

ŞÜKRAN AKDAĞ

Yüksek Lisans Tezi  
2017

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Primer Kornea Epitel Hücre Kültüründe Uv-A Ve  
Uv-B'nin Antioksidan Aktivitesinin Moleküler  
Biyolojik Araştırılması

Şükran AKDAĞ  
ŞUBAT 2017

**Biyoloji Anabilim Dalında**Şükran AKDAĞ tarafından hazırlanan PRİMER  
KORNEA EPİTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE UV-A VE UV-B'NİN  
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİK

ARAŞTIRILMASI adlı Yüksek Lisan Anabilim Dalı standartlarına uygun  
olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN  
Anabilim 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 : Yrd. 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 Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### KORNEA EPİTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ASTAKSANTİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİK ARAŞTIRILMASI

AKDAĞ, Şükran

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman:Doç. Dr. Mustafa Türk

ŞUBAT 2017 101 SAYFA

Keratokonus, henüz sebebi bulunamamış ve oluşumundaki sebepleri incelenmeye devam eden bir göz hastalığıdır. Epitel ve stroma hücrelerinde yüksek seviyede UV ışınlarına maruzat sebebiyle oksidatif stres yoğun olarak yaşanır ve bu hücreler güçlü bir antioksidan sisteme sahiptir. Keratokonusta oksidatif streste artış gösterilmiş olsa da, antioksidan mekanizmadaki değişiklikler bu tez ile açığa çıkarılmıştır.

Keratokonus ile ilgili henüz genetik bir sebep bulunamamasına rağmen çevresel etkenlerden en önemlisi güneş ışınlarındaki yüksek enerjili mor ötesi (UV) ışınların gözde ciddi etkiler oluşturmasıdır. Güneş ışınlarındaki yüksek enerjili UV ışınları üç kısma ayrılır ve en yüksek enerjili olan 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 soğurulur. Kornea epiteli hücreleri UV-B'ye doğrudan maruz kalan ilk hücre tabakasıdır ve olumsuz etkilerin önlenmesi için yüksek miktarda antioksidan molekül ve enzim ifadesi bulunmaktadır. Keratokonusta hücrelerde DNA hasarı durumu incelenmiş fakat önemli bir fark bulunamamıştır. Antioksidan enzimlerinin miktarları ve aktiviteleri de hem normal-keratokonusta kornea epitel hücrelerinde hem de UV-A/B ile maruz bırakılan epitel hücrelerinde incelenmiştir. Enzim olmayan moleküller de oksidatif stres ile mücadelede UV emilimi açısından önemli bir rol oynar. Keratokonusta epitel

hücrelerinde bu moleküllerin azalması veya UV-A/B maruzatı ile ifade değişikliğinin bulunmaması sorun olabileceği şüphesini çıkartır. Çalışmalar kapsamında enzim olmayan antioksidan moleküller glutathione, C-vitamini, E-vitamini, NADPH ve Ferritin incelenmiştir. Epitel hücre kültürlerinin normaller ile ve UV-A/B maruzatı durumu ile karşılaştırmalı olarak toplam antioksidan kapasitesi incelenmiştir. Bunun yanı sıra, aynı şekilde antioksidan aktiviteleri ve miktarları açısından incelenen enzimler SOD-1, SOD-2, ALDH, Catalase, G6PD, Glutathione Peroxidase, ve Glutathione Reductase enzimleridir. Antioksidan enzimlerinin transkripsiyon ya da translasyonun hangi aşamasında problem oluşturduğunun anlaşılması için ise hem qPCR analizleri hem de protein seviyesinde ELISA testleri gerçekleştirilmiştir.

Antioksidan mekanizmasının son ürünleri olan NO sentaz, NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NADH miktarları da incelenmiştir. Tüm bu analizler sayesinde keratokonus hastalığının epitel tabakadan kaynaklanabileceğine dair önemli bulgular elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: keratokonus, epitel, UV-A, UV-B, antioksidan, oksidatif stres, hücre kültürü

## **ABSTRACT**

### **MOLECULAR BIOLOGICAL INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF UV-A AND UV-B IN THE PRIMARY KORNEA EPITHELIAL CELL CULTURE**

**AKDAĞ, Şükran**

**Kırıkkale University**

**Grade School of Naturel and Applied Sciences**

**Department Of Biology, Graduate Thesis**

**Supervisor:Doç. Dr. Mustafa Türk**

**FEBRUARY2017,101 Pages**

Keratoconus is an eye disease with limited findings about its prognosis and progression. Epithelial and stromal cells are highly exposed to UV of sunlight which causes oxidative stress and thus these cells have to possess high degree of anti-oxidant mechanisms. By this project, abnormalities in antioxidant mechanisms of epithelial cells are revealed.

Although there is limited findings about genetic background of Keratoconus, effect of high energy UV of sunlight has strict effect on cornea cells. There are three subtypes of sunlight UV and UV-C, with highest energy, absorbed through atmosphere. UV-A and UV-B, however, reaches cornea and absorbed by both epithelial and stromal layers, and eye lens. Corneal epithelial cells are first layer of cells exposed to UV-A/B and its antioxidant mechanism is well developed.

Amount and activity rate of antioxidant enzymes, both in normal and epithelial cells and UV-A/B exposed cells. Non-enzyme molecules, also, have an important role for absorbance of UV. Down-regulation of these molecules of unaltered expression after high dose UV-A/B exposure in Keratoconus provides information about a problem. Non enzyme molecules, glutathione, C-vitamin, E-vitamin, NADPH and Ferritin have been investigated. The other enzymes are SOD-1, SOD-2, ALDH, Catalase, G6PD, Glutathione Peroxidase, and Glutathione Reductase. To understand

better about the point of problem during transcription and translation, both qPCR and ELISA methods have been applied.

The end products of antioxidant mechanism, NO synthase, NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NADH quantities are also measured. By all these analysis, it is reached that keratoconus disease can also be originated at cornea epithelial layer.

**Key Words:** Keratoconus, Epithelium, UV-A, UV-B, antioxidant, Oxidative stress, cell culture



## ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımı esirgemeyen ve biz genç araştırmacılara büyük destek olan, bilimsel deney imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRK 'e, tez çalışmalarım esnasında, bilimsel konularda daima yardımını gördüğüm Sayın hocam Doç. Dr. Nurullah Çağıl 'a ve Sayın Doç. Dr. Özge SARAÇ'a, büyük fedakarlıklarla bana destek veren arkadaşım Esmâ METE, tezimin birçok aşamasında yardım gördüğüm Sema TUNCER'e ve son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında da yardımlarını esirgemeyen Arife ÖZÇELİK ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında beni 113S906 nolu projeye maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel Ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde karşılıksız destekleri ve fedakârlıklarını esirgemeyen sevgili annem Anber AKDAĞ sevgili abim Sait AKDAĞ ve sevgili kardeşlerim Azime AKDAĞ, Yunus AKDAĞ ve Yusuf AKDAĞ 'a sonsuz teşekkürler...

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT .....	III
ÖNSÖZ.....	V
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	VIII
TABLOLAR .....	X
ŞEKİLLER .....	X
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	XIV
1. GİRİŞ .....	1
1.2.Gözün Anatomisi ve fizyolojisi .....	1
1.1.1. Kornea.....	1
1.1.1.1.Epitel Tabakası .....	2
1.1.1.2. Bowman Membranı .....	2
1.1.1.3. Stroma.....	2
1.1.1.4. Dessement Membranı .....	3
1.1.1.5. Endotel.....	3
1.2. Keratokonus (KC).....	3
1.2.1. Keratokonusun Tanım ve Epidemiyolojisi.....	4
1.2.2. Keratokonusun Etyopatogenezi .....	4
1.2.2.1. Genetik .....	4
1.2.2.2. Ekstrasellüler Matriks Anormallikleri.....	5
1.2.2.3.Enzim Anormallikleri .....	5
1.2.2.4.Apopitoz .....	5
1.2.2.5.Sinyal iletim Anormallikleri.....	6
1.2.2.6.Oksidatif Hasar .....	5
1.2.3. Keratokonus Tedavisi.....	6
1.2.3.1.Cerrahi dışı tedaviler .....	7
1.2.3.2.Cerrahi tedaviler .....	7



1.3.Hücre Kültürü .....	8
1.4. Elektromanyetik Spektrum Bölgeleri .....	9
1.4.1.Ultraviyole ışınlar.....	10
1.4.1.1. UV-A .....	10
1.4.1.2. UV-B .....	10
1.4.1.3. UV-C .....	10
1.5.Serbest Radikaller, antioksidan ve Oksidatif Stres .....	11
1.5.1. Serbest radikal türleri .....	12
1.5.2. Serbest radikallerin oluşumu (ROS) .....	12
1.5.3.Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türler .....	13
1.5.3.1.Süperoksit radikali.....	13
1.5.3.2.Hidroksil radikali.....	13
1.5.3.3.Hidrojen peroksit.....	14
1.5.3.4.Singlet oksijen.....	14
1.5.3.5.Nitrik oksit (NO•).....	15
1.5.3.Serbest Radikallerin Kaynakları.....	16
1.6.Antioksidan .....	17
1.6.1.Endojen antioksidanlar .....	18
1.6.1.1. Enzim olanlar .....	18
1.6.1.2.Enzim olmayanlar .....	21
1.7.Lipid peroksidasyonu .....	23
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>25</b>
2.1Kornea Epitel Hücre Örneklerinin Toplanması.....	25
2.2 Kornea Epitel Hücre Kültürü.....	25
2.3 UV Uygulaması .....	26
2.4 Antioksidan Enzim Aktivitesi.....	30
2.4.1Glutatyon Peroksidaz (GPX)Aktivites).....	30
2.4.2 GR Aktivitesi.....	32
2.4.3 SOD Aktivitesi .....	33
2.4.4 G6PD Aktivitesi .....	34
2.4.5 CAT Aktivitesi .....	35
2.4.6 ALDH Aktivitesi.....	36

2.5 Gerçek Zamanlı PCR İle Antioksidan Enzimlerin mRNA İfade Miktarındaki Değişimlerin Belirlenmesi .....	37
2.6 Enzim Olmayan Antioksidan Moleküller .....	39
2.6.1 Glutasyon (GSH) Miktarı .....	39
2.6.2 NADPH Miktarı .....	40
2.6.3 Ürik Asit Miktarı .....	41
2.6.4 Ferritin Miktarı .....	42
2.6.5 Askorbik Asit Miktarı.....	42
2.7 ROS Türevleri.....	44
2.7.1 Toplam Antioksidan Kapasite .....	44
2.7.2 Hidrojen Peroksit Miktarı .....	45
2.8 NOS ve NO .....	46
2.9 Oksidasyon Son Ürünleri .....	47
2.9.1 MDA Miktarı (Lipid Peroksidasyonu) .....	47
2.9.2 Nitrotirozin Miktarı .....	48
2.10 DNA Tamiri ve Kırıkları .....	49
2.11 UV Geçirgenlik Ölçümü.....	51
2.12 Gerçek Zamanlı PCR.....	51
2.13 İstatistik Analizler.....	54

<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>56</b>
3.1 ELİSA Sonuçları .....	56
3.2 Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları.....	68
3.3 UV Absorbans Ölçümü Sonuçları .....	71
3.4 DNA Hasarı Ölçümü .....	72
3.5 Antioksidan Ölçüm Sonuçları .....	73
3.5.1 Super Oksit Dismütaz(SOD) Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları... 73	
3.5.2Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları..... 74	
3.5.3Glutasyon Redüktaz(GR)Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları..... 74	
3.5.4 Aldehit Dehidrogenaz(ALDH)Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları. 75	
3.5.5 Total Antioksidan Seviyesinin (TAK)Ölçüm Sonuçları .....	75
3.5.6. Katalaz (KAT)Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları.....	77
3.5.7Glikoz-6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları.....	77
3.5.8 Nitrik oksit (NO) Seviyesin Ölçüm Sonuçları.....	78
3.5.9 Ürik Asit (Ü.A) Miktarının Ölçüm Sonuçları .....	79
3.5.10 Lipid Peroksidasyon(MDA) Seviyesinin Ölçüm Sonuçları ....	79
3.5.11 Askorbik Asit Miktarının Ölçüm Sonuçları .....	80
3.5.12 Glutasyon (GSH) Seviyesinin Ölçüm Sonuçları .....	81
3.5.13 Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları ....	81
3.5.14 Hidrojen Peroksit Miktarının Ölçüm Sonuçları .....	82
3.5.15 NAD/NADPH Miktarının Ölçüm Sonuçları .....	83
3.5.16 Nitrotirozon Miktarının Ölçüm Sonuçları .....	84
3.5.17 Ferritin Miktarının Ölçüm Sonuçları.....	84
3.5.18 DNA Hasarının Belirlenmesi .....	85
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR</b> .....	<b>86</b>
<b>5.KAYNAKLAR</b>	

## **TABLO**

2.3. Gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılmam primerler .....	38
3.1.Gruplardaki analiz sonuçlarının karşılaştırılması .....	57
3.2. Anlamli çıkan gruplardaki analiz sonuçlarının kendi aralarında Karşılaştırılması .....	58
3.3. Keratokonus grubunda UV uygulamasına göre sonuçların Karşılaştırılması... ..	59
3.4. Keratokonus grubunda UV uygulamasına göre karşılaştırıldığında anlamli çıkan analiz sonuçları .....	60
3.5. Kontrol grubunda UV uygulamasına göre yapılan karşılaştırmalar .....	62
3.6.Kontrol grubunda UV uygulamasına göre karşılaştırıldığında anlamli çıkan analiz sonuçları .....	63
3.7. Keratokonus ve kontrol gruplarının herbir UV grubu içinde Karşılaştırmaları..	65
3.8. Enzim ekspresyonlarındaki değişimler .....	69
3.9. Gruplardaki enzim ekspresyonlarının ikili grup karşılaştırılması .....	69
3.10. Keratokonus ve Kontrol grubunda UV absorbans değerleri .....	71
3.11. Keratokonus ve kontrol gruplarında UV absorbans değerlerinin ikili karşılaştırmaları .....	71
3.12. Keratokonus ve kontrol gruplarında DNA hasarının karşılaştırılması.....	72
3.13.Keratokonus ve kontrol gruplarında DNA hasarının ikili Karşılaştırmaları .....	73

## **SEKİL**

1.1. Gözün şematik kesiti .....	1
1.2. Korneanın mikroskopik anatomisi .....	2
1.3. Korneanın histolojik katmanları.....	3
1.4. Normal ve keratokonuslu kornea .....	4
1.5. Elektromanyetik spektrum ve görünür ışık spektrumu .....	9
1.6.UV-A, UV-B,UV-C .....	11
1.7UV Çeşitlerinin Gözdeki Hasar .....	11
1.8Serbest Radikal Oluşumu .....	16
2.1.Kontrol epitel hücre kültürlerinin değişik büyütmeye görünümleri .....	25

2.2.Keratokonus epitel hücrelerinin tip 4 kollajen modifikasyonlu yüzeyde kültür görünümü .....	26
2.3. UV Maruzat cihazının resimleri.....	26
2.4.50 mJ/cm <sup>2</sup> dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	27
2.5.150 mJ/cm <sup>2</sup> dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	28
2.6.200 mJ/cm <sup>2</sup> dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyamayöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	28
2.7.1000 mJ/cm <sup>2</sup> dozunda UV-A uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri.....	29
2.8.2000 mJ/cm <sup>2</sup> dozunda UV-A uygulanan örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri .....	31
2.9.NADPH standart eğrisinin oluşturulması .....	31
2.10.TNB standart eğrisinin oluşturulması .....	32
2.11.NADH Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	35
2.12.H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	36
2.13.NADH Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	37
2.14.Glutatyon Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	40
2.15.NADH Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	41
2.16.Ürik Asit Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	42
2.17.Ferritine Ait Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	43
2.18. Askorbik Asit Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	44
2.19.Trolox Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	45
2.20.H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Standart Eğrisinin Oluşturulması.....	46
2.21.Nitrik Standart Eğrisinin Oluşturulması.....	47
2.22. MDA Standart Eğrisinin Oluşturulması.....	48
2.23. 3-NT Standart Eğrisinin Oluşturulması .....	49
2.24. DNA lezyonlarının belirlenebilmesi amacıyla apürinik/aprimidinik (AP)bölgelerinin sayısının gösterilmesiyle hazırlanmış standart eğris.....	50

3.1. Keratokonus grubunda UV uygulamasına göre Katalaz, NOS, Nitrotirozin-3 seviyelerinin grafikleri .....	61
3.2.Kontrol grubunda UV uygulama gruplarına göre anlamlı fark bulunan analizlerin grafikleri.....	64
3.3. UV-A uygulanan grupta ALDH ve TAS seviyelerinin grafiği .....	66
3.4. UV-A uygulanan grupta G6PD ve Katalaz seviyeler .....	66
3.5. UV-A uygulanan grupta NO ve NOS seviyeleri.....	66
3.6 UV-B uygulanan grupta ALDH ve TAS seviyeleri .....	67
3.7. UV-B uygulanan grupta G6PD ve MDA seviyeleri .....	67
3.8. UV-B uygulanan grupta NO ve NOS seviyeleri.....	67
3.9. UV uygulanmayan grupta ALDH ve TAS seviyeleri .....	68
3.10. UV uygulanmayan grupta G6PD ve TAS seviyeleri .....	68
3.11. UV uygulanmayan grupta NO ve NOS seviyeleri .....	68
3.12.Keratokonus ve kontrol gruplarında Uv absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	72
3.13.Normal ve keratokonuslu hasta gruplarında ölçülen total SOD aktivitesi .....	73
3.14.Keratokonuslu ve normal kornea epitel hücrelerinde ölçülen glutatyon peroksidaz antioksidan enzim aktivitesinin miktarları .....	74
3.15.Keratokonuslu ve normal kornea epitel hücrelerinde ölçülen glutatyon redüktaz antioksidn enzim aktivitesinin miktarları.....	74
3.16.Keratokonus ve kontrol grubu hastalarında ölçülen ALDH miktarı .....	75
3.17.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde Total Antioksidan Kapasitesi miktarı .....	76
3.18.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde Katalaz aktivitesi miktarı .....	77
3.19.Keratokonus ve kontrol grubu hastalarında G6PD aktivitesi miktarı .....	78
3.20.Keratokonus ve kontrol grubu hastalarında Nitrik Oksit aktivitesinin miktarları .....	78
3.21.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde ürik asit miktarının aktivitesinin Belirlenmesi .....	79
3.22.Keratokonus ve kontrol hastalarında MDA miktarları.....	79
3.23.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde Askorbat konsantrasyonun aktivitesinin miktarları .....	80
3.24.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde Glutatyon seviyesi miktarları.....	81

3.25.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde Nitrik Oksit aktivitesinin miktarları .....	82
3.26.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarının aktivitesi .....	82
3.27.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde NADPH miktarının aktivitesi .....	83
3.28.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde nitrotrozin miktarı .....	83
3.29.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde ferritin miktarı .....	85
3.30.Keratokonus ve kontrol grubu hücrelerinde DNA hasarının belirlenmesi amacıyla apürinik/aprimidinik (AP) bölgelerinin gösteren grafik .....	85

## ÇİZELGE DİZENİ

1.1. Elektromanyetik spektrumdaki ışınlar ve dalga boyları .....	9
1.2. Patolojik olarak önemli oksijen türevleri .....	15
1.3. Vücudumuzda serbest radikal .....	17
1. 4. Başlıca enzimatik endojen antioksidanlar .....	18
1. 5. Enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar .....	21
2.1. Çalışma ve Kontrol Grupları .....	26
2.2. Blank1, blank2, blank3 ve örneklerin hazırlanmasında kullanılacak Solüsyon.	34

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

% Yüzde

° Derece

μ Mikron

### Kısaltmalar

**ALDH** Aldehit Dehidrogenaz

**AP** Apürinik/Aprimidinik

**BTH** Bitemporal Hemianopsi

**CCL** Korneal Kollajen Çapraz Bağlanma

**DNA** Deoksiribo Nükleik Asit

**ELISA** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**FAD** Flavin Adenin Dinükleotid

**GR** Glutasyon Redüktaz

**GSH** İndirgenmiş Glutasyon

**GSH-Px** Glutasyon Peroksidaz

**GSSG** Okside Glutasyon

**GST** Glutasyon S-Transferaz

**G6PD** Glikoz-6 Fosfat Dehidrogenaz

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Hidrojen Peroksidi

**INTACS** Intrastromal Korneal Halka

**KAT** Katalaz



<b>KK</b>	Keratokonus
<b>M</b>	Molar
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>mg</b>	Miligram
<b>mL</b>	Millitre
<b><math>\mu</math>M</b>	Milimolar
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b>MMP</b>	Matriks Metalloproteinaz
<b>NADPH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>NBT</b>	Nitrobluetetrazolium
<b>Nm</b>	Nanometre
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>NO<sup>-</sup></b>	Nitrik Oksit Anyonu
<b>NOS</b>	Nitrikoksit Sentaz
<b>NT</b>	Nitrotirozin
<b>OH</b>	Hidroksil Radikali
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit
<b>PBS</b>	Tuzlu Fosfat Tamponu
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PMSF</b>	Phenylmethane Sulfonyl Flüoride
<b>TAC</b>	Total Antioxidant Capacity
<b>TAS</b>	Toplam Antioksidan Seviyesi

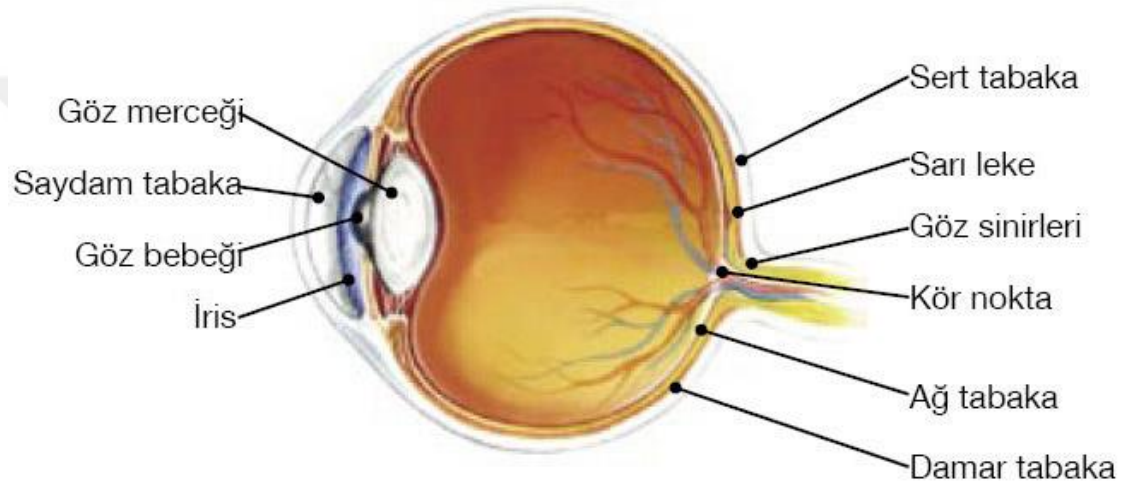
<b>RNA</b>	Ribo Nükleik Asit
<b>RNS</b>	Reaktif Nitrojen Türleri
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri



# 1.GİRİŞ

## 1.1. Gözün Anatomisi ve Fizyolojisi

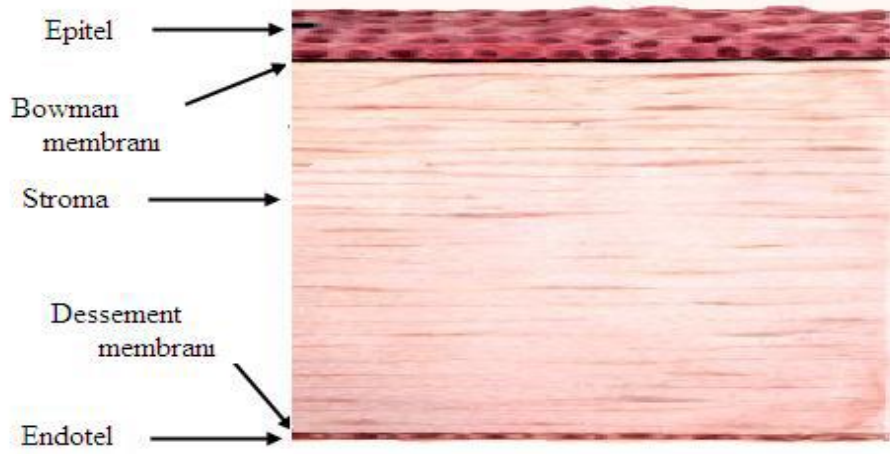
Göz küreleri (glob; bulbus okuli), orbita boşluğu içinde bağ dokusundan zengin bir yağ yastığına yerleşmiş görme duyusunda fonksiyonunda görevli olan bir çift organdır. Göz; oldukça gelişmiş, karmaşık fotosensitif (ışığa duyarlı), şeklini, ışık şiddetini ve nesnelere yansıyan renklerin analizini yapan organdır. Göz tabakadan oluşur: göz akı (sert tabaka), damar tabaka ve ağ tabakadır[1-3]. Göz küresinin gösterimi **Şekil1.1** de verilmiştir.



**Şekil1.1**Gözün şematik kesiti [4]

### 1.1.1. Kornea

Sert yapısı sebebiyle göz içindeki dokuları hasara karşı koruyan bir bariyerdir. Korneanın üzerini örten gözyaşı film tabakası vardır. Bu film tabakasıyla birlikte düzgün kırıcı ortam oluşturup gözü yapısal hasara ve enfeksiyona karşı koruyan kornea beş katlı bir yapıya sahiptir. Bu katlar; epitel, Bowman zarı, stroma, Descement membranı ve endoteldir ve şartlarda kan ve lenf damarları içermez[5,6].



**Şekil1.2.** Korneanın mikroskopik anatomisi[7].

#### **1.1.1.1.Epitel Tabakası:**

Kornea epiteli, korneanın en dışında yer alır. Sıkı ve koruyucu özellikte beş veya yedi tabası bulunabilen ve yassı epitel yapısındadır. Gözyaşı sıvısını stromaya geçişini epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar engeller. Bazal hücre tabakası rejeneratif özelliğine sahiptir ve limbal kök hücrelerden meydana geldiği düşünülmektedir. Bu hücreler devamlı olarak çoğalırlar ve farklılaşıp diğer tabakaları oluştururlar. Bu farklılaşma tüm epitelin yenilenmesini sağlar. Bu farklılaşma 7 ila 14 gün arasında tamamlanır. Bazal membran gerçek bir membran yapısındadır. Laminin, Tip IV kollojen, fibronektin ve fibrin içerir ve bazal membran rejenerasyon yeteneğine sahip değildir[8,9].

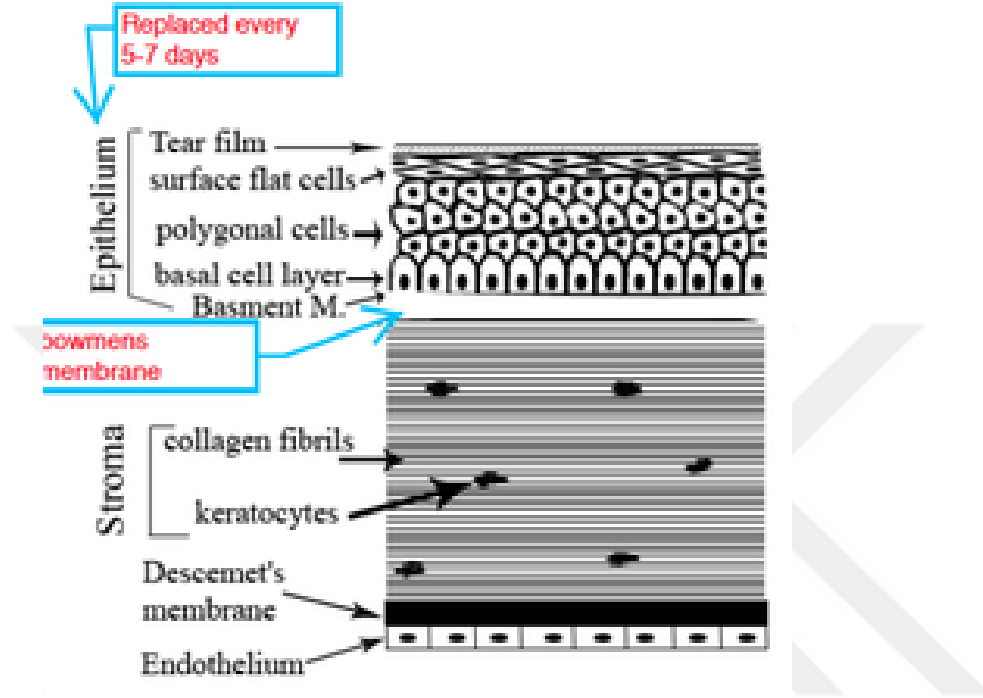
#### **1.1.1.2. Bowman Membranı:**

Bowman membranı hücre içermediğinden hasar gördüğünde kendini yenilemez. Bu membran Tip I ve V kollojenden ve bunların arasını dolduran Tip VI kollojen filamanları ve proteoglikanlardan oluşur. Bowman zarının kalınlığı yaşam boyu sabittir [9].

#### **1.1.1.3. Stroma:**

Korneal kalınlığının %90'ını kornea stroması oluşturmaktadır. Stromanın ana hücresi keratosittir ve ortalama ömürleri 2-3 yıldır. % 78'isi olan stromanın geriye kalan ağırlığın %70'i kollajen lifler tarafından oluşturulmaktadır. Kollajen lifler keratositler tarafından sentezlenmektedir. Kornea stromasında kollojenler; Tip III, IV

ve VI kollajen bulunmakta ve büyük çoğunluğu tip I kollajendir. Stromadaki kollejen lifler düzenli dizilir. Buda korneanın saydamlığı için büyük önem taşır kollejendeki fibriller 34-40 nm çapındadır ve olup 20-50 nm aralıklarla dizilirler. Stromada ortalama 200-250 2 µm genişlikte kollajen lameli mevcuttur [10].



Şekil 1.3. Korneanın histolojik katmanları[11]

#### 1.1.1.4. Dessement Membranı:

Kollojen fibrillerinin birleşmesiyle oluşan endotelin bazal membrandır. Kalınlığı 3-12 mikron asellüler bir zar olup stromanın arka yüzeyini kaplamaktadır[12].

#### 1.1.1.5. Endotel:

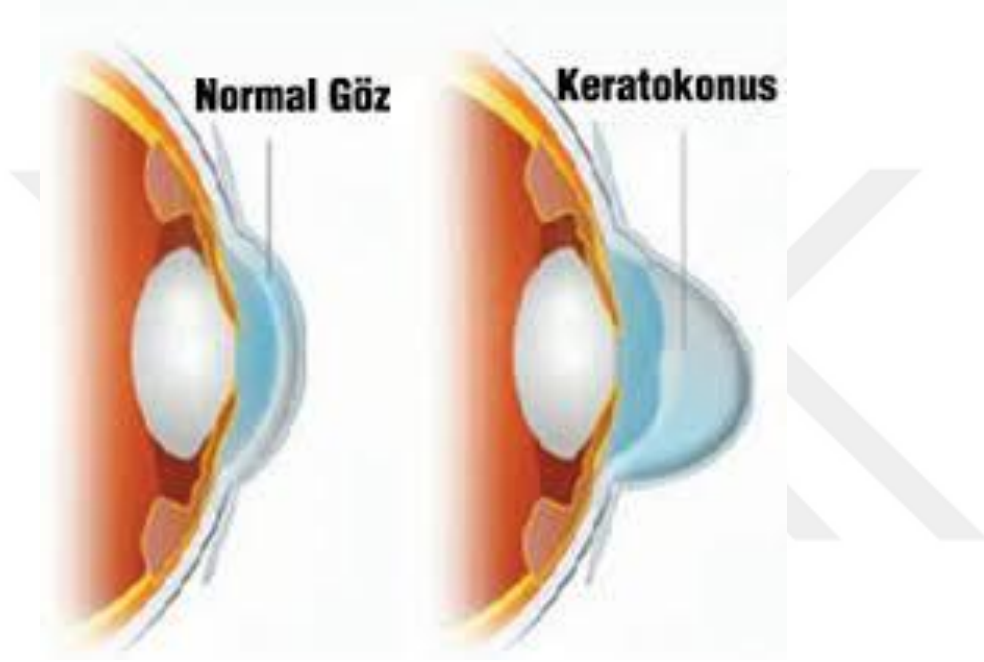
Tek sıra hücreden oluşan ve korneanın arka yüzeyini kaplayan tabakadır. Bu tabaka yaklaşık 500000 hegzagonal hücre bulunmakta ve bu hücreler rejenere olmadıkları için yaşlandıkça azalır Yenidoğan yaklaşık 5000 hücre/mm<sup>2</sup> iken korneadaki büyüme ve yaşa bağlı hücre ölümleri nedeniyle 20 yaşında ortalama 3000 hücre/mm<sup>2</sup> dir. Sonraki yıllar ortalama % 0,6 oranında azalmaktadır[13].

### 1.2. Keratokonus (KK);

Keratokonusun korneanın diğer hastalıklarından farklı bir hastalık olduğu ilk defa 1854 yılında John Nottingham tarafından tanımlanmıştı[14].

### 1.2.1. Keratokonusun Tanım ve Epidemiyolojisi

Keratokonus korneanın dikleşip ve incilmesiyle karakterize olan, ilerleyici noninflamatuvar bir hastalıktır. Myopik astigmatizması olan her genç erişkinde keratokonus olduğu düşünülmektedir[15]. Korneanın zayıflaması ve inceliğiyle oluşan, genetik ve çevresel etkenlerin ortak sebep olduğu, kornea nakline kadar varan şiddetlerde görülen ve dünya çapında gençlerde rastlanan bir görme rahatsızlığıdır [16].



Şekil 1. 4. Normal ve keratokonuslu kornea [17]

### 1.2.1. Keratokonusun Etyopatogenezi

Keratokonusun patogenezinin anlaşılabilmesi için birçok biyokimyasal ve epidemiyolojik yapılmış olmasına rağmen altta yatan biyokimyasal ve etiyolojik temeller çok az anlaşılmıştır. Keratokonusun etiyolojisinde birdençok faktörün rol oynadığı düşünülmekte ve bunlardan bazıları aşağıda açıklanmıştır [18].

#### 1.2.1.1. Genetik

Kalıtımın keratokonus etiyolojisinde kalıtımın rolü net bir şekilde ortaya konulmamıştır. Olguların sadece % 10'unda keratokonusun çocuklara aktarıldığı görülmüştür[19]. Wang ve ark. Yaptığı çalışmada keratokonus olgularının birinci

derece akrabalarındaki keratokonus yaygınlığının normal popülasyona göre daha fazla olduğu bulunmuş, bu artışın da genetik etkiye bağlı olduğu düşünülmüştür[20].

#### **1.2.1.2. Ekstrasellüler Matriks Anormallikleri**

Korneal şeffaflığını, Glikoprotein ve proteoglikanların içine gömülü halde bulunan sıkıca paketlenmiş kollajen liflerinden oluşan kollajen lamellerinin, eşsiz korneal stromal matriksi sağlar. Kornea şeffaf olabilmesi için; Küçük kollajen fibril çapı ve interfibriller boşluk düzenliliği gerekli fiziksel özelliklerdendir. Stromal proteoglikanların, kornea kollajen fibrilleri ile yakından ilişkili olduğu ve stromanın önemli bir bileşeni olduğu düşünülmektedir[21].

Keratokonuslu gözlerde kollajen lamellalar arası ve lamellaların içindeki yanlış yerleşimler ve kaymalar korneal eğriliklerdeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir[22].

Keratokonus; Ti p XII kollajen kornea epitel bazal membran bölgesi ve stromal matrikste azaldığı görülmüştür[23]. Keratokonus patogenezinde korneadaki bowman tabakası ve Descemet membranında tip IV kollajenin azalmasının rol oynayabileceği bildirilmiştir [24] .

#### **1.2.1.3.Enzim Anormallikleri**

Matriks Metalloproteinaz (MMP) stromada bulunan bir enzimdir ve yıkımdan sorumludur. Bu enzim proteinaz inhibitörlerini inflüasyonu, ülserasyon ve yara iyileşmesinde korneanın korunmasında önemli rolleri vardır[25]. Yapılan çalışmalarda keratokonus normal korneaya göre daha çok kollejenaz aktivitesi var. Son yılda keratokonus patogenezinde proteinaz faaliyetlerin sorumluluğunu olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır[26].

#### **1.2.1.4.Apoptoz**

Apoptozis; programlanmış hücre ölümüdür. Canlılarda normal gelişimde, hastalıklarda ve yara iyileşmesinde ortaya çıkar[27]. Kornea epitelinin kronik, tekrarlayan kaldırılmasının stromal apoptozisi uyardığı yapılan hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Buda keratokonus olgularında, sert gaz geçirgen kontakt lens kullanımına bağlı olarak veya genetik yapı durumunda olduğu gibi yoğun göz ovuşturması ikincil kronik iritasyonun apoptozise yol açabileceğini düşünmektedir[28,29].

Yapılan çalışmalar apoptozisi 2 mekanizmanın uyarabildiği gözlemlenmiştir. Bunlardan ilki transmembran fosfotirozin fosfatazı olan LAR (Leucocyte common

antigen related protein)'in apoptozisi uyardığı belirtilmiştir. İkinci mekanizma ise apoptozisi inhibe eden TIMP-1'in (matriks metalloproteinazların doku inhibitörü) keratokonuslu kornealarda düşük düzeylerde bulunmasıdır[30].

#### **1.2.1.5.Sinyal iletim Anormallikleri**

Proteinaz inhibitörünün ( $\alpha$ 1) promotor aktivitesini baskılayan ve bunun sonucunda bu enzimin düzeyini düşüren bir transkripsiyon faktörü olan Sp1'in, keratokonuslu kornealarda arttığı gösterilmiştir[31].Ayrıca bir fosfotirozin fosfataz enzimi ve LAR'ın keratokonuslu kornealarda arttığı gösterilmiştir. Fosfotirozin fosfatazların görevleri tirozin molekülünden bir fosfatı uzaklaştırmaktır[32].Tirozinin, bu defosforilasyonu ile LAR hücre içi sinyalizasyonu etkilemekte ve apoptozisi uyarmaktadır [ 30].

#### **1.2.1.6.Oksidatif Hasar**

Lipid peroksidasyon ve nitrik oksit yolu sonucu oluşan sitotoksik ürünlerin keratokonuslu kornealarda biriktiği gözlenmiştir[33-42]. Ayrıca kantakt lenslerin nede olduğu mekanik travmaultraviyole ışık, yoğun göz ovuşturmak oksijen radikallerinin kaynağı oksidatif strese sebep olabilmektedir[30].

Aldehid dehidrogenaz sınıf 3 enzimi reaktif aldehidlerin uzaklaştırılmasında rol oynar ve keratokonuslu kornealarda düşük seviyelerde bulunmaktadır[43].keratokonuslu kornealarda süperoksit dismutaz düzeyi düşüktür. Süperoksit dismutaz serbest radikaller ve süperoksitler gibi reaktiflerin uzaklaştırılmasında rol oynar[44,45]. Keratokonuslu kornealarda sitotoksik olan aldehid grubunda yer alan malondialdehid ve sitotoksik peroksinitrit olan nitrotirozin artar[33-42].

#### **1.2.2. Keratokonus Tedavisi**

Keratokonus hastalarında tedavinin çeşitli aşamaları vardır. Bu aşamalardaki amaçlar; hastanın yaşamını devam ettirebilecek kadar görme keskinliği sağlama, hastalığın ilerlemesini durdurma mümkün olduğu kadarıyla kornea nakli gibi cerrahi işlem gerektiren işlem yerine işlem gerektiren yöntemler kullanarak nakil ihtiyacını engellemek veya ileri yaşlara ertelemektir[46].



### 1.2.2.1 Cerrahi Dışı Tedaviler

A) Gözlükle düzeltme durumlarda: gözlük hafif keratokonus vakalarında miyopi ve astigms düzeylerinde kullanılır. Ki bu evrede gözlük yeterli olacak görme keskinliği sağlar. Düzensiz astigma, reaktif kussru çok kısa sürede değişmesi vb. gözlük verilir.

B) Kontakt lensle düzeltme: kontak lens, korneanın ön yüzeyini kaplayıp ve düzenli sferik bir optik yüzey sağlayarak düzensiz astigmatı düzeltebilir. Kontakt lens hastalığın ilerleyip ve veya ilerlemesini durdurucu bir etkisi yoktur. Keratokonus sert gaz geçirgen kontak lens, yumuşak kontak lensler, sert-yumuşak kontak lens kombinasyonları ve sklera lensleri kullanılabilir.

### 1.2.2.2.Cerrahi tedaviler

A) Korneal kollajen çapraz bağlanma (CXL) tedavisi: Cerrahi tedaviler içerisinde keratokonus ilerlemesini durdurduğu gösterilmiş tek tedavi yöntemidir [47].Korneal kollajen çapraz bağlanma tedavisi korneal kollajenler arasındaki kovalent bağları artırır ve kollajen matriks biyomekaniğini güçlendirerek keratokonus ilerlemesini durdurmayı amaçlayan bir tedavi yöntemidir[48].

B) Intrastromal korneal halka (INTACS) tedavisi: santral korneayı düzleştirmek amacıyla stromanın derinine cerrahi yöntemle yerleştirilen, kavisli yay benzeri segmentlerdir. Bu segmentler polimetilmetakrilattan üretilir. Keratokonusa uygulanan INTACS tedavisi geri dönüşlü bir cerrahi bir tekniktir.INTACS keratokonusa marjinaldejanerasyon hastalıklarının tedavisinde popüleritesi artan bir yöntemdir[50].

C) Penetran keratoplasti: Keratokonus nedeniyle sert kontak lens kullanan hastalarda daha sonraki yıllarda penetran keratoplastiye ihtiyaç duyulabilmektedir. Kontakt lens intoleransı, santral kornea skarı gelişmesi ve görmenin arttırılamaması gibi nedenlerle keratokonus hastalarında keratoplasti yapılmaktadır. Penetran keratoplasti sonrasında gelişen yüksek astigmatizma ve greft rejeksiyonu gibi komplikasyonlar alternatif tedavi seçeneklerini ön plana çıkarmaktadır.

D) Derin anterior lameller keratoplasti (DALK): Bu teknikte lameller cerrahide en büyük sorun olan ara yüzeyi ortadan kaldırmak için descement membranına kadar inmek amaçlanmıştır. 400 µm periferik trepanasyon sonrası derin stromaya hava injeksiyonu yapılarak posterior stroma ile descement membranı arasındaki hava aracılığı ile bir disseksiyon planı oluşturulur. Daha sonra ön stroma bıçaklar ile diseksiyon edilerek büyük kabarcık olan alana bıçak ile girilir ve posterior stroma alıcı yataktan

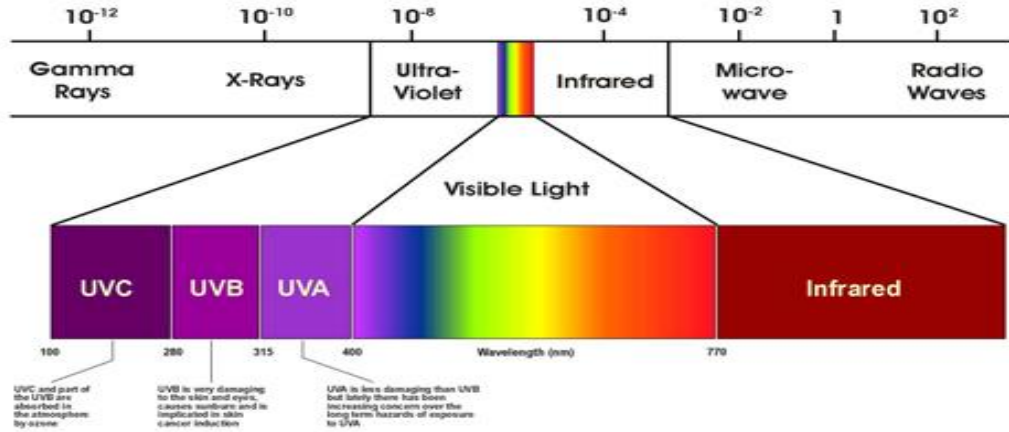
uzaklaştırılır. Hazırlanan donör korneanın endoteli soyularak alıcı yatağa suture edilir. Yöntem kornea endotelini yerinde bırakması ve lameller ara yüzey olmaması nedeni ile teorik olarak penetran cerrahi tekniklere üstün görülmektedir[51].

### **1. 3.Hücre Kültürü**

Hücre kültürü; canlı bir doku veya organdan alınan küçük bir parçanın in vitro ortamda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemine verilen isimdir[52]. Hücre kültürü yönteminin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların in vitro koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla çeşitli canlıların (insan, maymun, fare, tavşan gibi) çeşitli dokuları (böbrek, akciğer, tümör, amniyon zarları) önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, aminoasitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspansiyon ederek steriltüp veya şişelere koyulur. Bu hücre süspansiyonu 36 °C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler[145,146]. Hücre kültürü çalışmalarında iki tip hücre kullanılır. Bunlar primer hücreler ve devamlı hücre hatlarıdır. Primer hücre kültürleri doku ve organlardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilir. Diş eti ve pulpa fibroblastları, primer kültür hücrelerine örnektir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürlere ekilebilir ve çoğaltılabilir. Bu şekilde elde edilen ilk alt kültürlere sekonder hücre kültürleri denir ve bir seri kültür işlemlerinden sonra hücre hatları elde edilir. Fakat primer kültürlerin insandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması oldukça zordur. Primer kültürler farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıtması farklıdır. Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve daha stabil bir fenotipe sahiptir. Devamlı hücreler meydana gelen transformasyondan dolayı in vivo özelliklerinin tümünü koruyamazlar. Devamlı hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilir. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatları fare fibroblastları ( L-929, 3T3) veya insan epitelyal hücreleridir (HeLa). Ayrıca çalışmalarda insan ve hayvan pulpa hücreleri, insan THP-1 monositleri ile immortalize fare odontoblast hücre hatlarında kullanılmaktadır [145,147,148].

#### 1.4. Elektromanyetik Spektrum Bölgeleri

Elektromanyetik dalgaların özelliklerine göre sınıflandırılıp türlerinin dalga boyu veya frekanslarına göre sıralanmış, gama ışınlarından çok düşük frekanslı elektromanyetik dalgalara kadar uzanan dizilimlere elektromanyetik spektrum denir. Elektromanyetik dalgaların frekansı artıkça enerji artar yani en düşük frekanslı elektromanyetik dalgalar en düşük enerjiye sahiptir ve spektrum süreklidir[53].



Şekil1. 5. Elektromanyetik spektrum ve görünür ışık spektrumu.

Çizelge1.1. Elektromanyetik spektrumdaki ışınlar ve dalga boyları

İŞINLAR

DALGA BOYLARI

Kozmik Işınlar	
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 Civarı	0,74-1,5 mikrometre ( $\mu\text{m}$ )
IR	1,5-5,6 mikrometre ( $\mu\text{m}$ )
IR Ötesi	5,6-1000 mikrometre ( $\mu\text{m}$ )
Mikrodalgalar	1-5 milimetre (mm)
Radyo Dalgaları	$>5$ milimetre (mm)

### **1.4.1.Ultraviyole ışınlar**

Güneşten gelen zararlı ultraviyole ışınlar(UV)'ın %90'nı dünyaya ulaşmaz. Çünkü ulaşmasını ozon tabakası engeller. UV ışınları UV-A,UV-B,UV-C olmak üzere üçe ayrılır[54].

Yeryüzüne ulaşan güneş radyasyonununun %5'ini oluşturmaktadır ve 100-400 nm dalga boyu aralığındadır. Bu aralığın %95-98'i UV-A ve %2-5'i UV-B'dir. UV-C ise ozon tabakası tarafından emildiğinden yeryüzüne ulaşmaz[55].

#### **1.4.1.1. UV-A**

Yeryüzüne ulaşan en yaygın spektrumdadır ve pencere camından geçer. Deride var olan pigmentlerin oksidasyonu sağlayıp hızlı pigmentasyon yapar fakat bu çabuk kaybolan bir pigmentasyondur ve deri hastalılarını tedavi amaçlı kullanılır[55].

#### **1.4.1.2. UV-B**

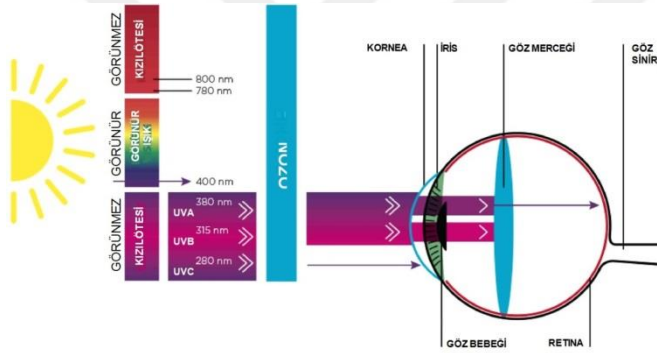
Güneş yanıklarının ve kızarıklarının en büyük sorumlusudur. Kalıcı pigmentasyona sebep olur. Deri yaşlanması ve deri kanserlerinin oluşmasında rol oynar. Ayrıca vücuttaki D vitamini yapımını başlatan UV-B ışınlarıdır. Bu ışınlar UV-A gibi pencere camından geçmez. UV-B'nin sebep olduğu güneş yanığı, yaşlanması, deri kanserine sebep olması nedeniyle güneş koruyucu gereçlerin hazırlanmasında hedef ışığı izgesi olma özelliği taşır. [55].

#### **1.4.1.3. UV-C**

Ozon tabakası tarafından tutulduğundan, normal atmosfer şartlarında yeryüzüne ulaşmaz.



Şekil1. 6.UV-A, UV-B,UV-C [56]



Şekil 1.7UV Çeşitlerinin Gözdeki Hasarı[57].

### 1.5.Serbest Radikaller, antioksidan ve Oksidatif Stres

Dış orbitalinde eşlenmemiş elektron bulunan kısa ömre sahip reaktif atomlu ve moleküler **serbest radikal** denir. Organik ya da inorganik moleküller halinde bulunurlar. Dayanıklı değildirler. Çok aktiftirler bunun sebebi elektron konfigürasyonlarını pozitif yüke dengelemeleridir. Aerobik hücrelerdeki serbest radikaller biyokimyanın en önemli tepkimeye kattıkları oksijen ve oksijen radikalleridir[58].

Serbest oksijen radikallerin yaşam süresi kısadır ve miktarca derişimleri düşük olmasına rağmen çok aktif yapılı zararlı bileşiklerdir ve tüm hücre bileşenleriyle etkileşme özelliği vardır. Serbest radikaller protein, lipid(yağ),karbonhidrat, nükleik

asitlerle reaksiyona girip bu yapıların yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açarlar. Bu değişiklikler, oksidasyon, kromozom kırılması ve mutasyon şeklindedir [59].

### **1.5.1. Serbest radikal türleri**

Aerobik metabolizması yapan canlılarda serbest radikal kaynağı oksijen molekülünden türeyen serbest radikaller olduğu kabul edilir. Aerobik organizmaların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için organik moleküllerden enerji açığa çıkarmada oksijen molekülünün kullanma mecburiyeti bu canlıları oksijenin toksik metabolik ürünleriyle birlikte yaşamak zorunda bırakır[60,61]. Metabolik reaksiyonlarda oksijen ta olarak indirgenir ve son ürün olarak suya indirgenir. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında,kısmi reaksiyonla veya redüksiyon ara basamaklarında metabolik olarak çok fazla yüksek derecede reaktif ara ürünler açığa çıkar. Bu ürünlerin hepsi radikal değildir. Bu sebeple reaktif oksijen türevleri kullanılır[60,62,63].

Oksijenle oluşan serbest radikaller, biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikallerdir. Serbest radikallerin yanı sıra organizmada oksijen türevi serbest radikali dışında daha az miktarda karbon ve kükürt merkezli radikallerde oluşmaktadır [64,65,66].

Reaktif oksijen türleri (ROS) : Oksijen radikallerini ve oksitleyici ajanları kolayca radikal haline dönüştüren, radikal ve radikal olmayan oksijen bileşikleri içeren kompleks bir tanımdır.

Reaktif nitrojen türleri (RNS) ise nitrik oksit (NO.), azot dioksit (NO<sub>2</sub>) ve radikal olmayan azot bileşikleri içeren kompleks bir tanımdır[67,68].

### **1.5.2. Serbest radikallerin oluşumu (ROS)**

ROS, hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşmaktadır. Hücrelerde zara bağlı olarak yada serbest bulunabilen değişik enzimlerin etkisiyle ROS oluşmaktadır. Ayrıca enzimatik olmayan tepkimeler sonucu oluşan otooksidasyon sırasında ve radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı gibi bir çok dış etken ROS oluşmasında etkindir. Tüm aerobik hücrelerde düzeyde oluşurlar[72, 73, 74, 75].

ROS'lar çok reaktifler çünkü elektron sayısının çekirdekdeki proton sayısı eşit olmadıkları için dayanıklı olmayan radikaller, elektron konfigürasyonlarını pozitif yüke dengelemek gerektiği için reaktiflerdir. Tek elektronun başka moleküle verebilen bu radikaller, başka bir molekülden elektron çiftini oluşturabilirler [60,75,76,77].

Aerobik canlılarda oksijenin suya indirgenmesi sırasında oluşan ROS sağlıklı durumlarda belirli oranlarda canlılığın devamı için gereklidir [60,69,70]. Oksijen bir elektron alarak indirgenmesiyle süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ), süperoksitin bir elektron almasıyla peroksit oluşur. Peroksit molekülü ise iki hidrojen molekülü ile birleşip hidrojen peroksiti( $H_2O_2$ ) oluşturur. Ancak biyolojik sistemlerde  $H_2O_2$  'in üretilmesi süperoksitin dismütasyonu ile olur. Ki süperoksit molekülü iki proton alarak  $H_2O_2$  ve moleküler oksijeni oluştururlar.  $H_2O_2$  bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler oluştuğu için bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak da bilinir [60,69,70,72].

### **1.5.3.Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri**

#### **1.5.3.1.Süperoksit radikali**

Aerobik hücrelerde oksijen bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan ilk ürün süperoksit radikaldir. Oksijen potansiyel toksik bir maddedir. Bunu asıl nedeni oksijenin elektron alıp indirgenmesi sonucu süperoksit radikale dönüşümü olduğu ileri sürülmektedir. Endojen oksijenin radikallerinin en büyük kaynağı süperoksit radikaldir. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğine sahiptir. Süperoksit radikali hidrojen peroksitin kaynağı ve geçiş metallerinin indirgenmesi sebebiyle çok önemlidir[60, 72, 78, 79].

Mitokondri, endoplazmik retikulum gibi selüler transport zincirinin çeşitli komponentlerinden oksijene elektron sızmasıyla süperoksit oluşur. Fagositik hücrelerdeki solunumsal patlama süperoksit kaynağıdır. Nötrofillerin plazma membranının dış yüzünde yerleşmiş olan NADPH oksidaz, nötrofilin uyarılmasıyla oksijene iki elektron aktararak iki molekül süperoksit oluşturur [60,80,81,82].

Hücrelerde ksantin oksidaz enzim de hücrelerde süperoksit üreten başka bir enzimdir. Ksantinün ürik aside dönüşmesini katalizleyen ksantin hidroksil radikali bu sırada süperoksit radikali oluşumunda sebep olur[81,82].

#### **1.5.3.2.Hidroksil radikali**

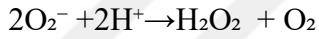
Hidroksil radikali; geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksitin indirgenmesi sonucu oluşur ve çok reaktif bir radikaldir. Bu reaksiyon ilk defa Fenton tarafından tanımlanmıştır. Bu nedenle **Fenton** reaksiyonu olarak da adlandırılır.Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyona girmesiyle de açığa çıkmaktadır. Bu reaksiyona **Haber-Weiss reaksiyonu** ismi verilmiştir [83-85].

Hidroksil radikali bütün organizmalarda, yüksek enerjisi olan iyonize edici radyasyon etkisi altında suda bulunan oksijen-hidrojen bağlarının homolitik in vivo olarak meydana gelebilir [72,80].

Hidroksil radikalının ömrü çok kısadır. Buna rağmen olduğu yerdeki bütün biyolojik molekülleri etkileyebilir. Hidroksil radikallerinin spesifik hedefi metalloproteinlerdir. Hidroksil radikali en aktif ve en toksik serbest radikaldir. Hidroksil radikali açığa çıktığı hücre kompartmanından uzaktaki hücre bileşenleri ile difüzyona gerek duyulmaksızın reaksiyona girebilir. Bu sebeple endojen olarak şekillenen çoğu peroksidanların ve onların etkilerinin asıl sorumlularıdır[86-90].

### **1.5.3.3.Hidrojen peroksit**

Oksijen molekülünün çevre moleküllerden 2 elektron alması ya da süperoksitin 1 elektron almasıyla oluşur. Peroksit molekülünün 2 hidrojen atomu ile birleşmesiyle hidrojen peroksit oluşur [45,66,79]. Hidrojen peroksitin;hidroksil radikal kaynağı olduğundan dolayı reaktif oksijen metabolitleri arasında önemli bir yere sahiptir. Hidrojen peroksitin organizmada üretimini süperoksitin dismutasyonu ile olur. Bu reaksiyon SOD enzimi tarafından katalizlenir. Enzimatik dismutasyonun PH aralığı geniştir[72, 87, 91].



Hidrojen peroksit üretimine Glukoz oksidaz ve D-aminoasit oksidaz içeren enzimler de sebep olabilir. Hidrojen peroksit radikallerin sebep olduğu hücresel değişiklikler kritik öneme sahiptir[78, 92, 93].

### **1.5.3.4.Singlet oksijen**

Singlet oksijen bir radikal değildir çünkü ortaklaşmamış elektronu yoktur. Fakat serbest radikal reaksiyonlarını başlatırlar. Oksijen elektronlarından birinin enerji alması sonucu kendi yörüngesi tersi bir yönde başka bir orbitale geçmesi sonucu singlet oksijeni oluşur. Miyeloperoksidaz enzimi lökositlerden salınır. Bu enzimin reaksiyonuyla hipokloröz asit (HOCl) oluşmaktadır. HOCl ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyonda singlet oksijeni oluşur. Singlet oksijeni membran lipid peroksidasyonunda etkisi bulunur ve aynı zamanda mutajeniktir [60, 73,78, 91].



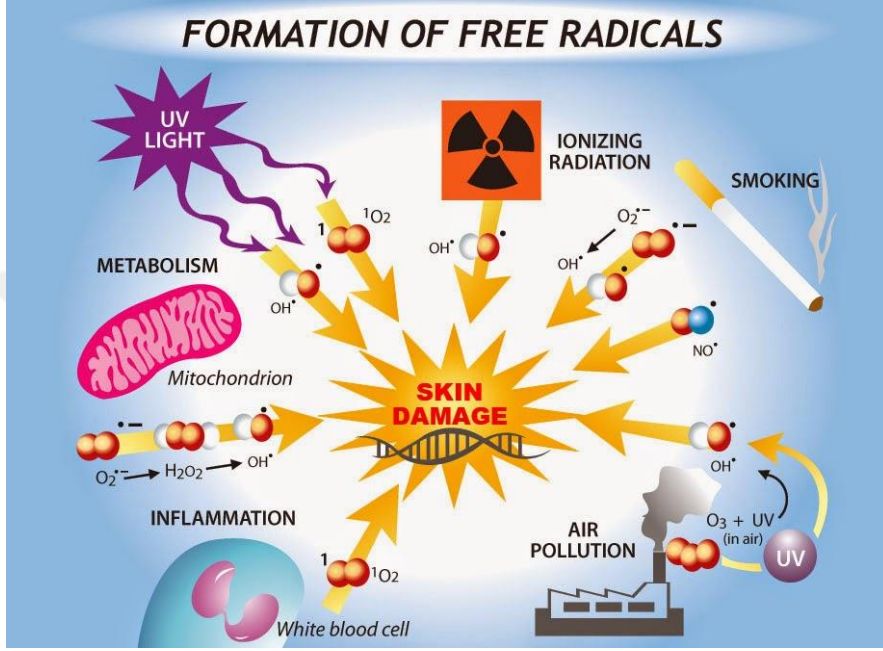
### 1.5.3.5.Nitrik oksit (NO•)

Nitrik oksitin hücresel düzeyde koruyucu etkileri vardır. Ancak oksidatif stres altında süperoksit radikali ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitrit çok güçlü bir oksidandır. Peroksinitrit birçok biyolojik materyali direkt olarak etkilemesinin yanı sıra proteinlerdeki tirozini nitratlaştırarak bazı hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır Nitrik oksit vazomotor tonusun sağlanmasının yanı sıra enflamasyon yanıtlarında, homeostazisde, vasküler hücre büyümesinde de önemli rollere sahiptir [ 83,91, 94 , 95,96,]. Nitrik oksitin fizyolojik şartlarda süperoksit radikaliyle birleşmesi oldukça sınırlıdır. Çünkü oluşan süperoksit radikali, hücrede yüksek konsantrasyonda bulunan SOD tarafından kolaylıkla ortadan kaldırılabilir. Patolojik şartlarda ise hem nitrik oksit hem de süperoksit sentezi artmakta, oluşan süperoksit, süperoksit dismutaz enzimi tarafından yeterli bir şekilde yok edilemediği için peroksinitrit radikali oluşmaktadır [94,95].

**Çizelge1.2.** Patolojik olarak önemli oksijen türevler

<b>Patolojik olarak önemli oksijen radikalleri:</b>	
<b>Adı</b>	<b>Moleküler Formülü</b>
Süperoksit radikali	O <sub>2</sub> -
Hidroksil radikali	.OH
Nitrik oksit	NO.
Ferril iyonu	FeO.+2
Perferril iyonu	FeO <sub>2</sub> .+2
Allil	R.
Aloksil	RO.
Peroksil	ROO.
<b>Radikal olmayan oksijen türevi bileşikler:</b>	
Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Singlet Oksijen	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>

Ozon	$O_3$
Hipoklorit asit	HOCl
Lipit hidroperoksit	LOOH



Şekil1.8Serbest Radikallerin Oluşumu[97].

### 1.5.3.Serbest Radikallerin Kaynakları

Hücrede yer alan serbest radikal kaynakları, normal metabolik olayların seyri sırasında gelebildiği gibi, organizmada yabancı maddelerin metabolize edilmesi sırasında ve radyasyon vb. dış etkenlere maruz kalınması durumlarında da meydana gelebilmektedir[98]. Bu sebeple serbest radikal oluşturan mekanizmalar endozen ve ekzojen olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [99].

**Çizelge1. 3.**Vücudumuzda serbest radikal[100].

<b>Endojen Kaynaklar</b>	<b>Eksojen Kaynaklar</b>
<b>Mitokondriyal elektron transport zinciri Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz</b>	<b>İlaç oksidasyonları</b>
<b>İndolamin dioksijenaz</b>	<b>İyonize radyasyon</b>
<b>Triptofan dioksijenaz</b>	<b>Güneş ışığı</b>
<b>Galaktoz oksidaz</b>	<b>X-ışınları</b>
<b>Fagositik hücreler</b>	<b>UV-ışınları</b>
<b>Nötrofiller</b>	<b>Isı şoku</b>
<b>Monosit veEozinofiller</b>	<b>Glutasyonu okside eden maddeler</b>
<b>Makrofajlar</b>	<b>Ortam hava</b>

### **1.6.Antioksidan**

Vücudumuz serbest radikal oluşumunu ya da oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemeye çalışarak kendini korumaya çalışır. Bu savunma mekanizmasındaki faktörler**antioksidanlar** olarak adlandırılır[101].

## 1.6.1.Endojen antioksidanlar

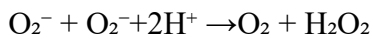
### 1.6.1.1. Enzim olanlar

**Çizelge1. 4.** Başlıca enzimatik endojen antioksidanlar[111].

Antioksidan	Reaksiyonu
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Süperoksit serbest radikalinin ( $O_2^-$ ) ve hidrojen peroksit radikallerinin moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. ( $2O_2 + 2H \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ )
Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Özellikle eritrositlerde oksidatif strese karşın etkili antioksidan enzimidir. $H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2 H_2O$
Glutatyon Redüktaz	GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan Okside Glutatyonu (GSSG) tekrar indirgenmiş Glutatyona (GSH) dönüşümünü kataliz eder.
Glutatyon S-Transferaz ( GST)	Lipid peroksitlere karşın GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.
Katalaz	Hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil (OH) radikallerinin oluşu-munu önlemek için bunları suya ve oksijene parçalar.
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	Solunumun zincirinin son enzimi olup, Süperoksidi ( $O_2^-$ ) detoksifiye eder.

### Süperoksit Dismutaz (SOD)

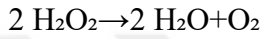
SOD antioksidan savunmasının ilk basamağı olan süperoksitin  $H_2O_2$ 'e dismutasyonu katalizleyen enzimdir.SOD Metalloproteindir. SOD bir süperoksit molekülünü  $O_2$  molekülünü yükseltgeyerek,diğer süperoksit molekülünü  $H_2O_2$ 'e indirger



Bu dismütasyon reaksiyonu süperoksit radikalini anyon ve katyon formlarının eşit oranda bulunduğu PH 4,8'de kendiliğinden gelişmektedir. Fakat fizyolojik şartlarda yani PH'ın 7,35-7,45 arasında iken reaksiyon çok daha yavaş oluşmaktadır. SOD aerobik hücrelerde oksijen radikalinin zararına karşı intrasellüler savunmasında büyük rol oynamaktadır. SOD aktivitesi yaşlanmaya bağlı olarak azaldığı görülmektedir [102].

### **Katalaz (KAT)**

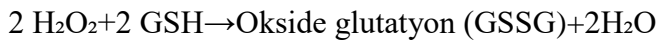
Her biri bir prostetik gruptan oluşan ve yapısında Fe<sup>+3</sup>bulunduran 4 hem grubu olan bir hemoproteindir. SOD'ın oluşturduğu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i katalaz peroksidaz enzimiyle birlikte oksijen ve suya parçalar [102].



KAT'ın indirgeyici aktivitesi küçük moleküller olan hidrojen peroksit ile metil,etil hidroperoksit vb. küçük moleküllere karşıdır. Lipid hidroperoksit gibi büyük moleküllere etki etmez [102-105].

### **Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)**

Lipid hidroperoksitlerin her birinin selenosistein bulunduran 4 alt birimde oluşur. Redükte glutasyon yükseltirken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i de suya çevirir böylelikle membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korumaktadır.



Glutasyon peroksidaz E vitamin eksikliğinde membranı peroksidasyona karşı korumaktır. Eritrositlerdeki en kuvvetli antioksidandır. Selenyum eksikliği sonucunda glutasyon peroksidaz yetersizliği olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır[106-109].

### **Glutasyon S-Transferaz (GST)**

Araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite göstererek antioksidan etki gösterir[102,110].

### **Glutasyon Redüktaz (GSSG-R)**

Hidroperoksitlerin redükte olması sırasında meydana GSSG gelir,GSSG-R katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüştürmektedir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH' a gereksinim vardır[103, 104, 111].



### **Aldehit Dehidrogenaz**

Aldehid dehidrogenaz enzim ailesi, aldehitin piridin pirimidin nükleotine bağlı olarak karboksilik aside oksidaysonunda rol alır ve 19 enzimden meydana gelir[112].Aldehidler oldukça reaktif eozifik ve uzun yaşam süresi olan bileşiklerdir. Fiziyojik süreçlerde rol aldıkları gibi mutajenik, karsinojenik ve sitotoksik rolleri de mevcuttur[113-115].

ALDH enzimi sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitekondride bulunabilmektedir. İnsanlarda gösterilmiş 19 ALDH geni mevcuttur[116].

### **Glukoz-6 Fosfat Dehidrogenaz**

G6PD pentaz fosfat metabolik yolunda ilk ve kontrol enzimidir [117]. Bu metabolik yolun en önemli görevlerinden birisi de NADPH üretimidir. NADPH ise hücrede yağ asidi, kolesterol, L- askorbij asit, nitrik asit biyosentezi,glutatyonun indirgenmesi, ilaç ve ksenobiyotik detoksifikasyonu ve peroksitlerin indirgenmesinde rol oynar [118,119]. Enzim genelde dimerik yapı gösterir. Dimerik veya tetramik formunu sıcaklık, NADP<sup>+</sup> , NADPH derişimi vb. faktörler etkiler [120].

### **Nitrik Oksit Sentaz(NOS)**

NO; oksijen molekülü süperoksit anyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), sülfhidril ve tiol gruplarıyla hemoglobin demirine yüksek eğilim gösteren iki atoma sahip bir radikaldir. İnflamatuar olaylarda indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS) olarak adlandırılan bir enzim tarafından sentezlenmektedir. Bu enzim hem eklem içi hem de eklem dışı pek çok hücre grubu tarafından sentezlenir[121-123].

NO, biyolojik sistemlerde çok yönlü hücre içi haberci olan bir gaz molekülüdür[124]. Hücre içi NO üretimi; NOS enzimi yapar, L-arginin aminoasidinin L-sitruiline çevrilmesi sonucu gerçekleşir [125].

### 1.6.1.2.Enzim olmayanlar

**Çizelge1. 5.** Enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar[111]

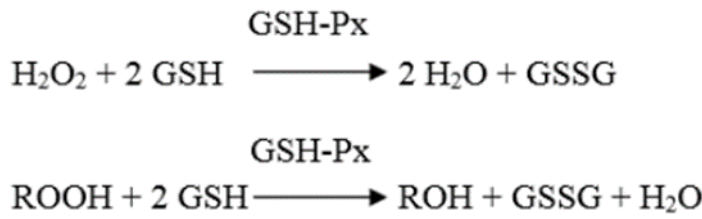
Antioksidan	Reaksiyonu
Melatonin	Lipofilik özellik göstermesinden dolayı hücrenin hemen hemen bütün organellerine hatta hücrelerine kadar ulaşarak geniş bir dağılım gösteren melatonin, hidroksil ve süperoksit radikallerini tutarak antioksidan etki gösterir.
Seruloplazmin	Ferro demiri (Fe <sup>2+</sup> ) ferri demire (Fe <sup>3+</sup> ) yükseltgeyerek fenton reaksiyonunu ve hidroksil radikali oluşumunu engeller
Transferrin	Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu önler
Laktoferrin	Düşük pH'lı ortamlardaki demir iyonlarını bağlar.
Glutatyon (GSH)	Karaciğerde sentezlenen bir tripeptittir. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini önler. Eritrositleri, lökositleri, göz lensini oksidatif hasara karşı korur.
Sistein	Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.
Ürik asit	Genelde metal bağlayıcı olarak çalışırken değişik radikalleride toplar.
Glikoz	Hidroksil radikali gidericisidir.
Albumin	HOCl radikali toplar. Proteini ve metal iyonlarını bağlar.

### Glutatyon

Glutatyon hücrenin antioksidan savunmasında görev yapar ve nonprotein tiyoldür. Sistein kalıntısındaki tiyol (-SH) aktif grubudur. Özellikle karaciğerde olmak üzere bütün organkarda sentezlenir ve tüm dokularında mevcuttur [126].

Total GSH'nın çoğu sitozolde (%85–90) bulunur iken geri kalan ise (%10-15) mitekondri ve diğer organlarda bulunmaktadır. Mitekondride GSH sentezleyen enzimlerde eksiklik olduğu durumlarda sitozolden alınarak devamlılık sağlanır [127].

Hücrelerde total glutatyon, serbest ya da proteinlere bağlı (%15)olarak bulunmaktadır. Serbest glutatyon çoğunlukla redükte formda bulunmakta ve oksidatif streste forma dönüştürülmektedir. Hücrelerde redoks halde bulunan glutatyon ve okside formda bulunan glutatyon oranı (GSH/GSSG) kritik öneme sahiptir. Normalde glutatyon redoks çifti 1-10mM konsantrasyon aralığında bulunur ve redükte glutatyon,okside forma göre daha üst seviyede bulunmaktadır. Hücre dinlenme halindeyken bu oran 100'ü aşarken oksidatif stres modellerinde bu oran 10 ile 1mM'a düşer [128].Glutatyon, birincil olarak ROS'a karşı engelleyici olarak görev alır. Bu amaçla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> azaltır ve serbest radikalleri süpürür. Hücrelerde oksidatif stres etkisiyle hidrojen peroksit(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),glutatyon peroksidaz(GSH-Px) oluşur. Glutatyon, oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve GSH-Px suya yıkar.. Ancak redükte glutatyon (GSH), okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Okside glutatyon daha sonra glutatyon redüktaz (GR) ile tekrar GSH'a dönüştürülür[129].



### Ürik Asit

Ürik asit, nükleer materyalin katabolizması sonucu açığa çıkar. Guanozin ve adenozin bazlı pürinlerin metabolizmasının son ürünüdür. Vücuttaki ürik asit özellikle kas hücrelerinin, nükleik asitlerin dönüşümü ile oluşan (endojen) ve gıda(eksojen) kaynaklı olabilmektedir[130].

Pürin nükleotidleri; nükleotidi oluşturan bileşenlerin sırasıyla ayrılması sonucu yıkılır. İnsan organizması ürikaz içermez bu nedenle bu yıkımın son ürünü ürik asittir.

Memelilerde( primatlar hariç) ürik asit; allantoin, üre ve hatta amonyağa kadar parçalanabilir. Ürik asit canlı dokuda antioksidan ve kuvvetli bir radikal çöpçü olarak görev yapar [131].

İnsan vücudunda ürik asit genelde idrarla atılmaktadır. Gastrointestinal sistemden az bir kısmı emilmektedir.%98'i plazmada sodyum-ürat şeklinde serbest olarak dolaşır ve glomerüler filtrasyondan geçer, %5'ten azı ise proteine bağlıdır [132,133].



## **Askorbik Asit**

Askorbik asidin görevi lipidleri oksidasyona karşı korumaktır ve antiproteazların oksidan maddeleriyle inaktive olmasını engellemektir. Fagositozda parçalanma ürünlerinin zararlı etkilerini önlemek. Askorbik asit E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonu engellemektir [134].

### **1.6.2.Eksojen antioksidanlar**

Allopinol, folik asit, C vitamini, trolox C, asetilsistein, mannitol, adozin gibi.

### **1.7.Lipid peroksidasyonu**

Lipid peroksidasyonu reaksiyonu, hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest radikaller tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasına yol açar. Bunun sonucunda zarın lipid yapısı, hücre yapı ve fonksiyonları bozulur. Lipid peroksidasyonunda rol oynayan en önemli serbest oksijen radikali, hidroksil radikali olup bu radikalın de olağanüstü hasarlayıcı etkisi vardır(100). Hidroksi radikali son derece reaktif olduğundan canlı hücrelerde bulunan DNA, proteinler, karbonhidratlar dahil bütün biyomoleküllerle süratle reaksiyona girer[135].

Biyomembranlar, membranfosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerine sahip olmaları nedeniyle lipid peroksidasyon hasarının en çok olduğu yerdir. Çoklu doymamış yağ asitleri yapılarında bir ya da daha fazla karbon çift bağı taşırlar. Bu biyokimyasal özellikleri onları serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasara daha duyarlı kılar. Hidroksil radikali çoklu doymamış yağ asitlerini, tekli doymamış ya da doymuş yağ asitlerinden daha hızlı hasara uğratar. Çift bağ sayısı ne kadar fazlaysa hidrojen atomunun yer değiştirmesi de o ölçüde kolaydır.

Serbest radikallerin etkisiyle çoklu doymamış yağ asitleri zincirinden hidrojen atomu uzaklaşır ve lipid radikalleri ortaya çıkar. Oluşan lipid radikali (L.) dayanıksız bir yapıya sahiptir ve bir dizi spontan değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle molekül çift bağ aktarımıyla konjuge dienler meydana gelir. Konjuge dienler moleküler oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksid radikali (LOO.) oluşur. Bu radikaller de hidrojen atomu alarak, lipid hidroperoksidlerine (LOOH) dönüşmektedirler. Bu otokatalitik reaksiyonlar sonucunda aldehid, etan ve pentan gibi ürünler oluşur. Aldehidler bilinen en toksik ürünlerdir. Lipid peroksidasyonu ile oluşan ürünlerin tiobarbitürik

asit(TBA) ile reaksiyona girmeleri sonucu MDA oluşur. Mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olan MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini göstermektedir. MDA doku, kan ve vücut sıvılarında ölçülerek lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır.

İnsanlarda birçok hastalığın etyopatogenezinde serbest oksijen radikallerinin neden olduğu lipidperoksi dasyonuna bağlı olarak organ ve dokularda açığa çıkan hücre membranı hasarı suçlanmaktadır[136-144].



## 2.METARYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Kornea Epitel Hücre Örneklerinin Toplanması

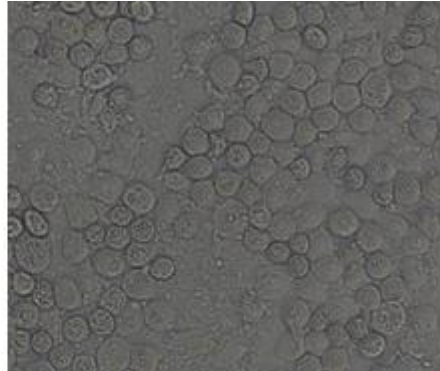
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi bünyesinde bulunan Keratokonus ve Refraktif Cerrahi Merkezi'nde Keratokonus tanısı alan ve Korneal Çapraz Bağlama tedavisi kararı verilen hastalardan bu tedavi sırasında rutin olarak soyulan ve atılan kornea epitel dokusu alınacaktır.

Kontrol grubunu oluşturmak üzere yine aynı merkezde kırma kusuru tedavisi için Excimer Lazer tedavisi olmak için başvuran hastalardan bu tedavi sırasında rutin olarak soyulan ve atılan kornea epitel dokusu alınacaktır. Excimer Lazer tedavisine uygun olmak için kişide keratokonus ile ilgili hiçbir bulgunun olmaması gerekmektedir. Yapılan kornea topografisi, kornea kalınlık haritası, oküler histerezis ölçümü ve biyomikroskopik muayene sonucunda bu karar verilmektedir. Bu nedenle excimer lazer adayları keratokonus olmayan kontrol grubu olarak alınmıştır.

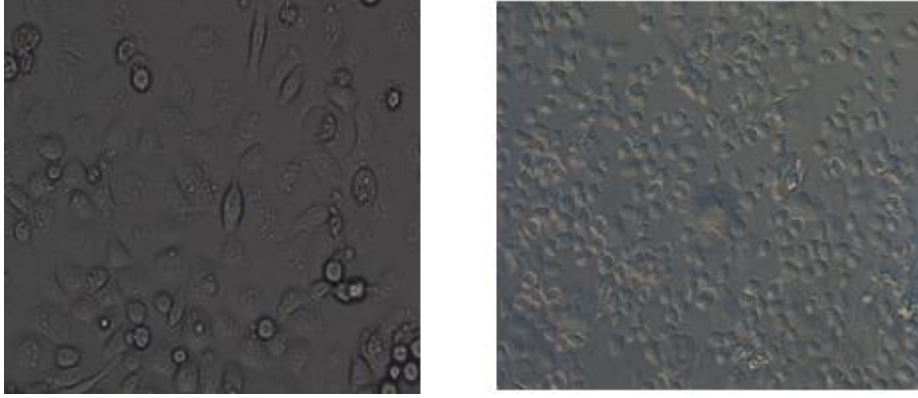
Hastalardan alınan dukular için etik raporu **Ek-1'dir**.

### 2.2 Kornea Epitel Hücre Kültürü

Hastalardan alınan kornea örnekleri hücre kültürü besiyerinde soğuk ortamda laboratuvara getirildi. Hücrelerin laminar flow kabin içerisinde pipetajla birbirinden ayrılması sağlandı, daha sonra 200 mikrolitre sıvı içinde 700.000 hücre olarak 12 kuyucuklu flasklara ekildi. Hücreler ekilirken kuyucuğun ortasına damlatıldıktan sonra pipet ucuyla kuyucuk kenarına doğru homojen şekilde yayılarak hücrelerin tüm flask tabanına mümkün olduğu kadar eşit dağılması sağlandı. Daha sonra flask içine Keratinocyte-Serum Free Medium (GİBCO) eklenerek 24 saat inkübe edildi.



**Şekil2.1.**Kontrol epitel hücre kültürlerinin değişik büyütmede görünümleri (Keratinocyte Serum Free Medium-GIBCO)Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50µm mesafeyi göstermektedir



**Şekil2.2.** Keratokonus epitel hücrelerinin tip 4 kollajen modifikasyonlu yüzeyde kültür görünümü.Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50µm mesafeyi göstermektedir.

### 2.3 UV Uygulaması

Deney düzeneği tablodaki gibi oluşturuldu.

#### Çizelge2.1. Çalışma ve Kontrol Grupları

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

UV uygulaması için UV-A ve UV-B dalga boylarında uygulama yapabilen dış ortama kapalı ve içine kuyucuklu kültür kaplarının yerleştirebildiği iki adet cihaz yaptırıldı (Nehir Biyoteknoloji). Her iki UV dalga boyu için optimizasyon çalışmalarından sonra uygun dozlar belirlendi.

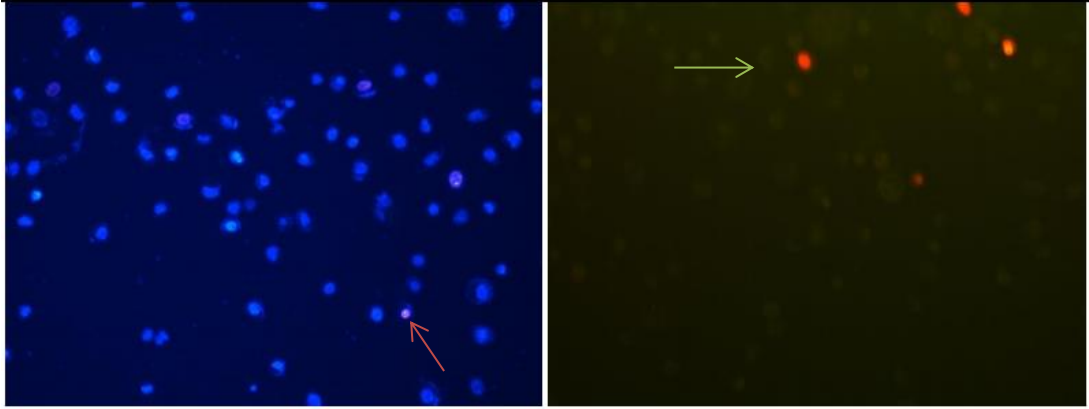


#### Şekil2.3. UV Maruzat cihazının resimleri

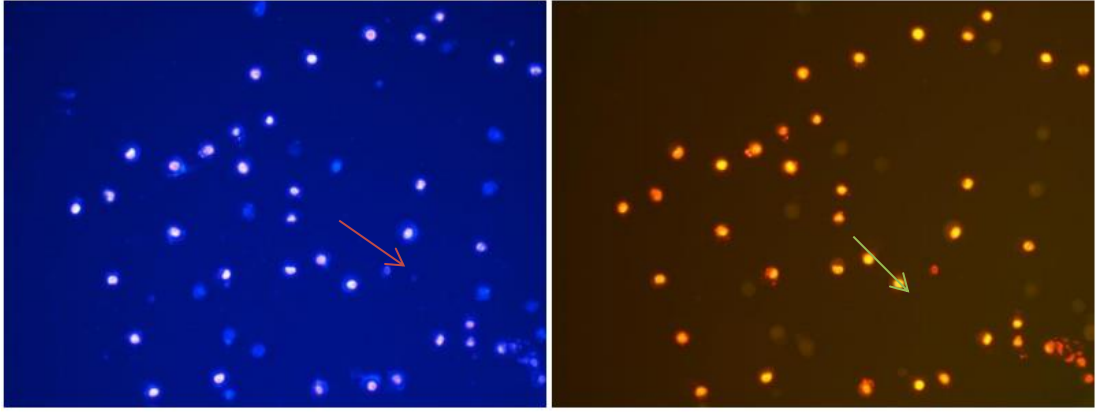
Literatürde UV-A ve UV-B uygulama dozları ile ilgili çeşitli bilgiler mevcuttur. Ancak,bizim projemizde uyguladığımız şekilde kültür ortamına tek kat olarak

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 (**çizelge2.1**). Ancak, bu dönemde sadece 4 grupta ölçüm yapıldı. UV uygulaması yapılmayan kontrol grubu sadece canlılık testleri için çalışıldı.

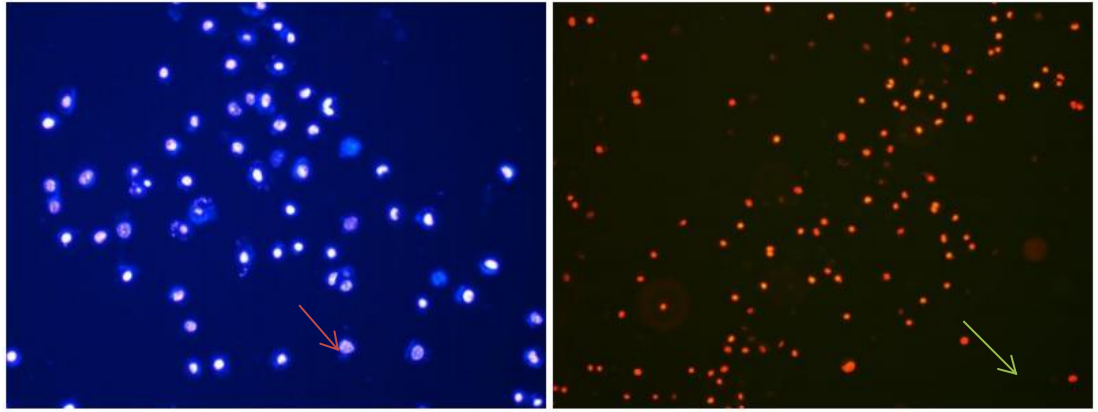
UV-B için  $50 \text{ mJ/cm}^2$  dozundan başlandı. Bu dozda hücrelerde kayda değer bir değişiklik izlenmedi (**Şekil 2.4**). Daha sonra 100, 150 ve  $200 \text{ mJ/cm}^2$  dozlarında UV-B uygulanarak aynı testler tekrarlandı.  $100 \text{ mJ/cm}^2$  dozunda da kayda değer değişiklik gözlenmezken  $150 \text{ mJ/cm}^2$  dozunda makul seviyelerde (**Şekil 2.5**),  $200 \text{ mJ/cm}^2$  dozunda ise aşırı miktarda apoptoz/nekroz görüldü (**Şekil2.6**).



**Şekil2.4.**  $50 \text{ mJ/cm}^2$  dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen (A)apoptotik(mavi filtre) ve (B)nekrotik(yeşil filtre) hücre görüntüleri.Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek  $50\mu\text{m}$  mesafeyi göstermektedir.



**Şekil2.5.** 150 mJ/cm<sup>2</sup> dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen (A)apoptotik(mavi filtre)ve (B)nekrotik(yeşil filtre) hücre görüntüleriFotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50µm mesafeyi göstermektedir

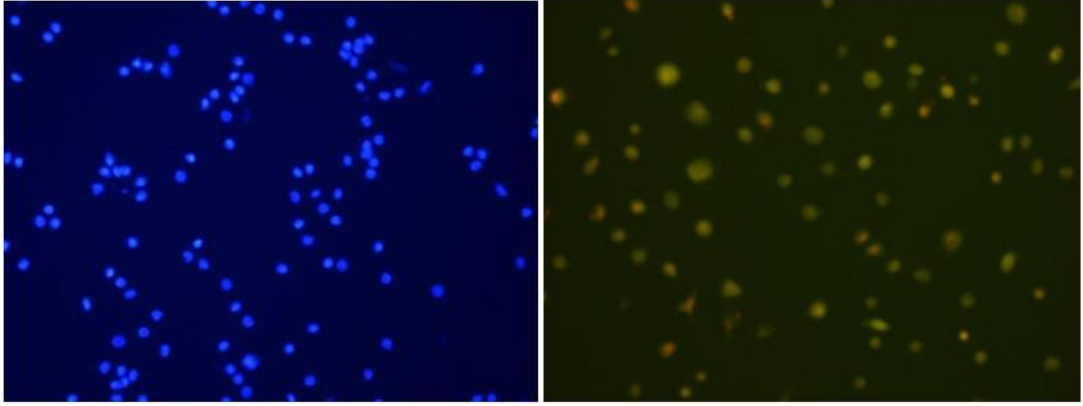


**Şekil2.6.** 200 mJ/cm<sup>2</sup> dozunda UV-B uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyamayöntemiyle elde edilen (A)apoptotik(mavi filtre)ve (B)nekrotik(yeşil filtre) hücre görüntüleriFotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50µm mesafeyi göstermektedir

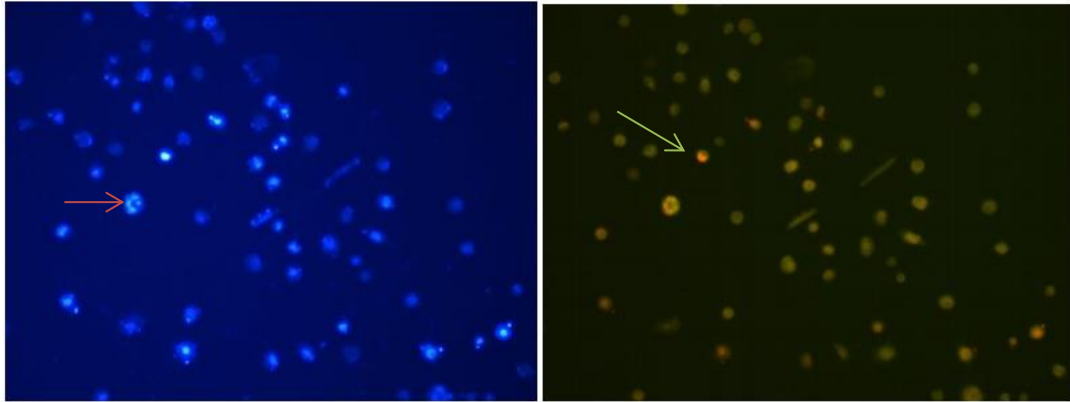
UV-A uygulaması için yine doz optimizasyonu yapılarak en uygun UV doz miktarıbelirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre, artan dozlarda UV-A verilerek hücrelerin % canlılık oranlarına bakılmıştır. 500, 1000 ve 1500 mJ/cm<sup>2</sup>'de hücre canlılığında önemli bir fark olmazken (**Şekil 2.7**), 2000 mJ/cm<sup>2</sup> enerji değerinde hücrelerde kontrole göre makul bir değişim gözlenmiştir (**Şekil 2.8**).Bu nedenle UV-A doz uygulaması için en uygun doz miktarının 2000 mJ/cm<sup>2</sup> olduğuna karar verilmiştir.Bunun sonucunda aşağıdaki dozlarda UV uygulaması yapıldı:

UV-A: 2000 mJ/cm<sup>2</sup>

UV-B: 150 mJ/cm<sup>2</sup>



**Şekil2.7.** 1000 mJ/cm<sup>2</sup> dozunda UV-A uygulanan keratokonuslu örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen (A)apoptotik ve(B) nekrotik hücre görüntüleri.Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50µm mesafeyi göstermektedir



**Şekil2.8.** 2000 mJ/cm<sup>2</sup> dozunda UV-A uygulanan örneklerde ikili boyama yöntemiyle elde edilen (A)apoptotik ve (B)nekrotik hücre görüntüleri.Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 200X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 50µm mesafeyi göstermektedir

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 keratokonuslu hücre grupları için  $7 \times 10^5$  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

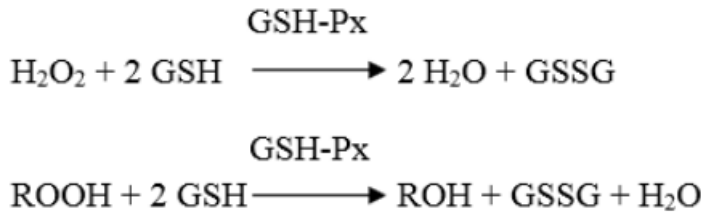
uygulaması sonrası 24 saat boyunca inkübe edilecek hücreler, tekrar başlangıç besiyeri ortamına alındı (Keratinocyte Serum FreeMedium GIBCO)

## 2.4 Antioksidan Enzim Aktivitesi

Birincil hücre kültürlerinden SOD1/2/3, Glutathione Reductase (GR), Glutathione Peroxidase (GPX), Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD), Catalase (CAT), Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) ve Cathepsin VL2 antioksidan enzim aktiviteleri incelenmiştir. Yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır;

### 2.4.1 Glutasyon Peroksidaz (GPX)Aktivitesi

Glutasyon peroksidaz enzimi, Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), organik ve lipit peroksitlerini etkisizleştirmeye yarayan ve yapısında dört Selenyum (Se) atomu bulunduran tetramerik yapıda antioksidan enzimlerdendir. Glutasyon peroksidaz aktivitesindeki azalmanın, hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına yol açtığı bilinmektedir. GPX aktivite tayin yönteminde,  $H_2O_2$ varlığında indirgenmiş glutasyon (GSH), GPx tarafından okside glutatyona (GSSG) oksitlenir ve oksitlenen GSSG, glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Kullanılan bu NADPH miktarı absorbanstaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlenir.



Keratokonuslu ve normal bireylerden alınan hücreler 12 kuyucuklu plakalar üzerine ekildi ve hücrelerin plaka üzerine tutunabilmesi amacıyla bir gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

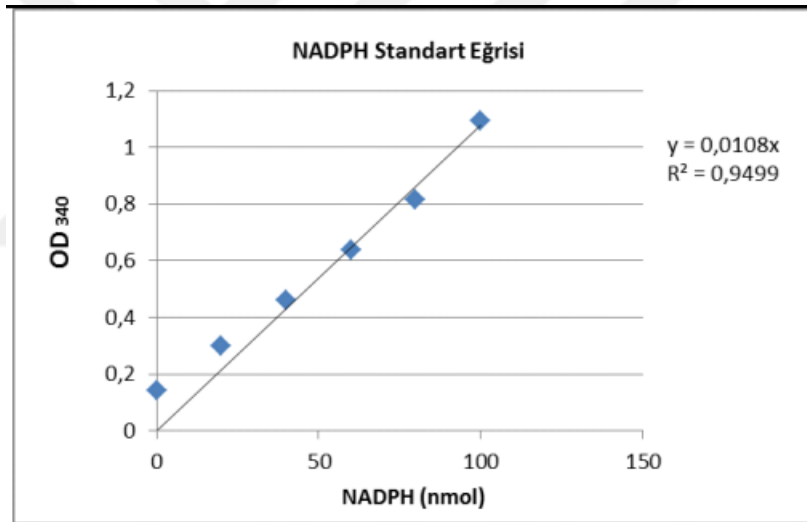
Daha sonra UV ışınlarına maruz bırakılarak üzerinden 24 saat geçmesi beklendi. Bu süre sonunda hücreler kaldırılarak "Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay" (Biovision) ile GPx aktivitesi incelendi. Testin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle belli derişimlerde hazırlanan NADPH standart eğrisi oluşturuldu (**Şekil 2.9**).Kültür kabından kaldırılan hücreler ( $1 \times 10^6$ ), santrifüj



edilerek üzerlerine soğuk “assaybuffer” ilave edildi ve süpernatantlar toplandı. Ölçümler süpernatant üzerinden yapıldı. Kit protokolünde belirtilen reaksiyon karışımı hazırlanarak test örneklerinin, glutatyon peroksidaz pozitif kontrolünün ve reagent kontrolü üzerine eklendi. 96 kuyucuklu plaka üzerine alınarak her örnek üzerine “Cumene Hydroperoxide” eklendi ve optik dansisitenin 340 nm olduğu dalga boyunda ilk okuma gerçekleştirildi (A1). 25°C’de 5 dakika inkübe edilen örnekler için ikinci okuma gerçekleştirildi (A2).

Reaksiyon karışımının hazırlanışı:

**Reaction Mix:** For each well, prepare 40 µl Reaction Mix:  
33 µl Assay Buffer  
3 µl 40 mM NADPH solution  
2 µl GR solution  
2 µl GSH solution



**Şekil2.9.** NADPH standart eğrisinin oluşturulması

A1 ve A2 okumalarının farkı alınarak, her bir örnekteki NADPH miktarı hesaplandı. Bulunan NADPH miktarı üzerinden örneklerdeki glutatyon peroksidaz antioksidan enzim değerleri hesaplandı

GPx aktivitesinin hesaplanabilmesi için kullanılan eşitlik :

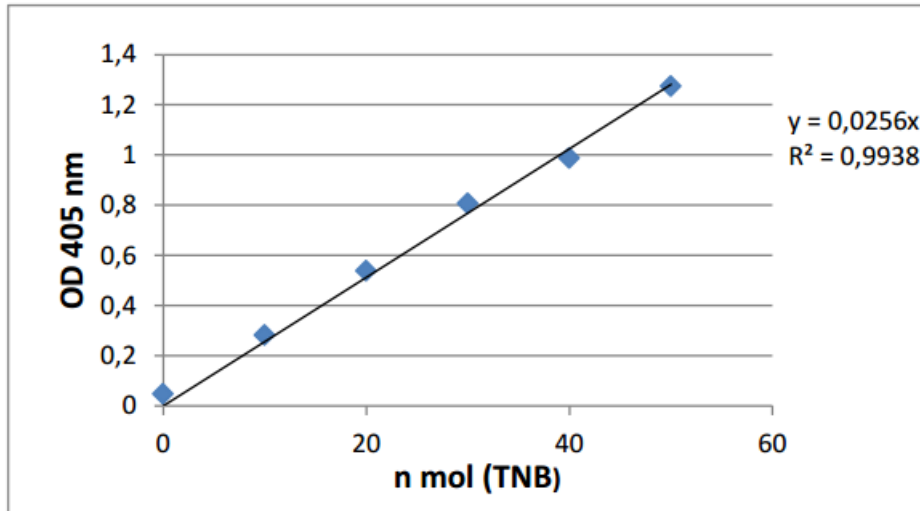
$$\text{GPx Activity} = \frac{B}{(T2 - T1) \times V} \times \text{Sample dilution} = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/mL}$$

#### 2.4.2 GR Aktivitesi:

Glutatyon redüktaz, Glutatyon peroksidaz vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun, (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder:



Glutatyon redüktaz; flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir. NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir. Dolayısıyla enzim etkinliğinin azalması, hücrelerin oksidatif hasardan korunmasını azaltır. Glutatyon redüktaz aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla, yine aynı şekilde 12 kuyucuklu plakalara hazırlanan keratokonumlu ve normal epitel hücreleri inkübasyona bırakılmış ve UV maruziyeti sağlanmıştır. Deney, "Glutathione Reductase Activity Colorimetric Assay" kiti (Biovision) ile gerçekleştirildi. Deneye başlamadan önce TNB ( Trinitro benzen) standart eğrisi hazırlandı (Şekil 2.10).



Şekil2.10. TNB standart eğrisinin oluşturulması

Bireylerden elde edilen hücreler ( $1 \times 10^6$ ) santrifüj edilip üzerlerine soğuk “assay buffer” ilave edilerek süpernatantlar toplandı. Toplanan süpernatantlar, Glutasyonun ortamdan uzaklaştırılması amacıyla bir ön işleme tabi tutuldu. 100  $\mu$ l kadar alınan süpernatant üzerine %3’lük Hidrojen peroksit ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra üzerine Katalaz enzimi eklendi ve tekrar oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ardından kit protokolünde belirtilen reaksiyon karışımı hazırlanarak test örneklerinin üzerine

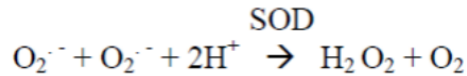
- ✓ 40  $\mu$ l Gr assay buffer
- ✓ 2  $\mu$ l DTNB solüsyonu
- ✓ 2  $\mu$ l NADPH-GNERATTM solüsyonu
- ✓ 6  $\mu$ l GSSG solüsyonu eklendi.

96 kuyucuklu plaka üzerine alınan örneklerden, optik dansitenin 405 nm olduğu dalga boyunda ilk okuma gerçekleştirildi (A1). Daha sonra 25°C’de 10 dakika inkübe edildi ve ikinci okuma gerçekleştirildi (A2). Glutasyon redüktaz aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanıldı:

$$\text{GR Activity} = \frac{\Delta B}{(T_2 - T_1) \times 0.9 \times V} \times \text{Sample Dilution Factor} = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/mL}$$

#### 2.4.3 SOD Aktivitesi:

Bu enzim, süperoksit anyonunun ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu tür radikallerin etkisini azaltmaktadır. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir defans olup katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir.



SOD tayininin prensibi, nitrobluetetrazolium’un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantinksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla öncelikle keratokonuslu ve normal hastalardan alınan hücreler 12 kuyucuklu plakalar üzerine ekildi. Hücrelerin plaka üzerine tam tutunabilmesi amacıyla bir gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra UV ışınlarına maruz bırakılarak üzerinden 24 saat geçmesi beklendi. Bu süre sonunda hücreler kaldırılarak

“SOD Activity Assay Kit” (Biovision) ile SOD aktivitesi incelendi. Örnekler, **çizelge2.2**'ye göre hazırlandı.

SOD aktivitesi için;

— 24 saat önce UV ışınlarına maruz bırakılan hücreler, çöktürüldükten sonra üzerlerine 0.1 M Tris/HCl, %0.5'lik Triton X-100, 5mM  $\beta$ -ME, 0.1 mg/mL PMSF içeren lizis çözeltisi eklendi. 14000 g'de 5 dakika (+4 °C) santrifüj edildi ve çöken hücre artığı uzaklaştırıldı.

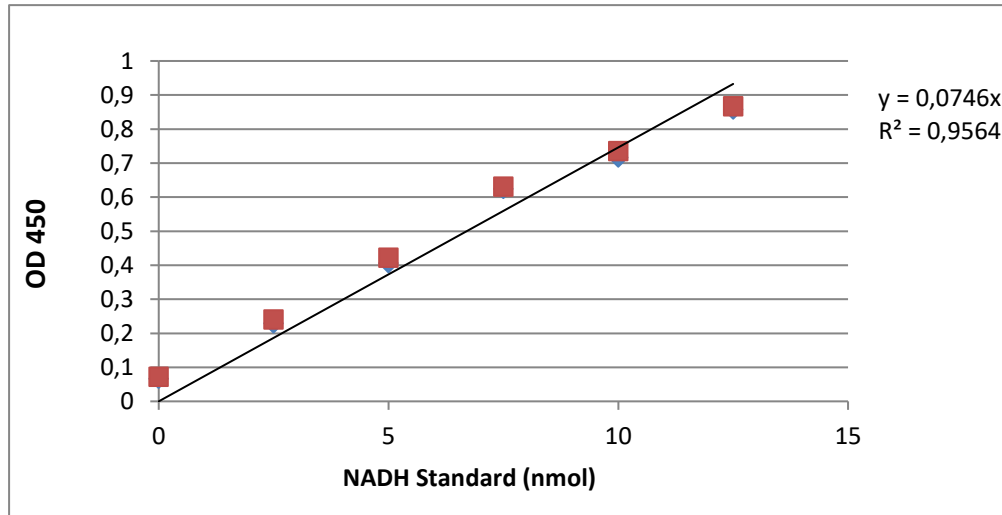
— Süpernatantlar temiz bir tüpe alınıp 5 dakika kadar buzda bekletildikten sonra 370C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi (Çalışma solüsyonları hazırlanıp örnek gruplar içerisine konulacak miktarlar belirlendi).

**Çizelge2.2.** Blank1, blank2, blank3 ve örneklerin hazırlanmasında kullanılacak solüsyon

	sample	blank 1	blank 2	blank 3
Sample Solution	20 $\mu$ l		20 $\mu$ l	
ddH <sub>2</sub> O		20 $\mu$ l		20 $\mu$ l
WST Working Solution	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Enzyme Working Solution	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l		
Dilution Buffer			20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

#### 2.4.4 G6PD Aktivitesi:

Glukoz-6 fosfat dehidrojenaz aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve keratokonus grubu hücreleri bir gün önceden uv muamelesine maruz bırakıldı ve



24 saat sonunda hücreler plate'lerden kaldırılarak soğuk pbs ile santrifüj edildi. Ve süpernatantlar toplanarak 1-50 µl arası örnek hacminde 96 well plate'e konuldu üzerleri 50 µl assay buffer ile tamamlandı. NADH standart eğrisinin oluşturulabilmesi amacıyla 4, 6, 8, ve 10 µl hacimlerinde 1.25 mM NADH standardından alınarak 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, ve 12.5 nmol/well derişimleri oluşturulmuş ve son hacim 50 µl olacak şekilde Assay Buffer ile tamamlanmıştır (**Şekil 2.11**). Reaksiyon karışımının oluşturulabilmesi amacıyla her kuyucuğa 46 µl G6PDH Assay Buffer, 2 µl G6PDH Substrat ve G6PDH Developer karışımı ayarlanıp 50'şer µl eklenmiştir. Absorbans okuması 450 nm'de gerçekleştirilmiştir.

#### **2.4.5 CAT Aktivitesi**

BioVision firmasının (Milpitas, CA) "Catalase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit" ürünü ile Catalase enziminin aktivitesi ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır.

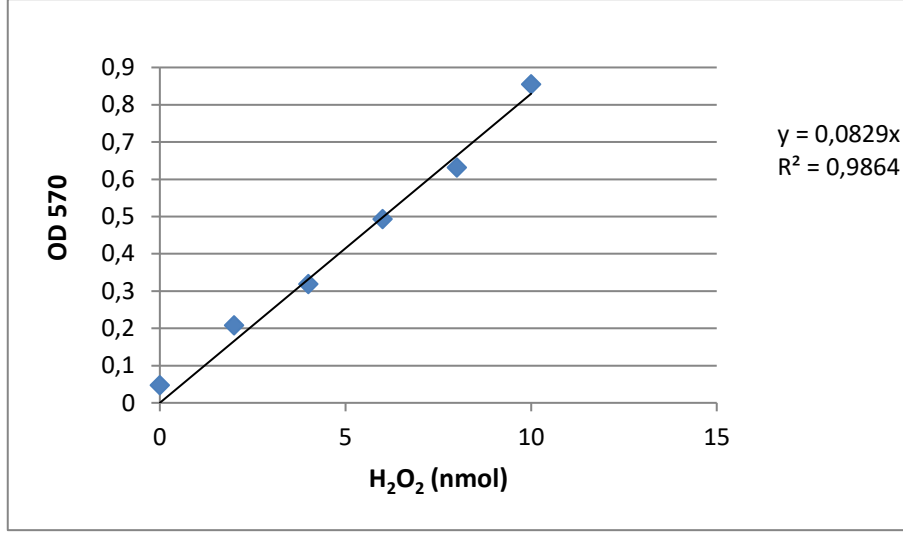
Keratokonuslu ve normal bireylerden alınan hücreler uv ışınlarına maruz bırakıldıktan sonra tripsin ile kaldırılarak santrifüje tabi tutulmuştur. Hücre pelletleri üzerine soğuk assay buffer konularak 10.000 g +4°C'de tekrar santrifüj edilerek

#### **Şekil2.11. NADH Standart Eğrisinin Oluşturulması**

süpernatantlar toplanmıştır.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart eğrisinin oluşturulabilmesi (**Şekil 2.12**) amacıyla 0.88 Molar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dH<sub>2</sub>O ile dilue edilerek 20mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturulmuştur. Daha sonra bu çözelti 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olacak şekilde seyreltilmiştir. Ve bu çözülden 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol olacak şekilde 96 well kuyucuklarına konulmuş assay buffer ile tamamlanmıştır. Daha sonra üzerlerine 10 µL stop solüsyonu ilave edilmiştir.

Reaksiyon karışımının hazırlanabilmesi amacıyla her bir kuyucuğa 6 µl Assay Buffer, 2 µl OxiRed ve 2 µl HRP olacak şekilde ayarlanarak kuyucuklara 50'şer µl eklenmiştir. Sonrasında oda sıcaklığında 25°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Ve 570 nm'de absorbans ölçümleri alınmıştır.

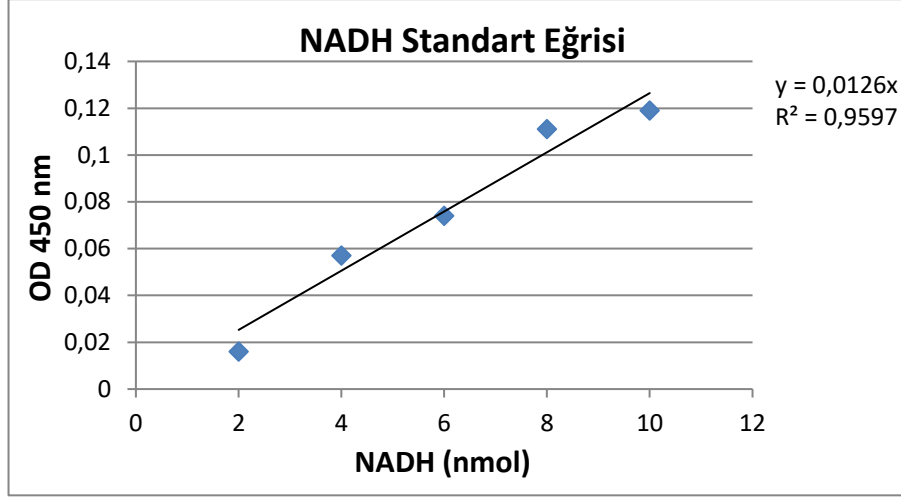


Şekil2.12. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standart Eğrisinin Oluşturulması

#### 2.4.6 ALDH Aktivitesi

BioVision firmasının (Milpitas, CA) “Aldehyde Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit” ürünü ile ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır.

Keratokonuşlu ve normal bireylerden alınan hücreler kaldırılarak Aldehyde Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay (Biovision) ile ALDH aktivitesi incelendi. Bu amaçla öncelikli olarak NADH Standart eğrisi oluşturulmuştur. Kaldırılan hücreler santrifüj edilerek dipte oluşan pellet üzerine MDA lizis buffer ilave edilmiştir. Daha sonra yeniden santrifüje alınarak pellet uzaklaştırılmış ve süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır. Daha sonra 50 uL’lik reaksiyon karışımının oluşturulabilmesi amacıyla, her örnek başına 43 µl ALDH Assay Buffer, 48 µl ALDH Substrate Mix ve 5µl Acetaldehyde karışımı hazırlanmıştır. Her örnek kuyucuklarına, standartlara ve kontrol grubuna 50’şer µl reaksiyon karışımından konulmuştur. Ölçümler 450 nm’de ELISA okuyucuda ölçülmüştür.



Şekil 2.13. NADH Standart Eğrisinin Oluşturulması

## 2.5 Gerçek Zamanlı PCR İle Antioksidan Enzimlerin mRNA İfade Miktarındaki Değişimlerin Belirlenmesi

Gerçek zamanlı PCR yöntemi olarak SYBR Green yöntemi kullanılmıştır. SYBR Green yöntemi için kit olarak Roche veya Takara markalarının ilgili kitleri tercih edilecektir.

Gerçek zamanlı PCR öncesi RNA izolasyonu için Qiagen veya Invitrogen markalarının RNeasy Plus Mini Kit veya Trizol kitleri kullanılacaktır. cDNA sentezi için ise Roche markasının ilgili kitinin yöntemi kullanılacaktır. RNA ile çalışılırken tüm işlemler RNaz'dan arındırılmış ortamda yapılacaktır. Kontroller ve karşılaştırma B-Actin ifade düzeyine bakılarak yapılacaktır. Gerçek zamanlı PCR deneylerinin verileri ( $\Delta\Delta C_t$ ) yöntemi ile analiz edilecektir.

Kullanılacak primerler aşağıdaki çizelgede verilmiştir. Oksidatif stres işleyişinde önemli görevleri bulunan genlerin ifade miktarı incelenmesi için seçilmişlerdir ve bazı primerlerin verimli çalışmamasından dolayı alternatif primerler oluşturulmuştur. Primerlerin seçimi için veritabanlarından güvenilir kaynak makalesi bulunanlar ve kornea dokusunda incelenmiş olanlar tercih edilmiştir.

**Tablo2.3.** Gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primerler

<b>Gen</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>m</b>	<b>Kaynak</b>
<b>GPX1</b>	F:TCCCCGTGCAACCAGTTTG	R:TTCACCTCGCACTTCTCGAA	0°C	[31]
<b>GPX1</b>	F:CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG	R:GAGGGACGCCACATTCTCG	2,5°C	[32]
<b>GR</b>	F:GATCCTGTCAGCCCTGGGTTC TAAGA	R:CGTCTACGATGATATGACCCTT GTCATC	4°C	[11]
<b>GR</b>	F:AGCTGAATCAGAAGAGTGAT GGC	R:TCAATACTCGACCGCTGTAGG	1,5°C	[32]
<b>SOD1</b>	F:AGTGCAGGGCATCATCAATTT CGAGCAG	R:GATGCAATGGTCTCCTGAGAG TGAGATC	0°C	[2]
<b>SOD1</b>	F:AGTGCAGGGCATCATCAATTT CGAGCAG	R:GATGCAATGGTCTCCTGAGAG TGAGATC	6°C	[11]
<b>SOD1</b>	F:AGGCCCTTAACTCATCT	R:CTACAGGTACTTTAAAGCAAC TCT	5°C	[31]
<b>SOD1</b>	F:GGTGGGCCAAAGGATGAAGA G	R: CCACAAGCCAAACGACTTCC	2°C	[32]
<b>ALDH3A1</b>	F:GCATGAGCCCATTGGTGTCT	R:CGCAGGCTTCAGGACCAT	0°C	[31]
<b>ALDH3A1</b>	F:TTCATGAACAGTGGCCAG	R:CTTGTCGTTGCTGGAGAA	6°C	[11]
<b>ALDH3A1</b>	F:TGTTCTCCAGCAACGACAAGG	R: AGGGCAGAGAGTGCAAGGT	2,7°C	[32]
<b>ACTB</b>	F:CCATCATGAAGTGTGACGTGG	R: GTCCGCCTAGAAGCATTGCG	0°C	[31]
<b>ACTB</b>	F:AAAGACCTGTACGCCAACAC	R: GTCATACTCCTGCTTGCTGAT	7°C	[31]



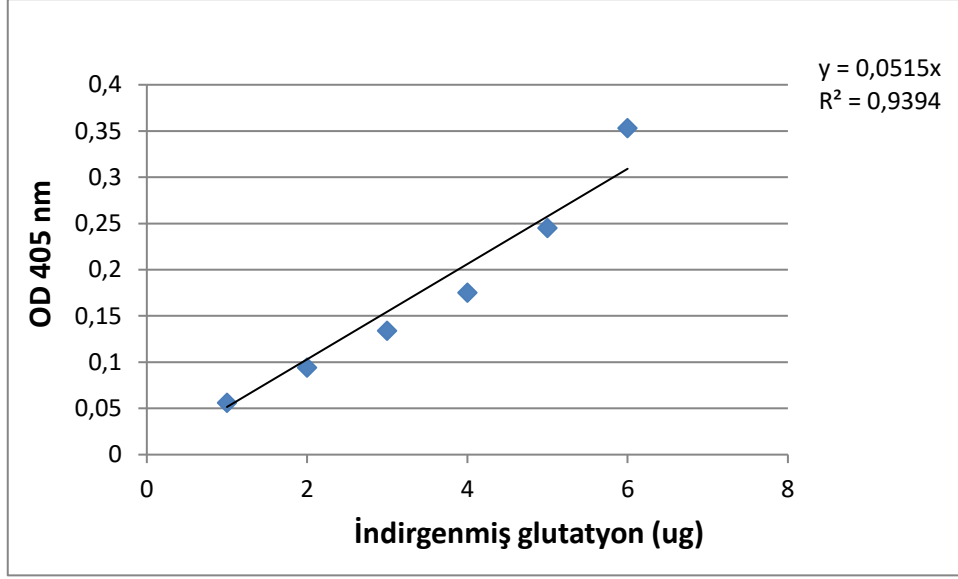
## 2.6 Enzim Olmayan Antioksidan Moleküller

Birincil hücre kültürlerinden, enzim olmayıp doğrudan UV ışınlarını soğuran ve indirgeyici Glutathione (GSH), NADPH, Ürik asit ve Ferritin moleküllerinin miktarı incelenecektir.

### 2.6.1 Glutasyon (GSH) Miktarı

BioVision firmasının (Milpitas, CA) “Glutathione Colorimetric Assay Kit” ürünü ile ölçülmüştür.

Glutasyon seviyesinin belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve keratokonus hücreleri bir gün önceden UV ışınlarına maruz bırakılmış ve üzerinden 24 saat geçmesi beklenmiştir. Bu süre sonunda hücreler tripsin ile kaldırılmıştır. İlk yapılan santrifüjde hücreler soğuk PBS ile yıkanıp 700xg 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelletleri yeniden soğuk PBS ile resüspanse edilmiştir. 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak yeniden 700xg 5 dakikada santrifüj edilmiş ve yine süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin lizise uğratılması için 80 µl soğuk Glutathione Buffer ilave edilmiş ve 10 dakika da buzda inkübe edilmiştir. Üzerlerine 20 µl of 5% SSA ( Sülfosalisilik asit) mix konularak 8000 x g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar temiz bir tüpe alınarak glutasyon analizi için kullanılmıştır. Reaksiyon karışımının oluşturulabilmesi amacıyla 20 µl NADPH Generating Mix 20 µl Glutathione Reductase ve 120 µl Glutathione Reaction Buffer karışımından her kuyucuğa 160 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır ve NADH dönüşümü için oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra absorbans okuması için 405 nm’de ölçümler alınarak grafiğe aktarılmıştır.



**Şekil 2.14** Glutatyon Standart Eğrisinin Oluşturulması

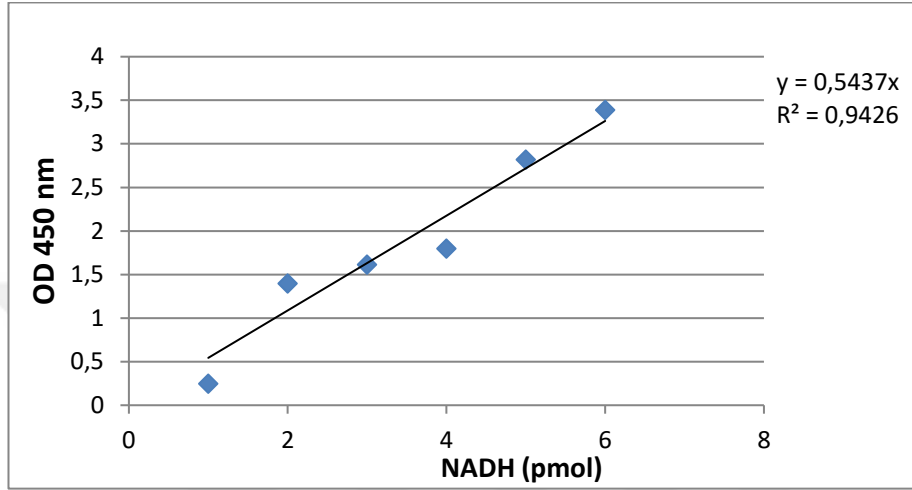
### 2.6.2 NADPH Miktarı

BioVision firmasının (Milpitas, CA) “NADP/NADPH Quantitation Colorimetric Kit” ürünü ile NADP/NADPH miktarı ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır.

NAD/NADH konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve keratokonus grubu hücreleri bir gün önceden uv ışınlarına maruz bırakılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak deney için hazır hale getirilmiştir. Daha sonra hücreler soğuk pbs ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. 2000 rpm 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet üzerine 400 µl of NADH/NAD Extraction Buffer ile iki defa olmak koşuluyla kuru buz üzerinde 20’şer dakika bekletilmiş ve ardından 10’ar dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. 10 saniye süreyle vortekslenip 14000 rpm 5 dakikada santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır.

Standart eğrisinin oluşturulabilmesi amacıyla (Şekil 2.14) 1 nmol/µl NADH standardından 10 µl alınıp üzerine 990 µl NADH/NAD Extraction Buffer ilave edilerek 10 pmol/µl standard NADH oluşturulmuştur. 96 well plate’in kuyucuklarına bu dilue edilmiş NADH standardından 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl hazırlanarak 50 µl NADH/NAD Extraction Buffer ile tamamlanmış ve 0, 20, 40, 60, 80, 100 pmol/well standartları elde edilmiştir. Örnek kuyucuklarına 1-50 µl arası örnek yüklenerek son hacim Extraction Buffer ile 50 µL’ye tamamlanmıştır.

Reaksiyon karışımının hazırlanabilmesi için, her bir standart ve örnek sayısı için NAD Cycling Buffer'dan 98 µl ve NAD Cycling Enzyme karışımından 2 µl ilave edilerek hazırlanmış ve kuyucuklara eklenmiştir. Daha sonra NAD'ın NADH'ye dönüşümü için oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Ardından her bir kuyucuğa 10 µl NADH developer ilave edilerek 1-4 saat aralığında oda sıcaklığında tutulmuştur. Ve bu süre sonunda plate ELISA okuyucuda 450 nm'de absorbans değerleri alınmıştır.



**Şekil2.15.** NADH Standart Eğrisinin Oluşturulması

### 2.6.3 Ürik Asit Miktarı

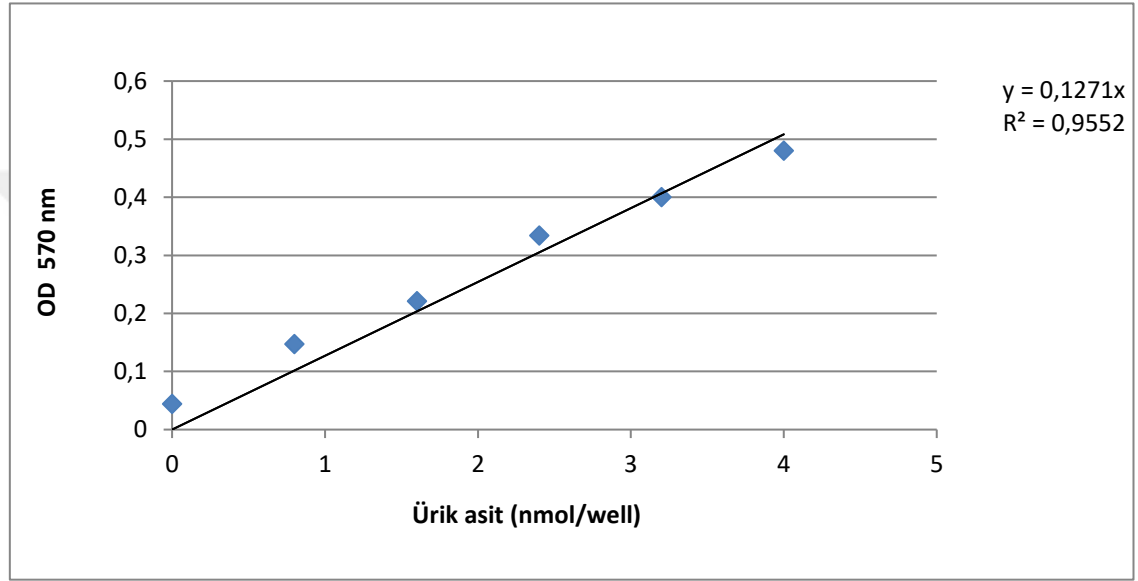
BioVision firmasının (Milpitas, CA) “Uric Acid Colorimetric/Fluorometric Assay Kit” ürünü ile Ürik asitin miktarı ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır.

Ürik asit miktarının belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve keratokonus grubu hücrelerine UV uygulaması yapıldıktan sonra tripsin ile kaldırılmış ve hücreler soğuk PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra üzerine 100 µl ürik asit assay buffer eklenip pipetaj yapılarak en yüksek hızda +4 derecede 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz tüpe alınarak her bir kuyucuğa (96 well plate) 50 µl olacak şekilde örnek konmuştur. Ürik asit standardının belirlenebilmesi amacıyla her kuyucuğa 0, 4, 8, 12, 16, 20 µl hacimlerinde ürik asit standardından konularak üzerleri 50 µl ürik asit assay buffer ile tamamlanmış ve 0, 8, 16, 24, 32, 40 nmol/well standartları oluşturulmuştur (Şekil2.16). Reaksiyon karışımının hazırlanabilmesi amacıyla her örnek ve standarda 46 µl ürik asit Assay Buffer, 2 µl ürik asit Probe ve 2 µl ürik asit Enzyme Mix karıştırılıp tüm kuyucuklara 50 µl olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra yarım saat

boyunca 37<sup>0</sup>C’de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 570 nm’de kolorimetrik ölçüm yapılarak absorbans değerleri alınarak grafiğe dökülmüştür.

#### 2.6.4 Ferritin Miktarı

MyBioSource firmasının (San Diego, CA) “Human L-ferritin ELISA Kit” ürünü ile Ferritin miktarı ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır.

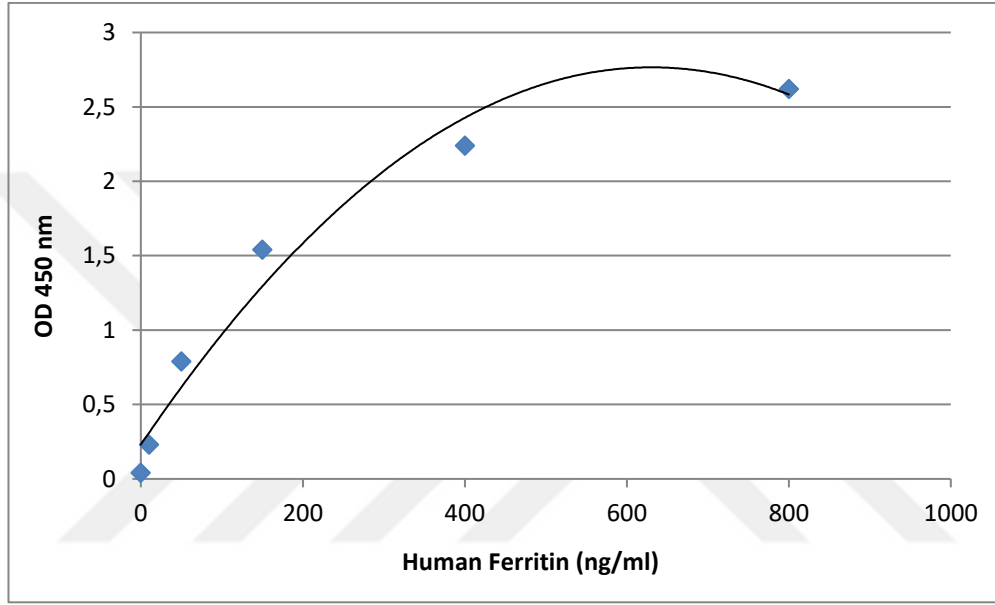


**Şekil2.16.**Ürik Asit Standart Eğrisinin Oluşturulması

Ferritin konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve keratokonus grubu hücreleri bir gün önceden uv ışınlarına maruz bırakılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak deney için hazır hale getirilmiştir. Deneyin öncesinde kullanılacak tüm kimyasallar oda sıcaklığına getirilmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Ferritin standardı, kontrol ve örneklerden 25’er µl istenen kuyucuklara pipetlenmiştir. Sonrasında da tüm kuyucuklara inkübasyon buffer’ından 100’er µl konmuştur. Ve 20-30 saniye hafifçe karıştırılmıştır. Plate’in kapağı kapatılarak 30 dakikalığına oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüm kuyucuklardan sıvı uzaklaştırılarak wash buffer ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Ve kağıt havlu üzerinde sıvı emdirilerek kurutulmuştur. Enzim konjugatından 100’er µl eklenmiştir. 20-30 saniye kadar hafifçe karıştırıldıktan sonra kapağı kapatılıp oda sıcaklığında yarım saat kadar karıştırılıp inkübe edilmiştir. Süre

sonunda kuyucuklar içerisindeki sıvı boşaltılarak 3 kez yıkama yapılmıştır (1X Wash Buffer).

Ve yine kağıt havlu ile kurutularak sıvı emdirilmiştir. Üzerine TMB standardından 100 µl konularak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonundan ilave edilmiştir. Plate hafifçe karıştırıldıktan sonra 15 dakika içerisinde ELISA okuyucuda absorbans ölçümleri yapılmıştır (450 nm).

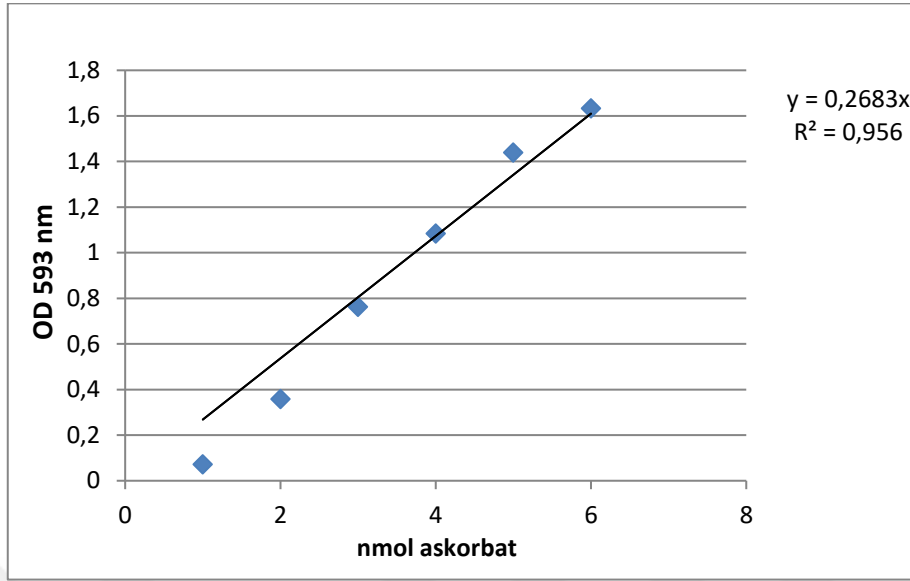


Şekil 2.17. Ferritine Ait Standart Eğrisinin Oluşturulması

### 2.6.5 Askorbik Asit Miktarı

BioVision firmasının (Milpitas, CA) “Ascorbic Acid Colorimetric Assay Kit II (FRASC)” ürünü ile C-vitamini miktarı ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır.

Askorbik asit miktarının belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve karatokonus hücreleri tripsin ile kaldırıldıktan sonra soğuk PBS ile yıkanıp santrifüj edildikten sonra üzerlerine 100 µl ultra saf su eklenip pipetaj yapıldı. En yüksek hızda +4 derecede 2-5 dakika santrifüj edildi. Süpertanat temiz tüpe alındı. Her bir örnekten kuyucuklara 50’şer µl alınarak 120 µl Askorbik asit assay buffer ile tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımının hazıranabilmesi için her grup hücre için 80 µl FRASC Buffer, 10 µl Ascorbic Acid Probe ve 10 µl FeCl<sub>3</sub> karışımı hazırlandı ve her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendi. Absorbans ölçümleri 545 nm’de ölçülerek grafikte gösterilmiştir.



**Şekil 2.18.** Askorbik Asit Standart Eğrisinin Oluşturulması

## 2.7 ROS Türevleri

Birincil hücre kültürlerinden, ROS miktarını gösteren ve azaltılmasını sağlayan moleküller incelenmiştir.

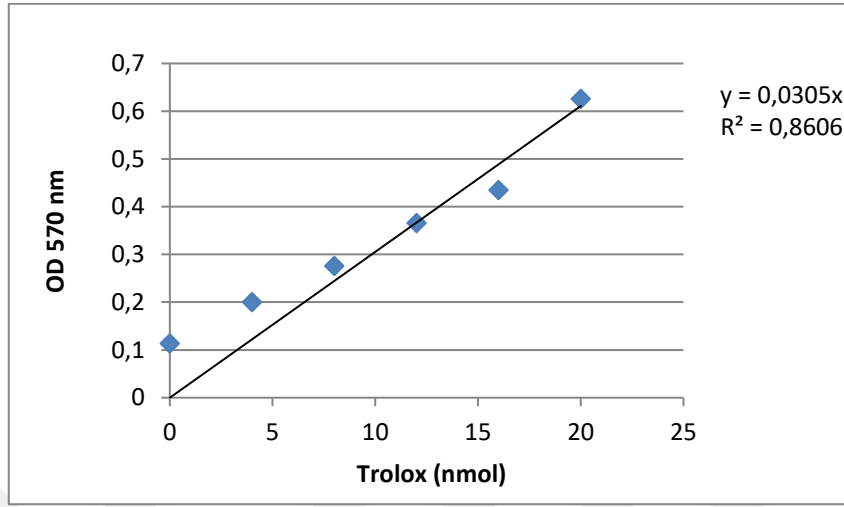
### 2.7.1 Toplam Antioksidan Kapasite

BioVision firmasının (Milpitas, CA) “Total Antioxidant Capacity (TAC) Colorimetric Assay Kit” ürünü ile  $Cu^{2+}$  molekülünün miktarı ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır. Bu kit ile örnekteki tüm antioksidan protein ve moleküllerin toplam aktivitesi ölçülebilmektedir.

Keratokonumlu ve normal bireylerden alınan hücreler UV ışınlarına maruz bırakılarak üzerinden 24 saat geçmesi beklendi. Bu süre sonunda hücreler tripsin muamelesi ile kaldırılarak santrifüj edildi ve hücreler önce soğuk PBS ile daha sonra da ultrasaf su ile yıkanarak resüspanse edildi. Buz üzerinde 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve 5 dakika maksimum hızda soğuk santrifüj uygulanmıştır. Çözülmeyen materyaller uzaklaştırılmış süpernatantlar ise temiz bir tübe alınmıştır.

Standart eğrisinin oluşturulabilmesi amacıyla belli derişimlerde (0, 4, 8, 12, 16, 20 nmol) trolox standardından eklenmiş ve trolox standart eğrisi oluşturulmuştur (**Şekil2.19**). Temiz tüpe aktarılan süpernatant örneklerinden her kuyucuğa 200  $\mu$ l olacak şekilde örnek konmuştur. Tüm standart ve örnek kuyucuklarının üzerlerine  $Cu^{2+}$  çalışma solüsyonu eklenmiştir. Plate’in kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 1.5

saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 570 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır.



**Şekil 2.19.** Trolox Standart Eğrisinin Oluşturulması

### 2.7.2 Hidrojen Peroksit Miktarı

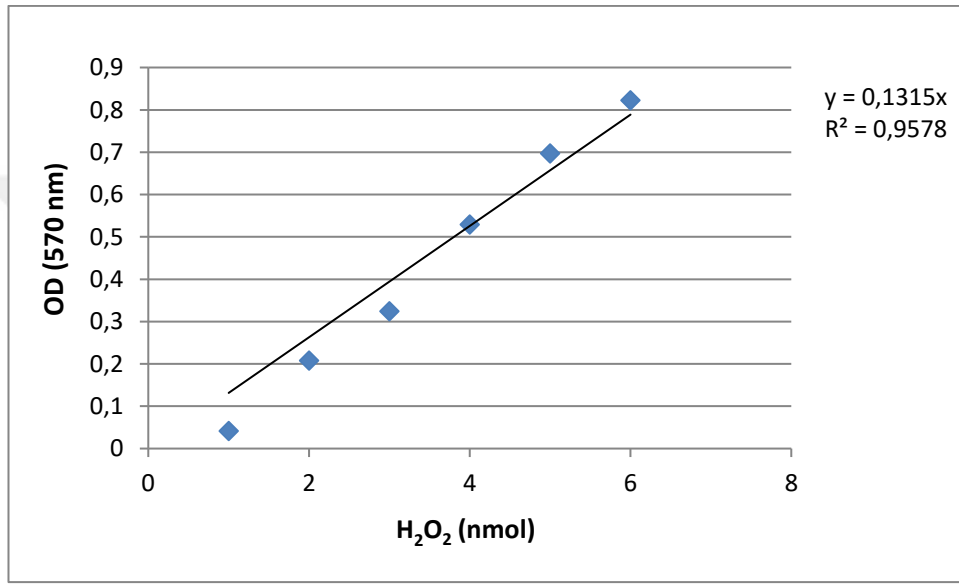
BioVision firmasının (Milpitas, CA) “Hydrogen Peroxide Assay Kit” ürünü ile ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır. Bu kit ile örnekteki hidrojen peroksit miktarı Horse Radish Peroxidase enzimi ile parçalanması miktarına göre ölçülebilmektedir.

Hidrojen peroksit konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve keratokonus grubu hücreleri bir gün önceden uv ışınlarına maruz bırakılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak deney için hazır hale getirilmiştir. Daha sonra hücreler soğuk pbs ile yıkama işleminden geçirilerek assay buffer ile yeniden süspansedilmiş ve buz üzerinde bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında hücreler santrifüj edilerek (1000g, 30 dakika) pellet uzaklaştırılmış, süpernatant ise temiz tüplere alınmıştır.

Hidrojen peroksit standart eğrisinin oluşturulabilmesi öncelikle  $H_2O_2$  standardından (0.88 M) 10  $\mu$ l alınarak içerisine 870  $\mu$ l  $dH_2O$  ilave edilmiş ve 10 mM  $H_2O_2$  standardı elde edilmiştir. Daha sonra bu 10  $\mu$ l of the 10 mM  $H_2O_2$  standardından 10  $\mu$ l alınarak 990  $\mu$ l  $dH_2O$  ile tamamlanmıştır ve 0.1 mM  $H_2O_2$  standardı oluşturulmuştur.

Daha sonra kuyucuklara 0.1 mM  $H_2O_2$  standardından 0, 10, 20, 30, 40, 50’şer  $\mu$ l konularak 0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol/well  $H_2O_2$  standardı elde edilmiştir (**Şekil 2.20**).

Bu aşamadan sonra örnek hazırlanmaya geçilmiştir. 96 well plate'inher kuyucuğuna her grup örnekten 2 – 50 µL olmak üzere örnekten alınıp üzeri 50 µL/well Assay Buffer ile tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler ve standart kuyucuklarının üzerine reaksiyon karışımından 50'şer µL ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımının hazırlanması için, her örnek sayısı için 46 µl Assay Buffer, 2 µl OxiRed™ Probe solution, 2 µl HRP solution hazırlanarak ilave edilmiştir. İyice karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda Elisa plate okuyucuda 570 nm'de örneklerin absorbans değerleri kaydedilmiş ve grafiğe aktarılmıştır.



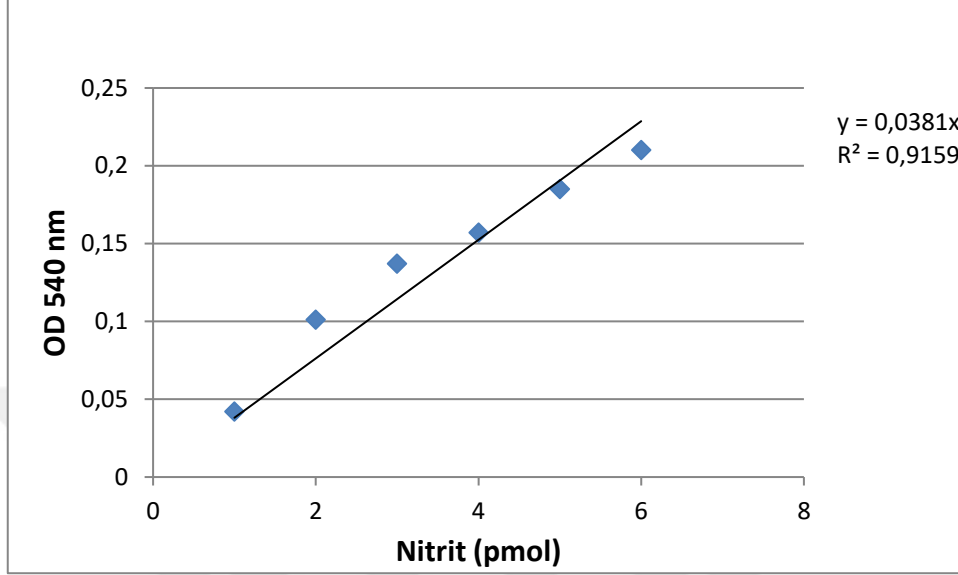
**Şekil 2.20.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standart Eğrisinin Oluşturulması

## 2.8 NOS ve NO

Nitrik oksit sentaz aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve keratokonus grubu hücreleri bir gün önceden uv ışınlarına maruz bırakılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak deney için hazır hale getirilmiştir. Hücre pelletleri üzerine ilave edilen soğuk NOS Assay Buffer ile hücreler lizise uğratılmıştır. Nitrit Standardının belirlenebilmesi amacıyla 10 mM'lık Nitrite Standardından 5 ul alınarak 995 µl Assay Buffer ile tamamlanmış ve 50 µM'lık çalışma solüsyonu elde edilmiştir. İyice karıştırılarak 0, 5, 10, 15, 20, and 25 µl hacimlerinde 96-well plate'e aktararak 0, 250, 500, 750, 1000, ve 1250 pmol/well Nitrit Standardı oluşturulmuştur (**Şekil 2.21**). Reaksiyon karışımının oluşturulabilmesi amacıyla her bir kuyucuk için diluted NOS Cofactor1 (15 µl), NOS Cofactor 2 (20 µl), NOS Substrate (5 µl) ve Nitrate Reductase (5 µl) karışımı hazırlanmıştır. Her örnek ve standart için 45'er ul reaksiyon karışımı ilave edilmiş ve



37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüm standart ve örneklere 90 ul NOS Assay Buffer ilave edilmiştir. Daha sonrasında ise sırasıyla 50 µl Griess Reagent 1 ve 50 µl Griess Reagent 2 çözeltilerinden konulmuştur. Absorbans ölçümleri 540 nm’de okutularak grafiğe dökülmüştür.



Şekil 2.21. Nitrit Standart Eğrisinin Oluşturulması

## 2.9 Oksidasyon Son Ürünleri

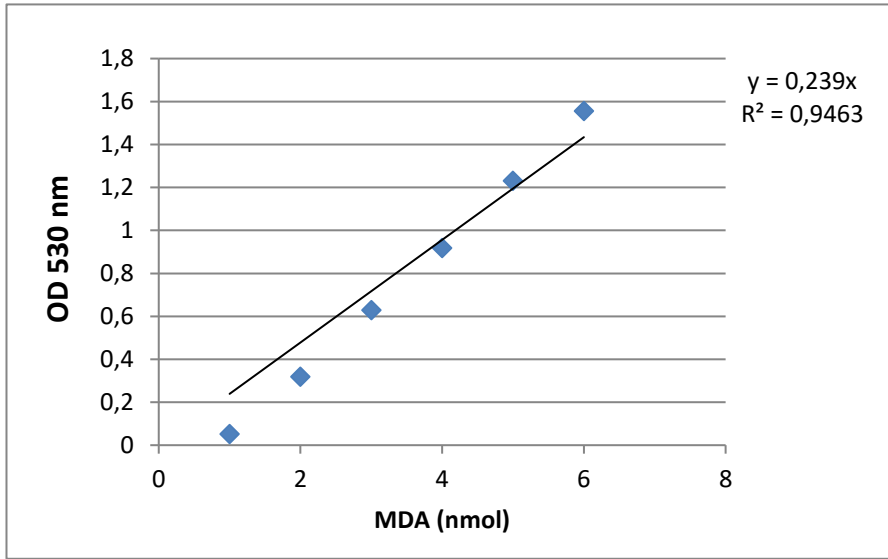
Birincil hücre kültürlerinden lipid peroksidasyonu ve protein nitrasyonu son ürünleri olan MDA ve Nitrotirozin (NT) miktarları incelenmiştir.

### 2.9.1 MDA Miktarı (Lipid Peroksidasyonu)

MDA miktarı BioVision firmasının (Milpitas, CA) “Lipid Peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay Kit” ürünü ile ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır.

Lipid Peroksidasyonunun son ürünlerinden olan Malondialdehit (MDA) seviyesinin belirlenebilmesi amacıyla Kontrol ve Keratokonus grubu hücreleri kaldırıldıktan sonra soğuk PBS ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Her bir örnek için 300µl MDA lizis buffer ve 3 µl BTH (100x) hazırlandı. Hazırlanan lizis bufferden (Buffer+BHT) 303 µl homojenize edilerek hücrelerin üzerine eklendi. 13000xg +4°C’de 10 dakika santrifüj edildi. Toplanan süpernatant temiz bir ependorfa alındı. MDA Standardı oluşturuldu (Şekil 2.22) ve 530 nm’de absorbans değerleri okunarak çıkan sonuçlar grafiğe aktarıldı.

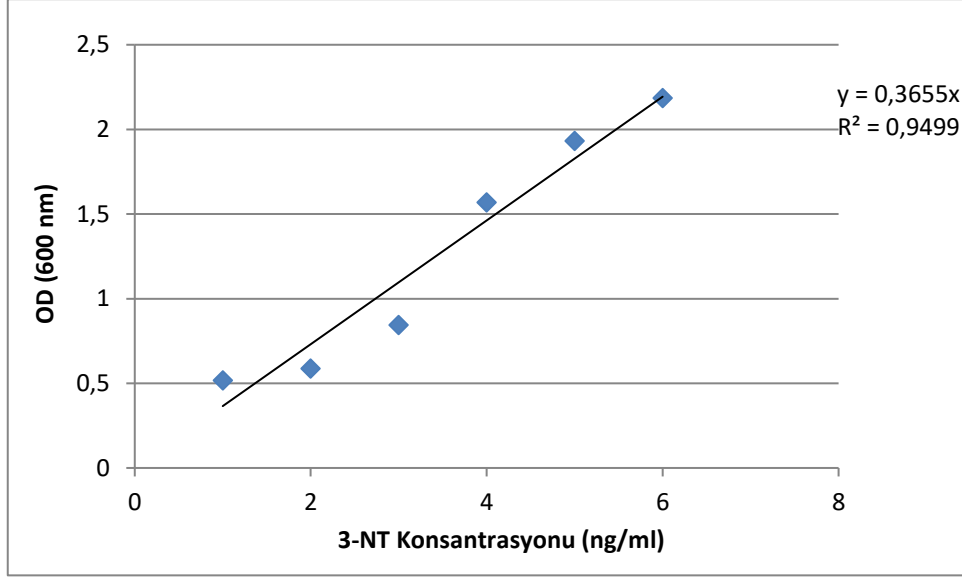
### 2.9.2 Nitrotirozin Miktarı



Alpco firmasının (Salem, NH) “Nitrotyrosine ELISA” ürünü ile Nitrotirozin miktarı ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır.

**Şekil 2.22.**MDA Standart Eğrisinin Oluşturulması

Nitrotirozin konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla kontrol ve keratokonus grubu hücreleri bir gün önceden uv ışınlarına maruz bırakılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak deney için hazır hale getirilmiştir. Daha sonra kit içerisindeki kimyasallar oda sıcaklığına getirilmiştir. Tüm örnekler ve standartlar kit protokolüne uygun şekilde hazırlanmıştır. Kalibrasyon için standart eğrisi oluşturulmuştur (Şekil2.23). Her bir kuyucuk içerisinde örneklerden 50 µL konularak oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda vasat atılarak 2 kez yıkama yapılmıştır. Her bir kuyucuğa 50 µL ‘detector antibody’ ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Yeniden aspire edilmiş ve 2 kez yıkama yapılmıştır. Üzerine 50 µL ‘HRP label’ katılarak etiketleme yapılmıştır. Ve yine oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Yeniden aspire edilerek 3 yıkama yapılmıştır. Kuyucukların üzerlerine 100 µL ‘TMB Development Solution’ ilave edilmiştir. Ve 15 dakika içerisinde 600 nm’de renk gelişimi kaydedilmiştir.



**Şekil 2.23.** 3-NT Standart Eğrisinin Oluşturulması

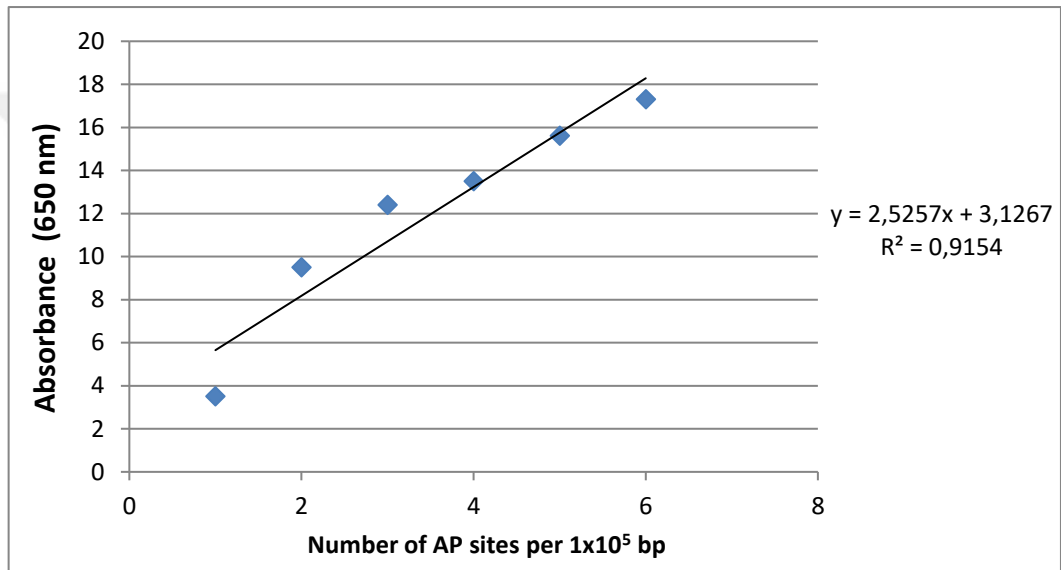
## 2.10 DNA Tamiri ve Kırıkları

Birincil hücre kültürlerinden, UV soğurma ve ROS indirgenimi işleyişlerinde bir sorun olması durumunda genomik DNA ya olan etkinin anlaşılması için genomik DNA'da oluşan hasar incelenecektir. Nükleotidlerin oksitlenmesi, deamine olması ve alkillenmesi sonrası tamir mekanizması ile apuridik ve apirimidinik bölgeler oluşur. Tahminlere göre bu şekilde bir günde 200.000 bölge oluşur ve bu bölgelerin miktarı DNA hasarı ile tamiri miktarının ölçülmesini sağlar. Bu deneyde kullanılan yöntem Aldehyde Reactive Probe ile apuridik ve apirimidinik bölgelerdeki aldehyd grupları tepkimeye girer ve biotin ile işaretlenir. Sonrasında avidin işaretli ELISA yöntemi kullanılarak ölçüm yapılır.

Çalışmada BioVision firmasının 'DNA Damage Quantification Colorimetric Kit' ürünü ile DNA'daki apuridik ve apirimidinik bölgeler ölçülmüştür. Deneysel yöntem olarak, kitin kendi prosedürü uygulanmıştır. Bu amaçla kontrol ve keratokonus grubu hücreleri bir gün önceden uv ışınlarına maruz bırakılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak deney için hazır hale getirilmiştir. DNA hasarının belirlenebilmesi için öncelikle genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA spektrofotometrede okunarak konsantrasyonu belirlenmiştir. Elde edilen Genomik DNA, konsantrasyonu 0.1 µg/µl olacak şekilde TE Buffer içerisinde çözülür. Daha sonra ARP etiketleme aşamasına geçilir. Bu amaçla saflaştırılmış DNA solüsyonundan 5 µl alınıp ARP solüsyonundan da aynı hacimde karıştırılarak, DNA AP bölgelerinin etiketlenmesi amacıyla 1 saatliğine

37°C’de inkübe edilir. Daha sonra reaksiyon solüsyonunun üzerine 88 µl TE ve 2 µl Glycogen eklenerek iyice karıştırılır. Ve bu karışıma 0.3 ml saf etanol eklenerek – 20°C’de 10 dakika bekletilir. Sonrasında etiketlenmiş DNA’nın AP-bölgelerini presipite etmek amacıyla 10 dakikalığına en yüksek hızda santrifüj edilir. Pellet 0,5 ml %70’lik etanol ile 3 kez yıkanır. Etanol kalıntılarını gidermek amacıyla hızlı spinleme yapılır. Pellet 5 dakikalığına havada kurutulur. Biotin ile etiketlenmiş genomik DNA pelleti elde edilmiş olur.

Daha sonra DNA’daki ‘‘abasic-sites’’larının sayısının belirlenmesi aşamasına geçilir. Bu amaçla 40 ARP-DNA Standardı (40 ARP sites per 105 bp) ile 0 ARP-DNA



Standardı; 0, 8, 16, 24, 32, 40 ARP-DNA solüsyonlarının her birinden 200 µl olacak şekilde dilue edilir (tabloda gösterilmiştir).

ARP Number	0	8	16	24	32	40
40 ARP-DNA Standard (µl)	0	40	80	120	160	200
0 ARP-DNA Standard (µl)	200	160	120	80	40	0

**Şekil2.24.** DNA lezyonlarının belirlenebilmesi amacıyla apürinik/aprimidinik (AP) bölgelerinin sayısının gösterilmesiyle hazırlanmış standart eğrisi

Biotin ile etiketlenmiş DNA örnekleri 1 ml TE buffer içerisinde çözülür (0.5 µg/ml). Her kuyucuğa ARP-etiketlenmiş DNA örneklerinden ve ARP-DNA standartlarının her birinden 60 µl eklenir. Plate yüzeyinde etiketlenmiş DNA’nın bağlanmasına izin vermek için standartlara ve örneklere 100 µl DNA Binding Solution eklenerek oda sıcaklığında bir gece boyunca bekletilir. Kuyucuklar kapalı tutulur. Bu süre sonunda kuyucuklardaki DNA bağlama solüsyonu uzaklaştırılır ve

250 µl Wash Buffer ile 5 kez yıkanır. Üzerine dilue edilmiş HRP-Streptavidin solüsyonundan 100 µl konularak oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalanır. Kuyucuklardaki solüsyon uzaklaştırılarak yine 250 µl Wash Buffer ile 5 kez yıkama yapılır. Üzerlerine 100 µl HRP Developer katılarak 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilir. Ve 650 nm'de absorbans ölçümleri yapılır.

## 2.11 UV Geçirgenlik Ölçümü

Korneal epitel hücrelerinin UV geçirgenliklerini test etmek ve UV maruziyeti sonrası UV geçirgenliğindeki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. hücrelerin UV geçirgenliğini ölçmek için kontrol ve keratokonus grubu hücreleri bir gün önceden UV ışınlarına (UV-A ve UV-B) maruz bırakılmış ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler kültür ortamından kaldırılarak 1 ml de 100.000 hücre olacak şekilde süspansiyon haline getirildi. 6 farklı grupta (keratokonus UV-A, keratokonus UV-B, keratokonus UV-YOK, kontrol UV-A, kontrol UV-B, kontrol UV-yok) korneal epitel hücrelerinin UV geçirgenliğinin test edilmesi amacıyla ELISA okuyucu (Biotek, Powerwave XS2) kullanılarak hücrelere 300-700 nm skalasında dalgaboyu taraması yapıldı.

## 2.12 Gerçek Zamanlı PCR

Örnekler, deney aşamasına kadar -20° C'de muhafaza edilmiştir.

### İzolasyon;

Örneklere 400 µl lysis/binding buffer eklenmiştir. 15 saniye vortexlenmiştir. Karışım filtre-koleksiyon tüpünün üst kısmına konulmuştur. Maximum 700 µl olacak şekilde konulmuştur. 15 saniye 8.000 xg de santrifüj yapılmıştır. Alt rezervuara çöken sıvı dökülüp, Filtre tekrar tüpe konulmuştur. Her bir örnek için; 90µl DNase incubation buffer, 10µl Dnase I karıştırılıp, Rezervuarın üst kısmına her bir örneğe 100µl konulmuştur. 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır (+15°-+25°). 500 µl yıkama solüsyonu I üst rezervuara eklendi. 8000 xg de 15 saniye santrifüj yapılmıştır. Alt rezervuara çöken sıvı dökülüp, Koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konulmuştur. 500 µl yıkama solüsyonu II üst rezervuara eklenmiştir. 8000 xg de 15 saniye santrifüj yapılmıştır. Alt rezervuara çöken sıvı dökülüp, Koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konulmuştur. 200 µl yıkama solüsyonu II üst rezervuara eklenmiştir. 2 dakika maksimum hızda santrifüj yapılmıştır. Alt rezervuara çöken sıvı dökülüp, Koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konuldu ve max hızda (13000 xg) 2 dakika boş santrifüj yapılmıştır. Yıkama solüsyonunun tamamen uzaklaştırılması

sağlanmıştır. Filtre tüpü 1.5 ml'lik ependorflara konulmuştur.50-100 µl elution solüsyonu (örneğe göre kitin içinde değişir.) üst rezervuara eklenmiştir. 8000 xg de 1 dak. santrifüj yapılmıştır. Filtre tüpü atılmıştır. Çöken kısım RNAnın olduğu kısımdır. Ependorf cDNAya çevirene kadar -20 °C'ye konulmuştur.(Hemen çalışılacak ise +4 °C de bekletilebilir.).cDNA sentezi;DNA örnekleri izolasyondan sonra gerçek zamanlı pcr konulurken RNA cDNA çevrilir. Çevrilme işlemi, Qubit cihazında RNA miktarına bakıldıktan sonra, kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

### **Örnek başına;**

Kitin içindeki iki farklı primer 1 µl olarak konulmuştur. Primerler ayrı ayrı kullanılabilirdiği gibi ikisi bir arada da kullanılabilir. Spesifik primerler kullanılmak istendiğinde yine 1µl konulmuştur.

Total RNA miktarı gerçek zamanlı pcr konulurken her bir örnek için 50-100 ng mRNA düşecek şekilde hesaplanır ve cDNAya çevrilirken değişken olarak RNA maksimum 11µl olacak şekilde konulmuştur. Daha düşük miktarlar kitin içinden çıkan su ile toplamı 13µl olacak şekilde tamamlanmıştır.Oluşan 13 µl'lik karışım opsiyonel olarak;65 °C 10 dakika PCR'a konulmuştur.

### **Çıkan örneklerin üstüne, her bir örnek için;**

Kimyasallar	Vol.	Son konsantrasyon
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction buffer	4µl	1x (8 mM MgCl <sub>2</sub> )
Deoxynucleotide mix	2µl	1 mM (her biri)
Protector RNase Inhibitor	0.5µl	20 U
Transcriptor Reverse Transcriptase	0.5µl	10 U

Toplamda her bir örnek için 7 µl olacak şekilde karışım hazırlanır, vorteks yapılmadan iyice pipetaj yapılmıştır. PCR'dan çıkan örneklerin üzerine 7 µl konulmuştur. Örnek toplamda 20 µl'lik bir karışım halinde PCR cihazına tekrar konulmuştur;

**Anchored-oligo(dt) primer veya spesifik primer için hedef mRNA uzunluğuna göre;**

4 kb 30 dakika 55°C

>4 kb 60 dakika 50°C

Random primer için,

4 kb 10 dakika 25°C

30 dakika 55°C

>4 kb 10 dakika 25°C

60 dakika 50°C

Devamında; 5 dakika 85° bekletilmiştir. Çıkan cDNA'lar buz üstüne alınmıştır veya -20 °C'de saklanmıştır.

Gen ekspresyonu çalışmalarında Hydrolysis Probes Master veya SYBR Green master kullanılır.

#### **Hydrolysis probes master PCR' Mix'in hazırlanması:**

PCR mix hazırlanırken her bir örnek için su (4µl), LightCycler 480 Probes Master (10µl), Real Time Ready Assay (1µl) toplam hacim 15 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan mix vortex kullanılmadan pipetle yukarı aşağı yapılarak karıştırılmıştır. LightCycler 480 multiwell plate in her kuyucuğuna pcr miksten 15 µl, üzerine 5µl cDNA eklenmiştir. Kuyucuklardaki hacim 20 µl olur. Multiwell Plate 2 dk 1500 x g santrifüjedilmitir. Santrifüj işleminden sonra plate cihaza yerleştirilip kullanılacak olan MonocolorHydrolysisProbe/ UPL Probe programı seçilmiştir. UPL Probe için gerekli protokoller cihazda seçildikten sonra LightCycler 480 PCR başlatılmıştır.

<b>Set up</b>			
<b>Detection format</b>		<b>BlockType</b>	<b>Reaction Volume</b>
MonocolorHydrolysisProbe/ UPL Probe		96	20µl
Filtercombination: dynamicMode FAM483–533or465–510respectively,forLightCycler®480InstrumentVersionIorII			
<b>Programs</b>			
ProgramName		Cycles	Analysis Mode
Pre-Incubation		1	None
Amplification		45	Quantification
Cooling		1	None
<b>TemperatureTargets</b>			
Target (°C)	AcquisitionMode	Hold( hh:mm:ss)	RampRate(°C/s)
<b>Pre-Incubation</b>			
95	None	00:10:00	4.4
<b>Amplification</b>			
95	None	00:00:10	4.4
60	None	00:00:30	2.2
72	Single	00:00:01	4.4
<b>Cooling</b>			
40	None	00:00:30	2.2

### 2.13 İstatistik Analizler

Tüm veriler SPSS18.00 paket program kullanılarak analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler (median) (min-max) olarak verildi.

Gruplar arasındaki verilerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi. Anlamlı çıkan farkların ikili grup karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Her döngü, gerçek zamanlı PCR analizi LightCycler Yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Bağlı transkript seviyeleri housekeeping gene dayalı olarak hesaplanmıştır.



İstatistiksel analizler "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS / PC 15. 0) paket programı ile yapıldı.

ALDH, GPX, GSR, SODI ve SODIII genleri için Kruskal Wallis Testi ( $p = 0.034 < p = 0.05$ ), daha sonra Mann Whitney U testi istatistiksel analizi yapıldı. 0.05 'den daha düşük bir P seviyesinin Mann-Whitney U testi için önemli olduğu kabul edildi.



### 3 BULGULAR

#### 3.1 ELİSA Sonuçları

ELİSA yöntemi ile yapılan analizlerin toplu sonuçları **Tablo3.1**'te görülmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı değişim bulunan analiz sonuçları şunlardır: GPX (0,016), ALDH (<0,001), TAS (<0,001), G6PD (<0,001), NO(0,001), Ürik Asit (0,034), MDA (0,047), NOS (<0,001), Ferritin (0,049). İstatistiki olarak anlamlı bulunan analiz sonuçları kendi içinde ikili olarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonuçları **Tablo3.2**'te verilmiştir.

Keratokonus grubu içinde UV uygulamasına göre yapılan karşılaştırmalar **Tablo3.3**'te görülmektedir. UV-A uygulanan, UV-B uygulanan ve UV uygulanmayan gruplar istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı fark bulunan analizler ve p değerleri sırasıyla; Katalaz (p=0.042), G6PD (p=0.022), NOS (p=0.013), Nitrotirozin (p=0.020) olarak bulundu. Bu gruplar kendi içlerinde ikili olarak karşılaştırıldığı zaman anlamlı farklılık gösteren sonuçlar **Tablo 3.4**'da gösterilmiştir

**Tablo3.1.** Gruplardaki analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Değişken	KK/UV-A	Kontrol/UV-A	KK/UV-B	Kontrol/UV-B	KK	Kontrol	p
GPX (Median/Min-Max)	77,50 (68,33-81,66)	39,16 (16,66-95)	89,99 (40-110)	107,49 (83,33-158,33)	68,33 (21,66-168,33)	117,50 (70-123,33)	<b>0,016</b>
GRA (Median/Min-Max)	1,406 (0,351-4,921)	2,460 (0,351-4,570)	1,054 (0,351-1,406)	1,406 (0,351-4,921)	1,230 (0,703-2,109)	1,582 (0,351-4,570)	0,418
SOD (Median/Min-Max)	87,50 (25-100)	81,250 (12,50-87,50)	68,75 (25-100)	43,75 (25-100)	56,25 (25-100)	43,75 (25-87,50)	0,724
ALDH (Median/Min-Max)	1,587 (1,216-1,851)	5,978 (4,656-7,089)	1,746 (1,375-2,804)	6,349(5,185-7,460)	1,560 (1,058-1,904)	5,873 (5,185-6,560)	<b>&lt;0,001</b>
TAS (Median/Min-Max)	1,653 (1,280-1,717)	1,831 (1,723-1,885)	1,553 (1,452-1,655)	1,828 (1,731-1,912)	1,693 (1,475-1,776)	1,797 (1,725-1,886)	<b>&lt;0,001</b>
Katalaz (Median/Min-Max)	1,552 (0,536-2,251)	0,510 (0,104-1,117)	0,888 (0,016-1,190)	0,940 (0,305-1,921)	1,407 (0,104-1,552)	0,743 (0,538-1,455)	0,052
G6PD (Median/Min-Max)	7,618 (6,925-12,60)	5,384 (5,00-4,702)	10,455 (7,41-15,86)	6,925 (5,898-7,238)	6,501 (6,032-9,025)	5,540 (5,00-6,032)	<b>&lt;0,001</b>
NO (Median/Min-Max)	0,302 (0,277-0,360)	0,244 (0,127-0,265)	0,350 (0,234-0,432)	0,216 (0,101-0,402)	0,306 (0,243-0,337)	0,196 (0,118-0,242)	<b>0,001</b>
Ürik Asit (Median/Min-Max)	0,798 (0,479-1,140)	0,369 (0,346-0,448)	0,574 (0,377-1,093)	0,385 (0,361-0,731)	0,393 (0,354-1,038)	0,476 (0,354-0,904)	<b>0,034</b>
MDA (Median/Min-Max)	0,453 (0,355-0,757)	0,564 (0,418-0,656)	0,470 (0,359-0,719)	0,926 (0,648-1,054)	0,715 (0,368-1,364)	0,592 (0,389-1,497)	<b>0,047</b>
Askorbik Asit (Median/Min-Max)	0,270 (0,268-0,313)	0,285 (0,272-0,294)	0,279 (0,264-0,301)	0,279 (0,264-0,294)	0,281 (0,260-0,301)	0,281 (0,272-0,290)	0,934
Glutatyon (Median/Min-Max)	1,252 (1,080-1,300)	1,165 (1,126-1,223)	1,165 (1,087-1,786)	1,165 (1,126-1,262)	1,300 (1,145-1,533)	1,135 (1,126-1,223)	0,403
NOS (Median/Min-Max)	2,992 (2,729-4,015)	4,580 (3,438-5,616)	2,637 (1,732-2,887)	4,868 (4,251-5,485)	2,270 (2,125-2,992)	3,622 (3,543-4,645)	<b>&lt;0,001</b>
H2O2 (Median/Min-Max)	0,338 (0,326-0,395)	0,342 (0,296-0,357)	0,338 (0,326-0,692)	0,361 (0,342-0,562)	0,349 (0,319-0,653)	0,361 (0,342-0,486)	0,273
NAD/NADH (Median/Min-Max)	0,533 (0,476-0,606)	0,656 (0,489-0,836)	0,511 (0,358-0,557)	0,720 (0,682-0,796)	0,502 (0,428-0,640)	0,768 (0,588-1,121)	<b>&lt;0,001</b>
Nitrotirozin-3 (Median/Min-Max)	1,129 (0,864-2,235)	0,928 (0,662-1,794)	1,120 (0,856-1,321)	1,094 (0,902-3,086)	1,616 (1,537-3,124)	1,086 (0,894-1,668)	0,101
Ferritin (Median/Min-Max)	70,50 (50-142)	47,00 (44-84)	60 (49-117)	54,80 (44-85)	51,50 (47-75)	76,50 (61-137)	<b>0,049</b>

Gruplar arasındaki verilerin karşılaştırılmasında **Kruskal-Wallis testi** kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel olarak anlamlı değişim bulunan analiz sonuçları şunlardır: GPX (0,016), ALDH ( $< 0,001$ ), TAS ( $< 0,001$ ), G6PD ( $< 0,001$ ), NO(0,001), Ürik Asit (0,034), MDA (0,047), NOS ( $< 0,001$ ), Ferritin (0,049). İstatistiki olarak anlamlı bulunan analiz sonuçları kendi içinde ikili olarak karşılaştırılmıştır. Anlamlı çıkan farkların ikili grup karşılaştırmasında **Mann-Whitney U testi** kullanıldı(**tablo3.2**).

**Tablo3.2.** Anlamlı çıkan gruplardaki analiz sonuçlarının kendi aralarında karşılaştırılma

Grup	P (GPA)	P (ALDH)	P (TAS)	P (G6PD)	P (NO)	P (Ürik A)	P (MDA)	P (NOS)	P (NAD/ NADH)	P (Ferritin)
<b>KK-UVA/ Kontrol-UVA</b>	0,065	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	0,262	<b>0,006</b>	0,078	<b>0,045</b>
<b>KK-UVB/ Kontrol-UVB</b>	0,297	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,037</b>	0,336	<b>0,010</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	0,337
<b>KK / Kontrol</b>	0,150	<b>0,004</b>	<b>0,025</b>	<b>0,005</b>	<b>0,004</b>	0,574	1,00	<b>0,004</b>	<b>0,006</b>	0,54
<b>KK-UVA / KK-UVB</b>	0,336	0,374	0,200	0,150	0,337	0,262	1,00	<b>0,013</b>	0,336	0,378
<b>KK-UVA/KK</b>	0,470	0,936	0,522	0,109	0,749	<b>0,037</b>	0,262	<b>0,016</b>	0,173	0,078
<b>KK-UVB/KK</b>	0,470	0,336	0,078	<b>0,010</b>	0,297	0,172	0,173	0,261	0,519	0,310
<b>Kontrol-UVA/ Kontrol-UVB</b>	<b>0,016</b>	0,423	0,749	<b>0,010</b>	0,423	0,228	<b>0,006</b>	0,631	0,262	0,422
<b>Kontrol-UVA / Kontrol</b>	<b>0,010</b>	0,873	0,873	0,936	0,150	0,148	0,631	0,109	0,200	<b>0,025</b>
<b>Kontrol-UVB/Kontrol</b>	0,337	0,378	0,423	<b>0,020</b>	0,749	0,936	0,150	<b>0,010</b>	0,337	<b>0,030</b>

**Tablo3.3.** Keratokonus grubunda UV uygulamasına göre sonuçların karşılaştırılması

Analiz	UV-A	UV-B	UV-YOK	p
GPA (Median/Min- Max)	77,50 (68,33-81,66)	89,99 (40-110)	68,33 (21,66-168,33)	0,567
GRA (Median/Min- Max)	1,406 (0,351-4,921)	1,054 (0,351-1,406)	1,230 (0,703-2,109)	0,549
SOD (Median/Min- Max)	87,50 (25-100)	68,75 (25-100)	56,25 (25-100)	0,545
ALDH (Median/Min- Max)	1,587 (1,216-1,851)	1,746 (1,375-2,804)	1,560 (1,058-1,904)	0,556
TAS (Median/Min- Max)	1,653 (1,280-1,717)	1,553 (1,452-1,655)	1,693 (1,475-1,776)	0,172
Katalaz (Median/Min- Max)	1,552 (0,536-2,251)	0,888 (0,016-1,190)	1,407 (0,104-1,552)	<b>0,042</b>
G6PD (Median/Min- Max)	7,618 (6,925-12,600)	10,455 (7,417-15,862)	6,501 (6,032-9,025)	<b>0,022</b>
NO (Median/Min- Max)	0,302 (0,277-0,360)	0,350 (0,234-0,432)	0,306 (0,243-0,337)	0,489
Ürik Asit (Median/Min- Max)	0,798 (0,479-1,140)	0,574 (0,377-1,093)	0,393 (0,354-1,038)	0,079
MDA (Median/Min- Max)	0,453 (0,355-0,757)	0,470 (0,359-0,719)	0,715 (0,368-1,364)	0,347
Askorbik Asit (Median/Min- Max)	0,270 (0,268-0,313)	0,279 (0,264-0,301)	0,281 (0,260-0,301)	0,850
Glutatyon (Median/Min- Max)	1,252 (1,080-1,300)	1,165 (1,087-1,786)	1,300 (1,145-1,533)	0,586
NOS (Median/Min- Max)	2,992 (2,729-4,015)	2,637 (1,732-2,887)	2,270 (2,125-2,992)	<b>0,013</b>
H2O2 (Median/Min- Max)	0,338 (0,326-0,395)	0,338 (0,326-0,692)	0,349 (0,319-0,653)	0,758
NAD/NADH (Median/Min- Max)	0,533 (0,476-0,606)	0,511 (0,358-0,557)	0,502 (0,428-0,640)	0,337
Nitrotirozin-3 (Median/Min- Max)	1,129 (0,864-2,235)	1,120 (0,856-1,321)	1,616 (1,537-3,124)	<b>0,020</b>
Ferritin (Median/Min- Max)	70,50 (50-142)	60(49-117)	51,50 (47-75)	0,173

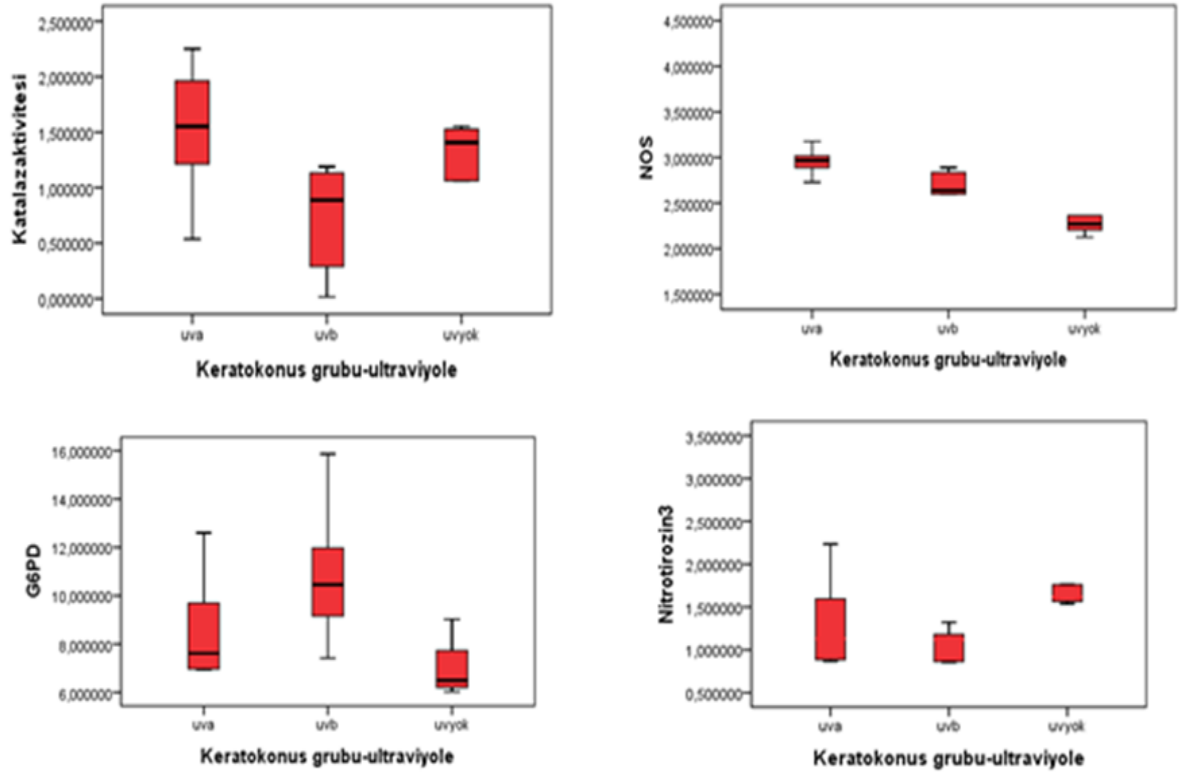
**Tablo3.4.** Keratokonus grubunda UV uygulamasına göre karşılaştırıldığında anlamlı çıkan analiz sonuçları

Analiz	UV-A	UV-B	p*	UV-YOK	p†	p‡
<b>Katalaz</b> (Median/Min-Max)	1,552 (0,536-2,251)	0,888 (0,016-1,190)	<b>0,026</b>	1,407 (0,104-1,552)	0,310	0,093
<b>G6PD</b> (Median/Min-Max)	7,618 (6,925-12,600)	10,455 (7,417-15,862)	0,180	6,501 (6,032-9,025)	0,132	<b>0,009</b>
<b>NOS</b> (Median/Min-Max)	2,992 (2,729-4,015)	2,637 (1,732-2,887)	<b>0,009</b>	2,270 (2,125-2,992)	<b>0,015</b>	0,310
<b>Nitrotirozin-3</b> (Median/Min-Max)	1,129 (0,864-2,235)	1,120 (0,856-1,321)	0,485	1,616 (1,537-3,124)	0,132	<b>0,002</b>

p\* : UV-A ve UV-B ikili grup karşılaştırması

p† : UV-A ve UV-YOK ikili grup karşılaştırması

p‡ : UV-B ve UV-YOK ikili grup karşılaştırması



**Şekil3.1.** Keratokeratosis grubunda UV uygulamasına göre Katalaz, NOS, G6PD ve Nitrotyrosin-3 seviyelerinin grafikleri

Kontrol grubu içinde UV uygulamasına göre yapılan karşılaştırmalar **Tablo3.5'**de görülmektedir. UV-A uygulanan, UV-B uygulanan ve UV uygulanmayan gruplar istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı fark bulunan analizler ve p değerleri sırasıyla; GPX (p=0.012), G6PD (p=0.016), MDA (p=0.039), NOS (p=0.042), H2O2 (p=0.046), Ferritin (p=0.031) olarak bulundu. Bu gruplar kendi içlerinde ikili olarak karşılaştırıldığı zaman anlamlı farklılık gösteren sonuçlar **Tablo3.6'**da gösterilmiştir.

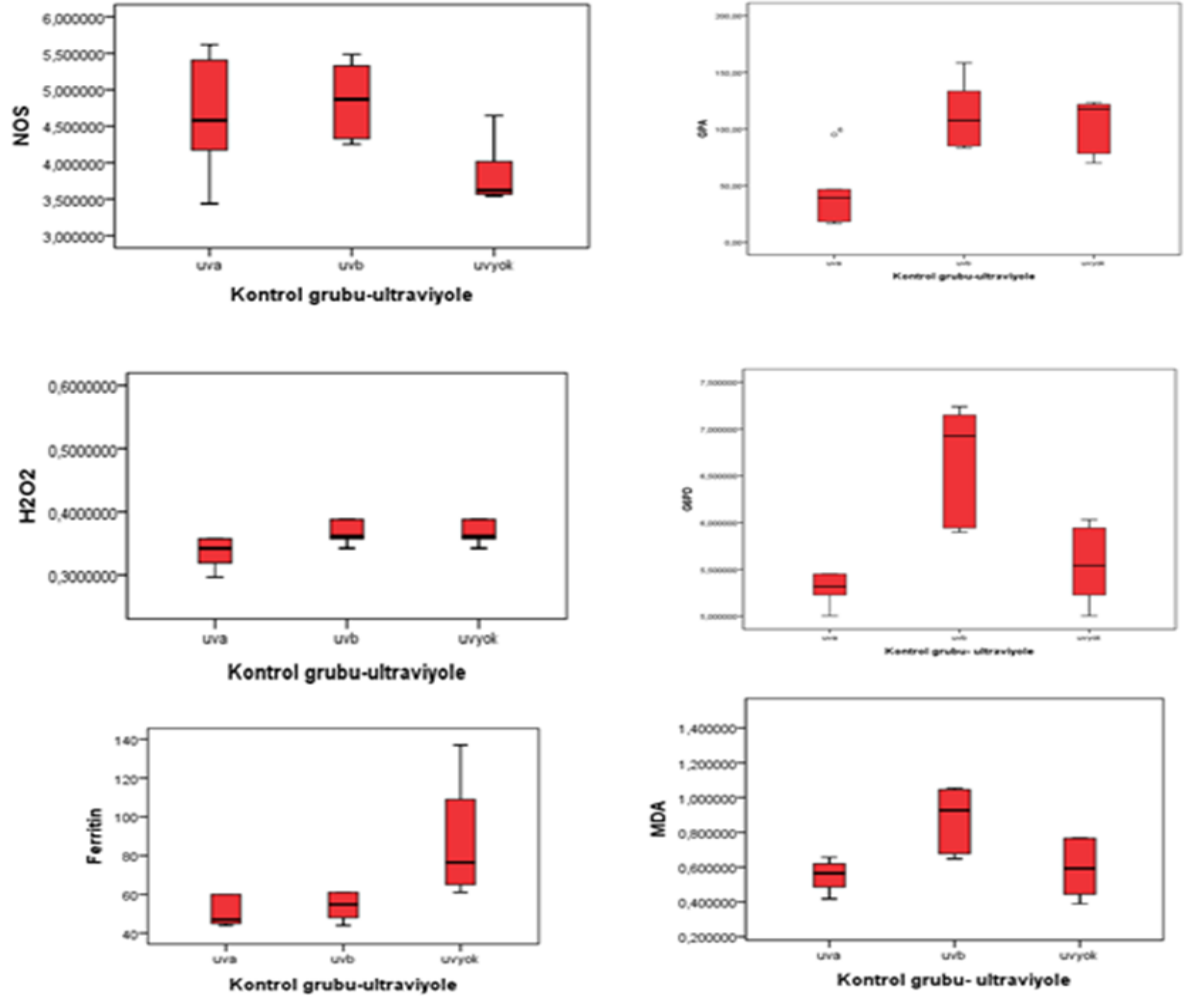
**Tablo3.5.** Kontrol grubunda UV uygulamasına göre yapılan karşılaştırmalar

Değişken	UVA	UVB	UVyok	p
GPA (Median/Min-Max)	39,16 (16,66-95)	107,49 (83,33-158,33)	117,5 (70-123,33)	0,012
GRA (Median/Min-Max)	2,46 (0,351-4,570)	1,406 (0,351-4,921)	1,582 (0,351-4,570)	0,63
SOD (Median/Min-Max)	81,25 (12,50-87,50)	43,75 (25-100)	43,75 (25-87,50)	0,819
ALDH (Median/Min-Max)	5,978 (4,656-7,089)	6,349 (5,185-7,460)	5,873 (5,185-6,560)	0,611
TAS (Median/Min-Max)	1,831 (1,723-1,885)	1,828 (1,731-1,912)	1,797 (1,725-1,886)	0,778
Katalaz (Median/Min-Max)	0,51 (0,104-1,117)	0,94 (0,305-1,921)	0,743 (0,538-1,455)	0,156
G6PD (Median/Min-Max)	5,384 (5,00-4,702)	6,925 (5,898-7,238)	5,54 (5,00-6,032)	0,016
NO (Median/Min-Max)	0,244 (0,127-0,265)	0,216 (0,101-0,402)	0,196 (0,118-0,242)	0,385
ÜrikAsit (Median/Min-Max)	0,369 (0,346-0,448)	0,385 (0,361-0,731)	0,476 (0,354-0,904)	0,298
MDA (Median/Min-Max)	0,564 (0,418-0,656)	0,926 (0,648-1,054)	0,592 (0,389-1,497)	0,039
AskorbikAsit (Median/Min-Max)	0,285 (0,272-0,294)	0,279 (0,264-0,294)	0,281 (0,272-0,290)	0,519
Glutasyon (Median/Min-Max)	1,165 (1,126-1,223)	1,165 (1,126-1,262)	1,135 (1,126-1,223)	0,448
NOS (Median/Min-Max)	4,58 (3,438-5,616)	4,868 (4,251-5,485)	3,622 (3,543-4,645)	0,042
H2O2 (Median/Min-Max)	0,342 (0,296-0,357)	0,361 (0,342-0,562)	0,361 (0,342-0,486)	0,046
NAD/NADH (Median/Min-Max)	0,656 (0,489-0,836)	0,72 (0,682-0,796)	0,768 (0,588-1,121)	0,291
Nitrotirozin-3 (Median/Min-Max)	0,928 (0,662-1,794)	1,094 (0,902-3,086)	1,086 (0,894-1,668)	0,342
Ferritin (Median/Min-Max)	47 (44-84)	54,8 (44-85)	76,5 (61-137)	0,031



**Tablo3.6.**Kontrol grubunda UV uygulamasına göre karşılaştırıldığında anlamlı çıkan analiz sonuçları

<b>Değişken</b>	<b>UVA</b>	<b>UVB</b>	<b>p*</b>	<b>Uvyok</b>	<b>p†</b>	<b>p‡</b>
<b>GPA</b> <b>(Median/Min-Max)</b>	39,16 (16,66-95)	107,49 (83,33-158,33)	0,015	117,5 (70-123,33)	0,009	0,394
<b>G6PD</b> <b>(Median/Min-Max)</b>	5,384 (5,00-4,702)	6,925 (5,898-7,238)	0,009	5,54 (5,00-6,032)	0,937	0,015
<b>MDA</b> <b>(Median/Min-Max)</b>	0,564 (0,418-0,656)	0,926 (0,648-1,054)	0,004	0,592 (0,389-1,497)	0,699	0,18
<b>NOS</b> <b>(Median/Min-Max)</b>	4,58 (3,438-5,616)	4,868 (4,251-5,485)	0,699	3,622 (3,543-4,645)	0,132	0,009
<b>H2O2</b> <b>(Median/Min-Max)</b>	0,342 (0,296-0,357)	0,361 (0,342-0,562)	0,041	0,361 (0,342-0,486)	0,041	0,937
<b>Ferritin</b> <b>(Median/Min-Max)</b>	47 (44-84)	54,8 (44-85)	0,485	76,5 (61-137)	0,026	0,026

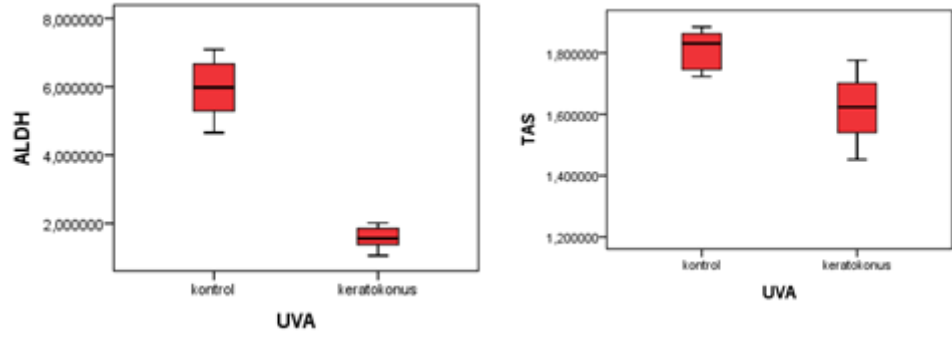


Şekil 3.2 Kontrol grubunda UV uygulama gruplarına göre anlamlı fark bulunan analizlerin grafikleri

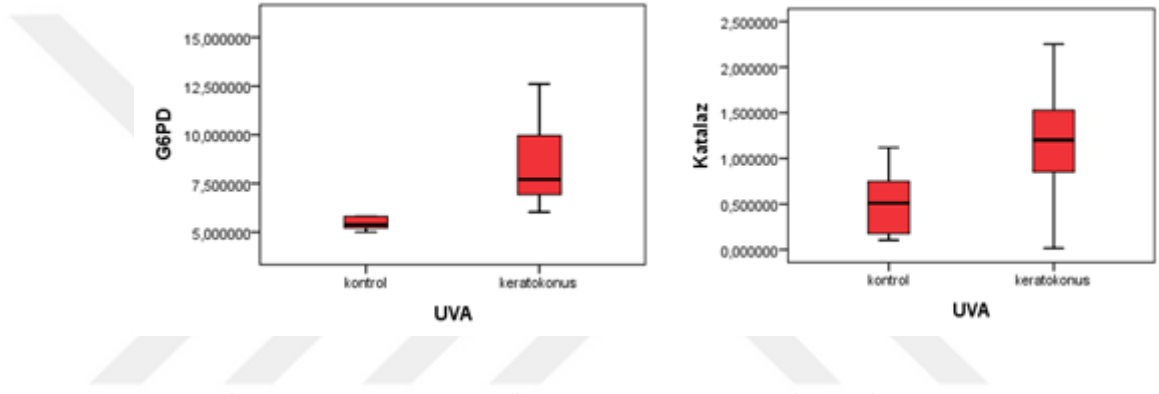
Örnekler her bir UV grubu içinde karşılaştırılarak da değerlendirildi. Bu karşılaştırmalar **Tablo3.7**'de verilmiştir. UV-A grubunda keratokonus ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan analizler şunlardır: ALDH(p=0.002), TAS (p=0.002), Katalaz (p=0.009), G6PD (p=0.002), NO (p=0.002), Ürik Asit (p=0.002), NOS (p=0.004). UV-B grubunda keratokonus ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan analizler şunlardır: ALDH (p=0.002), TAS (p=0.002), G6PD (p=0.002), NO (p=0.041), MDA (p=0.009), NOS (p=0.002), NAD/NADH (p=0.002). UV uygulanmayan gruptakeratokonus ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan analizler şunlardır: ALDH(p=0.002), TAS (p=0.026), G6PD (p=0.002), NO (p=0.002), NOS (p=0.002), NAD/NADH (p=0.004), Nitrotirozin-3 (p=0.026)

Değişken	UVA/KK	UVA/Kontrol	p	UVB/KK	UVB/Kontrol	p	UVyok/KK	UVyok/Kontrol	p
<b>GPA</b>	77,5	39,16	0,065	89,99	107,49	0,31	68,33	117,5	0,18
<b>Median/Min-Max</b>	(68,33-81,66)	(16,66-95)		(40-110)	(83,33-158,33)		(21,66-168,33)	(70-123,33)	
<b>GRA</b>	1,406	2,46	0,485	1,054	1,406	0,24	1,23	1,582	0,394
<b>Median/Min-Max</b>	(0,351-4,921)	(0,351-4,570)		(0,351-1,406)	(0,351-4,921)		(0,703-2,109)	(0,351-4,570)	
<b>SOD</b>	87,5	81,25	0,485	68,75	43,75	0,394	56,25	43,75	0,818
<b>Median/Min-Max</b>	(25-100)	(12,50-87,50)		(25-100)	(25-100)		(25-100)	(25-87,50)	
<b>ALDH</b>	1,587	5,978	<b>0,002</b>	1,746	6,349	<b>0,002</b>	1,56	5,873	<b>0,002</b>
<b>Median/Min-Max</b>	(1,216-1,851)	(4,656-7,089)		(1,375-2,804)	(5,185-7,460)		(1,058-1,904)	(5,185-6,560)	
<b>TAS</b>	1,653	1,831	<b>0,002</b>	1,553	1,828	<b>0,002</b>	1,693	1,797	<b>0,026</b>
<b>Median/Min-Max</b>	(1,280-1,717)	(1,723-1,885)		(1,452-1,655)	(1,731-1,912)		(1,475-1,776)	(1,725-1,886)	
<b>Katalaz</b>	1,552	0,51	<b>0,009</b>	0,888	0,94	0,589	1,407	0,743	0,24
<b>Median/Min-Max</b>	(0,536-2,251)	(0,104-1,117)		(0,016-1,190)	(0,305-1,921)		(0,104-1,552)	(0,538-1,455)	
<b>G6PD</b>	7,618	5,384	<b>0,002</b>	10,455	6,925	<b>0,002</b>	6,501	5,54	<b>0,002</b>
<b>Median/Min-Max</b>	(6,925-12,600)	(5,00-6,702)		(7,417-15,862)	(5,898-7,238)		(6,032-9,025)	(5,00-6,032)	
<b>NO</b>	0,302	0,244	<b>0,002</b>	0,35	0,216	0,041	0,306	0,196	<b>0,002</b>
<b>Median/Min-Max</b>	(0,277-0,360)	(0,127-0,265)		(0,234-0,432)	(0,101-0,402)		(0,243-0,337)	(0,118-0,242)	
<b>Ürik Asit</b>	0,798	0,369	<b>0,002</b>	0,574	0,385	0,394	0,393	0,476	0,589
<b>Median/Min-Max</b>	(0,479-1,140)	(0,346-0,448)		(0,377-1,093)	(0,361-0,731)		(0,354-1,038)	(0,354-0,904)	
<b>MDA</b>	0,453	0,564	0,31	0,47	0,926	<b>0,009</b>	0,715	0,592	0,958
<b>Median/Min-Max</b>	(0,355-0,757)	(0,418-0,656)		(0,359-0,719)	(0,648-1,054)		(0,368-1,364)	(0,389-1,497)	
<b>Askorbik Asit</b>	0,27	0,285	0,394	0,279	0,279	0,818	0,281	0,281	0,818
<b>Median/Min-Max</b>	(0,268-0,313)	(0,272-0,294)		(0,264-0,301)	(0,264-0,294)		(0,260-0,301)	(0,272-0,290)	
<b>Glutatyon</b>	1,252	1,165	0,394	1,165	1,165	0,818	1,3	1,135	0,026
<b>Median/Min-Max</b>	(1,080-1,300)	(1,126-1,223)		(1,087-1,786)	(1,126-1,262)		(1,145-1,533)	(1,126-1,223)	
<b>NOS</b>	2,992	4,58	<b>0,004</b>	2,637	4,868	<b>0,002</b>	2,27	3,622	<b>0,002</b>
<b>Median/Min-Max</b>	(2,729-4,015)	(3,438-5,616)		(1,732-2,887)	(4,251-5,485)		(2,125-2,992)	(3,543-4,645)	
<b>H2O2</b>	0,338	0,342	0,589	0,338	0,361	0,24	0,349	0,361	0,485
<b>Median/Min-Max</b>	(0,326-0,395)	(0,296-0,357)		(0,326-0,692)	(0,342-0,562)		(0,319-0,653)	(0,342-0,486)	
<b>NAD/NADH</b>	0,533	0,656	0,093	0,511	0,72	<b>0,002</b>	0,502	0,768	<b>0,004</b>
<b>Median/Min-Max</b>	(0,476-0,606)	(0,489-0,836)		(0,358-0,557)	(0,682-0,796)		(0,428-0,640)	(0,588-1,121)	
<b>Nitrotirozin-3</b>	1,129	0,928	0,589	1,12	1,094	0,485	1,616	1,086	0,026
<b>Median/Min-Max</b>	(0,864-2,235)	(0,662-1,794)		(0,856-1,321)	(0,902-3,086)		(1,537-3,124)	(0,894-1,668)	
<b>Ferritin</b>	70,5	47	0,065	60	54,8	0,394	51,5	76,5	0,065
<b>Median/Min-Max</b>	(50-142)	(44-84)		(49-117)	(44-85)		(47-75)	(61-137)	

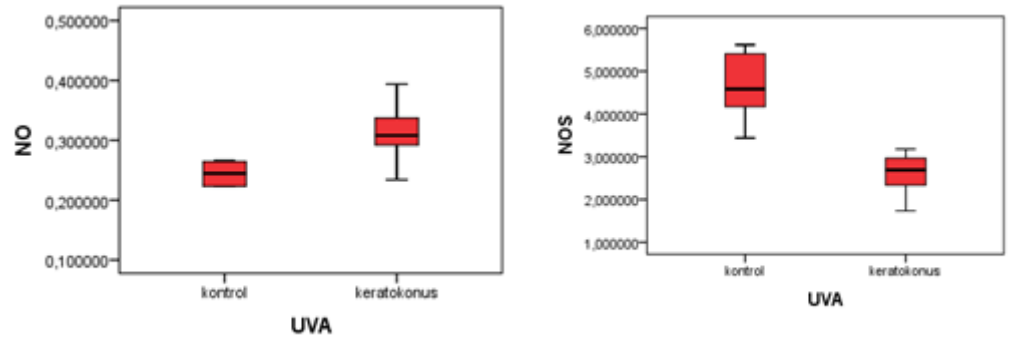
**Tablo3.7.** Keratokonus ve kontrol gruplarının herbir UV grubu içinde karşılaştırmaları



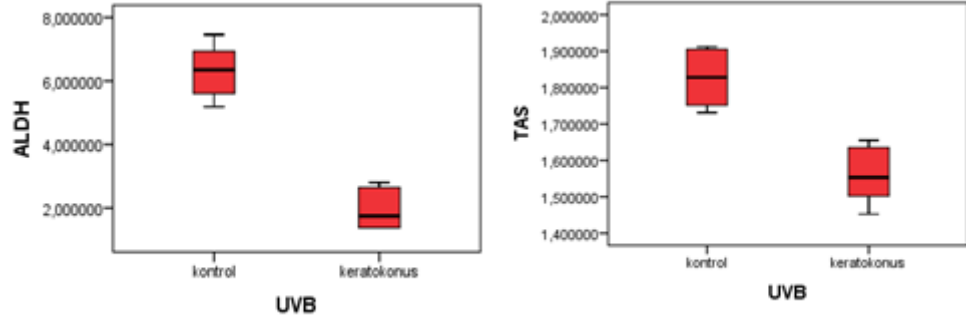
Şekil3.3. UV-A uygulanan grupta ALDH ve TAS seviyelerinin grafiği



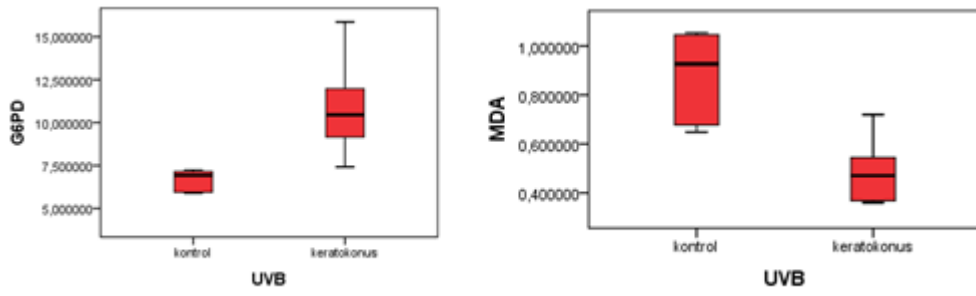
Şekil3.4. UV-A uygulanan grupta G6PD ve Katalaz seviyeleri



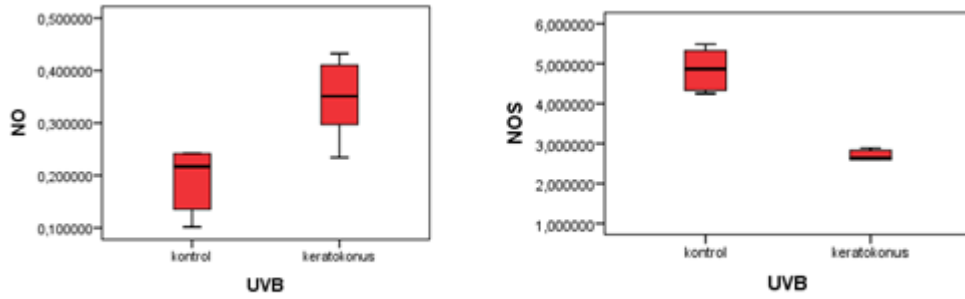
Şekil3.5. UV-A uygulanan grupta NO ve NOS seviyeleri



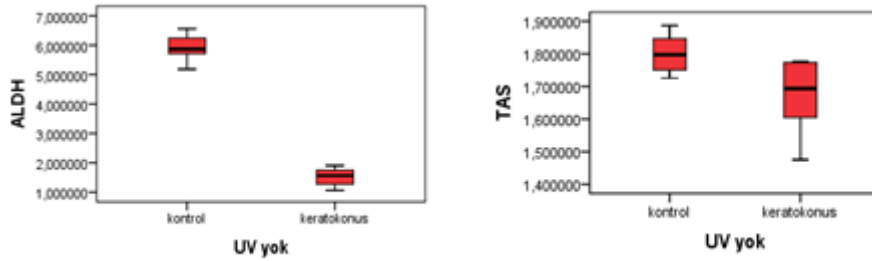
Şekil 3.6 UV-B uygulanan grupta ALDH ve TAS seviyeleri



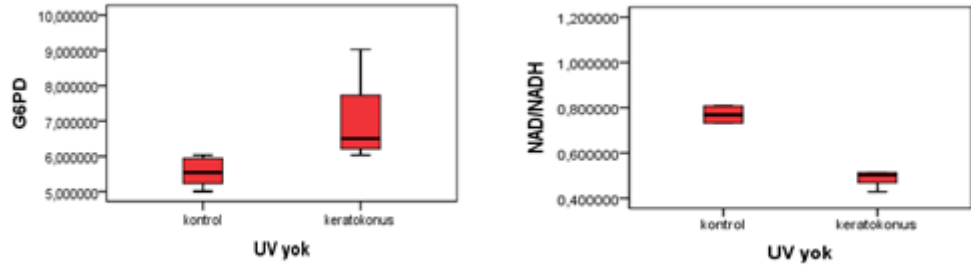
Şekil 3.7 UV-B uygulanan grupta G6PD ve MDA seviyeleri



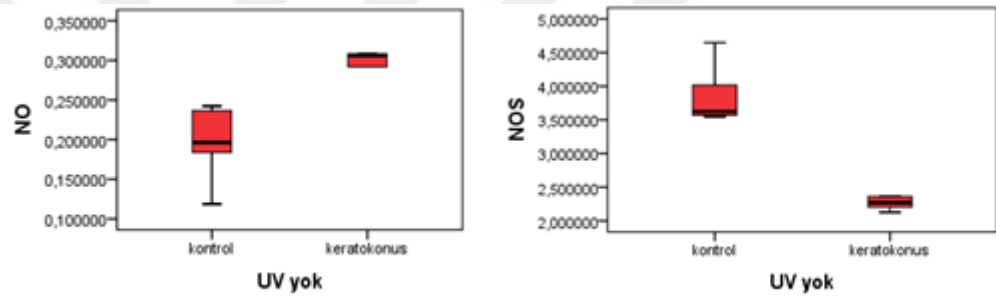
Şekil3.8. UV-B uygulanan grupta NO ve NOS seviyeleri



Şekil3.9. UV uygulanmayan grupta ALDH ve TAS seviyeleri



Şekil3.10. UV uygulanmayan grupta G6PD ve TAS seviyel



Şekil3.11. UV uygulanmayan grupta NO ve NOS seviyeleri

### 3.2 Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

Gerçek zamanlı PCR ile antioksidan enzimlerin mRNA ifade miktarındaki değişimleri incelenmiştir. Keratokonus ve kontrol gruplarında incelenen enzimlerin relatif ekspresyon değerleri **Tablo3.8**'da karşılaştırılmıştır. Keratokonus ve kontrol gruplarında antioksidan enzim ekspresyonları yönünden anlamlı fark bulunmamıştır.

**Tablo3.8.** Enzim ekspresyonlarındaki değişimler

Analiz	KK /UVA	Kontrol/ UVA	Kontrol/ UVB	KK UVB	KK	Kontrol	p*
<b>ALDH</b> (Median/Min- Max)	0,058 (0,00- 0,12)	0,078 (0,03- 0,18)	0,052 (0,00- 0,20)	0,037 (0,00- 0,08)	0,093 (0,04-0,12)	0,027 (0,00- 0,10)	0,010
<b>GPX</b> (Median/Min- Max)	0,074 (0,04-0,22)	0,066 (0,03- 0,12)	0,106 (0,01- 0,30)	0,033 (00-0,09)	0,106 (0,05- 0,16)	0,056 (0,00- 0,14)	0,015
<b>SOD1</b> (Median/Min- Max)	0,036 (00-0,10)	0,36 (0,03- 0,06)	0,050 (0,01- 0,14)	0,023 (00-0,13)	0,052 (0,04- 0,12)	0,037 (00-0,08)	0,127

\*Kruskal-Wallis test

**Tablo 3.9.**Gruplardaki enzim ekspresyonlarının ikili grup karşılaştırılması

Gruplar	P (ALDHmRNA)	P (GPmRNA)	P (SOD1mRNA)	P (SOD3mRNA)
<b>KK UVA / Kontrol UVA</b>	0,190	0,456	0,882	0,230
<b>KK UVB/ Kontrol UVB</b>	0,280	<b>0,049</b>	0,247	0,684
<b>KK/ Kontrol</b>	<b>0,03</b>	<b>0,034</b>	0,123	0,739
<b>KKUVA/ KKUVB</b>	0,918	0,705	0,654	0,123
<b>KKUVA/KK</b>	0,251	0,314	0,132	1,00
<b>KKUVB/KK</b>	0,165	1,00	0,579	0,143
<b>Kontrol UVA/ KontrolUVB</b>	<b>0,043</b>	<b>0,022</b>	0,095	0,842
<b>Kontrol UVA/ Kontrol</b>	<b>0,018</b>	0,549	0,604	0,400
<b>Kontrol UVB / Kontrol</b>	0,315	0,529	0,739	0,436

ALDH, GPX, SODI lokusları için gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre mRNA arasında ( $p > 0,05$ ) arasında anlamlı fark bulunmadı. ALDH lokusu için UVA grubu nispi değerler bakımından kontrol grubundan ( $p < 0,05$ ) farklıdır. Ancak, UVB ve kontrol grubu arasında ( $p > 0,05$ ) arasında anlamlı bir fark yoktur. GPX lokusu için UVA grubu nispi değerler bakımından kontrol grubundan ( $p < 0,05$ ) farklıdır. Ancak, UVB ve kontrol grubu arasında ( $p > 0,05$ ) anlamlı bir fark yoktur. GSR lokusu için tüm gruplarda ( $p > 0,05$ ) anlamlı bir fark yoktur. SODI lokusu için UVA grubu nispi değerler bakımından kontrol grubundan ( $p < 0,05$ ) farklıdır. Ancak, UVB ve kontrol grubu arasında ( $p > 0,05$ ) arasında anlamlı bir fark yoktur. SODIII lokusu için mRNA ekspresyonu, gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre dört grupta hemen hemen eşitti. Bu grupların ( $p > 0,05$ ) arasında anlamlı fark bulunmadı. ekspresyonu genel itibari ile azalma gösterdi ancak GSR ve SODIII lokusları açısından gruplar

**Sonuç:** Antioksidan enzimlerden Süperoksit Dismutaz, Glutatyon Peroksidaz ve Glutatyon Redüktaz enzimlerinin miktar değerlendirilmesi yapıldı. Altı lokusta Real-Time PCR analizi 8 örnek için yapıldı, sonraki dönemde bu sayı 20'ye tamamlanmıştır. Çalışmada sadece UV uygulanan keratokonuslu ve kontrol grubu hücreleri ile çalışılmış olup bir sonraki dönem için UV uygulanmayan grup ile birlikte karşılaştırılması yapılmıştır. Diğer antioksidan enzimler olan Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD), Catalase (CAT), Aldehit Dehydrogenaz (ALDH) enzimlerinin aktiviteleri sonraki dönemde incelenmiştir. Malzemelerin temininde firmalardan kaynaklanan gecikmeler nedeni ile Nitrik Oksit Sintaz (NOS) ve Nitrik Oksit (NO) miktarları; lipid peroksidasyonu ve protein nitrasyonu son ürünleri olan MDA ve Nitrotirozin miktarları sonraki dönemde incelenmeye alınmıştır. Ayrıca DNA tamir mekanizmasında etkili olan proteinlerin miktarı ve genomik DNA kırıkları incelemesi yapılacak, toplam ROS miktarı ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ) ve enzim olmayıp doğrudan UV ışınlarını soğuran ve indirgeyici Glutatyon (GSH), Askorbic Asit (C vitamini), alfa-Tokoferol (E Vitamini), NADPH, ve Ferritin moleküllerin miktar incelenmesi işlemleri de UV uygulanmayan ve UV ışınına maruz bırakılan keratokonuslu ve kontrol grubundan örnek alınarak bir sonraki dönemde gerçekleştirilmiştir.



### 3.3 UV Absorbans Ölçümü Sonuçları

UV uygulanan ve uygulanmayan keratokonuslu ve normal örneklerde UV absorbans ölçüm sonuçları **Tablo 3.9**'de verilmiştir. Keratokonus ve kontrol gruplarında UV uygulamasına göre ikili karşılaştırmalar **Tablo 3.10**'te gösterilmiştir. Keratokonus grubunda her 3 UV uygulaması arasında da anlamlı fark vardır: UV-A/UV-B (p=0.04), UV-A/UV-YOK (p=0.04), UV-B/UV-YOK (p=0.04). Yine kontrol grubunda da her 3 UV uygulaması arasında anlamlı fark çıkmıştır: UV-A/UV-B (p=0.04), UV-A/UV-YOK (p=0.04), UV-B/UV-YOK (p=0.04).

Her bir UV uygulama grubu kendi içinde keratokonus ve kontrol olarak karşılaştırıldığı zaman yine 3 grup arasında da anlamlı fark çıkmıştır. Bu sonuçlar da **Şekil 3.12**'de verilmiştir.

**Tablo 3.10.** Keratokonus ve Kontrol grubunda UV absorbans değerleri

	UV-A	UV-B	UV-YOK	P
Keratokonus (Median/Min- Max)	0,459 (0,457-0,468)	0,532 (0,513-0,542)	0,560 (0,550-0,569)	0,001
Kontrol (Median/Min- Max)	0,663 (0,659-0,670)	0,518 (0,510-0,523)	0,618 (0,612-0,623)	0,001

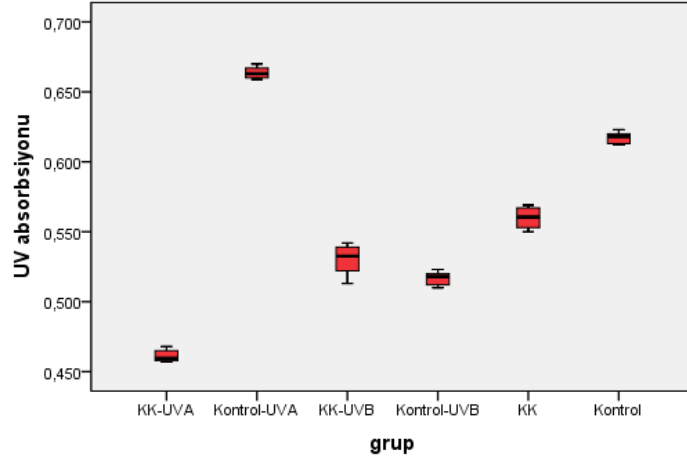
**Tablo 3.11.** Keratokonus ve kontrol gruplarında UV absorbans değerlerinin ikili karşılaştırmaları

	UV-A	UV-B	p*	UV-YOK	p†	p‡
Keratokonus (Median/Min-Max)	0,459 (0,457-0,468)	0,532 (0,513- 0,542)	0,004	0,560 (0,550-0,569)	0,004	0,004
Kontrol (Median/Min-Max)	0,663 (0,659-0,670)	0,518 (0,510- 0,523)	0,004	0,618 (0,612-0,623)	0,004	0,004

\* UV-A / UV-B ikili grup karşılaştırması

† UV-A / UV-YOK ikili grup karşılaştırması

‡ UV-B / UV-YOK ikili grup karşılaştırması



**Şekil 3.12.** Keratokonus ve kontrol gruplarında UV absorbans değerlerinin karşılaştırılması

### 3.4 DNA Hasarı Ölçümü

Keratokonus ve kontrol gruplarında UV uygulamasına göre DNA hasarı miktarlarının karşılaştırması **Tablo 3.11**'te verilmiştir. Gruplar arasında DNA hasarı yönünden anlamlı fark bulunmamıştır. Keratokonus ve kontrol gruplarında UV uygulamasına göre ikili karşılaştırmalar **Tablo 3.12**'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.12.** Keratokonus ve kontrol gruplarında DNA hasarının karşılaştırılması

	UV-A	UV-B	UV-YOK	p
Keratokonus (Median/Min- Max)	7,20 (5,50-9,60)	8,65 (4,40-9,70)	7,50 (4,90-8,80)	0,692
Kontrol (Median/Min- Max)	6,60 (4,60-8,80)	6,85 (5,40-9,00)	7,10 (4,80-9,80)	0,750

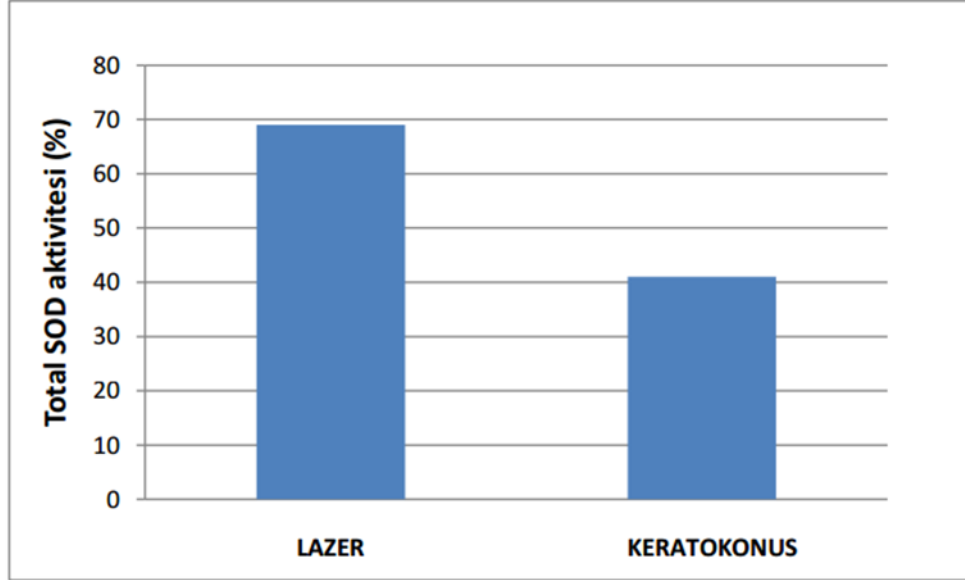
**Tablo 3.13.** Keratokonus ve kontrol gruplarında DNA hasarının ikili karşılaştırmaları

	Keratokonus	Kontrol	p*
UV-A	7,20	6,65	0,310

(Median/Min- Max)	(5,50-9,60)	(4,60-8,80)	
UV-B (Median/Min- Max)	8,65 (4,40-9,70)	6,85 (5,40-9,00)	0,310
UV-YOK (Median/Min- Max)	7,50 (4,90-8,80)	7,10 (4,80-8,80)	0,937

### 3.5 Antioksidan Ölçüm Sonuçları

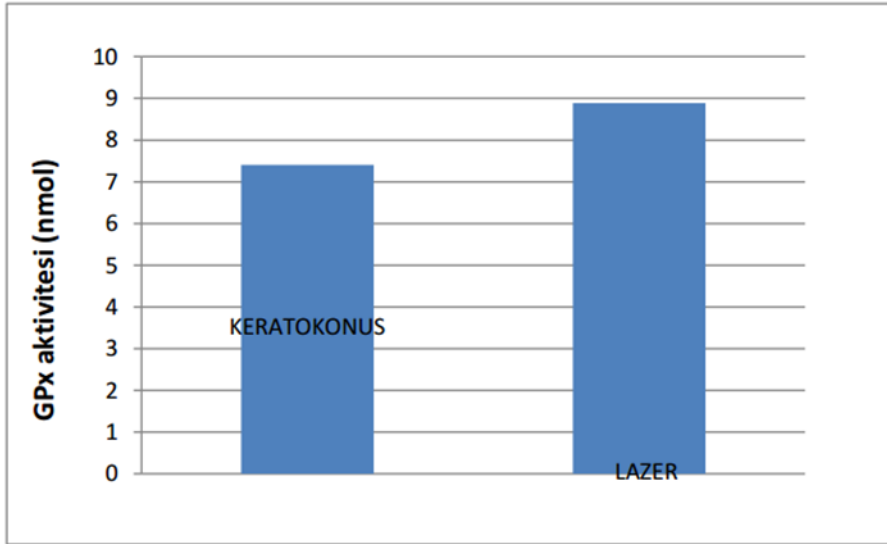
#### 3.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçüm sonuçları



Şekil 3.13. Normal ve keratokonuslu hasta gruplarında ölçülen total SOD aktivitesi

ELISA okuyucu ile yapılan ölçüm sonuçlarına göre, keratokonuslu olmayan örneklerde toplam SOD aktivitesi %67 iken, keratokonuslu hastalarla yapılan ölçüm sonuçlarında toplam SOD aktivitesi %41 olarak gözlemlendi.

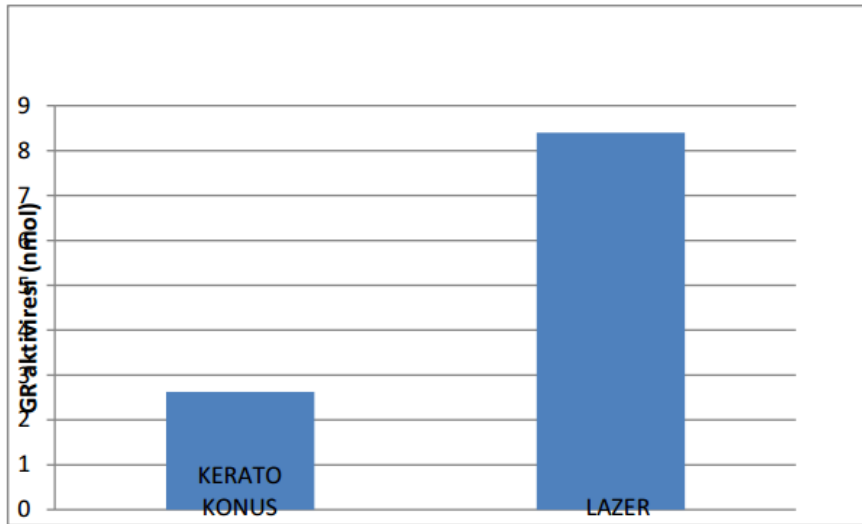
#### 3.5.2. Glutatyon peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları



**Şekil 3.14.** Keratokoniuslu ve normal kornea epitel hücrelerinde ölçülen glutatyon peroksidaz antioksidan enzim aktivitesinin belirlenmesi

Ölçüm sonuçlarına göre, keratokoniuslu hücre lizatlarından 25°C’de 5 dakika süresince ölçülen glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi 7,4 nmol; kontrol epitel hücrelerinden 25°C’de 5 dakikada ölçülen değer 8,8 nmol olarak hesaplandı.

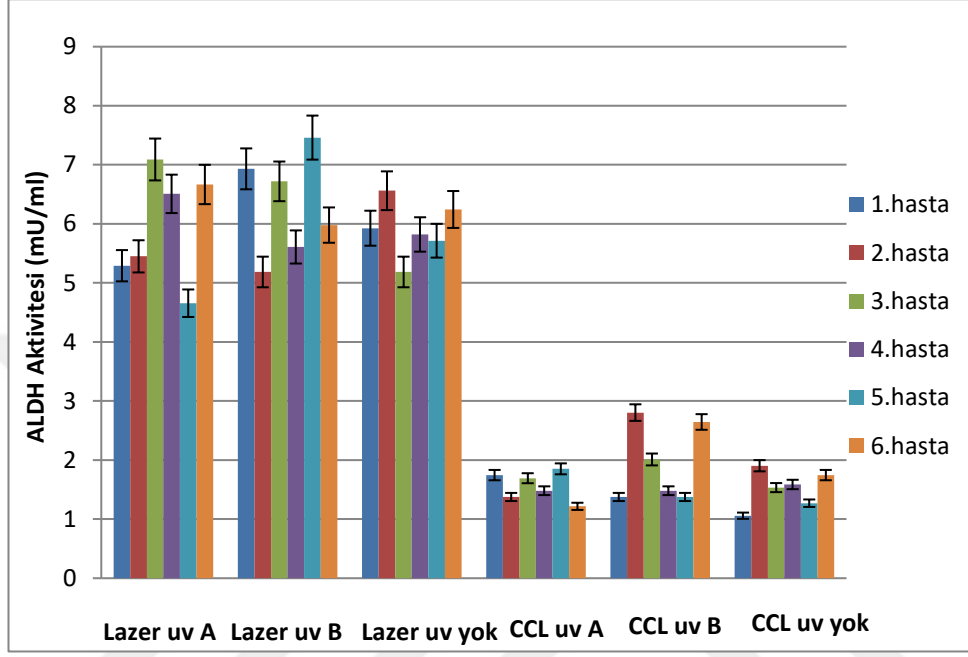
### 3.5.3. Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Ölçülmesi



**Şekil 3.15.** Keratokoniuslu ve normal kornea epitel hücrelerinde ölçülen glutatyon redüktaz antioksidan enzim aktivitesinin belirlenmesi

Yapılan ölçüm sonuçlarına göre, keratokonuslu hücre lizatlarından 25°C’de 10 dakika süresince ölçülen glutatyon redüktaz enzim aktivitesi 2,6 nmol; normal kornea epitel hücrelerinden 25°C’de 10 dakikada ölçülen değer 8,4 nmol olarak kaydedildi.

### 3.5.4. Aldehit Dehidrojenaz Aktivitesinin Ölçülmesi



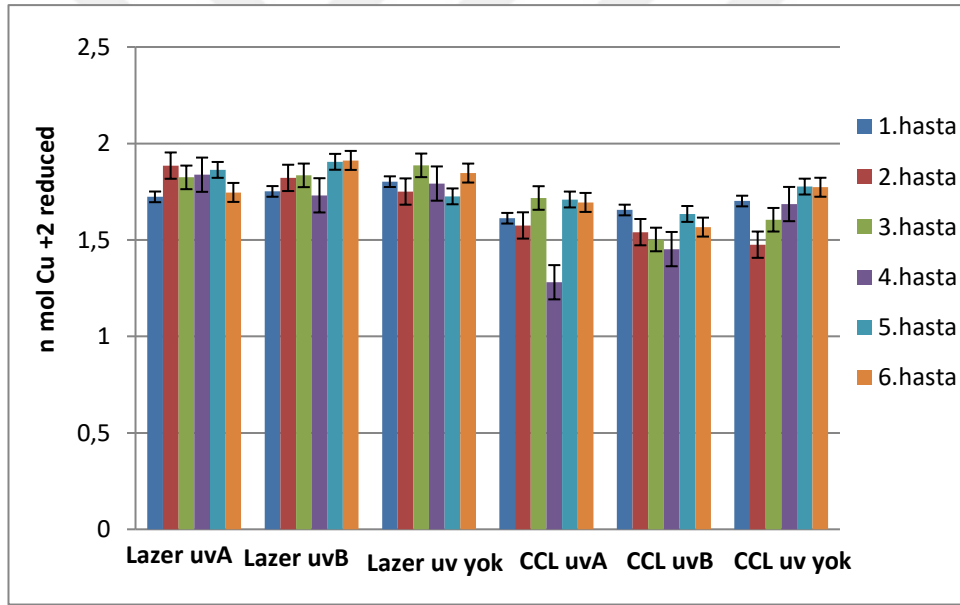
Şekil3.16. Kontrol Grubu ve Keratokonus Hastalarında Ölçülen ALDH Miktarları

ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde Aldehid Dehidrojenaz aktivitesi mililitrede **ortalama**6,0  $\mu$ U, uvB uygulanan kontrol grubunda 6,3  $\mu$ U, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 5,9  $\mu$ U olarak ölçülmüştür. Diğer yandan keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Aldehid Dehidrojenaz aktivitesi 1.6  $\mu$ U, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 1.9  $\mu$ U, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 1.5  $\mu$ U olarak ölçülmüştür.

Bu değerlendirmeden çıkan sonuçlara göre, kontrol grubu hücrelerinde ölçülen ALDH miktarının, keratokonus hastalarında ölçülen ALDH miktarından yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir.

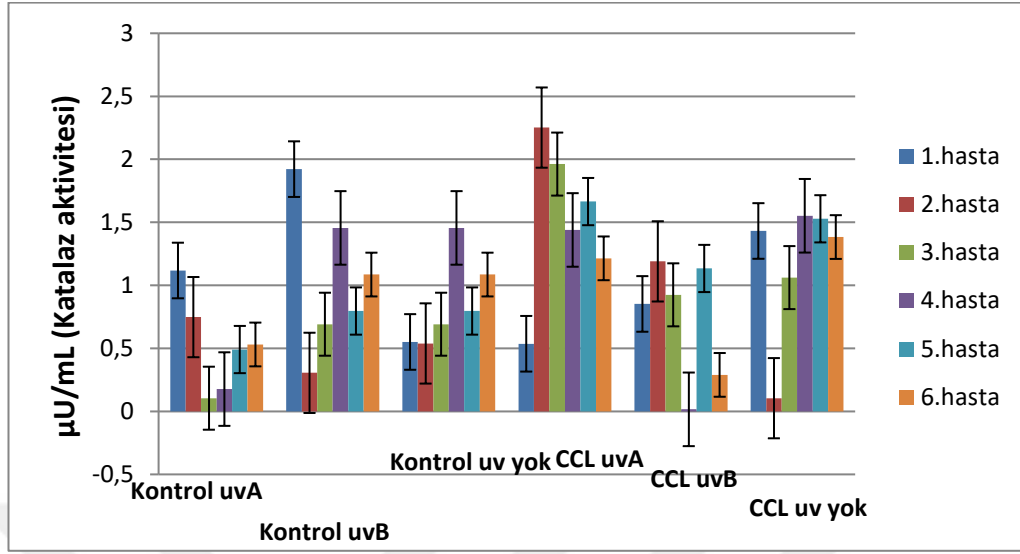
### 3.5.5.Total Antioksidan Seviyesinin Ölçümü

ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına bakıldığında, Total Antioksidan Aktivitesi indirgenmiş  $\text{Cu}^{+2}$  (nmol) baz alınarak değerlendirilmiştir. Buna göre uVA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde indirgenmiş  $\text{Cu}^{+2}$  oranı 1.81 nmol, uVB uygulanan kontrol grubunda 1.83 nmol, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 1.80 nmol olarak ölçülmüştür. Diğer yandan keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Aldehid Dehidrojenaz aktivitesi 1.60 nmol, uVB uygulanan keratokonuslu grupta 1.56 nmol, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 1.67 nmol olarak ölçülmüştür. Total antioksidan seviyesinin her iki gruptaki değerlendirmesine bakıldığında kontrol grubu ve keratokonus grubu hücrelerinde çıkan sonuçların birbirlerine yakın değerler olduğu görülmüştür



Şekil3.17.Kontrol ve Keratokonus Hücrelerinde Total Antioksidan Kapasitesi miktarı

### 3.5.6.Katalaz Aktivitesinin Ölçüm sonuçları

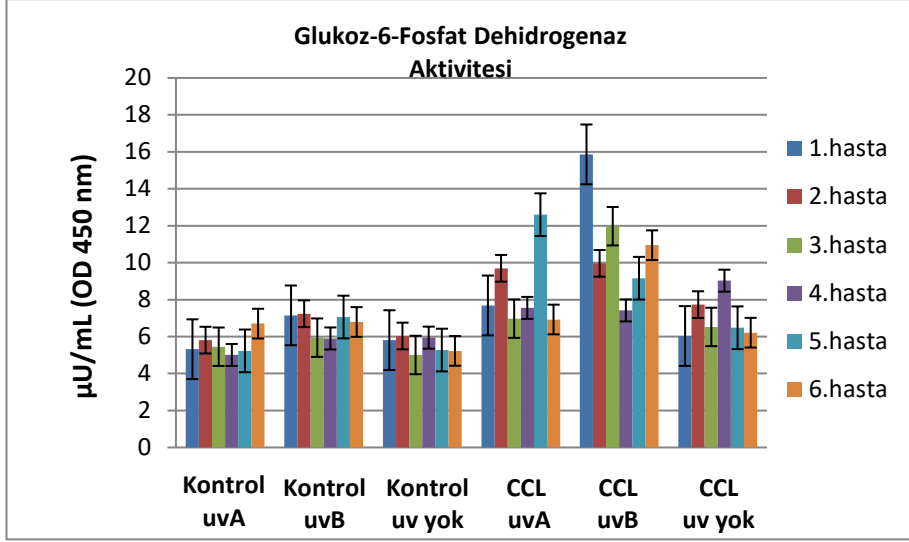


Şekil3.18.Kontrol ve Keratokonus Hücrelerinde Katalaz Aktivitesinin miktarları

kontrol grubu hücrelerinde Katalaz aktivitesi mililitrede **ortalama**0.79  $\mu$ U, uvB ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış uygulanan kontrol grubunda 1.56  $\mu$ U, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 2.52  $\mu$ U olarak ölçülmüştür. Diğer yandan keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Aldehid Dehidrojenaz aktivitesi 3.47  $\mu$ U, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 1.10  $\mu$ U, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 1.77  $\mu$ U olarak ölçülmüştür.

### 3.5.7.Glukoz-6 fosfat dehidrojenaz aktivitesinin ölçüm Sonuçları

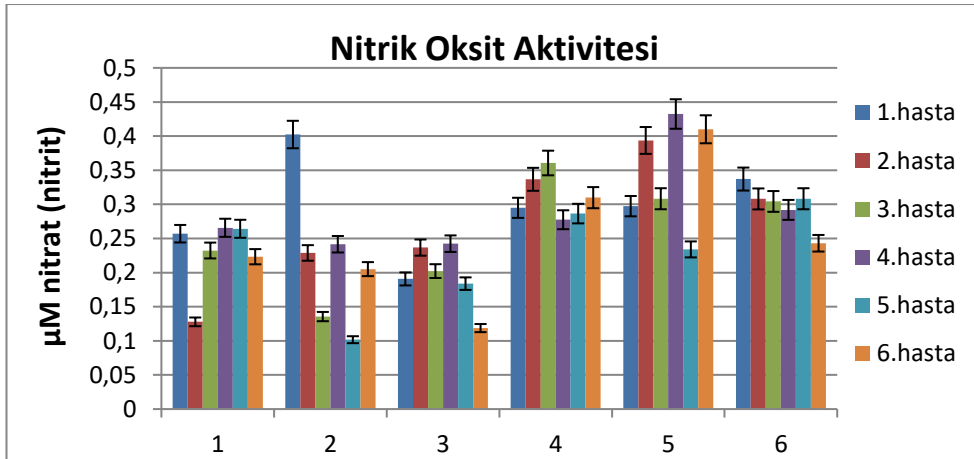
ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde Glukoz-6 fosfat dehidrojenaz aktivitesi mililitrede **ortalama**5.59  $\mu$ U, uvB uygulanan kontrol grubunda 6.68  $\mu$ U, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 5.55  $\mu$ U olarak ölçülmüştür. Diğer yandan keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Aldehid Dehidrojenaz aktivitesi 8.58  $\mu$ U, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 10.89  $\mu$ U, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 7.01  $\mu$ U olarak ölçülmüştür.



Şekil3.19.Kontrol ve Keratokonus Grubu Hastalarında Glukoz-6 Fosfat Dehidrojenaz Aktivitesinin miktarları

### 3.5.8 Nitrik Oksit Seviyesinin Ölçülmesi

ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde Nitrik Oksit aktivitesi **ortalama**0,23 µM, uvB uygulanan kontrol grubunda 0.22 µM, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 0.19 µM olarak ölçülmüştür. Keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Nitrik Oksit aktivitesi 0.31 µM, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 3.46 µM, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 0.29µM olarak ölçülmüştür.

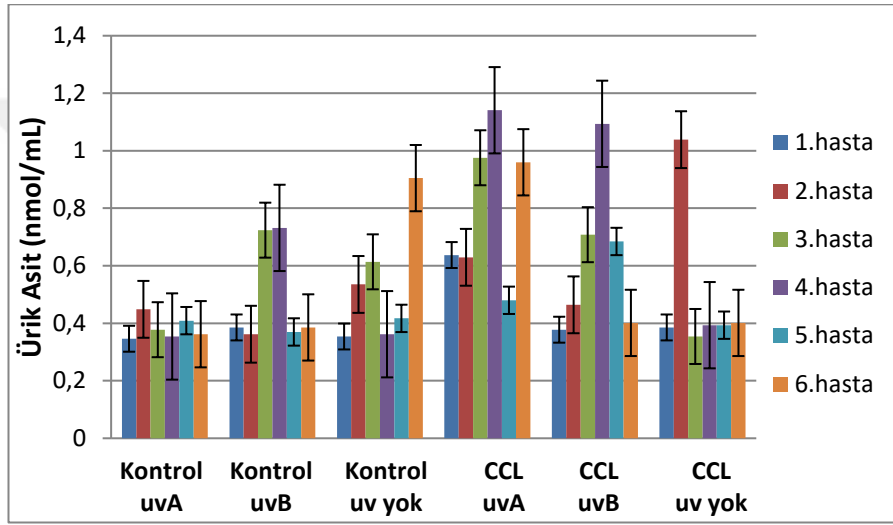


Şekil3.20.Kontrol ve Keratokonus Grubu Hastalarında Nitrik Oksit Aktivitesini miktarları



### 3.5.9. Ürik Asit Miktarının Ölçülmesi

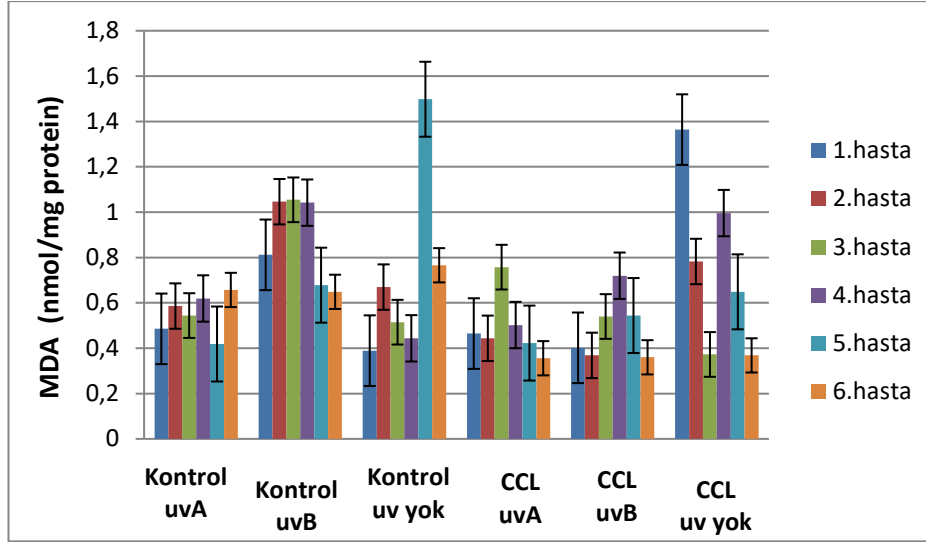
ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde Ürik asit miktarı mililitrede **ortalama**0.38 nmol, uvB uygulanan kontrol grubunda 0.49 nmol, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 0.53 nmol olarak ölçülmüştür. Diğer yandan uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama 0.80 nmol, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 0.62 nmol, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 0.49 nmol ürik asit ölçülmüştür.



Şekil3.21.Kontrol ve Keratokonus Hücrelerinde Ürik Asit Miktarları

### 3.5.10 Lipit Peroksidasyon (MDA) Seviyesinin Ölçülmesi

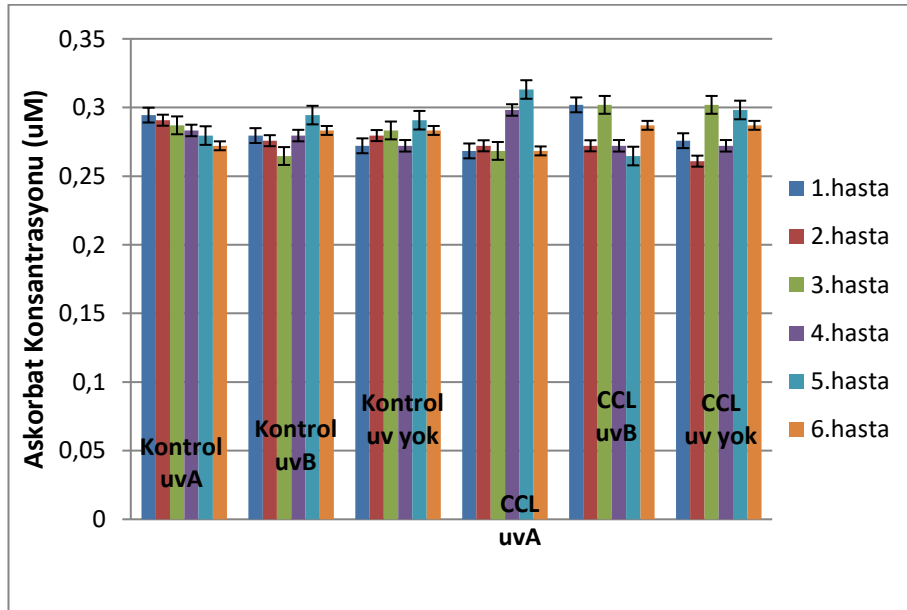
ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde Malondialdehit (MDA) miktarı 1 mg proteinde **ortalama**0.55 nmol MDA, uvB uygulanan kontrol grubunda 0.88 nmol, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 0.71 nmol olarak ölçülmüştür. Diğer yandan uvA uygulanan keratokonuslu grupta 1 mg proteinde ortalama 0.49 nmol MDA, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 0.48 nmol, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 0.76 nmol MDA olarak ölçülmüştür



Şekil3.22.Kontrol ve Keratokonus Hastalarında MDA Miktarları

### 3.5.11 Askorbik Asit Miktarının Ölçülmesi

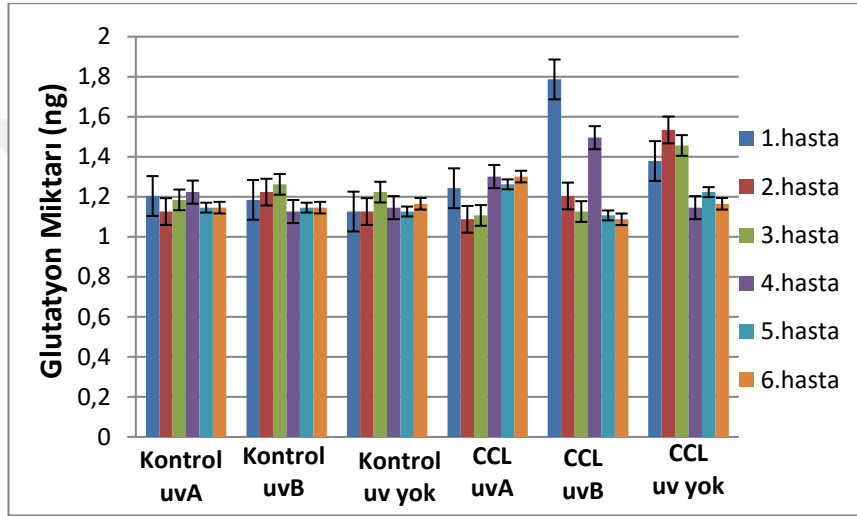
ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde Askorbat konsantrasyonu **ortalama** 0,285  $\mu\text{M}$ , uvB uygulanan kontrol grubunda 0.279  $\mu\text{M}$ , uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 0.280  $\mu\text{M}$  olarak ölçülmüştür. Keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Askorbat 0.281  $\mu\text{M}$ , uvB uygulanan keratokonuslu grupta 0.283  $\mu\text{M}$ , uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 0.282  $\mu\text{M}$  olarak ölçülmüştür.



Şekil3.23.Kontrol ve Keratokonus Hücrelerinde Askorbat Konsantrasyonları

### 3.5.12 Glutasyon Seviyesinin Ölçülmesi

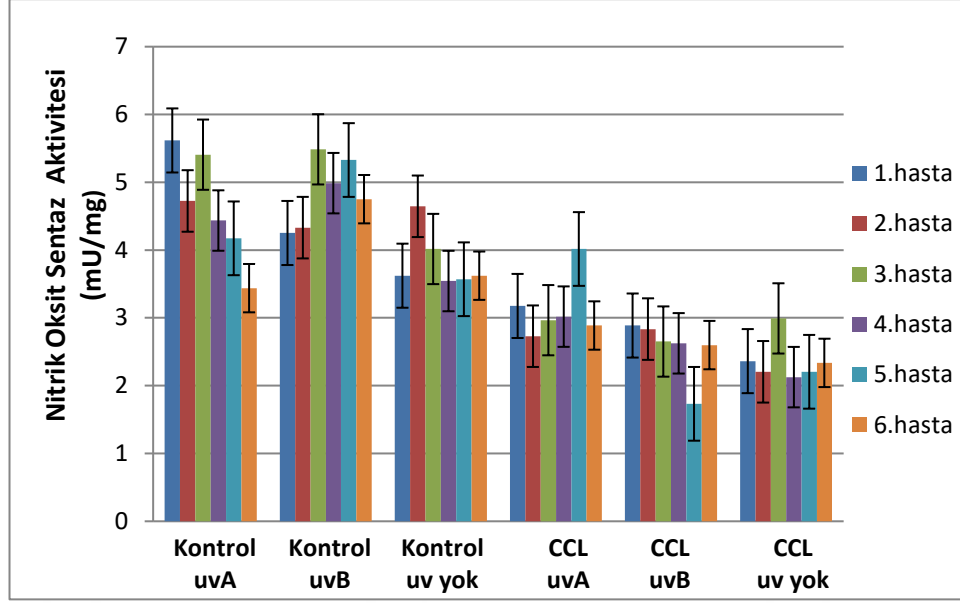
ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde Glutasyon konsantrasyonu **ortalama**1.172 ng, uvB uygulanan kontrol grubunda 1.181 ng, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 1.152 ng olarak ölçülmüştür. Keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Glutasyon 1.217 ng, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 1.301 ng, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 1.317 ng olarak ölçülmüştür.



Şekil3.24.Kontrol ve Keratokonus Grubu Hücrelerinde Glutasyon Seviyesi

### 3.5.13 Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Aktivitesinin Ölçülmesi

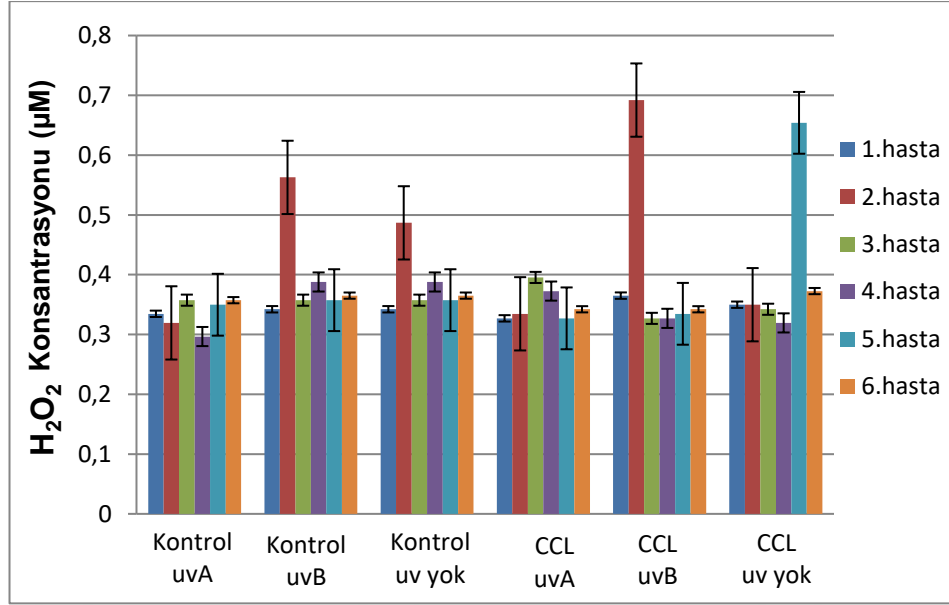
ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde Nitrit Oksit Sentaz konsantrasyonu **ortalama**4.63 mU/mg, uvB uygulanan kontrol grubunda 4.86 mU/mg, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 3.84 mU/mg olarak ölçülmüştür. Keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Nitrit Oksit Sentaz 3.13 mU/mg, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 2.55 mU/mg, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 2.37 mU/mg olarak ölçülmüştür.



**Şekil3.25.**Kontrol ve Keratokonus Grubu Hücrelerinde Nitrik Oksit Sentaz Aktiviteleri

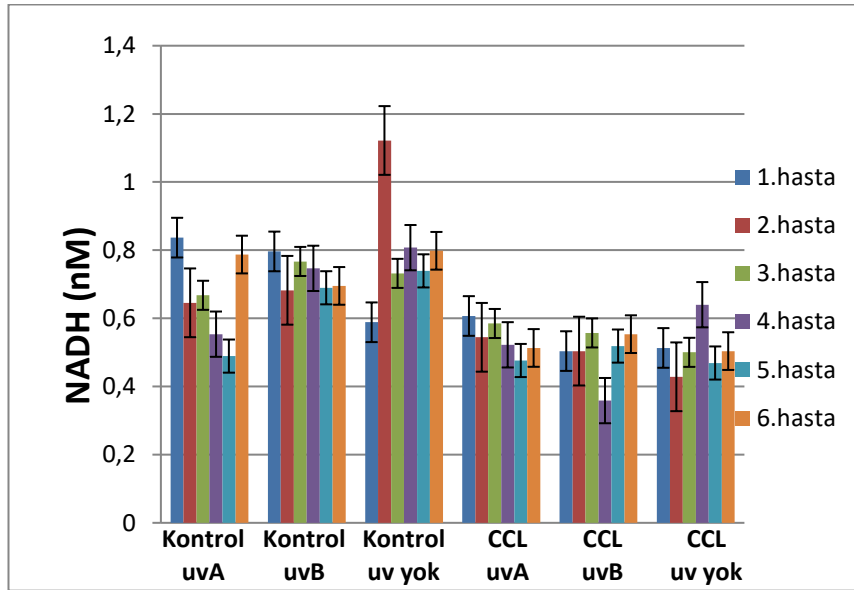
### 3.5.14 Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Miktarının Ölçülmesi

okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu **ortalama** 0,34 µM, uvB uygulanan kontrol grubunda 0.39 µM, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 0.38 µM olarak ölçülmüştür. Keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.35 µM, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 0.40 µM, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 0.38 µM olarak ölçülmüştür.



**Şekil3.26.**Kontrol ve Keratokonus Grubu Hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Miktarları **3.5.15**

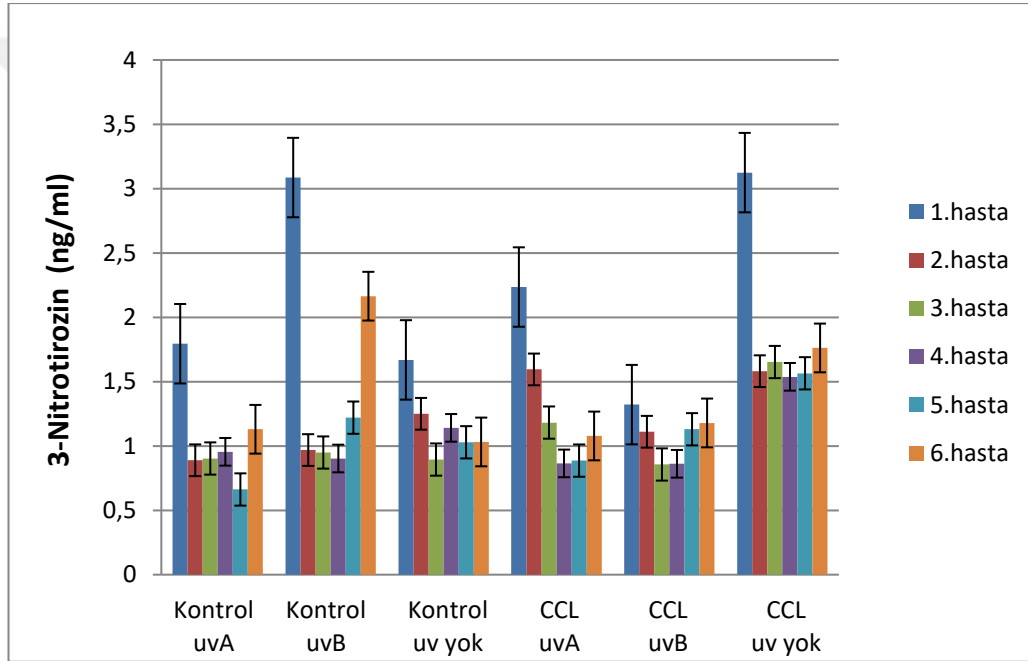
**NAD/NADH Miktarının Ölçülmesi**ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde NADH konsantrasyonu **ortalama**0,66 µM, uvB uygulanan kontrol grubunda 0.73 µM, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 0.79 µM olarak ölçülmüştür. Keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama NADH miktarı0.54 µM, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 0.49 µM, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 0.51 µM olarak ölçülmüştür.



**Şekil3.27.**Kontrol ve Keratokonus GrubuHücrelerinde NADH Miktarları

### 3.5.16 Nitrotirozin Miktarının Ölçülmesi

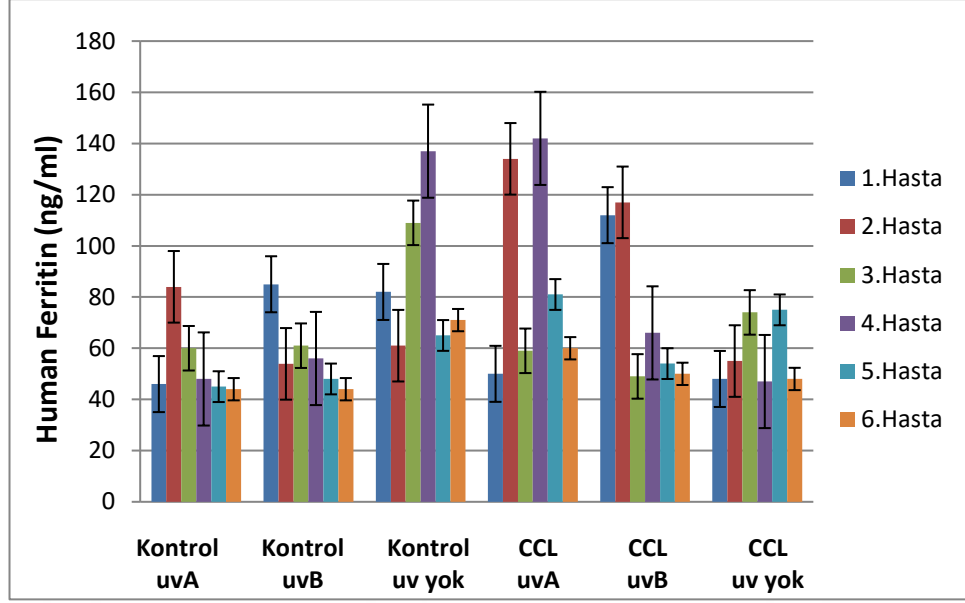
ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu hücrelerinde 3-Nitrotirozinkonsantrasyonu **ortalama**1.06 ng, uvB uygulanan kontrol grubunda 1.55 ng, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 1.17 ng olarak ölçülmüştür. Keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama 3-Nitrotirozin miktarı1.31 ng, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 1.08 ng, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 1.87 ng olarak ölçülmüştür.



Şekil3.28.Kontrol ve Keratokonus Grubu Hücrelerinde Nitrotirozin Miktarları

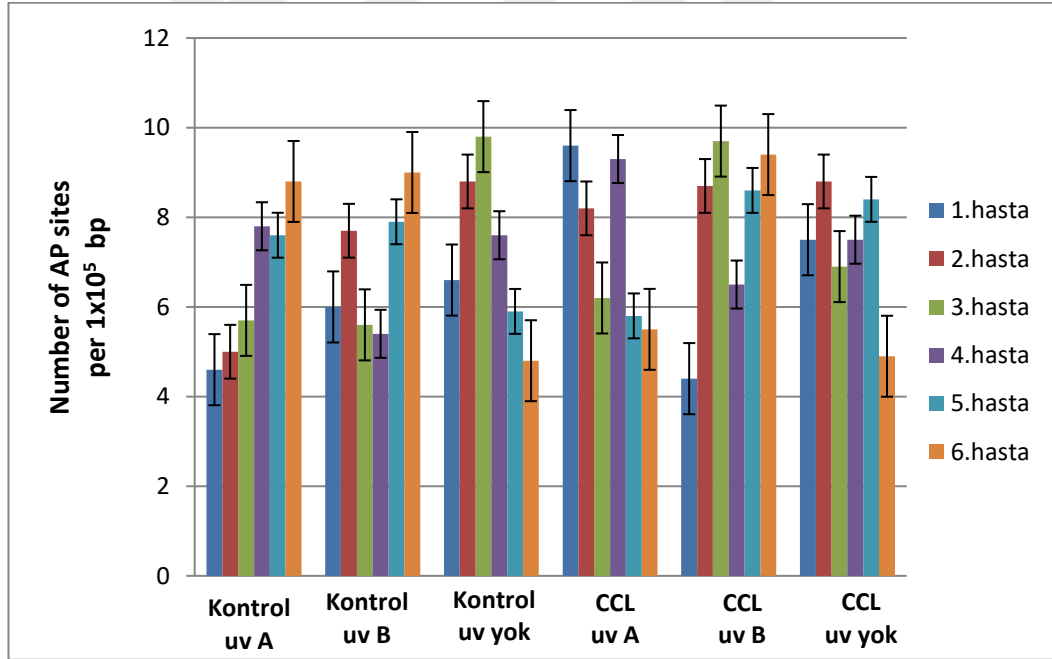
### 3.5.17 Ferritin Miktarının Ölçülmesi

ELISA okuyucu ile elde edilen grafik sonuçlarına göre, uvA uygulanmış kontrol grubu Ferritinkonsantrasyonu **ortalama**54.5 ng, uvB uygulanan kontrol grubunda 57.9 ng, uv uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise 87.5 ng olarak ölçülmüştür. Keratokonus grubu hastalarına bakıldığında uvA uygulanan keratokonuslu grupta ortalama Ferritin miktarı87.7 ng, uvB uygulanan keratokonuslu grupta 74.7 ng, uv uygulanmayan keratokonuslu grupta ise ortalama 57.8 ng olarak ölçülmüştür.



Şekil3.29.Kontrol ve Keratokonus Hücrelerinde Ferritin Miktarları

### 3.5.18DNA Hasarının Belirlenmesi



Şekil3.30.Kontrol ve keratokonus hücrelerinde DNA hasarının miktarını belirlenmesi amacıyla apürinik/aprimidinik (AP) bölgelerinin sayısını gösteren grafik

#### 4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Keratokonus hastalığının etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, çeşitli çalışmalarda antioksidan sistemle ilgili çok sayıda bozukluk tesbit edilmiştir. Keratokonusta görülen patolojilerin çoğu (stromada incelme, kollajen liflerinde dizorganizasyon, Bowman membranında çatlaklar, Desme membran rüptürü gibi) stromada meydana gelmektedir. Zaten kornea kalınlığının %90'ını da stroma tabakası oluşturmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmaların çoğunda patolojinin kaynağı olarak stroma gözönüne alınmakta ve incelenmektedir.

Kornea epiteli 50 mikron kalınlığıyla kornea kalınlığının %10'unu oluşturmaktadır. Ancak kornea açısından çok önemli fonksiyonları vardır. Bunlardan biri de UV ışınlarının filtrelenmesidir. UV-A ışınları görünür ışığa en yakın dalgaboyudur ve dokulara zararı nisbeten daha azdır. UV-A ışınının az bir kısmı epitelde, 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.

Kornea epiteli, UV-B nin zararlı etkilerine karşı güçlü antioksidan savunma sistemleriyle donatılmıştır. Tezimizde bu enzimlerin normal kornea epitelinde ve keratokonumlu epiteldeki seviyelerini inceledik ve UV-A ve UV-B nin etkisiyle bu enzim seviyelerinde oluşan değişimlere baktık.

UV uygulanmayan keratokonus ve normal kontrol hücrelerindeki antioksidan enzim seviyelerini incelediğimizde, ALDH, NOS, NAD/NADH, TAS aktivitelerinin keratokonumlu epitelde azalmış olduğunu, G6PD nin ise yükselmiş olduğunu görüyoruz. Azalmış antioksidan enzimlerden dolayı keratokonus hücreleri oksidatif strese karşı daha dayanıksız hale gelir. G6PD enziminin yüksekliği, oksidatif strese kompanseuar bir yanıt olabilir. NO ve NT seviyeleri de keratokonumlu hücrelerde anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. NO, çok kısa ömürlü bir serbest radikaldir ve hücre içi haberleşmede kullanılır, ancak süperoksit radikallerinin yüksek olduğu ortamlarda “peroksinitrit” oluşturarak doku hasarına neden olabilir (Buddi, 2002). Peroksinitrit molekülleri proteinlerle birleşerek oldukça stabil olan Nitrotirozin'i (NT) oluşturur. NT seviyelerinin yüksek olması, ortamda peroksinitrit ve nitrojen kaynaklı



oksidan moleküller olduğunu gösterir. Keratokonuslu hücrelerde çıkan NT yüksekliği, başka çalışmalarda da gösterilmiştir (Buddi, 2002).

Epitel hücrelerine UV-A uygulandıktan ve 24 saat kültür ortamında inkübe edildikten sonra yapılan ölçümlerde, Katalaz (CAT) ve Ürik Asit seviyelerinin keratokonuslu hücrelerde normallere göre anlamlı olarak yükseldiğini görmekteyiz. Öte yandan, ALDH ve TAS ise düşük kalmaktadır. ALDH ve Ürik Asit, oluşan oksidatif yüke cevap olarak yükselmiş olabilir.

Epitel hücrelerine UV-B uygulandıktan ve 24 saat kültür ortamında inkübe edildikten sonra yapılan ölçümlerde, katalaz ve ürik asitte UV-A dan sonra görülen artış gözlenmemiştir. Diğer enzimlerde ise UV-A dakine benzer farklılıklar olmuştur.

Keratokonus hücreleri UV uygulamasına göre de 3 grupta incelendi (UV-A, UV-B, UV-YOK). İstatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar Katalaz, G6PD, NOS ve NT-3 olarak bulundu. UV-B uygulanan grupta katalaz diğer gruplara göre düşük, G6PD ise yüksek bulundu. NOS ise UV-A ve UV-B grubunda UV uygulanmayan gruba göre yüksekti.

Kontrol hücreleri de UV uygulamasına göre incelendiğinde; GPX, G6PD, MDA, NOS ve Ferritin'de anlamlı farklılık izlendi. GPX UV-A grubunda diğer gruplara göre düşüktü. G6PD ve MDA UV-B grubunda yüksek bulundu. UV uygulanmayan grupta NOS seviyesi düşük, Ferritin seviyesi ise yüksekti.

Antioksidan enzimlerin ekspresyon seviyeleri incelendi. Enzim ifadelerine bakılan ALDH, GPX ve SOD enzimleri incelendiğinde; ALDH ifadesinin keratokonus grubunda kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu gözlemlendi. Keratokonus grubunda ALDH enzim seviyesi düşükken ekspresyon seviyesinin yüksek olması, translasyon aşamasında bir problem olduğunu düşündürür. GPX enzimi de keratokonus grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunurken, aynı yüksekliğin UV-B uygulaması sonrası da devam ettiği, ancak UV-A sonrası görülmediği izlenmektedir.

Hücrelerin UV absorpsiyonu incelendiğinde Keratokonus ve kontrol gruplarının birbirlerinden bariz şekilde farklılaştığı görüldü. Her 3 keratokonus grubunda da kontrol gruplarına göre UV absorpsiyonu anlamlı düşüktü. Keratokonus ve kontrol grupları arasındaki en belirgin farkın UV-A sonrası grupta en fazla olduğu, ondan sonra UV uygulanmamış grup, en sonra da UV-B grubu gelmekteydi. Bu bulguların keratokonus patojenezinde çok önemli olabileceği ortadadır. Özellikle UV-A

maruziyetinden sonra keratokonus epitelinin UV geçirgenliği artarken, normal epitelin ise UV geçirgenliği azalmaktadır. Bu bulgu, epiteldeki UV defans mekanizmalarının normal epitelde hızla devreye girdiğini, ancak keratokonus epitelinde bir şekilde devreye giremediğini düşündürmektedir.

Keratokonüs ve kontrol grubu DNA hasarı yönünden incelendiğinde iki grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Özellikle UV-B nin direk DNA hasarı yapıcı özelliği gözönüne alındığında en azından bu grupta DNA hasarının gözlenmesi beklenirdi. Bu durum, keratokonus patojenezinde direk DNA hasarının söz konusu olmadığını düşündürmektedir.

Tez kapsamında hücre yüzey hasarını incelemek üzere SEM incelemesi yapılması da planlanmıştı, ancak çalışmanın bu döneminde Kırıkkale Üniversitesinin SEM cihazı arızalandı. Çorum Üniversitesi ile anlaşılarak örnekler hazırlanıp oraya gönderildi. Orada da örneklerin uygun şekilde muamele edilmemesinden dolayı sonuç alınamadı. Bu aşamadan sonra vakit yetersizliği nedeniyle bu inceleme yapılamadı.

### **Sonuç olarak;**

Bu çalışmada keratokonuslu kornea epiteli ile normal kornea epitelinin antioksidan mekanizmaları incelenmiş, bu hücrelerin UV-A ve UV-B ye olan cevapları ve UV geçirgenlikleri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmadan önemli bilgiler elde edilmiştir: Birincisi, keratokonuslu epitelin UV absorbanasının normal epitele göre daha fazla olmasıdır. Bu nedenle stromaya daha fazla UV-B geçmekte ve muhtemelen UV-B ye bağlı stroma hasarı oluşmaktadır. Ayrıca, UV-A maruziyetinden sonra keratokonus epitelinin UV absorbanası daha da azalmaktadır. İkinci olarak, epitelde bulunan çok sayıda antioksidan enzimden bir kısmı keratokonusta azalmıştır. En başta ALDH olmak üzere bu antioksidanların eksik olması nedeniyle keratokonus epitelinde Total Antioksidan Status da düşük çıkmaktadır. Muhtemelen, epitelde biriken reaktif oksijen türevlerinin Bowman membranı ve stromaya geçmesiyle buralarda hasar ve enflamasyon olmaktadır. Üçüncüsü, ALDH enzimi keratokonus epitelinde düşük seviyedeysen, ekspresyonu yüksek seviyededir. Bu da translasyon aşamasında bir sorun olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] H. BAŞMAK, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Gözün Anatomisi ve Yapısı
- [2] [www.bilgiustam.com/gozun-yapisi](http://www.bilgiustam.com/gozun-yapisi) (Erişim tarihi:04.08.16)
- [3] Ayfer. A. Göz Histolojii <http://www.dicle.edu.tr/> (Erişim tarihi: 05.08.16)
- [4] [www.turkcebilgi.com](http://www.turkcebilgi.com)
- [5] Yiğit Mehmet S, Kornea Kalınlığının Kuru Göz ile İlişkisi ve Psödoekfoliyasyonun Kornea Kalınlığı ve Kuru Göze Etkisi. Uzmanlık Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van,2013.
- [6] Kaya M. Deneysel Kornea Yanığında Topikal İnflksimab ve Triamsinolon Asetonidin Korneadaki Mıf Etkileri, Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ,2010
- [7] Lang.Ophthalmology. Stuttgart -New York: Thieme, 2000: 118
- [8] Zieske JD. Perpetuation of stem cells in the eye. Eye 1994;
- [9] Karabulut M. , Korneal Neovaskülarizasyonda İnterferon Alfa 2b'nin Etkisi, Uzmanlık Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Aydın, 2015
- [10] Hogan M, Alvarado J, Weddell J. Histology of the Human Eye An Atlas and Textbook. Philadelphia. WB Saunders, 1971
- [11] <https://quizlet.com>
- [12] Akbulut D., Korneal Biyomekanik Parametreler Üzerine Diyabetik Retinopi ve Kan Gliloz Regulasyonunun Etkisi, Uzmanlık Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa 2014
- [13] Kılıç Bulam B., Korneal Kollojen Çapraz Bağlama Tedavisinin Deneysel Bakteriyel Keratit Modelindeki Etkisinin Araştırılması ve Topikal Antibiyotik Tedavisi ve Kombine Tedavi ile Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi,Ankara,2014
- [14] Grzybowski A, McGhee CNJ. The early history of keratoconus prior to Nottingham's landmark 1854 treatise on conical cornea: a review. Clin ExpOpt 2013; 96: 140-5.
- [15] Çüçen B., Keretokonus Tedavisinde Kullanılan Crossling Cihazının Deneysel Olarak Üretilmesi Güvenilirliğinin ve Etkinliğin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Kocaeli Üniversitesi,Kocaeli,2011
- [16] Arnal E.,Peris-Martinez C, Oxidative Stress in Keratoconus C

- [17] [www.doktorsitesi.com](http://www.doktorsitesi.com) (Erişim Tarihi:06.08.16)
- [18] Kaydu E., İlerleyici Keratokonus Olgularında Riboflavin/ UV-A İle Korneal apraz Bağlama tedavisinin Sonuçları, Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi,2013
- [19] Sturbaum CW, Peiffer RL Jr. Pathology of corneal endothelium in keratoconus.Ophthalmologica. 1993
- [20] Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study ofkeratoconus:evidence for major gene determination. Am J Med Genet. 2000 ;93: 403-409.
- [21] Funderburgh JL, Hevel one ND, Roth MR, Funderburgh ML, Rodri gues MR, Ni rankari VS, Conrad GW. Decorin and biglycan of normal andpathol ogic human corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci . 1998;39:1957- 64.
- [22] Zhou L, Yue BY, Twining SS, Sugar J, Feder RS. Expressi on of wound healing and stres rel ated proteins in keratoconus corneas. Curr Eye Res. 1996;15:1124-1131.
- [23] poer E, Mrochen M, Sliney D, et al Safet y of UVA-riboflavin cross-linkingof the cornea. Cornea 2007;26:385-9.
- [24] Newsome DA, Foidart JM, Hassell JR, Krachmer JH, Rodri gues MM, KatzSI. Detecti on of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. Invest. Ophthalmal. Vis. Sci . 1981;20:738-50.
- [25] American Academy of Ophthalmol ogy. Of talmol ojinin Esas ve İlkeleri .GüneşKi tapevleri . 2009;297-302115. Collier SA. Is the corneal degradati on in keratoconus caused by matrixmetall oproteinases? Clin ExperimentOphthalmol .2001;29:340-4.
- [26] Kao WW, Vergnes JP, Ebert J. Increased collagenase and gelatinase activitiesin keratoconus. Bi ochem Bi ophys Res Commun. 1982;107:929– 936.
- [27] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science.1995; 267(5203): 1456-62
- [28] Kim WJ.,Shah S.,Wilson SE. Differences in keratocyte apoptos

transepithelial and laser-scrape photorefractive keratectomy in rabbits. *J Refract Surg*.1998;14(5):526-33

- [29] Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea* 2000 (3Suppl);19:7-12
- [30] Kenney Mc, Donald J. Brown: The Cascade Hypothesis of Keratokonus. *Contact Lens & Anterior Eye* 2003;26:139-146
- [31] Whitelock RB., 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.
- [32] Streuli M. Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(2): 182-8
- [33] Kenney MC., Brown DJ., Rajeev B. Everett Kinsey lecture. The elusive causes of keratoconus: a working hypothesis. *Clao J* 2000; 26(1): 10-3
- [34] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203): 1456-62.
- [35] Kim WJ., Shah S., Wilson SE. Differences in keratocyte apoptosis following ract Surg.1998;14(5):526-33
- [36] Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea* 2000 (3Suppl);19:7-12
- [37] Hall PA, Watt FM; Stem Cells: The generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106:619
- [38] Kenney MC., Brown DJ., Rajeev B. Everett Kinsey lecture. The elusive causes of keratoconus: a working hypothesis. *Clao J* 2000; 26(1): 10-3
- [39] Whitelock RB., 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.
- [40] Sawaguchi S., Twining SS., Yue BY., Wilson PM., Sugar .J, Chan SK. Alpha-1proteinase inhibitor levels in keratoconus. *Exp Eye Res*1990;50(5):549-54
- [41] Maruyama Y., Wang X., Li Y., Sugar J., Yue BY. Involvement of Sp1 elements in the promoter activity of genes affected in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(9): 1980-5.

- [42] Streuli M. Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(2): 182-8
- [43] Buddi R., Lin B., Atilano SR., Zorapapel NC., Kenney MC., Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(3):341-51.
- [44] Behndig A., Svensson B., Marklund SL., Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(3):471-5
- [45] 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
- [46] M. Kahveci, Riboflavin/UV-A İle Kornea Kollajen Çapraz Bağlama (Cross-linking) Tedavisinin Sonuçları. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2012.
- [47] A. Sağlık, Keratokonusda Korneal Kollajen Çapraz Bağlanma Tedavisi (CLX), Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2012.
- [48] Funderburgh JL, Panjwani N, Conrad GW, Baum J. Altered keratan sulfate epitopes in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:2278-81.
- [49] Colin J, Malet FJ. Intacs for the correction of keratoconus: two-year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:69-74.
- [50] Rabinowitz YS. Intacs for Keratoconus. *Int Ophthalmol Clin* 2010;50:63-76.
- [51] Sawaguchi S, Yue BY, Chang I ve ark. Proteoglycan molecules in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1846-53.
- [52] Ovalı E, Uçar F. Hematolojide uygulamalı hücre teknikleri kurs kitabı. Trabzon, 2003; 217:7-16 York.).
- [53] Serway, R. a. V., Chris (2011). *College Physics*, Brooks/Cole Pub Co.
- [54] M. Varol, Liken Asitlerinin Ultraviyole Işımlarına KARŞI Korumucu Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 2013
- [55] Gül Ü: Güneş ve deri. T.C Ankara Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü Eğitim Şubesi Yayınları Yayın No:005 Ankara 200. S:1-16
- [56] <http://www.nikon-lenswear.com.tr/>(Erişim Tarihi:02.10.16)
- [57] <https://blog.decathlon.com.tr/>(Erişim Tarihi:02.10.16)

- [58] Hasbal, C., 2008, Bronşiyal Astımlı Çocuklarda Oksidatif DNA Hasarı, Uzmanlık Tezi, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği
- [59] Kohen, R., Nyska, A., 2002, Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification, *Toxicologic Pathology*, 30 (6), 620–650.
- [60] Akkuç, Ğ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Basım, Yayım ve Dağıtım A.ş., Konya.
- [61] ruoma, O.I., 1998, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *American Oil Chemists Society*: 199-209 s.
- [62] Aslan, R., ğekeroğlu, R. ve Bayıroğlu, F., 1995, Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma, *100. Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2: 137-142 s.
- [63] Henle, E.S. and Linn, S., 1997, Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide, *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 272 (31): 19095-19098 s.
- [64] Girotti, A.W., 1998, Lipid hydroperoxide generation turnover and effector action in biological systems, *Journal of Lipid Research*, 39: 1529-1542 s
- [65] Carr, A.C. and Frei, B., 1999, Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effect in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (6): 1086-1107 s.
- [66] Halliwell, B., 1994, Free radicals antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence, *The Lancet*, 344: 721-724 s.
- [67] Haklar, G., Yüksel, M., Soybaçılı, H.ve Yalçın, A.S., 1999, Süperoksit radikali, nitrik oksit ve peroksinitritin hasar oluşturuç metabolizmadaki rolleri, *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1: 53-67 s.
- [68] Fremont, L., Gozzelino, M.T., Franchi, M.P. and Linard, A., 1998, Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets, *The Journal of Nutrition*, 128: 1495-1502 s.
- [69] Bast, A., Haenen, M., Cees, J. and Doelwan, A., 1991, Oxidants and antioxidants: state of the art, *The American Journal of Medicine*, 91: 2-10 s.

- [70] McCord, J.M., 1993, Human disease, free radicals and the oxidant antioxidant balance, *Clinical Biochemistry*, 26: 651-357 s.
- [71] Halliwell, B. And Gutteridge, J.M.C., 1989, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2 nd. Ed. Clarendon Press, Oxford.
- [72] Halliwell, B., 1984, Oxygen radicals: commonsense look at their nature and medical importance, *Medical Biology*, 62: 71-77 s.
- [73] Çelik, S., 2001, APS ile opere edilen tavşanların kan ve karaciğer dokularındaki serbest oksijen radikalleri ve antioksidan enzim düzeylerinin tayini, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- [74] Bast, A., Haenen, M., Cees, J. and Doelwan, A., 1991, Oxidants and antioxidants: state of the art, *The American Journal of Medicine*, 91: 2-10 s.
- [75] Onat, T. ve Emerk, K., 1997, *Temel Biyokimya I*, Saray Medikal Yayıncılık.
- [76] Aslan, R., Çekeroğlu, R. ve Bayıroğlu, F., 1995, Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma, *100. Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2: 137-142 s.
- [77] Çevrim, E., 2000, Sigara içenlerde antioksidan enzimler, ferritin ve hemoglobin düzeylerinin değerlendirilmesi, Yüksek lisans tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- [78] Bruce, A., 1983, Dietary carcinogens and anticarcinogens; oxygen radicals and degeneration diseases, *Science*, 221: 1256-1267
- [79] Scandalios, J.G., 2002, The rise of ROS, *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9): 483-486 s.
- [80] Aruoma, O.I., 1994, Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 32: 671-683 s.
- [81] Bast, A., Haenen, M., Cees, J. and Doelwan, A., 1991, Oxidants and antioxidants: state of the art, *The American Journal of Medicine*, 91: 2-10 s.
- [82] McCord, J.M., 1993, Human disease, free radicals and the oxidant antioxidant balance, *Clinical Biochemistry*, 26: 651-357 s.



- [83] Henle, E.S. and Linn, S., 1997, Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide, *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 272 (31): 19095-19098 s.
- [84] Mates, J.M., Gomez, C., and De Castro, I.N., 1999, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clinical Biochemistry*, 32 (8): 595-603 s.
- [85] Ward, P.A., 1991, Mechanism of endothelial cell injury, *J. Lab. Clin. Med.*, 118: 421-426 s
- [86] Halliwell, B., 1991, Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human, *The American Journal of Medicine*, 91: 14-22 s.
- [87] Halliwell, B., 1994, Free radicals antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence, *The Lancet*, 344: 721-724 s.
- [88] Cochrane, C.G., 1991, Cellular injury by oxidant, *The American Journal of Medicine*, 91: 23-30 s
- [89] Sohal, R.S., 1988, Effect of hydrogen peroxide administration on life span, superoxide dismutase, catalase and glutathione in the adult housefly, *musca domestica*, *Experimental Gerontology*, 23: 211-216 s.
- [90] Sies, H., 1991, Oxidative stress: from basic research to clinical application, *American Journal of Medicine*, 91: 31-37 s.
- [91] Kutay, F.Z., 1999, Melatonin ve oksidatif strese bağlı nörodejenerasyon, *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1-23 s.
- [92] Aruoma, O.I., 1998, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *American Oil Chemists Society*: 199-209 s.
- [93] Sohal, R.S., 1988, Effect of hydrogen peroxide administration on life span, superoxide dismutase, catalase and glutathione in the adult housefly, *musca domestica*, *Experimental Gerontology*, 23: 211-216 s.
- [94] Haklar, G., Yüksel, M., Soybaçılı, H.ve Yalçın, A.S., 1999, Süperoksit radikali, nitrik oksit ve peroksinitritin hasar oluşturucu metabolizmadaki rolleri, *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1: 53-67 s.
- [95] Balabanlı, B., Türközkan, N., Polat, M. ve Akmansu, M., 1998, Radyasyonun oluşturduğu serbest radikal aracılıklı karaciğer harabiyetinin nitrik oksit oluşumu yoluyla incelenmesi, *Klinik Gelişim II*, 402-403 s.

- [96] Sözmen, E.Y., Tüzün, S., Uysal, F., Sözmen, B., Aldemir, S. ve Onat, T., 1998, Sıçan böbreğinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında EGb-761 in antioksidan sistem ve nitrik oksit üzerine etkileri, Klinik Gelişim II, 416-419 s.
- [97] [www.google.com.tr/search?q=Serbest+Radikallerin+Oluşumu](http://www.google.com.tr/search?q=Serbest+Radikallerin+Oluşumu)(Erişim Tarihi:20.10.2016)
- [98] Yanbeyi S. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun 1999
- [99] Fırat S. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm. Tezi, Ankara 1997
- [100] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RI, Mccord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 1987; 107:526-45.
- [101] Tekkes Y. Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı 2006: 1-81.
- [102] Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. AİBÜ Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 3: 20-39. .
- [103] Dikici İ. Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı,Uzmanlık Tezi, Konya 1999.
- [104] Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri.1.baskı Konya:Mimozayayınları, KuzucularBasımevi, 1995.
- [105] Yanbeyi S. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabili Dalı, Doktora Tezi, Samsun 1999.

- [106] Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40: 405-12.
- [107] Marsden, Hall, Brenner. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and the kidney. In: Brenner B(ed). *The Kidney*, 5th edition. Philadelphia W.B Saunders, 1996: 735-53.
- [108] Grisham MB, Granger DN. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Med.* 1989; 10: 1-81. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol* 1990
- [110] Fırat S. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm. Tezi, Ankara 1997.
- [110] Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR. *Techniques in free radicals research.* Elsevier 1999; 22: 119-24.
- [111] Akkuş İ(1995) *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri.* Mimoza Yayınları, Konya.
- [112] Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, Vasiliou V. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics* 2011; May : 283-303.
- [113] Balber A. Concise Review: Aldehyde Dehydrogenase Bright Stem and Progenitor Cell Populations from Normal Tissues: Characteristics, Activities, and Emerging Uses in Regenerative Medicine. *Stem cells* 2011; 29(4): 570-5.
- [114] Ma Irene, Allan A. The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* 2011 ;7: 292–306.
- [115] Marchitti S. A., Brocker C., Stagos D, Vasiliou, V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008; (6): 697–720.
- [116] Black, W. J., Stagos, D., Marchitti, S. A. Human aldehyde dehydrogenase genes: alternatively spliced transcriptional variants and their suggested nomenclature. *Pharmacogenetics and Genomics* 2009 ; 19: 893–902.

- [117] Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bailliers Best Pract Res Clin Haematol* 2000; 13: 21-38.
- [118] Wood T. Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. *Cell Biochem Funct* 1986; 4: 235-40.
- [119] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of biochemistry*Worth Publishers, USA 2000; 743-4,
- [120] Levy HR. Glucose-6-phosphate dehydrogenases, in: Meister A (ed). John Wiley and Sons Inc, New York, 1979; 97-191
- [121] Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans CH. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36(8): 1036-1044.
- [122] Jang D, Murrell GAC. Nitric oxide in arthritis. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(9): 1511-1519.
- [123] Carlo MD, Loeser RF. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum* 2002; 46(2): 394-403.
- [124] Furchgott ve diğ., 1984; Torreilles, 2001.
- [125] Rapoport ve Murad, 1983; Marletta, 1994; Alderton ve diğ., 2001.
- [126] Meister, A. Larsson, A. (1989). Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the  $\gamma$ -glutamyl cycle. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 855–68.
- [127] Martensson, J. Lai, JCK. Meister, A. (1990). High affinity transport of glutathione is part of a multi-component system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 7185–7189.
- [128] Chai, YC. Ashraf, SS. Rokutan, K. Johnston, Jr. RB. Thomas, JA. (1994). S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*, 310: 273– 281.
- [129] Hayes, JD. McLellan, LI. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*, 31: 273– 300.
- [130] Champe P.C., Harvey R.A. : *Nucleotid Metabolism In:Biochemistry* .

Lippincott's Illustrated Reviews, Lippincott Company 1994; 343-356.

- [131] Dantzler W.H.: Comparative Aspects of Renal Urate Transport. *Kidney Int* 1996 Jun; 49(6) :1549-1551.57 38
- [132] Yeldandi A.V., Patel Y.D., Liao M., Kao F.T., Rao M.S., Reddy J.K., Le Beau M.M.: Localization of the human urate oxidase gene (UOX) to 1p22. *Cytogenet Cell Genet* 1992; 61:121-122.
- [133] Wu X., Muzny D.M., Lee C.C., Casker C.T.: Two independent mutational events in the loss of urate oxidase. *J Mol Evol* 1992; 34:78-84
- [134] Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. *J Nutr.* 1989; 119(6):109-11.
- [135] Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647
- [136] Marubayashi S, Dohi K, Ochi K et al. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by alpha-tocopherol administration. *Surgery* 1986;99:184-191
- [137] Dormandy TL. In praise of peroxidation. *The Lancet* 1988;12:1126-1128
- [138] Kunimoto F, Mori ta T, Ogawa R et al. Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats. *Circ Shock* 1987;21:15-22
- [139] Cadenas E. Biochemistry oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 1989;58:79-
- [140] Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 1987;45:251-268
- [141] Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease : Evidence supporting it. *Ann Neurol.* 1992;32:804-812
- [142] Anderson LM, Chappell, Jones TG. Internal pH changes associated with the activity of NADPH oxidase of human neutrophils. *Biochem J* 1988;251:563-567
- [143] Van Bebber IPT, Boekholz WKF, Gori s RJA et al. Neutrophil function and lipid peroxidation in a rat model of multiple organ failure. *J Surg Res* 1989;47:471-475
- [144] Caraceni P, Rosenblum ER, Van Thiel DH et al. Reoxygenation injury in isolated rat hepatocytes: Relation to oxygen free radicals

and lipid peroxidation. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol 29) 1994;266:799-806

[145] R. Ian Freshney Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition,. Haboken; John Wiley & Sons: 2005.p.1-216

[146] Candan Ç., Bilgiç A., Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model, İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 2006; 20 (3): 231-241

[147] Schmalz G, Dorthe Arenholt Bindslev. Biocompatibility of Dental Materials. 1st ed. Verlag Berlin Heidelberg; Springer:2009. p.13-40

[148] Helgason CD, Miller CL. Methods in molecular biology. Third edition. Tatowa; Humana Press:2005. p. 1-12





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 **“Keratokonüs 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







