'nde Keratokonus tanısı konulan ve

korneal çapraz bağlama (CCL) tedavisi kararı verilen hastalardan, tedavi esnasında rutin olarak soyulan ve atılan kornea epitel dokusu alınmıştır.

Kontrol grubu hücrelerinin oluşturulabilmesi amacıyla, yine aynı merkezde kırma kusuru tedavisi olmak üzere başvuran hastalardan rutin olarak soyulan ve atılan kornea epitel dokusu alınmıştır. Bu sebepten kırma kusuru tedavisi (excimer lazer tedavisi) adayları keratokonus olmayan kontrol grubu olarak alınıp çalışılmıştır. Hastalardan alınan kornea epiteli dokularının kullanılabilmesi için gereken izinler alınmış olup, etik kurulu raporu EK-1’de verilmiştir.

Alınan dokular soğuk taşıma kabında hücre kültürü besiyeri içerisinde Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarı’na getirilmiş ve burada hücre kültürasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

2.3. Kornea epiteli hücre kültürünün gerçekleştirilmesi

Primer kültürler, doğrudan dokudan elde edilen kültürler olup hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikro-çevreyi sağlayan besleyici solüsyonlar içerisinde in-vitro şartlarda üretilmesine dayanır.

Bu amaçla, hastadan alınan kornea örneklerinin birincil hücre kültürlerinin oluşturulabilmesi için keratokonuslu ve normal bireylerden alınan epitel dokusu örnekleri, hücre kültürü besiyeri içerisinde (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium-DMEM) laboratuvara getirilip laminar flow kabin içerisinde petri kabına konulmuştur. Üzerine 1,5 mL Tripsin EDTA eklendikten sonra, enzim içerisinde steril bistüri ile küçük parçalara ayrılmıştır. 10 dakika enzim içerisinde 37°C’de bekletilmiştir. Bu süre sonunda petriden falkona alınarak 3000 rpm’de 3 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant kısmı atılıp dipte kalan pellet üzerine 6 mL taze besiyeri eklenmiştir. 2 ayrı flaska ekim yapılarak, iki günde bir hücrelerin çoğalıp çoğalmadığı kontrol edilmiştir.

Kornea epitellerinin kültürasyon işlemleri boyunca farklı besi ortamlarında çoğaltılması denenerek hücrelerin kültür kaplarına en iyi şekilde tutunduğu besiyeri ile çalışmalara devam edilmiştir. Çünkü kornea epitel hücrelerinin petri kabı zeminine tutunmaları pek kolay olmamıştır. Bu amaçla denenen besiyerleri; ‘Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium-DMEM’, ‘Corneal Cell Epithelium with Growth Supplement-GIBCO’, ‘Corneal Epithelial Cell Basal Medium-ATCC’, ‘Keratinocyte-SFM, serum-free medium’ besiyerleri ve hatta bunların kombinasyonları şeklindeki kültür ortamları denenmiş, en uygun olan ortamın hangisi olduğuna karar verilmeye çalışılmıştır.

Keratokonumlu epitel dokusu ve normal epitel dokusu ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında en başarılı sonucun “Keratinocyte-SFM, serum-free medium” ile alınabileceği belirlenmiştir. Bu besiyeri ile birlikte “Corneal Epithelial Cell Basal Medium-ATCC” de kullanılabilir olarak belirlenmiştir.

Bunun yanında farklı tekniklere de başvurulmuştur örneğin; bir amniyotik membran kullanılarak, bu membranın petri kabı zeminine yerleştirilmesi ve daha sonra hücre ekiminin yapılması şeklinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Amniyotik membran kullanımı dışında hücre kültür kaplarını modifiye etmek amacıyla Tip IV - Tip I Kollajen ve Hiyaluronik asit gibi yüzey modifiye edici ajanlar kullanılmıştır. Bunlar ile yapılan çalışmalarda hücrelerin plate üzerine ekimi gerçekleştirilmeden önce, zeminin bu malzemelerle yüzeyleri kaplanarak kurutulmaya bırakılmıştır. Bu yöntemle hücrelerin başarılı şekilde zemine tutunup yapışmaları sağlanmıştır.

Devam eden kültürasyon işlemleri süresince pek çok kontrollü deney yapılmıştır. Hastadan alınan epitel doku örnekleri DMEM ile laboratuvara getirildikten sonra üzerindeki medium dökülüp kollajenaz (1mg/mL) ve CaCl₂ (1mg/10mL) ilave edilmiştir ve 37°C’de 2,5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda üzerine Tripsin-EDTA eklenerek 15 dakika etüvde bekletilmiştir. Daha sonra üzerine mevcut hacmin iki katı olacak şekilde Fetal Bovine Serum (Biological Industries) ilave edilerek santrifüjlenmiştir (3000 rpm 3 dk) ve bu şekilde üzerine taze besi yeri ile kültürasyon işlemleri denenmiştir. Kollajenaz kullanılarak yapılan denemeler devam

ederken ara ara hücrelerin kollejenazda bekletilme süreleri kısaltılmış ve sonrasında hücrelerin herhangi bir enzim (kollejenaz veya tripsin) muamelesi olmaksızın sadece pipetaj yapılarak- direkt kültür kaplarında üretilmeleri sağlanmıştır. Bu yolla hücrelerin plate zeminine daha hızlı şekilde tutundukları görülmüştür.

Kültürasyon işlemleri esnasında yaşanan en önemli sorunlardan biri de istenmeyen kontaminasyon durumlarıyla karşılaşılması olmuştur. Bunun başta gelen sebebi olarak dokuların alındığı hastane -Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Atatürk ve Araştırma Hastanesi- ile dokuların soğuk zincir yoluyla getirildiği yer olan Kırıkkale Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarına ulaşmaya kadar geçen sürede yaşanan kontaminasyon olasılığıdır. Fakat bu sıkıntı, kullanılan besi yeri içerisinde antibiyotik miktarının artırılması yoluyla ve içerisindeki besiyerinin değiştirilmesiyle aşılmıştır.

Bu denemeler neticesinde; keratokonus ve normal epitel hücrelerinin primer kültürlerinin pasajlanmasına gerek olmadığına ve doğrudan ilk hücre yayılımlarından çalışmalarına devam edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmalar epitel hücrelerinin primer kültürde homojen bir biçimde plate'in yüzeyine yayılabildiği ve yüzeye tek tabaka şeklinde yapıştığını göstermiştir. Dolayısıyla laboratuvara getirilen hücrelerin santrifüj aşamasından sonra plate'lere ekilip bu hücrelerin flask zeminine düzgün şekilde tutunup epitel paterni oluşması sağlanmıştır. Bundan sonra yapılacak olan deneylerde de bu süreç uygulanarak devam edilecektir.

2.4. Hücre Sayımı

Hücre sayımı hemositometri ile yapılır. Santrifüj sonrasında tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1ml(%10FBS ve%1 antibiyotik DMEM/F-12 medyum eklenir. Pipet yardımıyla pellet ve DMEM/F-12 süspansedilir ve süspansedildikten sonra 10µl karışımdan alınıp ependorf tüpe koyulur. Üzerine 10µl tripan blue eklenir. Karışım homojenize edilir. Karışımdan mikropipetle 10µl alınıp hemositometri

lamına koyulur. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapılır. Tripan blue ölü hücrelerin içine girme özelliğindedir ve bu nedenle sayım yaparken koyu mavi gözükken hücreler ölü, açık renkteki parlak hücreler canlı olarak sayılır.

2.5. Kornea epitellerinde hücre canlılık ve sitotoksite testinin uygulanması

Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri olup; bunun için hücreler çoğunlukla bir kolorimetrik substrat ile inkübe edilir (MTT, XTT, INT, WST-1 gibi). Bu çalışmada WST-1 kolorimetrik substratı kullanılarak hücre canlılığı belirlenmiştir. Bu madde kullanılarak, canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla oluşturduğu reaksiyonda, çözeltilerde bulunan tetrazolyum halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristallerini oluşturur. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir ki buda hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir.

WST-1 testi için 24 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucuğa 10.000 hücre düşecek şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. Besiyeri olarak fenolredsiz DMEM kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µL fenolredsiz DMEM eklenerek 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Plate' in zeminine tutunan hücelere 15 µL WST-1 çözeltisi ilave edilerek 37 °C'de 4 saat karanlıkta (alüminyum folyo ile sarılı halde) etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre canlılığının tespiti için 24 kuyucuklu platelerin absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 440 nm'de okutulmuştur. WST-1 toksite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez.

2.6. Kornea epitellerinde ikili boyama metodu ile apoptoz/nekrozun tayin edilmesi

İkili boyama metodunda kullanılan Hoechst 33342 floresan boyası canlı hücrelerin zarlarından geçerek çekirdeği boyar ve floresan mikroskopta DAPI filtresi ile çekirdeklerin mavi görünmesini sağlar. Ayrıca çekirdek morfolojisinin değerlendirilmesi de bu yöntemle anlaşılır. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla çekirdeği görünür hale gelir.

İkili boyama metodunda kullanılan, ölü ve/veya plazma membranı hasarlı hücrelerin zarlarından geçerek çekirdeklerin floresan ışık altında kırmızı görünmelerini sağlayan bir diğer boya propidyum iyodür (PI) boyasıdır. Bu boya membranı sağlam olan (canlı) hücreleri boyaması için canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Sağlıklı ve apoptotik hücre çekirdekleri mavi renkte olup FITC floresan filtresi ile görüntülendiğinde yeşil görünürlerken, nekrotik hücreler PI boyası ile boyandıklarından kırmızı görünürler.

2.6.1. İkili Boyama Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Ribonükleaz A'dan 1mL PBS'de 10 mg RNA; Hoechst (33342) 1 mL PBS'de 200 mikrogram; Propidium Iodide 1mL PBS'te 100 mikrogram olacak şekilde hazırlandıktan sonra çalışma solüsyonunun içeriği: 10 mL PBS içine RNaz stoktan 100 mikrolitre, Hoechst stoktan 500 mikrolitre, Propidium Iodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlanmıştır.

Yapılan çalışmada yine 20 farklı hastadan alınan normal kornea epitel hücreleri ve keratokonuslu kornea epitel hücreleri, 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Keratinocyte-SFM, serum-free medium kullanılarak ekim yapılmıştır. Hücreler plate zeminine tutunduktan sonra, ikili boyama testine tabi tutulmuştur. Her kuyucuk içerisine 50 mikrolitre kadar ikili boyama çalışma solüsyonundan damlatılarak 15 dakika 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuğun floresan mikroskopta DAPI filtresi ışığı altına apoptoz ve nekroz görüntüleri fotoğraflanmıştır.

2.7. UV Işınlarnının Uygulanması

Literatürde UV-A ve UV-B uygulama dozları ile ilgili çeşitli bilgiler mevcuttur. Ancak, bizim çalışmamızda uyguladığımız şekilde kültür ortamına tek kat olarak yayılmış epitel hücrelerine yapılmış benzer bir UV uygulaması yoktu. Bu nedenle uygulanacak olan UV' nin hücrelerde aşırı zarar oluşturacak kadar yüksek veya hiçbir etki oluşturmayacak kadar düşük olmaması için UV-A ve UV-B 'nin optimal dozları bulunmaya çalışıldı.

UV ışınının epitel hücreleri üzerindeki etkisi ise apoptoz/nekroz oranı tayini ile tesbit edildi. Çalışmada 6 grup yapılması planlandı (Çizelge 2. 1.) Ancak, bu dönemde sadece 4 grupta ölçüm yapıldı. UV uygulaması yapılmayan kontrol grubu sadece canlılık testleri için çalışıldı.

Çizelge 2. 1. Çalışma grupları

Keratokonus	UV-A	UV-B	UV YOK
Lazer (Normal Epitel)	UV-A	UV-B	UV YOK

UV-B için 50 mJ/cm² dozundan başlandı. Daha sonra 100, 150 ve 200 mJ/cm² dozlarında UV-B uygulanarak aynı testler tekrarlandı.

UV-A uygulaması için yine doz optimizasyonu yapılarak en uygun UV doz miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre, artan dozlarda UV-A verilerek hücrelerin % canlılık oranlarına bakılmıştır. 500, 1000, 1500 ve 2000 mJ/cm² dozlarında UV-A uygulanarak aynı testler tekrarlandı.

UV-A ve B ışınlarına maruz bırakılacak olan hücre grupları, bir gün öncesinden 12 kuyucuklu plakalara ekilerek kornea epitel hücrelerinin zemine tamamen tutunması sağlandı. Her bir kuyucuğa normal epitel hücreleri ve keratokonussu hücre grupları için 7x10⁵ hücre ekildi. 24 saat sonra, zemine tutunan epitel hücreleri, "Hanks

Balanced Salt Solution” ile yıkama işlemine tabi tutuldu ve ölçüm yine bu solüsyon varlığında gerçekleştirildi.

Kültür solüsyonu içindeki Fenol kırmızısının UV bloke edici etkisi nedeni ile hücreler UV uygulanmadan hemen önce Hanks“ Balanced Salt Solution ile yıkanarak bu solüsyon içinde tutuldu. UV uygulaması sonrası 24 saat boyunca inkübe edilecek hücreler, tekrar başlangıç besiyeri ortamına alındı (Keratinocyte Serum FreeMedium-GIBCO).

2.8. UV Uygulanmış Kornea Epitellerinde Canlılık ve Apoptoz/Nekroz Tayini

Keratokonuslu ve normal kornea grubu epitel hücreleri kültür ortamında 24 saat bekletildikten sonra UV-A veya UV-B uygulamasından geçirildi. Daha sonra tekrar kültür ortamına alınarak 24 saat daha etüvde inkübasyona bırakıldı. Belirlenen sürede etüvde bekletilen hücelere canlılık(sitotoksite), apoptoz ve nekroz tayini yapıldı.

2.8.1. WST1 ile Sitoksisitenin Belirlenmesi

Keratokonuslu ve normal kornea epitel hücreleri 150 mJ/cm² dozunda UV-B veya 2000 mJ/cm² dozunda UV-A ışınına maruz bırakıldıktan sonra 24 saatlik inkübasyona alındı. Daha sonra hücre canlılığının test edilmesi amacı ile sitotoksite deneyleri yapıldı (WST1).

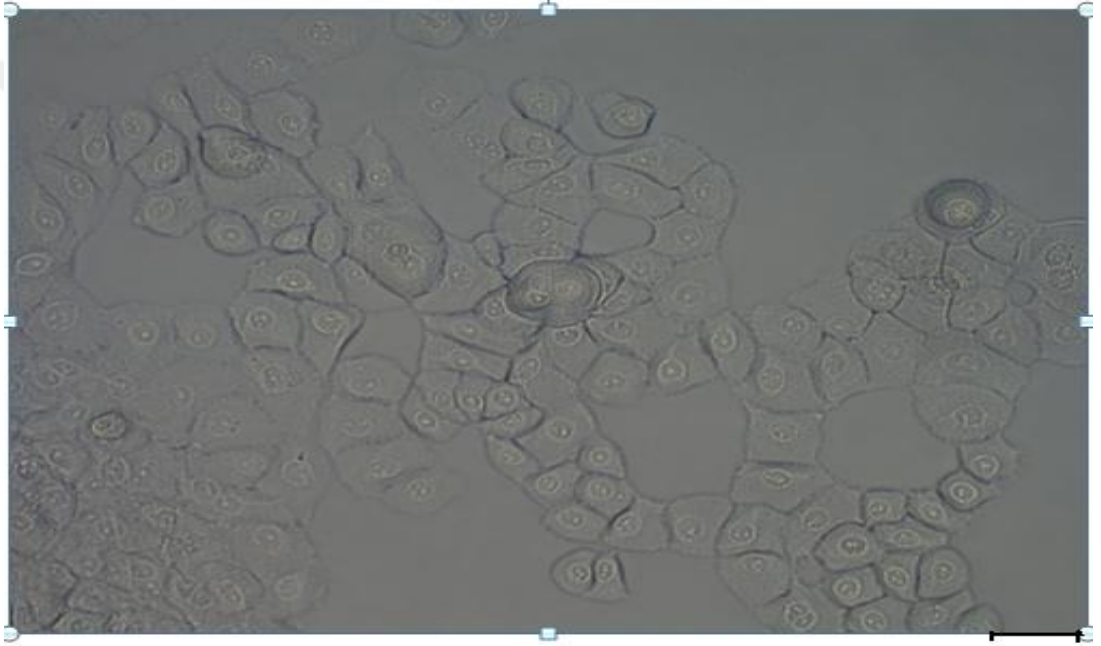
2.8.2. İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

Keratokonuslu ve normal kornea epitel hücreleri 150 mJ/cm² dozunda UV-B veya 2000 mJ/cm² dozunda UV-A ışınına maruz bırakıldıktan sonra 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Daha sonra keratokonus ve normal kornea epitel hücrelerine, apoptoz ve nekroz tayini için ikili boyama protokolü uygulandı.

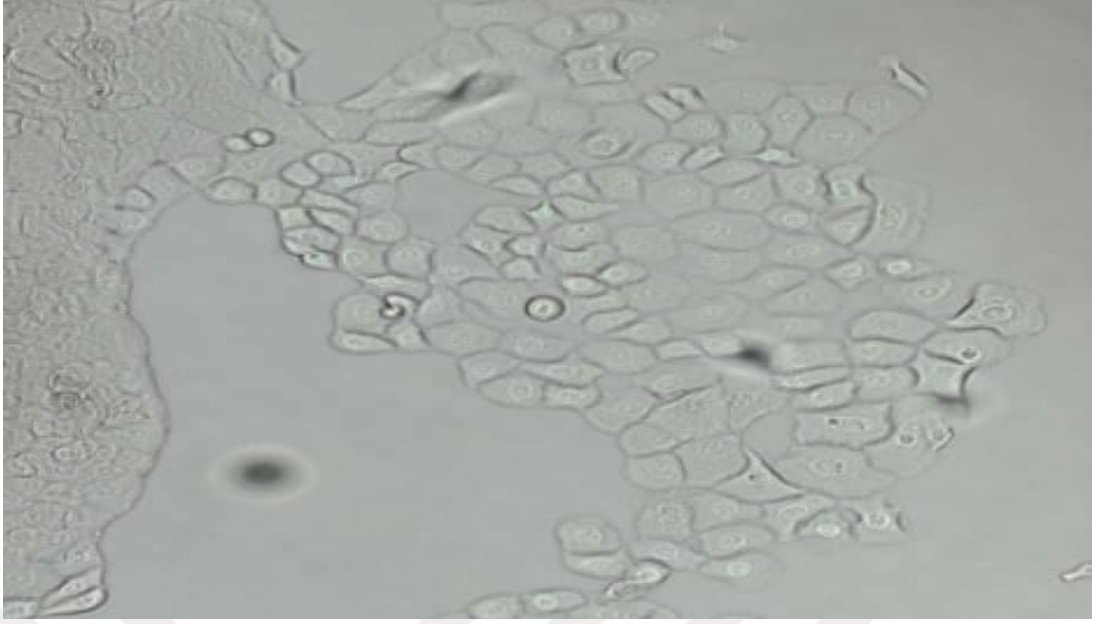
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Kornea epitel hücresinin morfolojik görüntülerinin kaydedilmesi

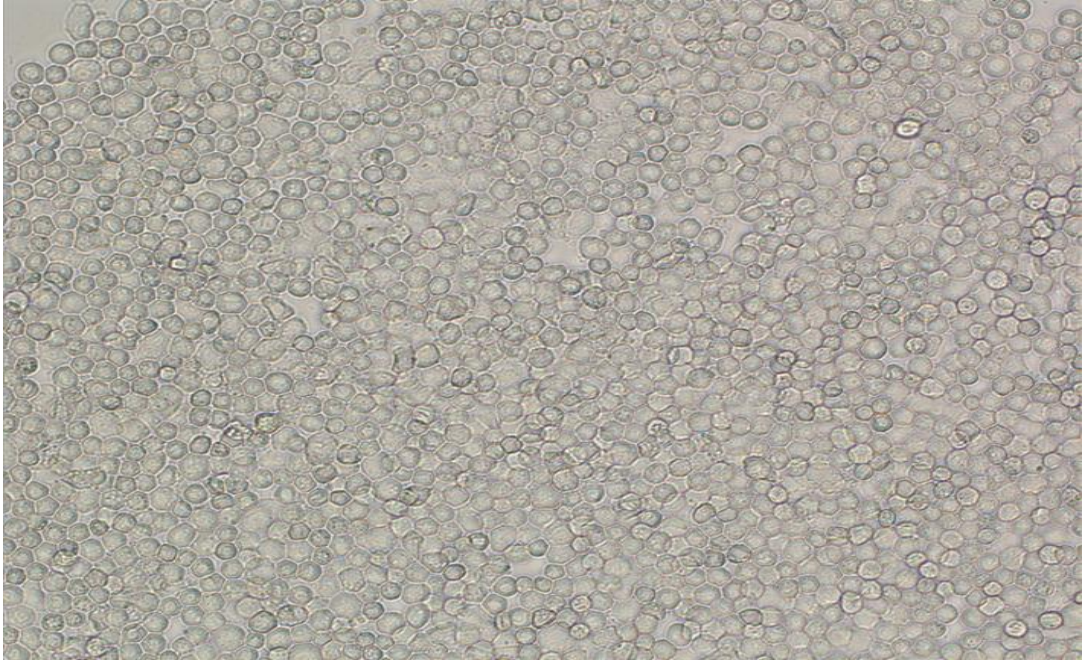
Hastalardan alınıp laboratuvara getirilen keratokonuslu hastaların kornea epitelleri kültür ortamına alındıktan 1 hafta sonra morfolojik görüntülerinin fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. 20 ayrı hastadan keratokonuslu ve normal epiteller olmak üzere farklı morfolojilerde görünüm elde edilmiştir. Bunların yanında Keratokonuslu hastalardan alınan epitel dokudan atipik görüntüde hücrelerle karşılaşmıştır.



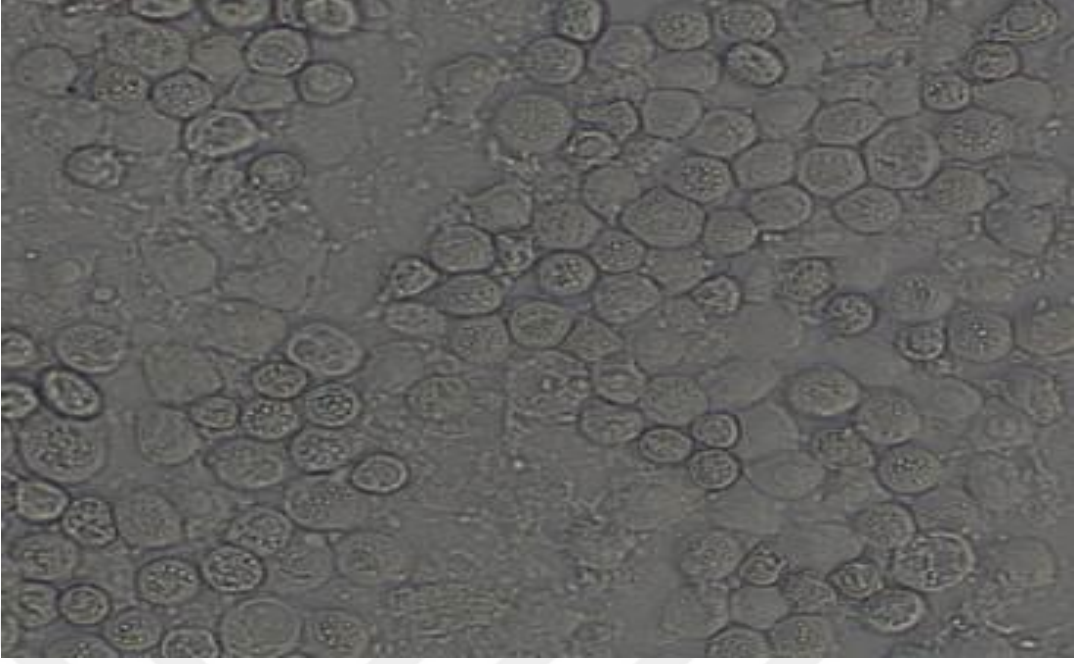
Şekil 3.1. Keratokonus epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Corneal epithelial cell basal medium, ATCC); Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir



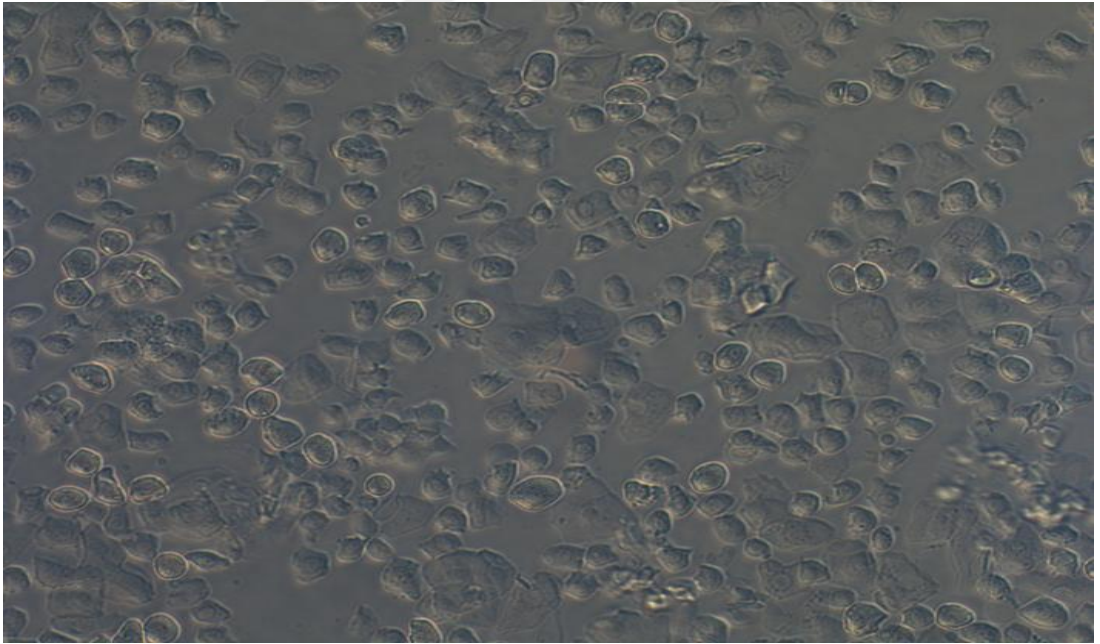
Şekil 3. 2. Normal epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Corneal cell basal medum, ATCC); Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



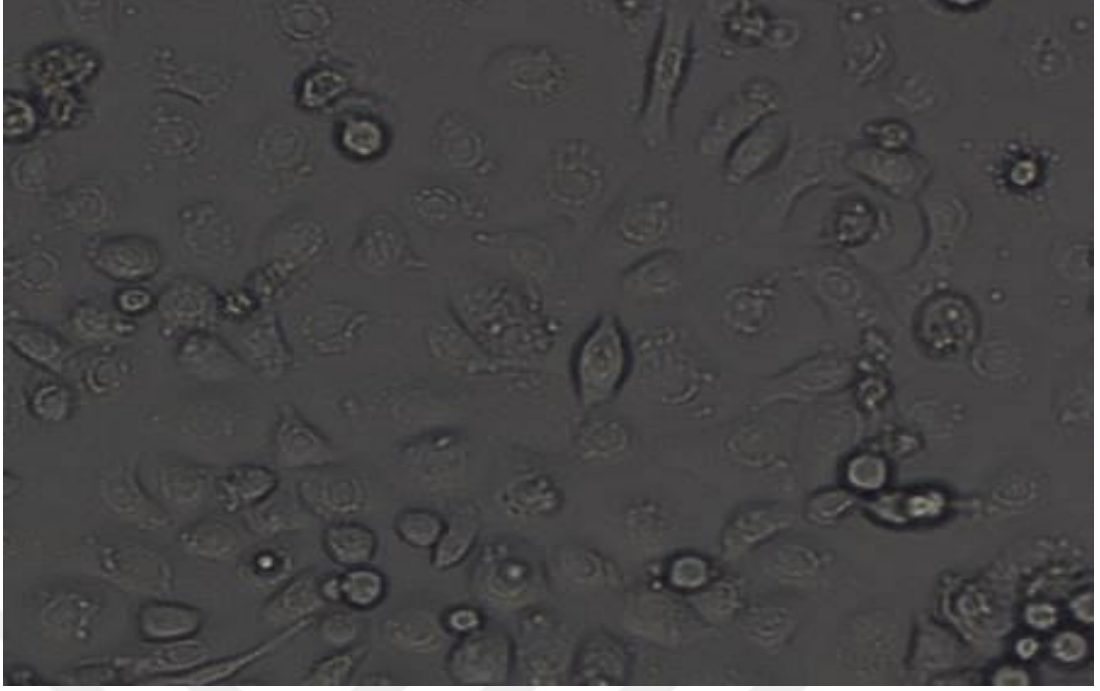
Şekil 3. 3. Keratokonus epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Keratinocyte-SFM serum free medium); Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



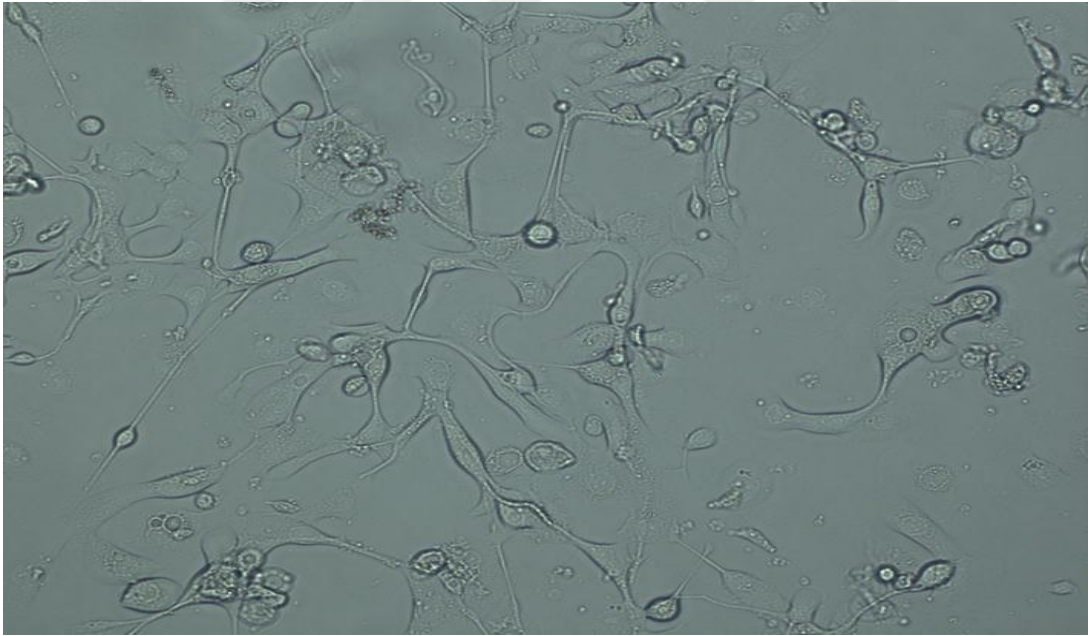
Şekil 3. 4. Normal epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü(Keratinocyte-SFM serum free medium);Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 3. 5. Keratokonus epitel hücrelerinin morfolojik görüntüsü (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM); Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 3. 6. Keratokonus epitel hücrelerinin Tip IV kollajen modifikasyonlu yüzeyde elde edilen morfolojik görünüşleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 3. 7. Keratokonus hücrelerinin atipik görüntüsü; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

3.2. Kornea Epitellerinde Canlılık ve Sitotoksosite Testinin Sonuçları

Bu testte, 20 farklı hasta için ayrı ayrı çalışılıp çıkan sonuçlar kaydedilmiştir. Çizelge 3. 1. ve Çizelge 3. 2.'de ' de üç tekrarlı olarak çalışılan her bir hastanın WST-1 testi sonuçlarının ortalama absorbans değerleri verilmiştir. Kaydedilen ölçüm sonuçları, UV uygulanmadan önceki hücre canlılık değerleri olup sonraki çalışmalar için baseline niteliğinde olacaktır.

Çizelge 3. 1. Keratokonuslu kornea epiteli primer hücre kültüründe, WST-1 testi ile hücre canlılığı seviyesi absorbans değerleri

keratokonus kornea epiteli				
1.hasta	2.hasta	3.hasta	4.hasta	5.hasta
2,105	2,123	2,122	2,134	2,184
6.hasta	7.hasta	8.hasta	9.hasta	10.hasta
2,11	2,119	2,139	2,142	2,152
11.hasta	12.hasta	13.hasta	14.hasta	15.hasta
2,14	2,138	2,146	2,128	2,163
16.hasta	17.hasta	18.hasta	19.hasta	20.hasta
2,131	2,197	2,185	2,136	2,138

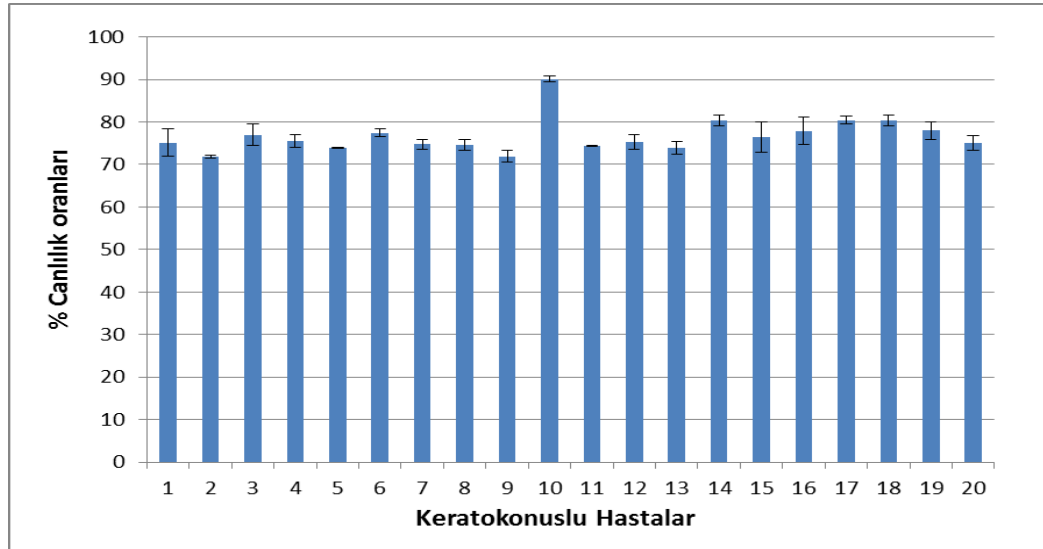
Çizelge 3. 2. Normal kornea epiteli primer hücre kültüründe, WST-1 testi ile hücre canlılığı seviyesi absorbans değerleri

normal kornea epiteli				
1.hasta	2.hasta	3.hasta	4.hasta	5.hasta
2,802	2,953	2,758	2,825	2,952
6.hasta	7.hasta	8.hasta	9.hasta	10.hasta
2,725	2,836	2,865	2,98	2,388
11.hasta	12.hasta	13.hasta	14.hasta	15.hasta
2,878	2,842	2,901	2,647	2,832
16.hasta	17.hasta	18.hasta	19.hasta	20.hasta
2,736	2,732	2,722	2,741	2,851

Aşağıdaki Çizelge 3. 3.'de keratokonus hastalarında saptanan % yüzde canlılık değerleri verilmiştir ve sonrasındaki grafikte bu sonuçlar görsel hale getirilmiştir.

Çizelge 3. 3. Keratokonus hastalarından alınan epitel dokuların primer kültür hücrelerinin WST-1 testi ile ölçülen % canlılık değerleri

1.hasta	2.hasta	3.hasta	4.hasta	5.hasta
75,12491	71,89299	76,93981	75,53982	73,98374
6.hasta	7.hasta	8.hasta	9.hasta	10.hasta
77,43119	74,71791	74,65969	71,87919	90,11725
11.hasta	12.hasta	13.hasta	14.hasta	15.hasta
74,35719	75,22871	73,97449	80,3929	76,37712
16.hasta	17.hasta	18.hasta	19.hasta	20.hasta
77,88743	80,41728	80,27186	77,92776	74,99123

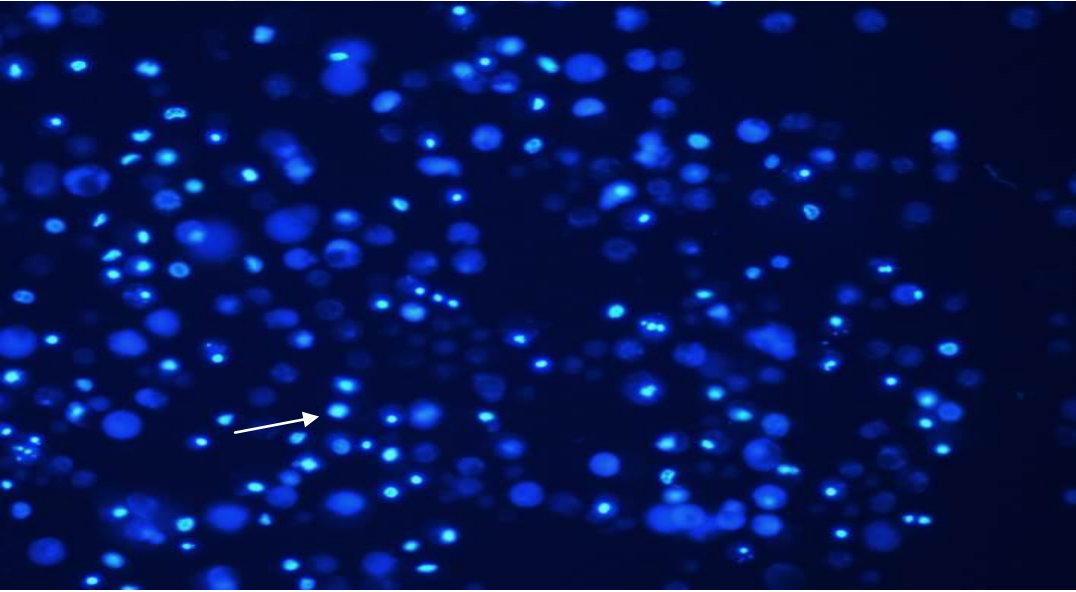


Şekil 3. 8. Yukarıdaki Çizelge 3. 3.'de verilen değerlerin görsel grafiğidir

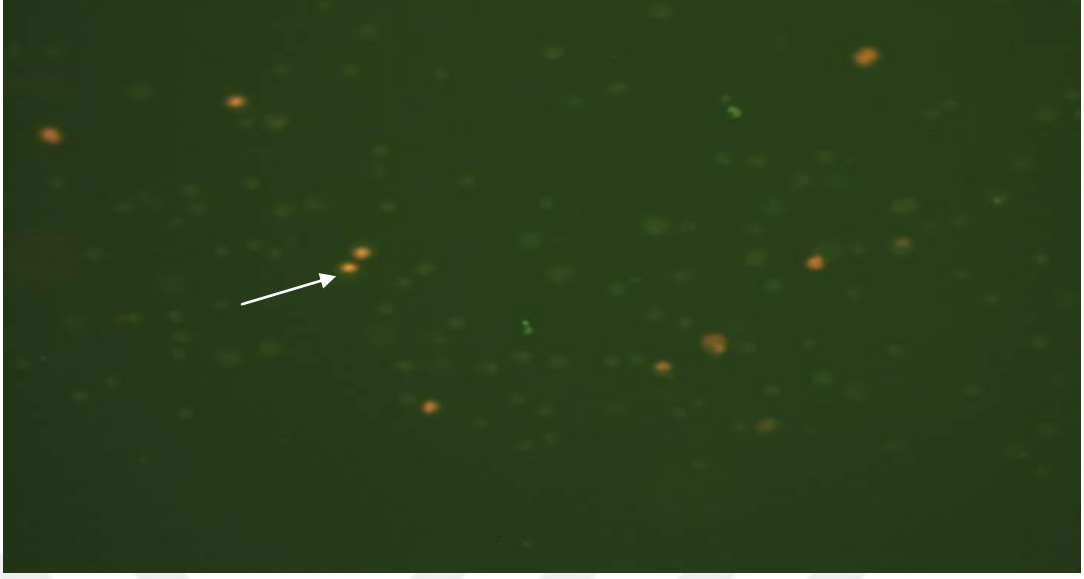
3.3. İkili Boyama İle Belirlenen Apoptotik ve Nekrotik Sonuçları

Yapılan çalışmada yine 20 farklı hastadan alınan kornea epitel hücreleri, 24 kuyucuklu plakalara ekilerek ikili boyama testine tabi tutulmuştur. Her kuyucuk içerisine 50 mikrolitre kadar ikili boyama çalışma solüsyonundan damlatılarak 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuğun floresan mikroskopta DAPI filtresi ışığı altına apoptoz ve nekroz görüntüleri fotoğraflanmıştır.

20 farklı hastadan alınan kornea epitel dokusundaki primer kültür hücrelerine uygulanan ikili boyama sonuçlarının apoptoz ve nekroz görüntüleri fotoğraflanmıştır. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre hücre canlılığı ortalama %77 olarak saptanmıştır. Bu ölçümler, UV uygulaması yapılmadan önceki, yani örneklerin hemen alınmasının ardından ölçülen değerler olup, UV uygulanması sonrası ölçülecek değerler ile karşılaştırma yapılacak ve ilk alınan bu ölçümler baseline olarak değerlendirilecektir.



Şekil 3. 9. Kornea epitel primer kültür hücrelerine uygulanan ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik hücre görüntüleri; Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Apoptoza uğramış hücre çekirdekleri parlak, parçalanmış, apoptoza uğramayanlar soluk mavi görünmektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 3.10. Kornea epitel primer kültür hücrelerine ikili boyama yöntemiyle elde edilen nekrotik hücreler; Oklar nekrotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Nekrotik hücrelerin çekirdeği kırmızı; apoptotik veya sağlıklı hücrelerin çekirdekleri yeşil olarak görünmektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

Aşağıdaki Çizelge 3. 4'te görüntü analizlerinin yüzdelik değerlendirilmesi bulunmaktadır.

Çizelge 3. 4. 20 farklı keratokonus hastası bireylerin epitel doku primer kültür hücrelerinin apoptotik/nekrotik hücre miktarı oranları

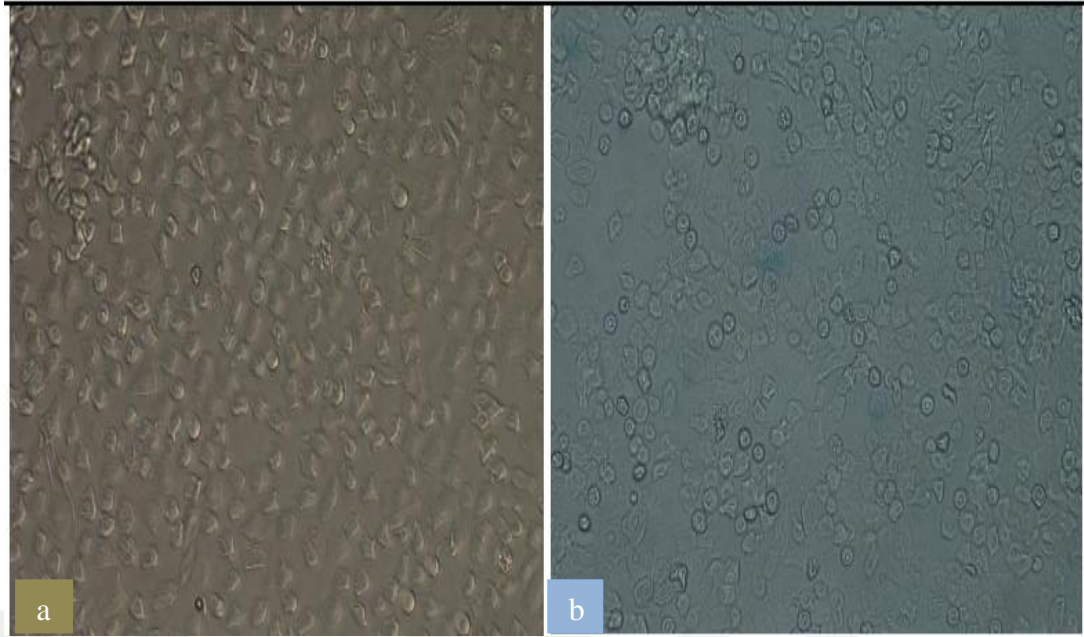
Hasta No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% apoptoz	6%	13%	15,82%	16,91%	17,84%	12,95%	11,22%	3,57%	11,23%	14,31%
% nekroz	3%	2,65%	3,98%	5,87%	1,23%	8,96%	7,36%	0,23%	4,56%	9,81%
Hasta No	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
% apoptoz	16,57%	3,94%	15,28%	17,81%	13,33%	11,28%	19,35%	21,66%	25,53%	20,29%
% nekroz	3,25%	0,58%	5,99%	11,25%	3,51%	9,55%	4,52%	6,25%	4,21%	8,58%

3.4. Kornea Epitel Hücrelerinde in vitro Çalışmalar

Keratokonus ve kontrol grubunda kornea epitel hücrelerinde gerçekleştirilen invitro çalışmalarda, primer kültürlerin pasajlanmasına gerek olmadığına ve doğrudan ilk hücre yayılımlarından çalışmalarına devam edilebileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçtan yola çıkılarak kornea epitel hücrelerinin kültürleri yapılmayıp, sadece besiyeri ortamında 1 gün süreyle bekletilip plate tabanına tutunup yapışması sağlandıktan sonra deneysel çalışmalar başlatılmıştır.

Başlangıçta 24 kuyucuklu kültür plakalarının kullanılması hedeflenmiş ve her kuyucuğa 100.000 hücre ekilerek hücrelerin kuyucuk tabanına yayılması planlanmıştı. Ancak, hücrelerin kuyucuk tabanına homojen yayılmadığı, adezyon kuvvetlerinin tesiriyle kuyucuk kenarlarına toplandığı gözlemlendi. Bunun üzerine 12 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Bu kuyucuklara 400-500.000 hücre ekildi. Ancak yine hücrelerin kenarlara toplandığı gözlemlendi. Bunun üzerine hücreler daha az miktarda besiyeri solüsyonu ile ve kuyucuğun ortasına gelecek şekilde damlatıldıktan sonra pipet yardımı ile homojen bir şekilde kuyucuk tabanına yayılmaya başlandı. Bu işlemden sonra hücrelerin tüm kuyucuk tabanına homojen şekilde dağıldığı ve kuyucuk kenarlarında toplanmadığı gözlemlendi.

Yapılan denemeler sonunda 12 kuyucuklu kültür kapları kullanılarak, her bir kuyucuğa 200 mikrolitre besiyeri solüsyonu içinde 700.000 hücre olacak şekilde ve yukarıda tarif edildiği şekilde hücre ekimi yapıldığı zaman en düzgün ve homojen hücre dağılımı olduğu görüldü.



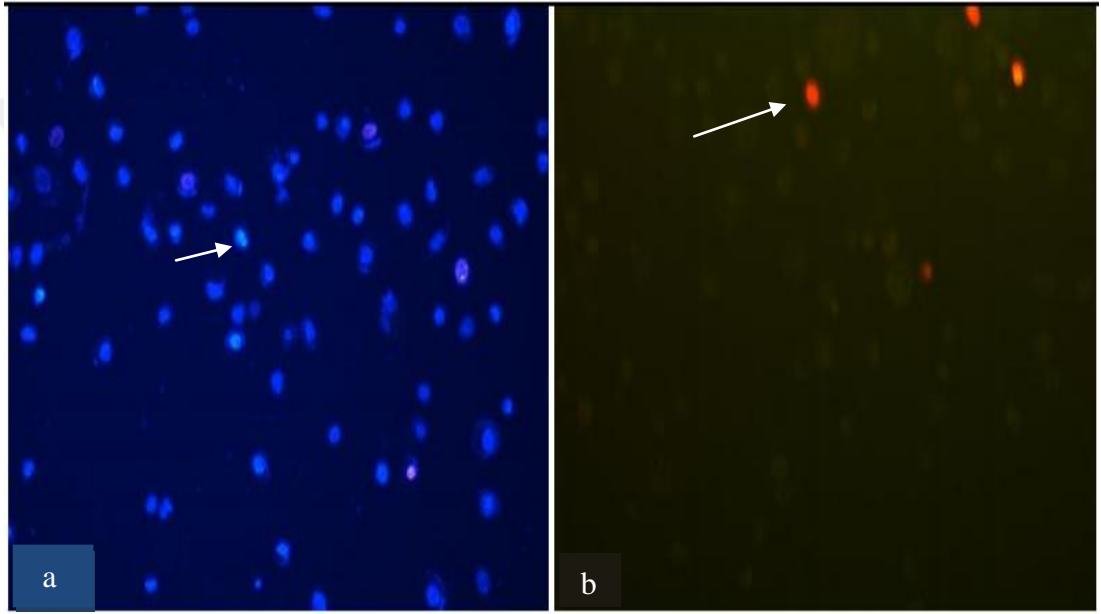
Şekil 3.11. a) Keratokonuslu kornea epitel hücrelerinin kültür ortamına yayılıp 24 saat bekletildikten sonraki morfolojik görüntüsü (Keratinocyte-SFM serum free medium) b) Normal kornea epitelyum hücrelerinin kültür ortamına yayılıp 24 saat bekletildikten sonraki morfolojik görüntüsü (Keratinocyte-SFM serum free medium) Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

3.5. UV'nin Optimal Dozlarının Ayarlanması

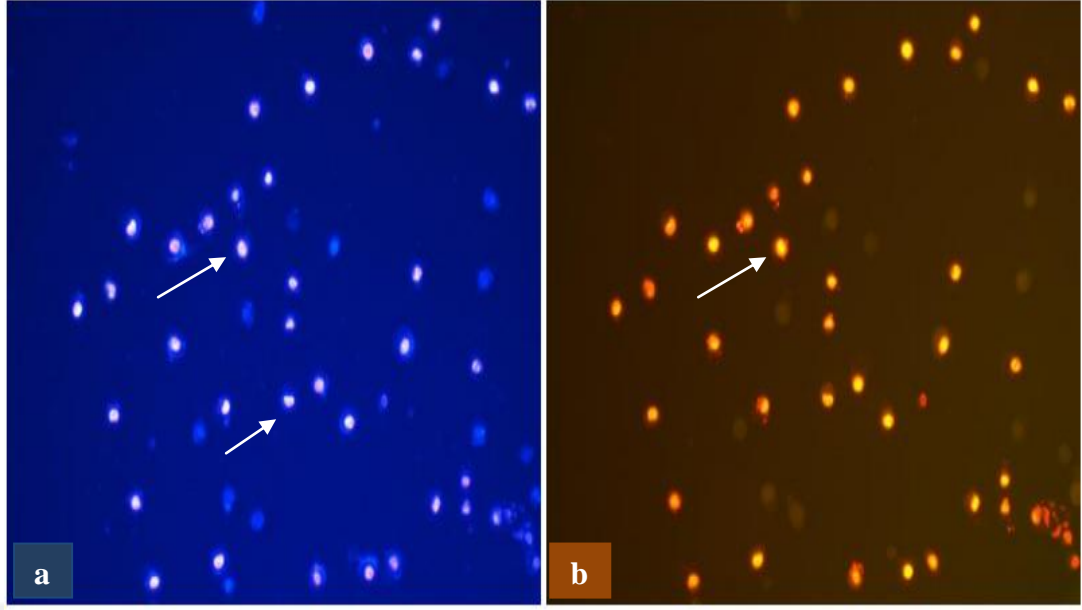
UV-A ve B ışınlarına maruz bırakılacak olan hücre grupları, bir gün öncesinden 12 kuyucuklu plakalara ekilerek kornea epitel hücrelerinin zemine tamamen tutunması sağlandı. Kültür ortamına tek kat olarak yayılmış epitel hücrelerine uygulanacak olan UV'nin hücrelerde aşırı zarar oluşturacak kadar yüksek veya hiçbir etki oluşturmayacak kadar düşük olmaması için UV-A ve UV-B nin optimal dozları bulunmaya çalışıldı. UV ışınının epitel hücreleri üzerindeki etkisi ise apoptoz/nekroz oranı tayini ile tesbit edildi.

3.5.1. UV-B'nin Optimal Dozunun Ayarlanması

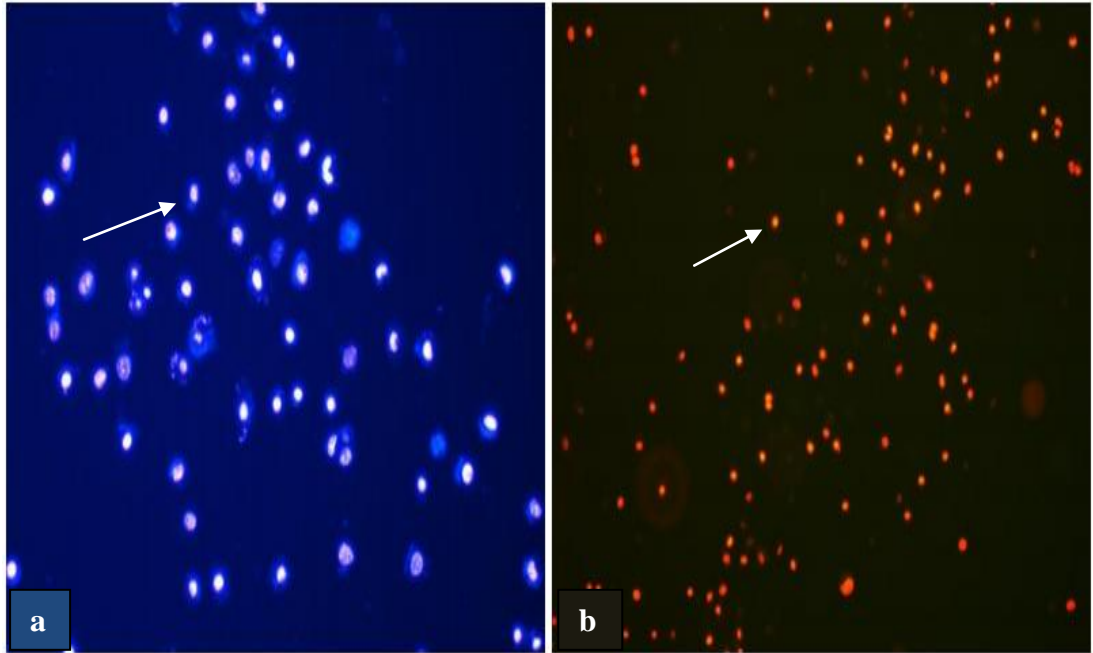
UV-B için 50 mJ/cm² dozundan başlandı. Bu dozda hücrelerde kayda değer bir değişiklik izlenmedi (Şekil 3.12). Daha sonra 100, 150 ve 200 mJ/cm² dozlarında UV-B uygulanarak aynı testler tekrarlandı. 100 mJ/cm² dozunda da kayda değer değişiklik gözlenmezken 150 mJ/cm² dozunda makul seviyelerde (Şekil 3.13), 200 mJ/cm² dozunda ise aşırı miktarda apoptoz/nekroz görüldü. (Şekil 3.14)



Şekil 3.12. 50 mJ/cm² dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



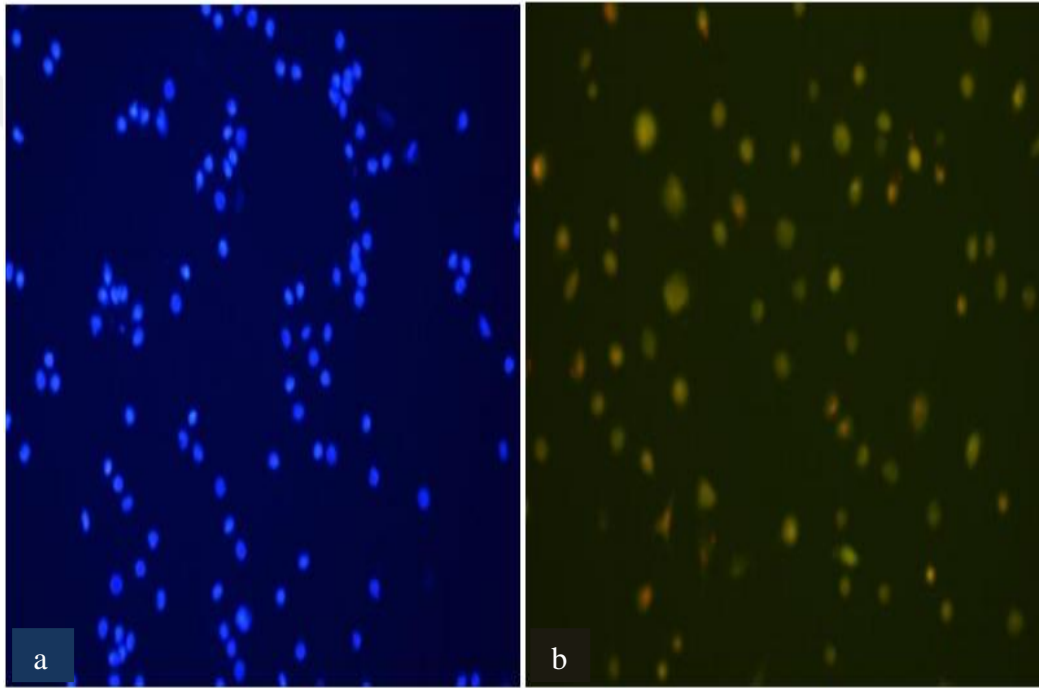
Şekil 3.13. 150 mJ/cm² dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



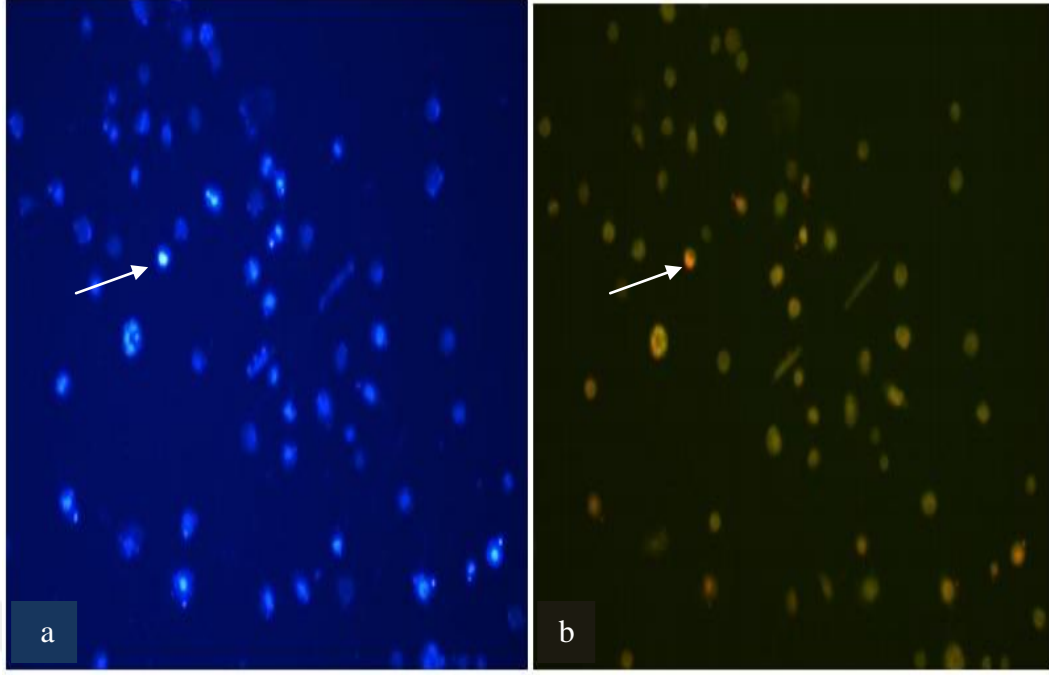
Şekil 3.14. 200 mJ/cm² dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

3.5.2. UV-A'nın Optimal Dozunun Ayarlanması

UV-A uygulaması için yine doz optimizasyonu yapılarak en uygun UV doz miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre, artan dozlarda UV-A verilerek hücrelerin % canlılık oranlarına bakılmıştır. 500, 1000 ve 1500 mJ/cm²'de hücre canlılığında önemli bir fark olmazken (Şekil 3.15), 2000 mJ/cm² enerji değerinde hücrelerde kontrole göre makul bir değişim gözlenmiştir.(Şekil 3.16.) Bu nedenle UV-A doz uygulaması için en uygun doz miktarının 2000 mJ/cm² olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 3.15. 1000 mJ/cm² dozunda UV-A uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 3.16. 2000 mJ/cm² dozunda UV-A uygulanan örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

Bunun sonucunda aşağıdaki dozlarda UV uygulaması yapıldı:

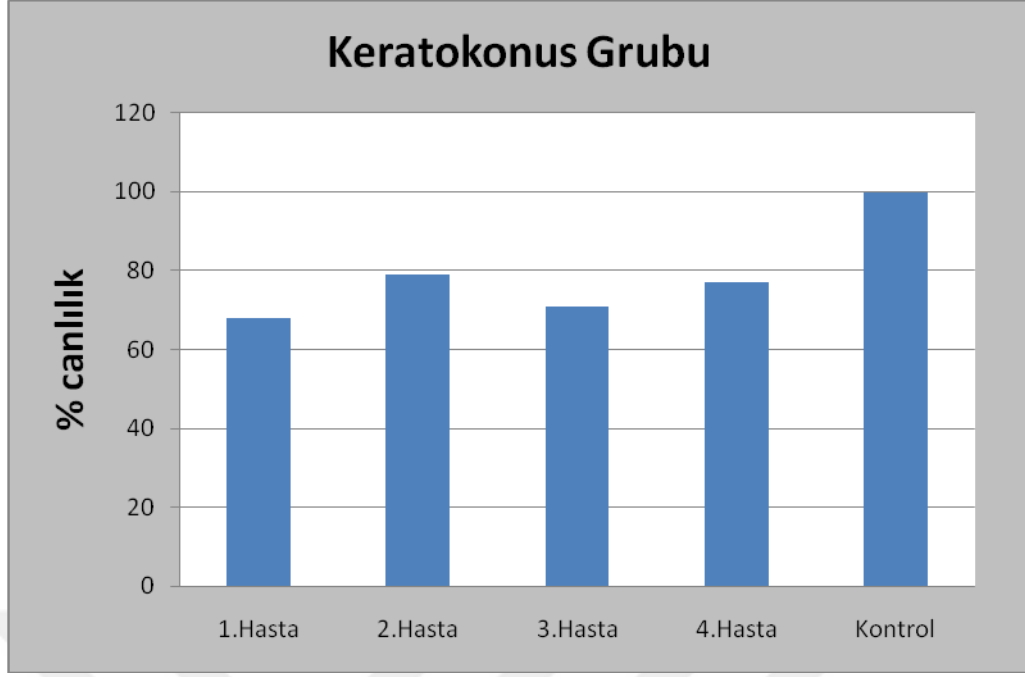
UV-A: 2000 mJ/cm²

UV-B: 150 mJ/cm²

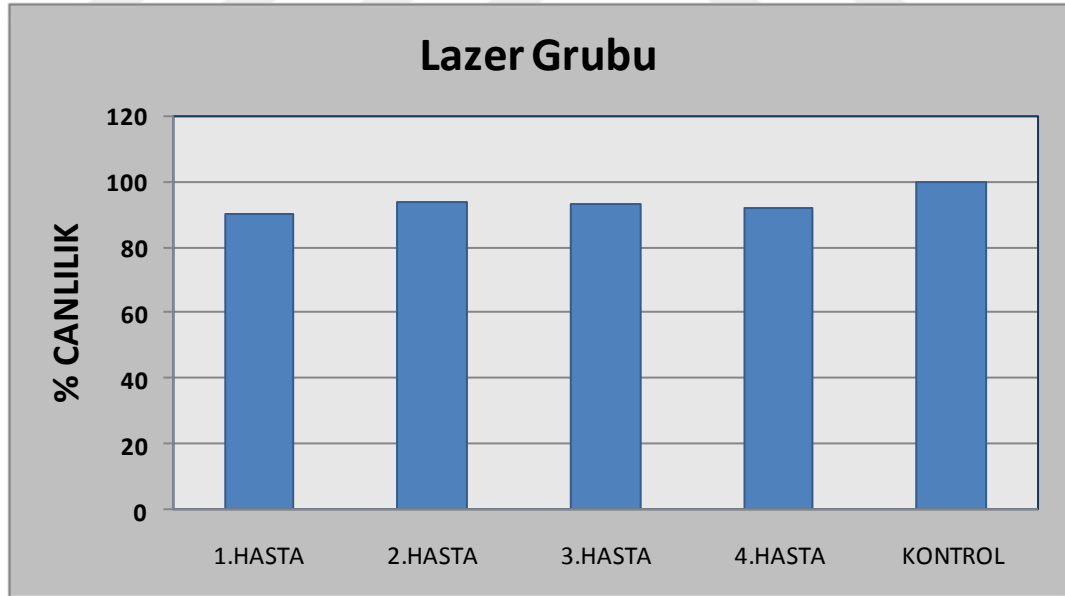
3.6. UV Uygulanmış Kornea Epitel Hücrelerinde Sitoksisitenin Belirlenmesi

Kornea epitel hücreleri 150 mJ/cm² dozunda UV-B veya 2000 mJ/cm² dozunda UV-A ışınına maruz bırakıldıktan sonra 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücre canlılığının test edilmesi amacı ile sitotoksisite deneyleri yapıldı (WST-1).

UV-B ışınına maruz bırakılan epitel hücrelerinde yapılan canlılık analizine göre hücre canlılığı keratokonus grubunda ortalama %73 olarak belirlenirken(Şekil 3.17.), kontrol grubundaki canlılık oranı ise ortalama % 92 olarak gözlemlendi (Şekil 3.18.)

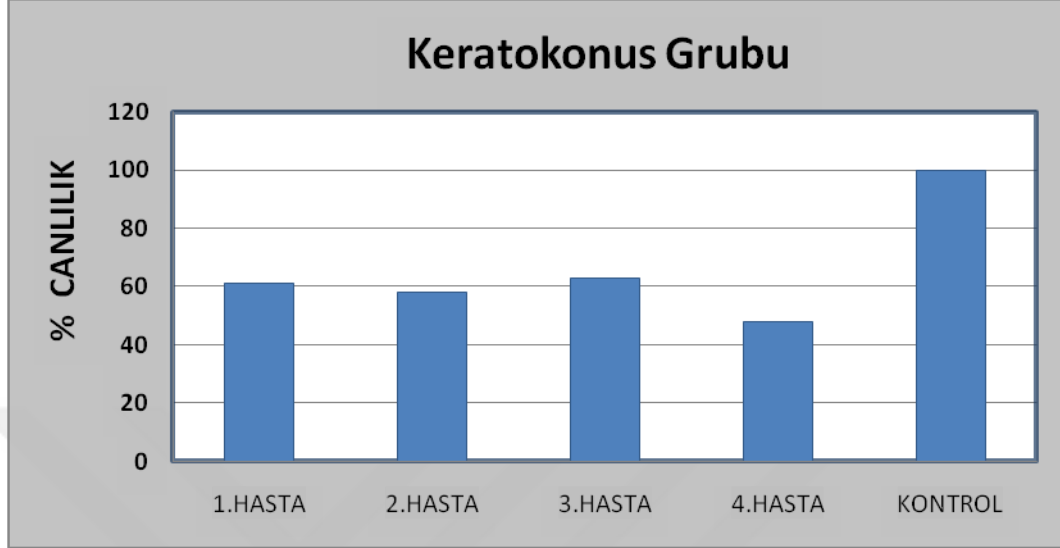


Şekil 3.17. 150 mJ/cm² dozunda UV-B uygulanan keratokonus epitel hücrelerinde % canlılık (WST-1) değerleri

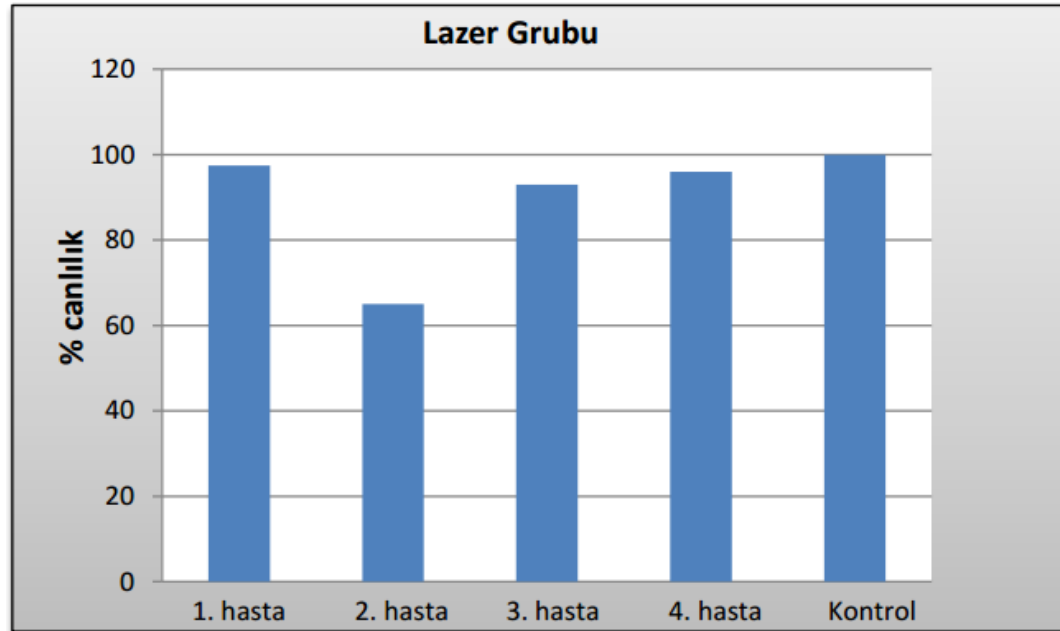


Şekil 3.18. 150 mJ/cm² dozunda UV-B uygulanan kontrol grubu hücrelerinde % canlılık (WST-1) değerleri

UV-A ışınına maruz bırakılan epitel hücrelerinde yapılan canlılık analizi sonuçlarına göre hücre canlılığı; hasta grubunda ortalama %66, kontrol grubunda ise yaklaşık %97 olarak belirlendi .(Şekil 3.19 ve 3.20)



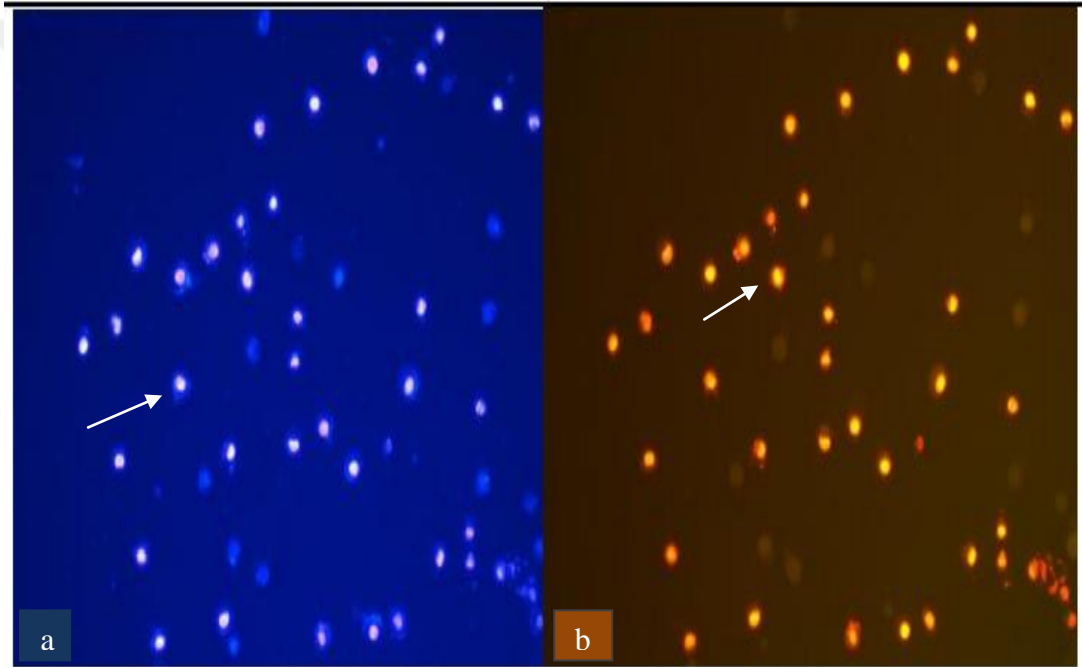
Şekil 3.19. 2000 mJ/cm² dozunda UV-A uygulanan keratokonus epitel hücrelerinde % canlılık (WST-1) değerleri



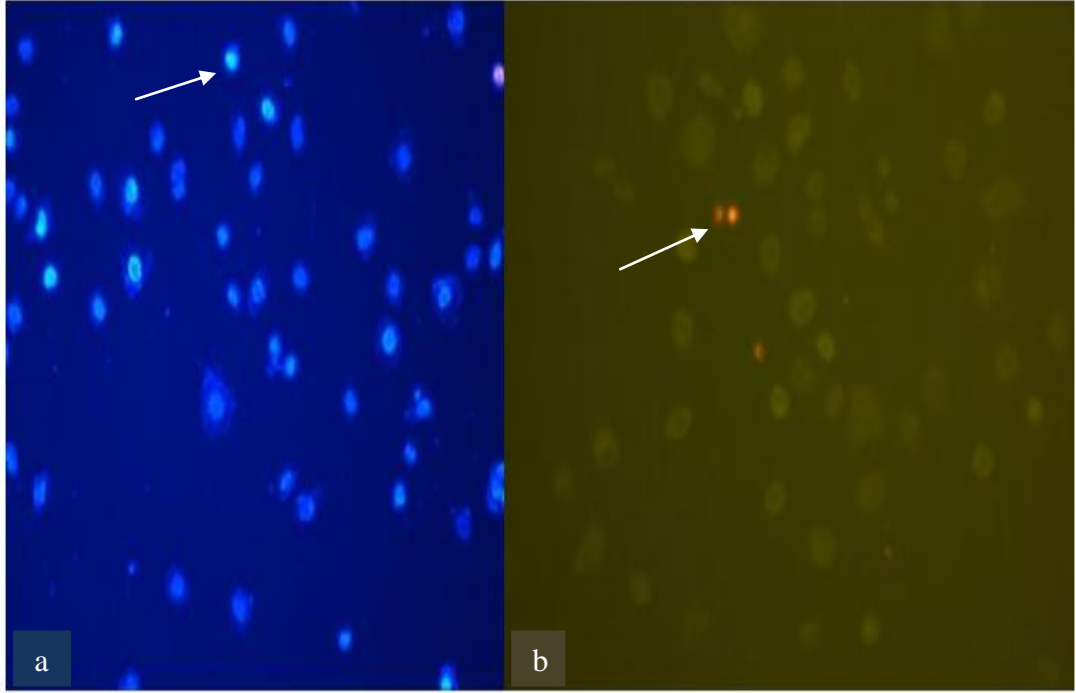
Şekil 3.20. 2000 mJ/cm² dozunda UV-A uygulanan kontrol grubu hücrelerinde % canlılık (WST-1) değerleri

3.7. UV Uygulanmış Kornea Epitel Hücrelerinde Apoptoz / Nekroz Sonuçları

Yukarıda bahsedilen dozlarda UV-B veya UV-A uygulanan keratokonus ve kontrol epitel hücrelerine, apoptoz-nekroz tayini için ikili boyama protokolü uygulandı. UV-B ışınına maruz bırakılan keratokonuslu epitel hücrelerine uygulanan ikili boyama sonucunda apoptoz oranı % 17 civarında, nekroz oranı ise %23 civarında olduğu belirlendi (Şekil3.21). UV-B ışınına maruz bırakılan kontrol grubu hücrelerine uygulanan ikili boyama sonucunda apoptoz oranınının % 3; nekroz oranınının ise %2 olduğu belirlendi (Şekil 3.22).

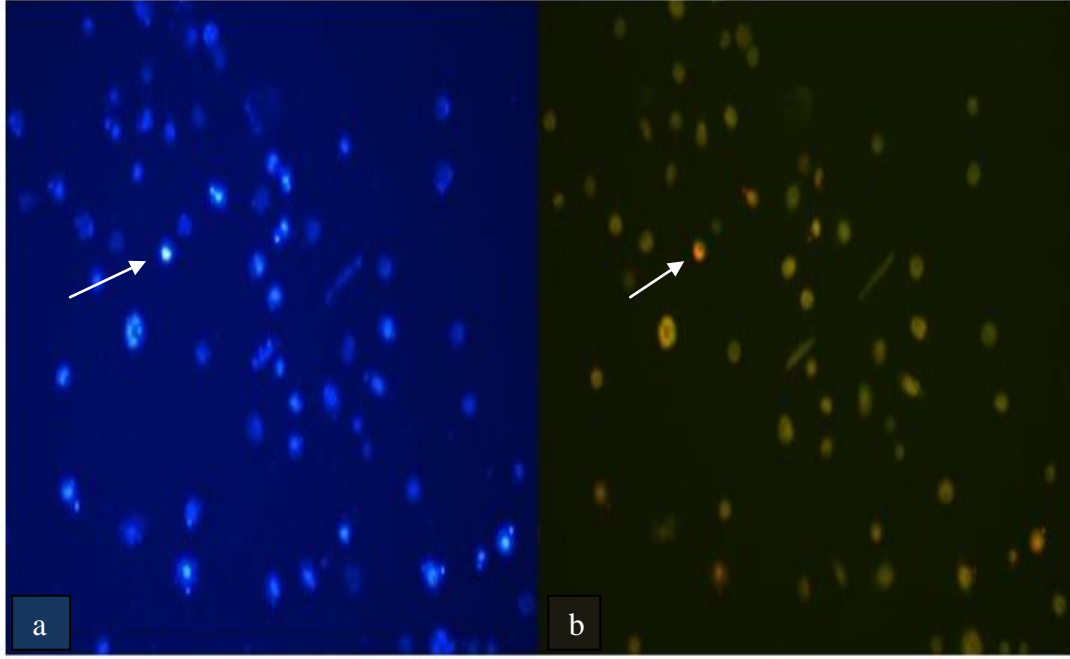


Şekil 3.21. 150 mJ/cm² dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

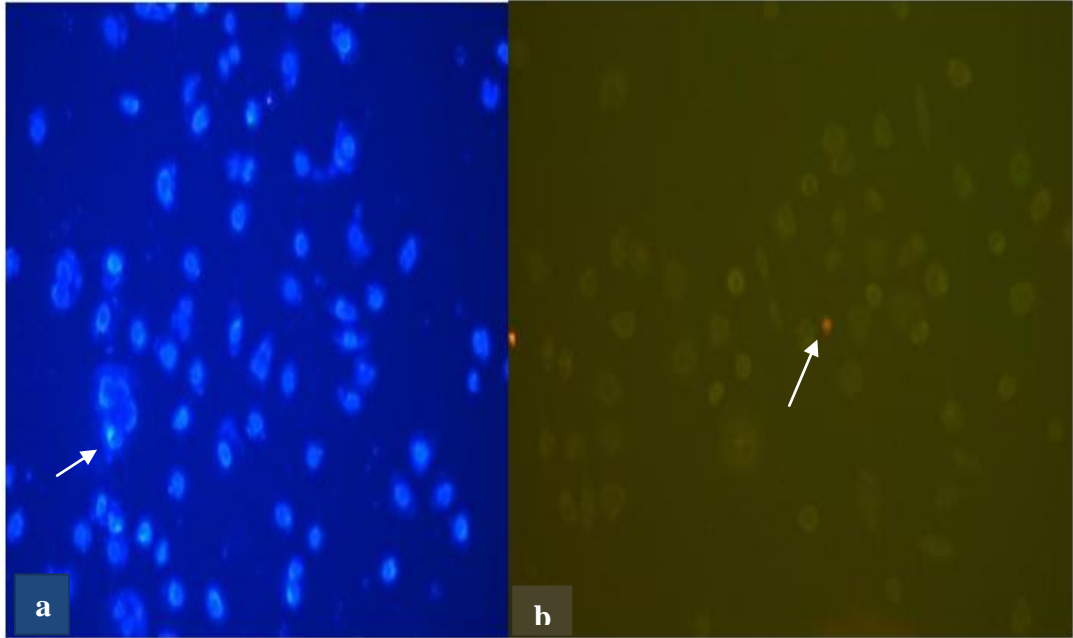


Şekil 3.22. 150 mJ/cm² dozunda UV-B uygulanan kontrol grubu hücrelerinde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

UV-A ışınına maruz bırakılan keratokonuslu epitel hücrelerine uygulanan ikili boyama sonucunda apoptoz oranının % 12 civarında, nekroz oranının ise %3 civarında olduğu belirlendi (Şekil 3.23). UV-A ışınına maruz bırakılan kontrol grubu epitel hücrelerine uygulanan ikili boyama sonucunda apoptoz oranının % 2 civarında, nekroz oranının ise %1 civarında olduğu belirlendi (Şekil 3.24).



Şekil 3.23. 2000 mJ/cm² dozunda UV-A uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 3.24. 2000 mJ/cm² dozunda UV-A uygulanan kontrol grubu hücrelerinde ikili boyama yöntemiyle elde edilen a) apoptotik hücre görüntüleri b) nekrotik hücre görüntüleri; Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50 µm mesafeyi göstermektedir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda UV-A ve UV-B'nin keratokonuslu kornea epiteli ve normal kornea epiteli üzerindeki apoptotik, nekrotik ve sitotoksik etkileri incelenerek karşılaştırılmıştır. Bu hücrelerin UV-A ve UV-B ye olan cevapları değerlendirilmiştir. Aynı zamanda hücrelerin UV-A ve UV-B ile maruz kalmaları durumunda apoptoz ve nekroz oranlarında olumsuz yönde bir değişme olup olmadığı araştırılmıştır. WST-1 testi ile de hücre canlılık değerleri ölçülmüştür.

Öncelikle Merkezi Araştırmalar Laboratuvarına soğuk zincir ile getirilen kornea dokuları ile hücre kültürü çalışmaları yapıldı. Uygun kültür ortamında inkübe edildi. Keratokonuslu ve normal kornea epitellerinin kültürasyon işlemleri boyunca farklı besi ortamlarında çoğaltılması denenerak hücrelerin kültür kaplarına en iyi şekilde tutunduğu besiyeri ile çalışmalara devam edildi. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında en başarılı sonucun 'Keratinocyte-SFM' ile alınabileceği belirlenmiştir(Şekil 3. 3.ve Şekil 3. 4.). Ayrıca keratokonuslu ve normal kornea epitel hücrelerinin tutunması ve çoğalması çok kolay olmadığı için, pasajlama yapmadan doğrudan ilk hücre yayılımından deneyler yapıldı. (Şekil.3.11.) Keratokonuslu ve normal kornea epitel hücrelerinin kültürleri UV-A ve UV-B ışınlarına maruz bırakılmadan önce bu hücrelerin apoptoz, nekroz ve sitotoksosite değerleri belirlendi. Böylece yapılacak diğer çalışmalar için dayanak oluşturuldu. Sitotoksisiteyi belirlemek için WST1 testleri yapılarak ölçülen % canlılık değerleri belirlendi (Çizelge 3. 1. ,Çizelge 3. 2.)

İkili boyama yöntemi ile keratokonuslu kornea epitellerinin apoptoz, nekroz sonuçlarının fotoğrafları çekildi.(Şekil 3. 9. ,Şekil 3.10.) Yapılan ölçüm sonuçlarına göre hücre canlılığı ortalama %77 bulundu. Literatürde UV-A ve UV-B uygulama dozları ile ilgili çeşitli bilgiler mevcuttur. Ancak, bizim çalışmamızda uyguladığımız şekilde kültür ortamına tek kat olarak yayılmış epitel hücrelerine yapılmış benzer bir UV uygulaması yoktu. Bu nedenle kültür ortamına tek kat olarak yayılmış kornea epitel hücrelerine uygulanacak olan UV'nin hücrelerde aşırı zarar oluşturacak kadar yüksek veya hiçbir etki oluşturmayacak kadar düşük olmaması için UV-A ve UV-B

nin optimal dozları bulunmaya çalışıldı. Bunun için de UV ışınının epitel hücreleri üzerindeki etkisi, apoptoz ve nekroz oranı tayini ile tespit edildi.

UV-B için 50, 100, 150 ve 200 mJ/cm² dozlarında UV-B uygulanarak apoptoz ve nekroz testleri tekrarlandı. 50 mJ/cm² ve 100 mJ/cm² dozundaki UV-B' de kayda değer değişiklik gözlenmezken 200 mJ/cm² dozunda ise aşırı miktarda apoptoz / nekroz görüldü (Şekil 3.14). UV-B için en uygun dozun 150 mJ/cm² olduğu anlaşıldı (Şekil 3.13.). UV-A için 500, 1000, 1500 ve 2000 mJ/cm² dozlarında UV-A uygulanarak apoptoz ve nekroz testleri yapıldı. 500, 1000 ve 1500 mJ/cm² dozundaki UV-A'da hücre canlılığında önemli bir fark olmadı (Şekil 3.15). UV-A için en uygun dozun 2000 mJ/cm² olduğu anlaşıldı(Şekil 3.16.).

Uygun dozlar belirlendikten sonra çalışmalara devam edildi. Keratokonuslu kornea epitelleri ve kontrol grubu olarak normal kornea epitellerine UV Maruzat Cihazı ile 150 mJ/cm² UV-B uygulandı. UV-B ışınına maruz bırakıldıktan sonra 24 saatlik inkübasyona alındı. Daha sonra hücre canlılığının test edilmesi amacı ile sitotoksisite deneyleri yapıldı (WST-1). Keratokonus grubunda ortalama canlılık %73 olarak belirlenirken(Şekil 3.17.), kontrol grubundaki canlılık oranı ise ortalama % 92 olarak gözlemlendi (Şekil 3.18.). Aynı işlemler bu kez 2000 mJ/cm² dozlarında UV- A uygulanarak gerçekleştirildi. UV-A uygulamasından sonra 24 saatlik inkübasyona alındı. Daha sonra hücre canlılığının test edilmesi amacı ile sitotoksisite deneyleri yapıldı (WST-1). Keratokonus grubunda canlılık ortalama %66, kontrol grubunda ise yaklaşık % 97 olarak belirlendi .(Şekil 3.19 ve 3.20)

150 mJ/cm² UV-B uygulanan keratokonuslu ve normal kornea epitel hücrelerine ikili boyama yöntemi uygulandı. Bunun sonucunda keratokonuslu kornea epitel hücrelerinde apoptoz oranı % 17 civarında, nekroz oranı ise %23 civarında olduğu belirlendi (Şekil3.21). UV-B ışınına maruz bırakılan kontrol grubu hücrelerinde apoptoz oranının % 3; nekroz oranının ise %2 olduğu belirlendi (Şekil 3.22).

2000 mJ/cm² dozlarında UV-A uygulanan keratokonuslu ve normal kornea epitel hücrelerine ikili boyama yöntemi uygulandı. Bunun sonucunda

keratokonuslu kornea epitel hücrelerinde apoptoz oranının % 12 civarında, nekroz oranının ise %3 civarında olduğu belirlendi (Şekil 3.23). UV-A ışınına maruz bırakılan kontrol grubu epitel hücrelerinde apoptoz oranının % 2 civarında, nekroz oranının ise %1 civarında olduğu belirlendi (Şekil 3.24).

UV-A ışınları görünür ışığa en yakın dalgaboyuna sahiptir. Ayrıca dokulara zararı nisbeten daha azdır. UV-A ışınının az bir kısmı kornea epitelinde, çoğunluğu stromada, geri kalan az bir oranı da lenste absorbe edilir. UV-B, daha kısa dalgaboyundan oluşur, daha fazla enerji taşır ve dokuya daha fazla zarar verir. UV-B'nin çoğu kornea epiteli tarafından soğurulur. Sağlıklı kornea epiteli hücreleri, UV-B nin zararlı etkilerine karşı güçlü antioksidan savunma sistemleriyle donatılmıştır.

Yaptığımız çalışmalar sonucunda, normal kornea epitel hücrelerinin UV-A ve UV-B uygulamasından çok az etkilendiği gözlenmiştir. Normal kornea epitel hücrelerinin UV uygulaması sonucu oluşan oksidatif hasara karşı çok güçlü antioksidan savunma mekanizmalarına sahip olduğu görülmüştür.

UV-A uygulaması ve UV-B uygulamasının, keratokonuslu kornea epiteli hücrelerinde canlılık oranını düşürdüğünü belirlenmiştir. Özellikle de UV-B uygulaması, keratokonuslu kornea epitel hücrelerinde, nekroz oranının çok yüksek olmasına neden olmuştur. Yani UV-B çok fazla hasara neden olmuştur. UV-B'nin daha fazla zarar vermesinin nedeni; öncelikle enerjisinin yüksek olmasıdır. Bunun dışında kornea epitel hücreleri, UV-B'nin çoğunu soğurmaktadır. Kornea epitel hücrelerinin UV-B'yi soğurma oranlarının yüksek olması da, hasarın fazla olmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Böyle bir sonuç, keratokonuslu kornea epitel hücrelerinin, UV uygulaması sonucunda oluşacak olan oksidatif hasara karşı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz ya da bozuk olduğu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Arnale, Peris- Martinez C, Oxidative Stress in Keratoconus, Cornea, 52, 12, 8592-97, 2011.
- [2] Or.H, ‘ Keratokonusun Etiyopatogenezine Güncel Bir Bakış ’ , Özel Muayenehane, Review, DO I: 10.4274 / tjo.41.75047, İstanbul, 2011.
- [3] Kenney . C, Brown. M. The cascade hypothesis of keratoconus. Cont Lens Anterior Eye; 26:139-46, 2003.
- [4] Scroggs. M, Proia A. ‘ Histopathological variation in keratoconus. Cornea.; 11:553-9, 1992.
- [5] Fernandes B, Logan P, Zajdenweber M, Santos. L, Cheema D, Burnier M. JR. ‘ Histopathological study of 49 cases of keratoconus ’ , Pathology ,; 40:6236, 2006.
- [6] Udar N., Atilano S.R., Brown D.J., SOD1: a Candidate Gene for Keratoconus, Investigative Ophthalmology & Visual Science , 47, 8, 3345–3351, (2006)
- [7] Chwa, Marilyn, et al. " Hypersensitive response to oxidative stress in keratoconus corneal fibroblasts. " *Investigative ophthalmology & visual science* 49.10 (2008): 4361-4369.
- [8] Buddi R., Brian L, Evidence of Oxidative Stress in Human Corneal Diseases, The journal of histochemistry and cytochemistry, 50, 3, 341-51, 2002.
- [9] Podskochy. A. Ultraviolet Radiation and Cornea, Karolinska University Press, ISBN 91-7349-118-7, (2002).
- [10] Marchitti S.A., Chen Y., Thompson D.C., Vasiliou V., Ultraviolet Radiation: Cellular Antioxidant Response and the Role of Ocular Aldehyde Dehydrogenase Enzymes, Eye Contact Lens., 37, 4, 206–213, (2011).

- [11] Gordon - Shaag, Ariela, et al. "Risk factors for keratoconus in Israel: a case–control study." *Ophthalmic and Physiological Optics* 35. (2015): 673- 681.
- [12] Robinson, J.C. (1993). Ocular Anatomy and Physiology Relevant to Ocular Drug Delivery. A.K. Mitra (Ed.). *Ophthalmic Drug Delivery Systems* (s. 29 - 57). NewYork: Marcel Dekker.
- [13] William R. Weimer, O. D. (t. y.). [http : //www. seeweimer.com / eye- anatomy](http://www.seeweimer.com/eye-anatomy/) / Erişim: 15 Temmuz 2016,
- [14] Stjernscantz, J. , Astin, M. (1993) . Anatomy and Physiology of the Eye Physiological Aspects of Ocular Drug Theraphy. P.Edman (Ed.). *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery* (s. 1-25). Boca Raton: CRC Press.
- [15] Netland, P. A. (2007). Ocular Pharmacology. P. A. Netland (Ed.) . *Glaucom Medical Therapy : Principles and Management* (s. 3 - 5). London : Oxford University Press.
- [16] Anonim, The Corneoscleral Tunic. (t.y.). Erişim : 15 Temmuz 2016, [http://www.education.vetmed.vt.edu/./eye/crnscsclra.htm/](http://www.education.vetmed.vt.edu/eye/crnscsclra.htm/)
- [17] Beuerman, R. W., Pedroza, L. (1996). Ultrastructure of the Human Cornea. *Microscopy Research and Technique*, 33(4), 320-335.
- [18] Song, Y., Wang, Y., Thakur, R., Meidan, M., Michniak, B. (2004). Mucosal Drug Delivery : Membranes , Methodologies and Applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(3), 195-256.
- [19] Schoenwald, R.D. (1993). Pharmacokinetics in Ocular Drug Delivery. P. Edma (Ed.). *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery* (s. 159-189). Boca Raton: CRC Press.
- [20] Green, K. (1993). The Effects of Preservatives on Corneal Permeability of Drugs. P. Edman (Ed.). *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery* (s. 43-59 Boca Raton: CRC Press.

- [21] Borderie, V. , Touzeau, O. , Bourcier, T. , Laroche, L. (2005). Physiology of the Cornea. *Ophthalmologie*, 2, 103-117.
- [22] Anonim Keratoconus. (t.y.). Erişim: 15 Temmuz 2016, [http // www.waleshospital.com/English/Keratoconus](http://www.waleshospital.com/English/Keratoconus)
- [23] Kanski JJ. Klinik Oftalmoloji; 4. Baskı. _İstanbul Nobel Tıp Kitabevi. 2001; 96-137.
- [24] Bechara SJ, Waring GO 3rd, Insler M. Keratoconus in two pairs of identical twins. *Cornea*. 1996; 15: 90-3.
- [25] Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet*. 2000; 93: 403-409.
- [26] Yue BY, Sugar J, Benveniste K. Heterogeneity in keratoconus: possible biochemical basis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1984;175:336-41.
- [27] Praus P, Goldman GN. Glycosaminoglycans in human corneal buttons removed at keratoplasty. *Ophthalmic. Res*. 1971;2: 223-230.
- [28] Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE, Butkowski RJ, Ljubimov AV Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea*. 1997; 16:345-51.
- [29] Zhou L, Yue BY, Twining SS, Sugar J, Feder RS. Expression of wound healing and stress related proteins in keratoconus corneas. *Curr Eye Res*. 1996; 15: 1124- 1131.
- [30] Hunter KW, Cheng EL, Ueda J, Sugar J. Keratocan expression is increased in the stroma of keratoconus corneas. *Molecular Medicine*. 2001;7: 470-477.

- [31] Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, Gil PSI, Hayes S, Newton RH, Bron AJ. Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 1948–1956.
- [32] Kao WW, Vergnes JP, Ebert J. Increased collagenase and gelatinase activities in keratoconus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;107:929–936.
- [33] Sawaguchi S., Yue BY., Sugar J., Gilboy JE. Lysosomal enzyme abnormalities in keratoconus. *Arch Ophthalmol* 1989; 107(10):1507-10
- [34] Zhou L., Sawaguchi S., Twining SS., Sugar J., Feder RS., Yue BY. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(7)1117-24
- [35] Kenney MC., Chwa M., Lin B., Huang GH., Ljubimov AV., Brown DJ. Identification of cell types in human diseased corneas. *Cornea.* 2001; 20 (3): 309-16
- [36] Parkin BT., Smith VA., Easty DL. The control of matrix metalloproteinase-2 expression normal and keratoconic corneal keratocyte cultures. *Eur J Ophthalmol.* 2000;10(4):276-85.
- [37] Kenney Mc, Donald J. Brown: The Cascade Hypothesis of Keratokonus Contact Lens & Anterior Eye 2003;26: 139-146
- [38] Brown D., Chwa MM., Opbroek A., Kenney MC. Keratoconus corneas: increased gelatinolytic activity appears after modification of inhibitors. *Curr Eye Res.* 1993;12(6):571-81.
- [39] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267(5203): 1456-62.
- [40] Kim WJ., Shah S., Wilson SE. Differences in keratocyte apoptosis following transepithelial and laser - scrape photorefractive keratectomy in rabbits. *J Refract Surg.* 1998;14(5):526-33

- [41] Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea* 2000 (3 Suppl);19: 7-12.
- [42] Hall PA, Watt FM; Stem Cells: The generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106;619
- [43] Kenney MC., Brown DJ., Rajeev B. Everett Kinsey lecture. The elusive causes of keratoconus: a working hypothesis. *Clao J* 2000; 26(1): 10-35
- [44] Whitelock R B., Li Y., Zhou LL. , Sugar J., Yue BY. Expression of transcription factors in keratoconus, a cornea thinning disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235(1):253-8.
- [45] Streuli M. Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(2): 182-8
- [46] Gondhowiardjo TO., van Haeringen NJ. Corneal aldehyde dehydrogenase, glutathione reductase, and glutathione S- transferase in pathologic corneas. *Cornea* 1993;12(4):310-4
- [47] Behndig A., Svensson B., Marklund SL., Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(3):471-5
- [48] Behndig A., Karlsson K., Johansson BO., Brannstrom T., Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42: 2293-6
- [49] Kılıç B. B. ‘Korneal Çapraz Bağlama Tedavisinin Deneysel Bakteriyel Keratit Modelindeki Etkisinin Araştırılması Ve Topikal Antibiyotik Tedavisi Ve Kombine Tedavi İle Karşılaştırılması’, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2014
- [50] Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve Antioksidan savunma, *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi* 1997. 3- 4, 92-95.

- [51] Temür N. Çam, kavak, söğüt ve armut ağaçları üzerinde yetisen ökse otu (*Viscum album* L.) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. *GOP Üni.* 2006. 109
- [52] Çakatay U, Kayalı R. Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelisimi, *Cerrahpasa Tıp Dergisi*, 2006. 37, 162-167.
- [53] Floyd R. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *Faseb J* 1990; 4: 2 587-2
- [54] Mccord J. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med*, 1985; 312: 159-163)
- [55] Anonim http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm. Erişim tarihi: 19.07. 2016
- [56] Ak T. Curcumunun Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi. 2006, Y.L. Tezi. Atatürk Üniversitesi
- [57] Anonim <http://slideplayer.biz.tr/slide/3007382/html> Erişim tarihi: 19.07. 2016
- [58] Gençaslan, G. Türkiyede tıbbi amaçla kullanılan bazı bitkilerin antioksidan özelliklerinin taranması ‘ Yüksek Lisans Tezi’(Ankara Üniversitesi). 2007.
- [59] Mercan, U. “ Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi “ *Yüzüncü yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 2004. 15 (1-2) Sayfa: 91-96
- [60] Carol MP. Pathophysiology. Lippincott. Philadelphia NY 1994: 39 – 40
- [61] Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*. 1998. 11: 336-341.
- [62] Halliwell B, Gutteridge, WMC. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Medicine Press, 1999, 246-351.

- [63] Jensen PA, Soriano J, Ahuja S, Morell FB, Tello MS Romero FJ, Abrahamson M, Veen T. Low Glutathione Peroxidase in Rd1 Mouse Retina Increases Oxidative Stress And Proteases. Lippincott Williams & Wilkins. Vol. 18, No. 8, 28 May 2007.
- [64] Wolf R, Wolf D, Ruocco V. Vitamin E: The Radical Protector, *J. of Eur. Academy of Derm.* 1998. 10, 103-117.
- [65] Betteridge D.J. What is Oxidative Stress? *Metabolizm.* 2000. 49, 3-8.
- [66] Kılınç K. Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları, Toksik Etkileri, *Biyokimya Dergisi*, 1985,10: 60-89.
- [67] Diplock AT. Antioxdant Nutrients and Disease Prevention: An Overview, *Am. J. Chim Nutr.* 1991. 53: 1895-1935.
- [68] Halliwell B, Gutteridge, WMC., Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Medicine Press, 1999. 246-351.
- [69] Akkuş, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38,Kuzucular Ofset, Konya.
- [70] Kılınç , A., Kılınç, K. 2003. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme Yayıncılık, 245, Ankara.
- [71] Yücel, D., Şeneş, M., Topkaya, Ç, B., Zengi, O. 2006. Oxidative / Nitrosative Stress in Chronic Heart Failure: A Critical Review. *Turkish Journal Biochemistry.*, 31(2); 86-95.
- [72] Gül Ü: Güneş ve deri. T.C. Ankara Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü Eğitim şubesi Yayınları No:005 Ankara 2001 . S:1-16.
- [73] Hankinson SE: The epidemiology of age – related cataract. In: Albert DM, Jacobiec AF: Principles and Practice of Ophthalmology Basic Sciences. W. B. Saunders Co. Philadelphia, 1994, P: 1255-1274.

- [74] Howard H: Effects of ultraviolet radiation. Medical clinics of North America 1990, March 74(2): 509-514.
- [75] Anonim Ultraviyole Teknolojisi (t.y.). Erişim: 15 Temmuz 2016, <https://www.tekstilvekonfeksiyon.com/pdf/>
- [76] Arpana UV-A and UV-B Australian Radiation Protection. (t.y.). Erişim: 15 Temmuz 2016 <http://www.arpana.gov.au/RadiationProtection/solaria/Offline/02/04.html>
- [77] Perincek, S., “Ozon, UV, Ultrason Teknolojileri ve Kombinasyonlarının Ön Terbiye İşlemlerinde Uygulanabilirliğinin Araştırılması”,Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 2006
- [78] Anonim, Gam UV Protection films and filters (t.y.). Erişim: 15 Temmuz 2016, <http://www.gamonline.com/catalog/uvfilter/UV-protection.php>
- [79] Gerstner, R. (1971). Tissue cultures of pulpal elements. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol, 32: 473-486
- [80] Ehrhardt C, Kneuer C, Fiegel J. Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an *in vitro* model for bronchial drug absorption studies. *Cell Tissue Res* 2002; 308: 391-400.
- [81] Paul J. Cell and tissue Culture. 4 th Ed. Edinburgh and London: Livinstone; 1970.
- [82] Harrison MA, Rae IF. General techniques of cell culture. Cambridge: Cambridge University Press;1997.
- [83] Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* 1994; 15(3): 173-90.
- [84] Van Wyk CW, Oliver A, Maritz JS. Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing? *J Oral Pathol Med* 2001; 30 (3): 168-77.

- [85] Caughman WF, Caughman GB, Dominy WT, Schuster GS. Glass ionomer and composite resin cements: effects on oral cells. *J Prosthet Dent* 1990; 63 (5): 513-21.
- [86] Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 1996; 12(3): 186-93.
- [87] Geurtsen W. Biocompatibility of dental casting alloys: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(1): 71- 84.
- [88] Browne, R.M. (1988). The in vitro assesment of cytotoxicity dental materials- does it have a role. *Int. Endod. J.*, 21: 50-58
- [89] ISO 7405, 1984. International Standard 7405. Technical Report. International Organization for Standardization. Geneva; 1984.
- [90] Freshney, R. I., (1994) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. John Wiley and Sons, New York.
- [91] Paul J. Cell and tissue Culture. 4 th Ed. Edinburgh and London: Livinstone; 1970.
- [92] Baserga R, Wiebel F. The cell cycle of mammalian cells. *Int Rev Exp Pathol*, 1969; 7: 1-30.
- [93] Thomas DB. Regulation of the mammalian cell cycle in vitro? *Biochem Soc Trans*, 1977; 5(6):1801-1808.
- [94] Barker K., (1998) At the Bench: A Laboratory Navigator. Cold Spring Harbor Press, New York.).
- [95] Helmrich A, Barnes D. Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol*, 1998; 57:3-17.
- [96] Stulberg CS, Coriell LL, Kniazeff AJ, Shannon JE. The animal cell culture collection. *In Vitro*, 1970; 5: 1 -16.

- [97] Petricciani J, Sheets R. An overview of animal cell substrates for biological products. *Biologicals*, 2008; 36(6):359-362.
- [98] Jacoby, W., Pastan , I. H. (1979). *Methods In Enzymology*. New York: Academic Press., s.: 132–146
- [99] Spier, R.E., Griffiths, J.B. (1985). *Animal Cell Biotechnology*. Volume 1: Cell Biology experimental aspects. St. Luis: Mosby co. p.: 61- 100; 225-227
- [100] Davis, J.M. (1996). *Basic Cell Culture*. New York: Oxford University Press, Chapter 12,13.
- [101] Clézardin P. Biphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 2011;48: 71-9.
- [102] Yurdakul , T. , Güven, S., 2006 . Benign prostat hiperplazisi (BPH) ve apoptozis. *Ankara Tıp Fakültesi mecmuası*, 59, 132-136.
- [103] Cohen, J. J., 1993. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *American College of Physicians, CHEST*, 103, 99-101.
- [104] Gavrieli, Y., Sherman, Y., Shumel, A., Sason, B., 1992. Identification of programmed cell death in situ via spesific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119(3), 493-501.
- [105] Güvenç, T., 2002. Infeksiyöz bursal hastalığın immünoperoksidaz tekniği ile tanısı ve B lenfositlerde apoptozisin incelenmesi. *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri*, Ankara.
- [106] Giannetti, L., Consolo, U., Magnoni, C., Muzio, L.L., 2004. Apoptosis; escaping strategies in human skin cancer. *Oncology Reports*, II, 401-405.
- [107] Nishihara, H., Kondoh, S.K., Insel, P.A., Eckmann, L., 2003. Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through

induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, 8921-8926.

[108] Mcphie, D.L., Coopersmith, R., Peralta, A.H., Chen, Y., Ivins, K.J., Manly, S.P., Kozlowski, M.R., Neve, K.A., Neve, R.L., 2003. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. The Journal of Neuroscience, 23, 6914-6927.

[109] Piret, J.P, Arnould, T., Fuks, B., Chatelain, P., Remacle, J., Michiels, C., 2004. Caspase activation PTP opening in TNF-a-induced apoptosis in L929 cells. Mitochondrion, 3, 261-278.

[110] Gale,P.R.,1997.Apoptosis in liver disease. Journal of Hepatology,27-405-412

[111] Öktem, S., Özhan, M.H., Özol,D., 2001. Apoptozisin önemi.Toraks Dergisi, 2, 91-95.

[112] Zhang, J., Xu, M., 2002. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis . Trends in Cell Biology, 12, 84-89.

[113] Squier, M.K., Miller, A.C., Malkinson, A.M., Cohen, J.J., 1994. Calpain activation in apoptosis. Journal of Cellular Physiology, 159, 229-237.

[114] Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A., 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. Trends in Cell Biology, 5, 21-6.

[115] Carson, D.A., Rbiero, J.M.,1993. Apoptosis and disease. The Lancet, 341, 1251-1254

[116] Ulukaya, E., 2003. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilimdalı, Bursa.

[117] Barrett, K.L., Jonathan M.W., Garvin, A.C., Mark, C.W., 2001. Advances in Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis, 49, 821-832.

EK-1: Etik Kurul Raporu



T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurul Koordinatörlüğü

SAYI : B.30.2.YBÜ.006.06.01/17

26./2./2013

KONU : 25.02.2013 Tarih ve 15 Sayılı Kurul Kararı

Sayın: Doç.Dr. Nurullah ÇAĞIL
Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Göz Hastalıkları Kliniği

Sorumlu Araştırmacılığımı yapmış olduğunuz **“Keratokonus ve Normal Kornea Epitel Hücre Kültürlerinde Oksidatif Strese Cevap ve Antioksidan Mekanizmaların İncelenmesi”** isimli çalışmanız Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 25/02/2013 tarih ve 15 sayılı kararı ile başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesi etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Feza KORKUSUZ
İlaç Dışı Etik Kurul Başkanı



Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi - Etik Kurul Sekreteryası
Eskişehir Yolu 8. Km. No.2 PK: 06800 Bilkent/Ankara
Telefon: 0(312) 291 25 25/40 64 - 36 45