

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ASTAKSANTİNİN ARPE-19 HÜCRELERİNDE SİGARA
DUMANI BİLEŞENLERİNDEN HİDROKÜİNON İLE
OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRES MODELİNDE
ANTIOKSİDAN PARAMETRELER (GSH, GSH-PX, MDA),
Ca⁺² SİNYALİ VE APOPTOSİS DÜZEYLERİ ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Musa YİĞİT

**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

I. DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Alime GÜNEŞ

II. DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ

**Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından Hızlı
Destek Programı, 114S969 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2015

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bana her türlü imkanı ve desteği sağlayan Göz Hastalıkları ABD Başkanı Doç. Dr. Özlem Y. TÖK ve Yrd. Doç. Dr. Levent TÖK hocalarıma;

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Alime GÜNEŞ başta olmak üzere, Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU, Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ'a ve Arş. Gör. Ahmi Öz'e;

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma;

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

Uzmanlık eğitimim sırasında tanıştığım ve hayatımı birleştirdiğim canım eşime;

Teşekkür ederim...

Dr. Musa YİĞİT

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
GRAFİKLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Retina	4
2.1.1. Retina Anatomisi.....	4
2.1.2. Retina Kan Dolaşımı	6
2.1.3. Retinanın Tabakaları	7
2.1.4. Kan-Retina Bariyeri ve Transeptelial Transport.....	11
2.1.5. Görsel Döngü ve Vitamin A Metabolizması.....	12
2.1.6. Fotoreseptör Dış Segmentlerinin Fagositozu	12
2.1.7. Fotooksidasyona Karşı Koruma	13
2.1.8. Büyüme Faktörleri ve Sitokinler	13
2.2. Serbest Radikaller	14
2.3. Antioksidanlar	15
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	16
2.4. Hücre İçi Kalsiyum (Ca ²⁺) Sinyali	17
2.4.1. Hücre İçerisine Ca ²⁺ Giriş Kanalları	18
2.4.2. Hücre İçi Depolardan Ca ²⁺ Salınımı	19
2.4.3. Ryanodin Reseptörü (RyRs) Aracılı	19
2.4.4. Sfingolipid Aracılı.....	19
2.5. Hücre İçi Ca ²⁺ Salınım Habercileri	20
2.5.1. Inositol-1,4,5-trifosfat	20
2.5.2. cADPR ve NAADP	20
2.6. Sigara Dumanı.....	20
2.7. Astaksantin.....	22

2.8. Oksidatif Stres	23
2.9. Ca ⁺² Sinyali ve Oksidatif Stresin Rolü.....	24
3.MATERYAL ve METOD	25
3.1. Materyal	25
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	25
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.3.1. Gruplar	26
3.3.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	27
3.3.2.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri.....	27
3.3.3. Hücre İçi Ca ⁺² Salınımının Ölçülmesi	28
3.3.4. Lipid Peroksidasyon Analizi	29
3.3.5. Kaspaz -3 ve -9 Aktivitelerinin Tayini	29
3.3.6. Apoptosis	29
3.3.7. ROT Üretimi	31
3.3.8. Protein Tayini.....	31
3.3.9. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR	33
4.1. ARPE-19 Hücrelerinde Lipid Peroksidasyon Düzeyleri.....	33
4.2. ARPE-19 Hücrelerinde GSH ve GSH-Px Düzeyleri	34
4.3. ARPE-19 Hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu (Ca ⁺²) _i Salınımı Düzeyleri	36
4.4. ARPE-19 Hücrelerinde ROT Düzeyleri.....	39
4.5. ARPE-19 Hücrelerinde Mitokondriyal Depolarizasyon Düzeyleri	39
4.6. ARPE-19 Hücrelerinde Apoptozis Düzeyleri	40
4.7. ARPE-19 Hücrelerinde Kaspaz-3 Düzeyleri	41
4.8. ARPE-19 Hücrelerinde Kaspaz-9 Düzeyleri	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
ÖZET.....	50
ABSTRACT	52
KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

RPE	Retina pigment epiteli
YBMD	Yaşa bağı makula dejenerasyonu
KNV	Koroidal neovaskularizasyon
HQ	Hidrokuinon
AST	Astaksantin
MDA	Malondialdehit
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon-peroksidaz
TGF-β	Transforming-growth factor-beta
FGF	Fibroblast-growth factor
HGF	Hepatocyte-growth factor
PDGF-A	Platelet-derived growth factor A
Apo A1	Apolipoprotein A-1
ROT	Reaktif oksijen türleri
LPO	Lipid peroksid
SOD	Süperoksid Dismutaz
H₂O₂	Hidrojen peroksid
ER	Endoplazmik retikulum
SR	Sarkoplazmik retikulum
TCA	Trisiklik karboksilik asit
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa
RyRs	Ryanodin Reseptörü
CRBP	Hücrel retinol-bağlayıcı protein
CRALBP	Hücrel retinaldehit-bağlayıcı protein

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar	28
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellenmesi	31
---	----

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Hidrokuinonun moleküler yapısı.....	22
Resim 2. HQ' nun redoks sistemi üzerindeki etkinliği ve indirgenme reaksiyonları. Elektron koparma ve serbest radikal üretimi yolağı göstermektedir...	22
Resim 3. Astaksantin moleküler yapısı	23
Resim 4. Astaksantin	45

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında lipid peroksidasyon düzeylerine etkileri.....	33
Grafik 2. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında GSH düzeylerine etkileri.....	34
Grafik 3. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında GSH-Px düzeylerine etkileri.....	35
Grafik 4. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında sitozole Ca ⁺² salınımının zaman akım grafiği.	36
Grafik 5. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında sitozole Ca ⁺² salınımı üzerindeki etkileri.	36
Grafik 6. Kontrol grubu ARPE-19 hücrelerinde sitozole Ca ⁺² salınımı düzeyleri. ..	37
Grafik 7. Astaksantin grubu ARPE-19 hücrelerinde sitozole Ca ⁺² salınımı üzerindeki etkileri.	37
Grafik 8. Hidrokuinon grubu ARPE-19 hücrelerinde sitozole Ca ⁺² salınımı üzerindeki etkileri.	38
Grafik 9. Hidrokuinon ve Astaksantin kombinasyon grubu ARPE-19 hücrelerinde sitozole Ca ⁺² salınımı üzerindeki etkileri.....	38
Grafik 10. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında ROT düzeylerine etkileri.....	39
Grafik 11. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında mitokondriyal depolarizasyon düzeylerine etkileri.....	39
Grafik 12. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında apoptozis düzeylerine etkileri.....	40
Grafik 13. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında kaspaz-3 düzeylerine etkileri.....	41
Grafik 14. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında kaspaz-9 düzeylerine etkileri.....	42

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Retina pigment epiteli (RPE) tek sıra küboidal hücrelerden oluşmuştur ve duyuşal retina ile Bruch membranı arasında yerleşmiştir. Tek sıra halindeki yaklaşık 5 milyon pigment hücresi bazal laminasına sıkı bir şekilde tutunmuştur. Bu laminadan kaynaklanan mikrofibriller, Bruch membranının lamina elastikası içine uzanır. Zengin damar ağından oluşmuş koryokapillaris ile fotoreseptörler arasında yerleşik olan RPE görme sisteminin bütünlüğünün korunmasında birçok göreve sahiptir. Fonksiyonlarının hepsi henüz tam açığa kavuşmuş değildir. Pigment epitelinin başlıca görevleri arasında fotoreseptörlerin dökülmüş olan dış segmentlerinin fagosite edilmesi, retinol metabolizması, ekstrasellüler matriksin düzenli olarak oluşturulup yerinde kalması, iyon ve metabolit naklinin düzenlenmesi vardır (1,2).

İnfant gözünde 4.2-6.1 milyon arasında RPE hücresi bulunmaktadır. Yaşın ilerlemesiyle gözün yüzey alanı da genişler ama buna rağmen hücre sayısında önemli artış olmaz. Erişkin gözünde normalde RPE içinde mitotik aktivite bulunmamaktadır.

Hücre şekli fundusun her bölgelerinde aynı değildir ve birbirinden farklılık gösterebilir. Hücre büyüklüğü 10 µm ile 60 µm arasında değişir. RPE hücreleri periferik retinada daha kısa, geniş ve iki çekirdekli iken makulada daha uzun ve incedir. Makula bölgesinde 12-18 µm genişliğinde ve yaklaşık 10-14 µm yüksekliğindedirler. Ora serrata yakınında pigment epitel hücrelerinin genişliği 60 mikrona yaklaşır ve daha kısa hale gelirler.

Makula bölgesi daha fazla ve daha geniş melanozomlar içerir. Tek sıra halindeki RPE hücreleri optik sinir kenarında başlar ve ora serrataya kadar uzanır, siliyer cismin pigment epiteli olarak devam eder. RPE hücrelerinin yoğunluğu fovea merkezinde daha fazladır ve periferik retinaya doğru giderek azalır. RPE hücrelerinin apeksi fotoreseptörlerin dış segmentleri ile yüz yüzedir. Ancak RPE tabanı alttaki Bruch membranına sıkı bir şekilde yapışıklık gösterir. RPE bazal membranı Bruch membranının en iç tabakasına karşılık gelir (1-3).

RPE hücrelerinde yaşlanma ile özel değişimler ortaya çıkar. Yaş artarken apoptotik RPE hücrelerinin oranı da artar ve bu apoptotik hücreler esas olarak

makula bölgesinde bulunurlar. Periferdeki RPE hücreleri makuladaki ölen RPE hücrelerini telafi edebilir. Ayrıca yaşlanma ile beraber RPE hücreleri şekil ve büyüklük olarak daha düzensizleşirler. Metabolizma artışı veya sindirilemeyen materyaller intraselüler olarak artış gösterirler ve bu maddeler Bruch membranında toplanırlar. Hücre sitoplazmasında ise lipofussin miktarı artar (1-7).

Lipofussin miktarının aşırı artışının yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. RPE hücresinde biriken lipofussin zamanla hücre metabolizmasının bozulmasına yol açar. Lipofussin içeriği tam olarak tanımlanmamış olmakla birlikte fototoksik bir florofor olan A2E içerdiği bilinmektedir. A2E, RPE hücrelerinde dejenerasyona yol açma potansiyeline sahiptir (1-5).

Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinde hasarlar meydana gelmekte ve sağlam kalan hücrelerin boyutu artmaktadır. Hücrelerin apoptozis ile ölümü çevredeki hücrelerin yayılması ile onarılmaya çalışılmaktadır. Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinin görevlerini yerine getirebilme yeteneği de azalmaktadır. Tüm bu değişiklikler YBMD' nin patogenezinde yer almaktadır (7-11).

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, yaşlı bireylerde görülen, körlüğe kadar gidebilen ağır ve geri dönüşsüz görme kaybının en sık nedenlerinden biridir. YBMD yaşam kalitesini yüksek oranda etkileyen ve görülme sıklığı hızla artan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (12).

YBMD gelişmesi ve ilerlemesinin risk faktörleri arasında ileri yaş, Kafkas ırkı, genetik polimorfizm, yüksek vücut kitle indeksi, fazla alkol tüketimi ve sigara öyküsü bulunmaktadır (13). Günümüzde YBMD patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte, oksidatif stresin patogeneizde önemli rolü olduğu bildirilmiştir (14). YBMD patogenezinde farklı klinik bulgular bulunmasına rağmen RPE hücre dejenerasyonu hastalığın erken evrelerinde sıklıkla gözlenmektedir (15).

Sigara tüketimi vücuttaki oksidatif hasar oluşumunu artırmakta ve antioksidan savunma mekanizmasının da yaşla birlikte daha da zayıflaması ile şiddeti artan inflamasyona neden olabilmektedir. Söz konusu durum YBMD' nin patofizyolojisinde mihenk taşı olarak değerlendirilen bir durum şeklinde karşımıza

çıkılmaktadır (16). Sigaranın YBMD yaygınlığı ve sıklığı ile ilişkili başlıca risk faktörlerinden biri olduğu bildirilmiştir (17,18).

Hidrokuinon (HQ) sadece sigarada değil aynı zamanda işlenmiş gıdalarda, plastik kaplarda, atmosferde yani doğada yaygın bir şekilde bulunur (19,20). HQ sigarada yüksek konsantrasyonda bulunur. Aynı zamanda benzene-1,4-diol veya quinol olarak bilinen aromatik organik fenol bileşenidir ve okside olarak parabenzoquinona (C₆H₆O₂) dönüşebilir, sıklıkla p-kuinon veya kısaca kuinon olarak bilinir (21).

Astaksantin (AST) kabuklu deniz canlılarında yüksek oranda bulunan provitamin olmayan ksantofil karotenoid olarak bilinen antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür (22). Son zamanlarda, YBMD hastalarında kullanılan besin takviyelerine antioksidan etkisi için AST eklenmiştir (23). Ancak, AST' nin RPE hücrelerinde sigaranın oluşturduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkinliği bilinmemektedir.

Bu çalışmada, oksidatif stres parametrelerinden malondialdehit (MDA) düzeyleri ile antioksidan moleküllerden glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri ve hücre içerisindeki Ca⁺² salınım miktarı ve apoptotik yolağın tetikleyicilerinden kaspaz ailesine ait proteinlerin tayini yapılarak, ARPE-19 hücrelerini sigara içerisinde yüksek oranda bulunan hidrokuinona maruz bırakıp, astaksantin koruyucu etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Retina

2.1.1. Retina Anatomisi

Retina, optik sinir yakınında 0,56 mm, ora serratada 0,1 mm, ekvatorunda 0,2 mm kalınlığı olan ince bir dokudur. Retinanın iç yüzeyi vitreus ile temastayken dış yüzeyi potansiyel bir boşluk ile retina pigment epitelinden ayrılmıştır. Bütün retina tabakaları arkadaki sinir lifi tabakası haricinde optik sinir başında sonlanır. Periferde sensoryel retina ora serrataya uzanır ve pars plana nonpigmente siliyer epiteli ile devam eder. Sadece optik disk ve ora serratada retina pigment epiteline sıkı yapışıklık mevcuttur (24). Retina pigment epiteliyle sensoryel retina arasında anatomik bağ yoktur, birbirlerine yalnızca yaslanmış vaziyettedirler. Retina dekolmanı, santral seröz koryoretinopati gibi hastalıklarda sensoryel retina pigment epitelinden ayrılır (25).

Retina oftalmoskopik olarak 3 bölgeye ayrılır:

- a. Makula (santral retina, arka kutup)
- b. Ekvator
- c. Ora serrata (26).

a. Makula

Makula lutea veya sarı nokta olarak adlandırılan bölge retinanın arka kısmında ksantofil pigmentinin toplandığı kısımdır. Özellikle lutein ve zeaksantinden oluşan karotenoidler burada toplanmıştır, bu yüzden santral makula sarı renktedir (27). Makulanın çapı yaklaşık 5,5 mm' dir, sınır olarak temporal vasküler arkuadlar kabul edilmektedir (24).

Topografik olarak 4 kısma ayrılır.

Fovea: Optik sinir başı merkezinden 4 mm temporal ve 0,8 mm aşağıda yaklaşık 1,5 mm çaplı alandır. Foveada 22 derecelik bir konkavite (clivus) mevcuttur, bu durum 2. ve 3. nöronların yana itilmesine bağlıdır.

Foveada ortalama retina kalınlığı 0,25 mm' dir ve arka kutuptaki retina kalınlığının yaklaşık yarısıdır. Foveada ganglion hücre, sinir lifi ve iç pleksiform tabakalar yoktur. Fovea kenarında iç nükleer tabaka iki sıra hücre şeklinde azalır. Santral foveadaki 0,57 mm çapındaki bölgede yalnızca koniler bulunmaktadır. Bazal membran kalınlığı konkavitenin kenarına doğru artmaya başlar ve fovea kenarında da en yükseğe ulaşır.

Foveola: Sadece konilerin bulunduğu 350 μ çapında ve 150 μ kalınlığında fovea çukurluğudur. İç nükleer tabaka seviyesindeki kapillerlerin oluşturduğu bir halka ile çevrelenen 250-600 μ genişliğindeki foveolar avasküler zon oluşur.

Umbo adı verilen 150-200 μ çapındaki foveolanın merkezinde en keskin görme sağlanır. Bu bölgede koni dansitesi yüksektir, milimetre karede 385000 koni mevcuttur.

Foveolada 1. ve 2. nöronlar kenara itildiğinden dış pleksiform tabakadaki lifler iç nükleer tabakayı oluşturan hücrelerin uzantıları ile sinaps yapmadan önce iç limitan membrana paralel seyrederek. Yani bu bölgede dış pleksiform tabakaya ait hücresel uzantıların horizontal seyri ile Henle tabakası oluşur.

Parafovea: Foveayı çevreleyen 0,5 mm genişliğindeki bölgedir. İç retina tabakasında, özellikle iç nükleer ve ganglion hücre tabakasında belirgin artış ile karakterizedir. Bu mesafede 4-6 tabaka ganglion hücreleri ve 7-11 tabaka bipolar hücreler ile retinanın normal yapısı gözlenmektedir. Sinir lifi tabakası özellikle nazal kenar papillomakuler demette relatif olarak kalındır. Koni-basil oranı 1:1' dir.

Perifovea: Makula bölgesinin parafoveayı çevreleyen 1,5 mm genişliğindeki periferik zonudur. Çok sayıda ganglion hücre tabakası ve 6 kat bipolar hücre tabakası içerir. Fovea merkezinden 2,75 mm mesafeye uzanır ve diğer periferik retinada olduğu gibi ganglion hücre tabakası tek nükleuslu tabaka halindedir. Bu bölgede koni-basil oranı 1:2' dir (24).

b. Ekvator

Basillerin çoğunlukta olduğu makula ile ora serrata arasında kalan bölgedir (28). Ekvator ora serratanın 6-8 mm posteriorunda, makulanın 18-20 mm anteriorundadır (24).

c. Ora Serrata

Retina ile siliyer cisim arasındaki sınıra dişli görünümü nedeniyle ora serrata denir (29). Bu dişli süreçler üst nazalde en fazladır ve alt nazal, üst temporal ve alt temporal kadranslara doğru gittikçe azalır.

Ora serrata temporalde nazal kadrana göre daha arkadadır ve nazalde 0,7-0,8 mm, temporalde ise 2,1 mm genişliğindedir. Nazalde limbusun 6 mm arkasında, temporalde de 7 mm arkasındadır.

Limbusun 7,7 mm gerisinde insersiyonu olan üst rektus haricindeki rektus kasları insersiyon yerleri ora serrata yakınındadır. Ora serratanın optik sinire olan ortalama uzaklığı nazalde 27 mm, temporalde 32,5 mm, üst ve altta 31 mm' dir (24).

Ora serratada fotoreseptörler yok olmuşlardır (28).

2.1.2. Retina Kan Dolaşımı

Retinanın iç kısmı oftalmik arterin ilk dalı olan santral retinal arter ve dalları ile beslenirken, dış pleksiform tabakaya kadar uzanan dış bölgesi koryokapillaris ile koroidal dolaşım tarafından beslenir. Retina kapillerleri çoklu arteriyoler bağlantılar içerir ve sinir lifleri katındaki yüzeyel ağ ve iç nükleer kattaki intraretinal ağ olmak üzere iki kat oluştururlar. Kapillerlerde endotel hücreleri düzenli bir dizilim gösterir ve terminal bağlarla birbirine bağlanarak kan-retina bariyerini oluştururlar. Bazal membranları ile endotel hücrelerden ayrılan perisit adındaki intramural hücrelerin de kan-retina bariyerinin korunmasında önemli rolleri vardır.

Retina arterlerinin dağılımını izleyen venler az miktarda bağ doku ile desteklenen bir endotel katından oluşurlar. Santral retinal ven arterin girdiği yerden optik siniri terk eder.

Posterior siliyer arterlerden gelen siliyoretinal arterler optik sinir kenarından çıkarak makulaya doğru uzanır (27).

2.1.3. Retinanın Tabakaları

Retinada dıştaki koroidden içteki vitreye kadar on tabaka mevcuttur:

- a. Retina pigment epiteli
- b. Fotoreseptör tabakası
- c. Dış limitans zarı
- d. Dış nükleer tabaka
- e. Dış pleksiform tabaka
- f. İç nükleer tabaka
- g. İç pleksiform tabaka
- h. Ganglion hücreleri
- i. Sinir lifleri tabakası
- j. İç limitans zarı

a. Retina Pigment Epiteli (RPE)

Retina pigment epiteli (RPE) duysal retina ile Bruch membranı arasında yerleşmiş olup tek sıra küboidal hücrelerden oluşmuştur. Tek sıra halindeki yaklaşık 5 milyon pigment hücresi bazal laminaya sıkıca tutunmuştur. Retina pigment epiteli başlıca dış kan-retina bariyerinden sorumlu olmakla birlikte birçok farklı fonksiyonlara sahiptir. Pigment epitelinin yerine getirdiği görevlerin başında fotoreseptörlerin dökülmüş olan dış segmentlerinin fagosite edilmesi, retinol metabolizması, ekstrasellüler matriksin düzenli olarak oluşturulup yerinde kalması, iyon ve metabolit naklinin düzenlenmesi gelmektedir (1,2). Erişkin gözünde normalde RPE içinde mitotik aktivite bulunmamaktadır. RPE hücrelerinin yoğunluğu fovea merkezinden perifer retinaya doğru giderek azalır (2). Yaşlanma ile RPE hücrelerinde özel değişimler görülür. Yaş artışıyla apoptotik RPE hücrelerinin oranı artar ve bu apoptotik hücreler başlıca makula bölgesi içindedir. Hücre içinde metabolizma artışı veya sindirilemeyen materyal artar ve bu maddeler Bruch membranında toplanır. Hücre sitoplazmasında ise lipofussin miktarı artar (1-5,7).

Lipofussin pigment epitelinin ikinci en belirgin pigmenti olup doğumdan sonra yaklaşık 16. ayda görülmeye başlar ve fagositoz artıkları ve hücre metabolizmasından geriye kalan artıklardan oluşur. Lipofussin granüllerinin sayısı yaşlanma ile artar. Lipofussin miktarının aşırı artışının YBMD ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. RPE hücresinde lipofussin birikimi en nihayetinde hücre metabolizmasının bozulmasına yol açar. Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinde kayıplar ortaya çıkmakta ve geriye kalan hücrelerin boyutu artmaktadır. Hücrelerin apoptozis ile ölümü çevredeki hücrelerin ölen hücrelerin yerine yayılması ile tamir edilmektedir. Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinin proliferasyon kabiliyeti de azalmaktadır. Tüm bu değişiklikler YBMD patogenezinde yer almaktadır (1-7,9-11).

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, yaşlı popülasyonu etkileyen dünya genelinde temel sosyoekonomik sağlık sorunlarından biridir. Koroidal neovaskularizasyonun (KNV) varlığına göre ikiye ayrılır. Neovaskular YBMD; KNV' ye sekonder makula ödemi ve/veya hemoraji mevcuttur. Nonneovaskular YBMD; retina pigment epitelinde depigmentasyon değişiklikleri, druzen ve/veya coğrafik atrofi mevcuttur. Atrofik tip daha siktir, ancak neovaskular tip daha ciddi görme kaybına yol açar. İlerlemiş yaş, Kafkas ırkı, gen polimorfizmi, yüksek vücut-kitle endeksi, fazla alkol tüketimi ve sigara öyküsü gibi risk faktörleri YBMD gelişmesine ve ilerlemesine yol açar. En önemli risk faktörü ileri yaş iken ikincisi sigaradır. Oksidatif stres yaşa bağlı RPE hücre dejenerasyonu, disfonksiyonu ve kaybında önemlidir (30).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) sigaradaki en önemli toksik bileşimlerden biridir (31). Benzopiren (BP) kültüre RPE' de toksik etki oluşturan bir PAH tipidir. Mitokondriyal DNA hasarına ve lizozomal aktivite artışına, reaktif epoksit oluşumuna (32) ve insan RPE hücrelerinde kaspaz-aracılı hücre apoptozuna sebep olur. RPE' deki hücresel biyolojik süreçlerin değişmesi sigara içenlerde druzen oluşmasına katkı yapar (16).

Retina pigment epiteli (RPE) Bruch membranı ile sensöriyel retina arasında yerleşmiştir. Yaklaşık 5 milyon pigment hücresi bazal laminaya sıkıca tutunmuştur. Tek sıra küboidal hücrelerden oluşmuştur. Fotoreseptörler ve zengin damar ağından oluşmuş koryokapillaris arasında konumlanmıştır (33).

Görme sisteminin devamlılığı ve bütünlüğünün korunmasında birçok önemli göreve sahiptir, bunların başında fotoreseptörlerin dökülmüş olan dış segmentlerinin fagosite edilmesi, retinol metabolizması, ekstrasellüler matriksin düzenli olarak oluşturulup yerinde kalması, iyon ve metabolit naklinin düzenlenmesi gelmektedir. Normal bir erişkin gözünde RPE içinde mitotik aktivite mevcut değildir. Hücre büyüklüğü 10 µm ile 60 µm arasında değişir. RPE hücreleri fovea merkezinde en yoğundur ve perifere doğru gidildikçe hücre yoğunluğu azalır. RPE tabanı alttaki Bruch membranına sıkı yapışıklık gösterirken apeksi fotoreseptörlerin dış segmentleri ile yüz yüzedir. RPE bazal membranı Bruch membranının en iç tabakasına karşılık gelir (34).

Retina ve RPE potansiyel bir aralık olan subretinal boşluk ile ayrılmışlardır. Apikal hücre membranı 3-7 µm uzunluğunda çok sayıda mikrovillüs ile karakterizedir. Villüsler fotoreseptörlerin dış segmentleri ile parmaklı bağlantılar oluşturur. Retina ve RPE arasında sıkı kavşak bağlantıları olmadığı için bu yapılanma retina ve RPE arasındaki anatomik olmayan yapışıklığın sürdürülmesinde önemli etkidir. Retina-RPE temasının devamını sağlayan diğer etken ise ekstrasellüler matriks ve RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden salınan nöral hücre adezyon molekülüdür (N-CAM). Ekstrasellüler matriks içinde laminin ve fibronektin gibi adezyon moleküllerinin bulunmaması ve anatomik bağlantının olmaması nedeni ile patolojik durumlarda sensöriyel retina pigment epitelinden kolayca ayrılabilir. RPE hücreleri apikal membranında yerleşik olan $Na^+/K^+/ATP$ az pompa sistemi RPE tarafından koroide olan aktif sodyum akımında kritik rol alır (35). RPE hücrelerinin lateral yüzleri zonula okludens ve zonula adherens kavşakları ile birbirine sıkı bir şekilde yapışmıştır. Bu kavşaklar makromoleküllerin koryokapillaris ile yer değiştirdiği alan olan subretinal aralığı geçişlere kapatır ve Verhoeff membranı adını alır (36,37). Bu bağlantı sayesinde yüksek transepitelial direnç ve kan retina bariyeri oluşur. Bu bağlantı moleküllerinin bazıları koroidden dış retina katlarına besin taşınması ve aksi yönde su, iyon ve atıkların atılmasından sorumludur. Bazolateral hücre membranlarında da bulunan Gap kavşakları hücreler arası iyon ve metabolit değişiminde görev yapar (38-40). Retinanın RPE ile olan yapışıklığı aktif ve pasif olan güçler tarafından sağlanır ve devam ettirilir. Vitreus jelinin endotamponat sağlaması, transretinal sıvı gradienti, fotoreseptörler arası madde ve koroidin osmotik

basıncı pasif güçleri oluşturur. RPE apeksinde yerleşik $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ pompası ve sekonder olarak HCO_3 transport sistemi ile subretinal boşluktan su ve elektrolitleri aktif olarak dışarı pompalayarak retinanın yatışıklığını devam ettirir. RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden salınan N-CAM da retinal yatışıklığın sağlanmasına katkıda bulunur (40).

b. Fotoreseptör Tabakası

Birinci nöron olan 130 milyon basil ve 7 milyon koni hücrelerinin dış segmentleri tarafından oluşturulmuştur. Dış segment, fotoreseptörlerin RPE ile dış limitans zarı arasındaki kısımdır. Koni ve basil hücrelerinin dış segmentleri mukopolisakkarid bir örtüyle kaplıdır ve pigment epiteli ile temas halindedir (28).

c. Dış Limitans Zarı

Koni ve basillerin dış ve iç segmentlerinin arasından geçer. Gerçek bir zar değildir. Fotoreseptörlerin iç segmentleriyle Müller hücrelerinin dış uzantılarının aralarındaki bağdan oluşmuştur (28).

d. Dış Nükleer Tabaka

Fotoreseptörlerin çekirdek ve sitoplazmalarının bulunduğu bölgedir.

e. Dış Pleksiform Tabaka

Birinci nöron fotoreseptörler ile bipolar hücrelerin arasındaki sinapsların bulunduğu bölgedir. Normal retinada kalınlığı 2μ olmasına karşılık, fovea çukurluğunun kenarında 50μ u bulur. Foveada konilerin önünü serbest bırakmak için kenarlara çekilerek Henle katını oluştururlar.

f. İç Nükleer Tabaka

İkinci nöron bipolar hücreleri, bağlantı hücreleri, amakrin ve horizontal hücreler ile destek hücreleri Müller hücrelerinin çekirdeklerinin bulunduğu bölgedir.

g. İç Pleksiform Tabaka

Foveolada bulunmayan iç pleksiform katı ikinci nöron bipolarlar ile üçüncü nöron ganglionlar ve amakrin hücreleri arasındaki sinapsların bulunduğu bölgedir.

h. Ganglion Hücreleri

Üçüncü nöron olan ganglion hücreleri katıdır. Foveolada bulunmaz. Merkezdekiler küçüktürler ve dendritleri konilerle sinaps yapan bir bipolar hücreyle sinaps yaparlar. Periferdekiler daha büyüktürler ve birkaç bipolar hücreyle sinaps yaparlar.

i. Sinir Lifleri Tabakası

Korpus genikulatum lateralede sonlanan 1,2 milyon dolayındaki ganglion hücresi aksonları, sinir lifleri katını oluşturur. Ayrıca retina arter ve venleri, astrositler, mikroglial hücreler ile oligodendrositler de vardır.

j. İç Limitans Zarı

Retinanın en iç katıdır, retinayı vitreden ayırır (28).

2.1.4. Kan-Retina Bariyeri ve Transepitelial Transport

RPE hücreleri dış kan retina bariyerini oluşturur, fenestre koryokapillaris ve dış retina katları arasındaki sıvı ve molekül alışverişini kontrol eder. Bu durum RPE hücreleri arasındaki sıkı kavşak-bağlantı kompleksleri ve RPE membran proteinlerinin polarize dağılımı sayesinde olur. Kavşak bağlantıları zonula adherens, gap kavşakları ve zonula okludensten oluşur. Hücreler arası sıvı difüzyonunu sıkı bağlantılar tarafından engellendiği için molekülerin yer değişimi bizzat RPE hücrelerinin içinden gerçekleşir. RPE hücrelerinin apeksindeki mikrovillüsler ve tabanındaki plazma membran katlantıları hücrenin yüzey alanını oldukça genişletir ve besin ve katabolitlerin değişimi görevinde önemli rol oynar (41,42).

Retinanın yatışık kalmasında RPE hücrelerinin subretinal boşluktan sıvıyı çektiklerinde gelişen emme mekanizması rol oynamaktadır. Su ve elektrolitlerin subretinal aralıktan dışarıya aktif olarak pompalanması $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ pompası ve HCO_3^- transport sistemi ile gerçekleştirilir. Akuaporin insan RPE hücresinde bulunmakta ve tek sıra RPE içinden suyun transportunu kolaylaştırmaktadır (41,43-45). RPE apikal yüzünde yerleşik olan $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ sodyum ve potasyum iyonlarının plazma membranından geçişini kontrol eder ve fotoreseptörler arası

madde de bu iyonların dengede kalması ve membran potansiyellerin oluşmasını sağlar (46-48).

Güneş ışını subretinal boşluktaki K^+ konsantrasyonunu azaltır. Bu durum $Na^+/K^+/ATPaz$ aktivitesini değiştirir ve sonucunda da RPE hücrelerinin transport fonksiyonu etkilenmiş olur (41).

2.1.5. Görsel Döngü ve Vitamin A Metabolizması

Fotoreseptör dış segmentlerinin disk membranlarında ışığa duyarlı pigmentlerin fotolizi ile görme başlar ve rejenerasyonu ile devam ettirilir. Döngü süreci fotoreseptörler ve RPE arasında retinoidlerin yer değiştirmesine bağlıdır. Işığa duyarlı görme pigmentlerinin tümünün içeriğinde A vitamini yer almaktadır. Üç adet sitozolik retinoid-bağlayıcı protein bulunur. Bunlar all-trans-retinol için hücrel retinoid-bağlayıcı protein (CRBP), 11-cis-retinal için hücrel retinaldehit-bağlayıcı protein (CRALBP) ve all-transretinol için yüksek afinitesi olan RPE65 proteindir (retina pigment epitel duyarlı protein 65kDa) (9,49).

Kandan retinolün alınması ve fotoreseptörler ile RPE arasında retinolün değişimi için transport mekanizmaları kullanılır. Plazma membran reseptörüne bağlanan retinol esterifiye olur ve buradan CRBP' ye transfer olur. CRBP ve CRALBP pigment epiteli içinde retinoidlerin taşınmasında görev alırlar. RPE içindeki CRBP hücre içine alınan retinolu inter-fotoreseptör matriksi içine bırakır. Retinol inter-fotoreseptör matriksi içinden fotoreseptörlere ulaşır. İnter-fotoreseptör retinoid bağlayıcı protein (IRBP), 11-cis-retinaldehidin RPE içinden fotoreseptörlere transferi ve all-trans-retinolün retinadan RPE içine transferinde aracı olarak çalışır (9).

2.1.6. Fotoreseptör Dış Segmentlerinin Fagositozu

RPE hücrelerinin fagositozunda yabancı maddelerin fagositozunda etkili olan yavaş ve nonspesifik yöntem ve dökülmüş olan dış segmentlerin hızlı ve reseptör aracılı alınmasında etkili olan yöntemler mevcuttur. Bu sayede diurnal olarak dökülen fotoreseptörlerin dış segmentleri distal uçları yenilenebilmektedir.

İnternalizasyon basamağı ile hücre içine alınan segmentlere sindirici enzimler içeren lizozomlar yapışarak fagolizozomlar oluşur ve fagolizozom içinde hapsedilmiş olan dış segmentleri hidrolize edilerek küçük moleküllere dönüştürülür. Ortaya çıkan bu küçük moleküller hücre içine dağılarak tekrar kullanılırlar. Sindirilemeyen materyal ise hücre içinde birikip birleşerek lipofussin granüllerini oluşturur. Bir grup antioksidan enzimler bu degradasyon süreci esnasında meydana gelen reaktif oksijen ara ürünlerinin etkilerinden RPE hücrelerini korur (50-54).

2.1.7. Fotooksidasyona Karşı Koruma

Retina vücudun nispeten en çok oksijen tüketen ve neticesinde yüksek oranda reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna yol açan bir dokudur. Yüksek oksidatif stresin dengelenmesinde RPE hücreleri kritik öneme sahiptir. RPE’ de bulunan melanin ve lipofussin gibi pigmentler farklı dalga boylarına ve özel dalga boyuna bağlı risklere karşı özelleşmişlerdir. RPE hücreleri enzimatik antioksidan olarak yüksek oranda süperoksit dismutaz ve katalaz, non-enzimatik antioksidan olarak da lütein, zeaksantin veya askorbat gibi karotenoidleri içerir. Antioksidan savunma sistemine glutasyon ve melaninin de ciddi katkısı mevcuttur (55).

RPE hücreleri sağladığı pasif bariyer yanında transforming-growthfactor-beta (TGF- β) gibi bağışıklık baskılayıcı sitokinleri de aktif olarak sekrete eder. Enflamatuar bir cevap varlığında, RPE enflamatuar mediatörlerin faaliyetini engelleyebilir. RPE hücreleri aktif olarak tumor necrosis factor alfa (TNF- α) reseptörleri sekrete eder ve lokal olarak TNF- α etkisini inhibe edebilir. Gözün immün ayrıcalıklı bir alan olarak kalmasında hangi mekanizmaların rol oynadığı tam olarak bilinmese de RPE hücrelerinin önemli bir rol üstlendiği açıktır (9,41).

2.1.8. Büyüme Faktörleri ve Sitokinler

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

(PEDF), retina ve koryokapillarisin yapısal bütünlüğünün devamına yardım eder. RPE tarafından sentezlenen ve düşük konsantrasyonda sekrete edilen diğer bir vazoaaktif faktör olan VEGF endotelyal hücre apoptozisini önler ve koryokapillarisin sağlam endotele sahip olması için gereklidir. Apolipoprotein A-1 (ApoA1) tüm retina katlarında bulunmakla beraber ana kaynağının RPE olduğu düşünülmektedir. ApoA1 retinayı oksidatif stresten korur ve lipotoksisiteyi engeller veya duraklatır (56-59).

2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ve negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir (60,61). Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler (62,63). Her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü arttırdığından dolayı serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (64-67). O₂ yapısı gereği radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla reaktif oksijen türleri (ROT) ifade edilmektedir. Organizmada normal şartlar altında ROT ve serbest radikaller devamlı oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar (68). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (69).

Serbest radikaller fizyolojik olarak endojen kaynaklı indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında fazlaca üretilir. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı (parasetamol, nitrofurantoin gibi), solventler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler (67,70,71).

Serbest radikaller vücutta 3 yolla meydana gelir:

1. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur (67,72).

2. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. O_2' in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin (O_2^-) oluşumuna neden olur (73).

3. Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, iki adet reaktivite düzeyi yüksek serbest radikal oluşur (63).

Bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal olmayan türler radikal haline gelir (74). Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (67,69,72). Organizmada oluşan serbest radikallerin en önemlileri ve büyük kısmı O_2 kaynaklı radikallerdir (75). O_2' in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür (76). O_2' in kısmi indirgenmesinden, ROT arasında yer alan $\cdot OH^-$ ve $O_2^- \cdot$ oluşmaktadır. Ayrıca O_2 ve H_2O_2 molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (77).

2.3. Antioksidanlar

İmmün sistem hücrelerinin (nötrofil, makrofaj gibi) savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gereklidir, ancak radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (73). ROT' un yarı ömürleri kısadır fakat başlattıkları serbest radikal zincir reaksiyonları ile doku hasarına sebep olmaktadır

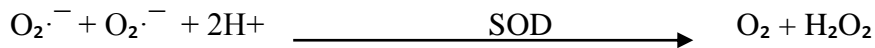
(78). Savunma mekanizmaları serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, onarım mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (67,73).

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere ‘antioksidanlar’ denir (79). Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir. SOD’ un yapısında bakır (Cu), çinko (Zn) ve manganez (Mn), GSH-Px’ de ise selenyum (Se) iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar (80-82). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise C ve E vitaminleri, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β-karoten sorumludur. SOD, GSH-Px ve KAT enzimlerinden ayrı olarak C ve E vitaminleri de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir (83). Her ikisi de hücre membranlarındaki lipid peroksit (LPO) zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (73,79,84).

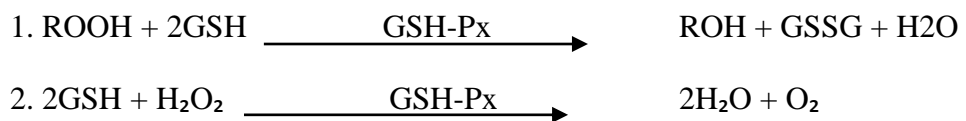
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Başlıca antioksidan enzimler: SOD, KAT ve GSH-Px’ dir (85).

Süperoksit Dismutaz (SOD): $O_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. SOD, hücrelerdeki $O_2^{\cdot-}$ düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir $O_2^{\cdot-}$ radikalini yükseltirken, diğer $O_2^{\cdot-}$ radikalini H_2O_2 ’ e indirger (86).



Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px): Glutatyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H’ a bağımlıdır (78).



GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) indirgerken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldıracak özelliğine sahiptir (66). Selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere farklı substratlar kullanan iki tip GSH-Px vardır. Selenyumdan bağımsız formu organik H_2O_2 moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (65).

Fagositik hücrelerde majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev yapan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Endoplazmik retikulumdan salınan H_2O_2 ' nin dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GSH-Px aktivitesindeki azalma, H_2O_2 ' nin artmasına ve hücrede şiddetli bir hasara yol açmaktadır (78). Ayrıca GSH-Px, araşidonik asit metabolizmasının iki temeli olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarının aktivasyonunu arttırarak, tümör oluşumunda anahtar rol oynar.

Glutasyon (GSH): GSH, sistein içeren bir tripeptit yapısında olup in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve ekzojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (79). GSH, DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkindir; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar (87).

2.4. Hücre İçi Kalsiyum (Ca^{+2}) Sinyali

Hücre içi ikincil haberci olan kalsiyum fertilizasyondan başlayarak gen transkripsiyonu, kas kasılması, hormon salınımı, öğrenme, hafıza, hücrelerin farklılaşması ve gelişmesi, nekroz ve apoptozla tanımlanabilecek hücre ölümü gibi birçok olaydan sorumludur. İstirahat halindeki bir hücrede $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu yaklaşık olarak 100 nM civarındadır. Depolarizasyon, hormon aktivasyonu vb

olaylar hücredeki $[Ca^{+2}]_i$ artış mekanizmalarını tetikler ve $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu 1–3 μM seviyesine yükselebilir.

Ca^{+2} un sinyal üretimine yönelik fonksiyonu sitozolik miktarının artması ile doğru orantılıdır (88-91). Bu artış nukleusdan sızma yolu ile olabileceği gibi sadece mitokondriden tek başına da olabilir (92). Hücre içerisindeki kalsiyum konsantrasyonu, eş zamanlı birçok ters yönlü (counteract) etkileşim neticesinde artabilmekte veya azalabilmektedir. Ca^{+2} konsantrasyonu artış mekanizmaları hücre dışından hücre içerisine yönelik, hücre zarına yerleşik vaziyetteki iyon kanalları ile ve endoplazmik retikulum (ER) ve sarkoplazmik retikulum (SR) yüzeyindeki iyon kanalları vasıtası ile olmaktadır (93). Buna zıt olarak Ca^{+2} konsantrasyonu da hücre zarında ve ER/SR’ deki istihdam edilen $Ca^{+2}/ATPaz$ ’ lar, yoğunluk farklılığından kaynaklanan ve enerji harcanması ile neticelenen bir takım değiş-tokuş mekanizmaları (Na^+/Ca^{+2}) tarafından sağlanır. $[Ca^{+2}]_i$ seviyesinin düzenlenmesinde mitokondri önemli rol oynar.

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

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

Depolanmış Ca^{+2} miktarına duyarlı (Storeoperated Ca^{+2} channels / SOCCs)

Reseptöre duyarlı Ca^{+2} kanalları (Receptoroperated Ca^{+2} channels / ROCCs)

Voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları (Voltageoperated Ca^{+2} channels / VOCCs)

Mekanik olarak aktive olan Ca^{+2} kanalları (Mechanicallyactivated Ca^{+2} channels) başlıkları altında sınıflandırılabilirler (89).

2.4.2. Hücre İçi Depolardan Ca⁺² Salınımı

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

a) Ins (1,4,5) P3

b) siklik ADP riboz (cADPR)

c) nikotikasidadenindinükleotit fosfat (NAADP) ve

d) sfingozin-1-fosfat (SIP) gibi hücre içi depoların üzerine yerleştirilmiş Ca⁺² salınım kanallarını uyarması sonucu gerçekleşir (94,95).

2.4.3. Ryanodin Reseptörü (RyRs) Aracılı

Hücre zarında bulunan reseptöre has birçok hormon ve büyüme faktörü ile fosfolipaz C(PLC)' nin aktive olmasına neden olur. PLC' de fosfatidilinositol 4,5-bifosfat' ın hidrolizini katalize ederek hücre içi haberci olan inositol 1,4,5-trifosfat (InsP3) ve diaçilgliserolun oluşmasına neden olur. InsP3 sitoplazma içerisinde çok hareketli bir durumdadır ve ER/SR üzerindeki özel reseptör bölgelerine karşılaştığı yerde bağlanır. Bu bağlanma olayı InsP3Rs' nin konformasyonunda değişikliğe neden olur. Bu da ER/SR içerisindeki yüksek konsantrasyonda depolanmış Ca⁺² un sitoplazma içerisine salınmasına neden olur (moleküler ağırlığı ~1200 kDa) (96).

2.4.4. Sfingolipid Aracılı

Sfingosilfosforilkolin (SPC) ve sfingosin-1-fosfat (S-1-P) gibi endoplazmik retikulumdaki (SCaMPER) Ca⁺² salınım kanallarını aktive eden bir sfingolipid türevidir.

proteindir. Kalp kası, pankreas ve karaciğer gibi farklı dokularda bulunabilen, InsP₃Rs veya RyRs' den daha düşük molekül ağırlığına sahiptirler (~20 kDa) (96).

2.5. Hücre İçi Ca⁺² Salınım Habercileri

2.5.1. Inositol-1,4,5-trifosfat

Hormon veya büyüme faktörlerinden herhangi birisi hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlandığında PIP₂' den PLC vasıtası ile InsP₃ sentezlenir. PLC hem diaçilgliserol hem de InsP₃ düzeylerinde yükselmelere neden olur ve bu yükselmeye protein kinaz C' nin aktive olmasına neden olur. InsP₃ hücre zarında üretilmesiyle birlikte yayılabilme özelliği yüksek olan bir maddedir. Bu özelliği ile hücre sitoplazmasından hızla geçebilir (93).

2.5.2. cADPR ve NAADP

Bu iki molekül aynı enzimatik yolak tarafından üretilmelerine rağmen, farklı mekanizmalarla hücre içi Ca⁺² salınımına neden olmaktadır (97).

Siklik ADP riboz (cADPR) RyRs aracılığı ile Ca⁺² salınımına neden olmaktadır. cADPR'nin bu etkisi NAD⁺ türlerinin deniz kestanesi yumurtaları üzerinde Ca⁺² salınım metabolizmasına etkisinin araştırıldığı dönemlerde bulunmuştur. cADPR β-NAD⁺'den ADP-ribozilsiklaz tarafından sentezlenmektedir (97). Memeli hücreleri ADP ribozilsiklazın hem sentez hem de hidrolizinde görev alan CD-38 maddesini içerirler. CD-38 bileşiğinde de β-NAD⁺'dan cADPR sentezlenmesini veya NADP' den NAADP sentezlenmesini sağlar. Ancak bu olay ekstrasellüler olarak gerçekleşmektedir.

2.6. Sigara Dumanı

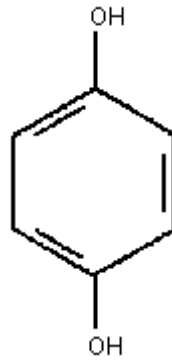
Benzen çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. Reçine, plastik, boya ve deterjan üretimi için endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Hidrokuinon (HQ) benzenin

primer oksidatif metabolitidir. Bundan dolayı HQ' a maruziyet kolay ve yaygındır (98).

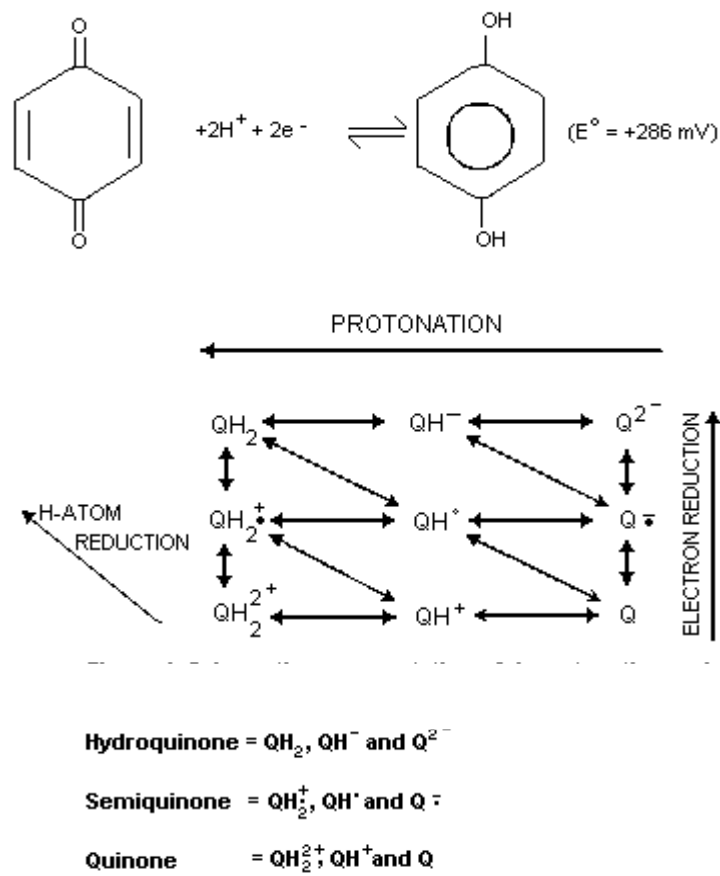
Benzen ve HQ aynı zamanda sigara dumanında fazla miktarda bulunmaktadır ve HQ en fazla miktarda bulunan komponenttir (99). Dolayısıyla HQ sigara içmeyenleri de etkileyebilir. Arbutin formunda diyetsel maruziyet, deri-beyazlatma ajanı (hipermelanososis, vitiligo, cafe-au-spotları tedavisi için) olarak dermal maruziyet olabilir.

HQ in vitro DNA hasarına sebep olur. DNA ve proteine bağlanabilme özelliği vardır ve oksidatif stresi uyarır, apoptozisi tetikler (100-102). HQ karaciğer ve belki başka organlarda benzenin sitokrom p450s aktivitesini kapsayan multi-step bir süreç sonucu oluşur. HQ kemikliğine geçebilir ve burada otooksidasyona uğrayabilir ve myeloperoksidaz (MPO) tarafından daha yüksek toksisiteye sahip kuinon haline okside olabilir (103).

Hidrokuinon (HQ) temelde beyaz renkli bir toz halinde bulunan, erime noktası yaklaşık olarak 173-174 °C olan kristal yapıda bir moleküldür. HQ yaygın bir şekilde indirgeyici bir ajan olarak kullanılmaktadır. HQ' un moleküler yapısı Resim 1' de gösterilmiştir (104). Polimer ve antiozonan üretiminde sanayide kullanılan HQ tütün mamülleri dumanında yüksek oranda (~%30) bulunmaktadır. HQ deriye kıyasla memeli trakeası ve bağırsaklarından hızlıca emilme özelliğine sahip bir moleküldür. Merkezi sinir sistemi (MSS) aşırı uyarılabilirlik, tremor, kasılma ve koma sonucu ölümün olduğu yapılan deney hayvanı çalışmalarında da tespit edilmiş olup istenmeyen yan etkiler arasında gösterilmektedir. Bununla birlikte subkutan olarak enjekte edilen HQ' nun doğurganlık oranını önemli düzeyde azalttığı, erkek ratlarda da kısırılığı tetiklediği gözlemlenmiştir. Yukarıda belirtilen araştırmaların sayısının literatür taramalarında çok fazla olduğu belirlenmiştir. HQ bu yan etkilerini temelde redoks sistemi üzerinden gerçekleştirmekte ve indirgenme reaksiyonlarının hızını artırarak normalde çok da aktif olmayan moleküllerde bile tepkimeye girerek elektron kaybetmelerine neden olması neticesinde kararsız molekül sayısını hızlı bir şekilde yükseltmektedir (Resim 2) (104). Bu sayede serbest radikal sayısı da orantılı olarak artmaktadır. O₂⁻ ve OH⁻ en iyi bilinen serbest radikaller arasındadır.



Resim 1. Hidrokuinonun moleküler yapısı (1,4-benzenediol; $C_6H_4(OH)_2$)



Resim 2. HQ'nun redoks sistemi üzerindeki etkinliği ve indirgenme reaksiyonları. Elektron koparma ve serbest radikal üretimi yolağı göstermektedir.

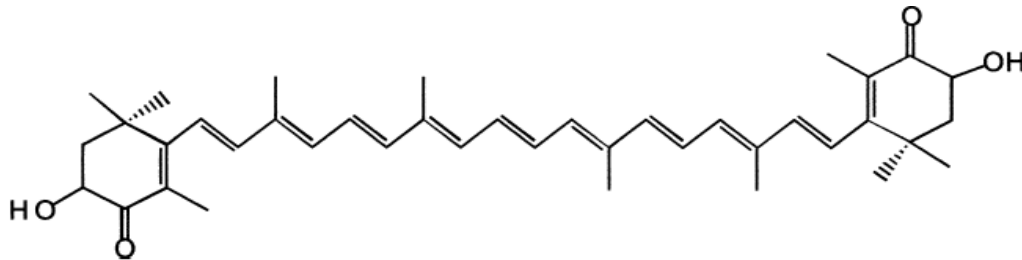
2.7. Astaksantin

Astaksantin (AST) sıklıkla deniz ürünlerinde (özellikle somon balığında) bulunan pembe-turuncu renkli bir karotenoiddir. Temelde karotenoidlerin türevleri olarak adlandırılmaktadır. Bu türevler karotenoidlerin oksijen kazandırılmış

molekülleri olarak da bilinmektedirler. Bitkilerde likopen sentezinde görev aldıkları bildirilmektedir (22). Deniz canlılarında yeteri miktarda gelişebilme ve üreyebilme için gerekli olduğu kanısı öne sürülmüştür. Deniz kabuklularına renk verme özelliğinin yanısıra β -karoten ya da α -tokoferol gibi antioksidan özelliği ispatlanmış moleküllerden bile üstün kapasitede detoksifiye edici bir molekül olduğunun ispatlanması ile dikkat çeker olmuştur (105). AST' in moleküler yapısı Resim 3' te gösterilmiştir (106).

AST özellikle peroksil (ROO) ve alkoksil radikallerine (RO) karşı in vitro ve in vivo güçlü bir antioksidandır (107). Son zamanlarda nanomolar konsantrasyonlarda bile AST' in membran potansiyelini sürdürmede, solunumda, oksidatif şartlara maruz izole mitokondrinin redoks tepkimesinde önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (108). AST göz ve cildi UV ışınlarına karşı korur, immun sistemi güçlendirir, Helicobakter pylori kaynaklı gastrik ülserle karşı korur, kardiyoprotektif etki gösterir ve insan sağlığına daha birçok fayda sağlar (109).

Antioksidan özelliğinin yanısıra güçlü bir antiinflamatuvar ve antikanserojen olarak da nitelendirilmektedir. Son zamanlarda, YBMD hastalarında kullanılan besin takviyelerine antioksidan etki için AST eklenmiştir (23). Ancak, AST' in RPE hücrelerinde sigaranın oluşturduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkinliği bilinmemektedir.



Resim 3. Astaksantin moleküler yapısı

2.8. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROT) olan süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi hemoglobin ve poliansatüre yağ asitleri ile otooksidasyon ile sürekli üretilir. Lipid peroksidasyonu hücre zarı hasarına ve dolayısıyla hücre ölümüne sebep olur. Hücrelerde çeşitli antioksidan mekanizmaları ROT' nin zararlı

etkilerine sebep olur, ancak hipoksiyle antioksidan mekanizmaların verimliliğinin kaybı ve mitokondriyal elektron sisteminde serbest radikal oluşumunda artış olur. Glutatyon peroksidazın (GSH-Px) suyla katalizi hidrojen peroksitin azalmasıyla sonuçlanır. GSH-Px aynı zamanda organik hidroperoksidazı ortadan kaldırabilir.

2.9. Ca⁺² Sinyali ve Oksidatif Stresin Rolü

Hücreler glutamat reseptörleri aracılığı ile uyarıldıklarında Mg⁺² düzeyi azalması ve hücre içi Ca⁺² miktarı artışı gözlenir. Hücre içi Ca⁺² miktarı artışı da NOS (Nitrikoksitsentaz) ve ROT üretimini artırır. ROT ve NOS üretimi ile de uyarılabilir aminoasit ve P substansı üretimi artması ile aşırı duyarlılık ve ağrı oluşturur (110,111). Sitozolda Ca⁺² artışı, mitokondride depolarizasyona ve porların açılmasına sebep olur. Mitokondride oluşan bu patofizyolojik değişiklikler daha fazla ROT ve katyon kanalı açıcı maddelerin (örneğin ADP-riboz) sentezlenmesine neden olur. Bu maddeler ve ROT, voltaja duyarlı Ca⁺² kapıları ve Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM2) kanalları gibi bir kısım katyon kanallarını açar, sonrasında sitozole kalsiyum akışı artar ve mitokondri daha fazla depolarize olur. Mitokondrinin depolarizasyonu katyon kanallarının daha da fazla açılmasına neden olmakta ve bu geri bildirim mekanizması ile hücre fonksiyonlarını kaybetmeye başlamakta ve sonuç olarak da apoptoza sürüklenmektedir (83).

3.MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 1002- Hızlı Destek Programı, 114S969 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Materyal

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

3.2. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

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

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tris, Merck (Almanya)
2. Sodium Chloride, Merck (Almanya)
3. Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)

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

3.3.1. Gruplar

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

Grup II (Hidrokuinon): Bu gruptaki h celer 24 saat boyunca 100 mikrom hidrokuinon ile inkübe edileceklerdir.

Grup III (Astaksantin): Bu gruptaki h celer 24 saat boyunca 200 mikrom astaksantin ile inkübe edileceklerdir.

Grup IV (Hidrokuinon + Astaksantin): Bu gruptaki hücreler önce 24 saat süre ile 100 mikromolar dozda HQ ile sonrasında 24 saat boyunca 200 mikromolar astaksantin ile inkübe edileceklerdir.

3.3.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü

3.3.2.1. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) ve Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay' in (112) bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

1- %10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu

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

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

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (113) tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan Solüsyonlar:

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

2- GSH solüsyonu

3- CHPO (cumene-hidroperoksit) solüsyonu

4- %10 TCA solüsyonu

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

6- DTNB solüsyonu

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

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu	0.3 ml	0.3 ml
CHPO	-	0.1 ml
GSH	0.1 ml	0.1 ml
TCA	1.0 ml	1.0 ml
Tris tampon	2.0 ml	2.0 ml
DTNB	0.1 ml	ml

Deneyin Yapılışı: 0,5 ml (örnek ve kontrole) hücre homojenatına 0,3 ml (örnek ve kontrole) Tris HCl tamponu eklendikten sonra örneğe 0.1 ml.CHPO ilave edildi. Her tüpe 5 sn aralıklarla 0,1 ml (örnek ve kontrole) GSH konuldu. Oda ısısında tam 10 dakika beklendi. Her tüp için 5 sn aralıklarla 1.0 ml (örnek ve kontrole) TCA konuldu. 2500 rpm’ de 5 dk santrifüj edildi. Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı ve üzerine 2.0 ml (örnek ve kontrole) Tris tampon ile 0.1 ml (örnek ve kontrole) DTNB eklendi. Oda ısısında 5 dk beklendikten sonra saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

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

Hücre içi Ca^{+2} salınım miktarının ölçümü için arka kök gangliyon hücreleri 37 °C’de 45 dakika boyunca 4 μ M Fura-2-AM floresan boyası ile boyandı (114). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2x10⁶ olacak şekilde Na⁺- HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometredeki (Varian Cary Eclipse, Sydney, Avustralya) haznesine yerleştirildi. Fura-2-AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm’ de floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile daha önceki yayınlarda (111) belirtildiği şekilde kaydedildi ve Grynkiewicz ve ark.’nın metoduna göre hesaplandı (115).

3.3.4. Lipid Peroksidasyon Analizi

ARPE-19 hücrelerinde lipid peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının (116) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV- 1800, Japonya) yapıldı.

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

3.3.5. Kaspaz -3 ve -9 Aktivitelerinin Tayini

Öncesinde bir saat süre ile 37°C' de 2 mL substrat solüsyonu (20 mM HEPES, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1% CHAPS, 5 mM dithiothreitol (DTT), ve 8.25 µM kaspaz substratı; pH 7.4 olacak şekilde ayarlanacak) içerisinde inkube edilecek hücreler sonrasında ultrasonik parçalama işlemine tabi tutuldu (117). Sonrasında açığa çıkan enzimler spektrofloreometre (Tecan Infinite M200, Avusturya) cihazında 360 nm uyarılma ve 460 nm emilme dalga boylarında okundu. Kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri floresan boyama ile boyanarak değerlendirildi (AC-DEVD-AMC Kaspaz-3 ve AC-LEHD-AMC Kaspaz-9 için). Elde edilen veriler floresan birimi / miligram protein olarak değerlendirildi.

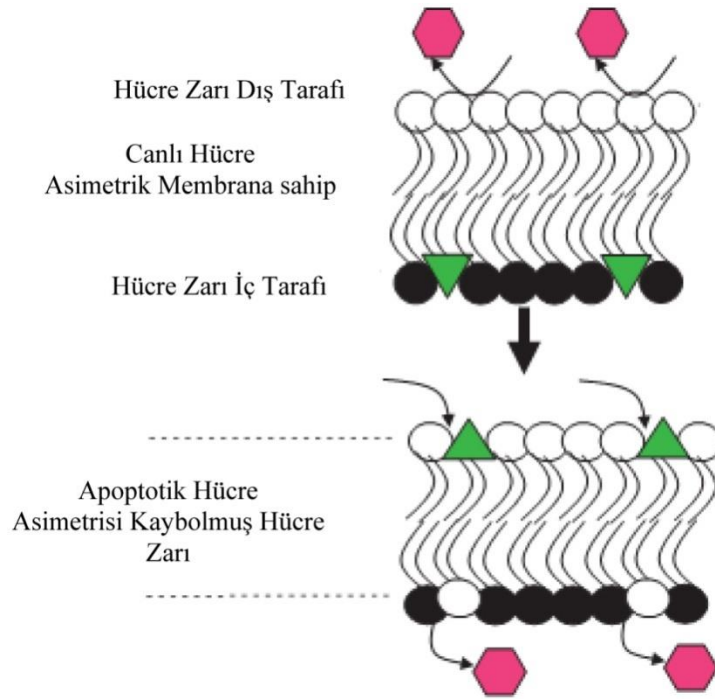
3.3.6. Apoptosis

Uzun süren internal ve eksternal kontrol ve ikinci bir kontrol safhasından sonra hücrenin kendi-kendini imha sürecine girmesine izin verilir. Bir hücrenin erimesi (melt-down) kendi içerisinde oluşan bir durumdur. Bütünlüğü bozulmamış,

sağlam bir hücre zarı içerisindeki interior bileşenler ve yapısal elementlerin parçalanmasıyla hücre erimesi süreci başlatılır. Apoptotik hücre membranları çoğunlukla fosfolipid içeren “bilayer” yapılarını hemen kaybetmezler. Bu korumalı birim bazı yangısal cevaplara sebep olabilecek hücre bileşenlerinin salınmasının önüne geçer. Bu son safhada bütün geri kalan atıklar ve son ürünler bilayer zar ile etrafları kaplanır. Minik boyutlarda paketçikler haline dönüşen apoptotik artıklar fagositoz ve yutma yeteneğine sahip komşu hücreler tarafından toplanır ve sindirilir. Bu nedenle apoptoz diğer hücreler için zararsız bir süreç halini alır. Bu aynı zamanda daimi bir homeostazisin devam ettirilmesi için gereklidir. Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellemesi şekil 1’ de gösterilmiştir (118).

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

Bunun yanı sıra apoptotik süreç kanser gibi birçok hastalığın oluşmasına da yol açmaktadır. Mesela yapısı değişmiş tümör hücreleri kendi apoptotik süreçlerini engellemekte ve hücrenin kontrolsüz bir biçimde faaliyetini sürdürmesine izin vermektedir ya da bunun tersine bazı nöronal hücrelerin aşırı apoptotik faaliyet göstermesi sonucu bunama (demans) gibi durumlar ortaya çıkaabilmektedir.



Şekil 1. Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellemesi (Biocolor, APO Percentage apoptoz kitinden)

3.3.7. ROT Üretimi

ARPE-19 hücreleri 2 μ M dihydorhodamine-123 (DHR-123) ile daha önce anlatıldığı gibi sallamalı su banyosunda 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildiler (116). Bu kimyasal normalde, hücre dışında herhangi bir floresan özellik göstermemektedir. Hücre içerisine girdiğinde rhodamine-123 (Rh-123) bölümü, hücre içerisinde meydana gelen oksidasyon ile aktive olmakta ve floresan özellik göstermektedir. Rh-123 maddesinin oluşturduğu floresan ışık tam otomatik mikropate okuyucu (Tecan Infinite M200) ile gerçekleştirildi. Bu işlem yapılırken eksitasyon dalga boyu 488 nm ve emisyon 543 nm'ye ayarlandı (119). Elde edilen veriler kontrol grubuna kıyasla misli artış/azalış şeklinde ifade edildi (Fold Increase).

3.3.8. Protein Tayini

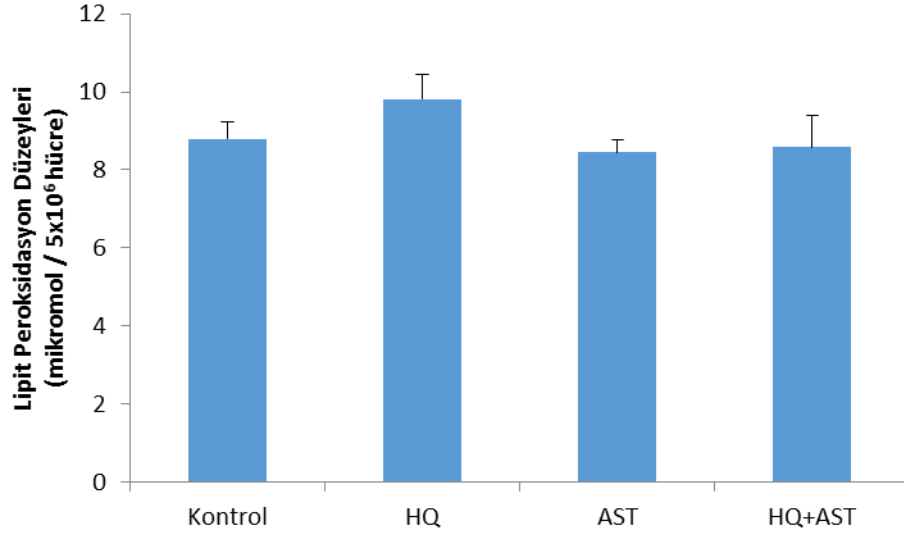
Çalışmamızda yapılan protein tayini deneyleri tüm örneklerde Lowry ve arkadaşlarının (120) tanımladığı yöntemle yapıldı.

3.3.9. İstatistiksel Analiz

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

4. BULGULAR

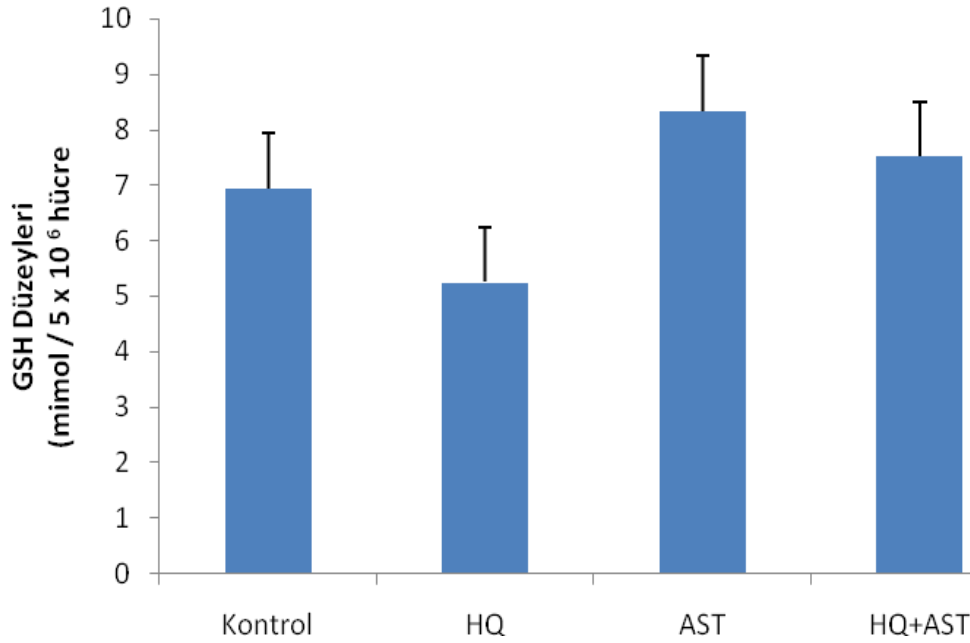
4.1. ARPE-19 Hücrelerinde Lipid Peroksidasyon Düzeyleri



Grafik 1. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında lipid peroksidasyon düzeylerine etkileri

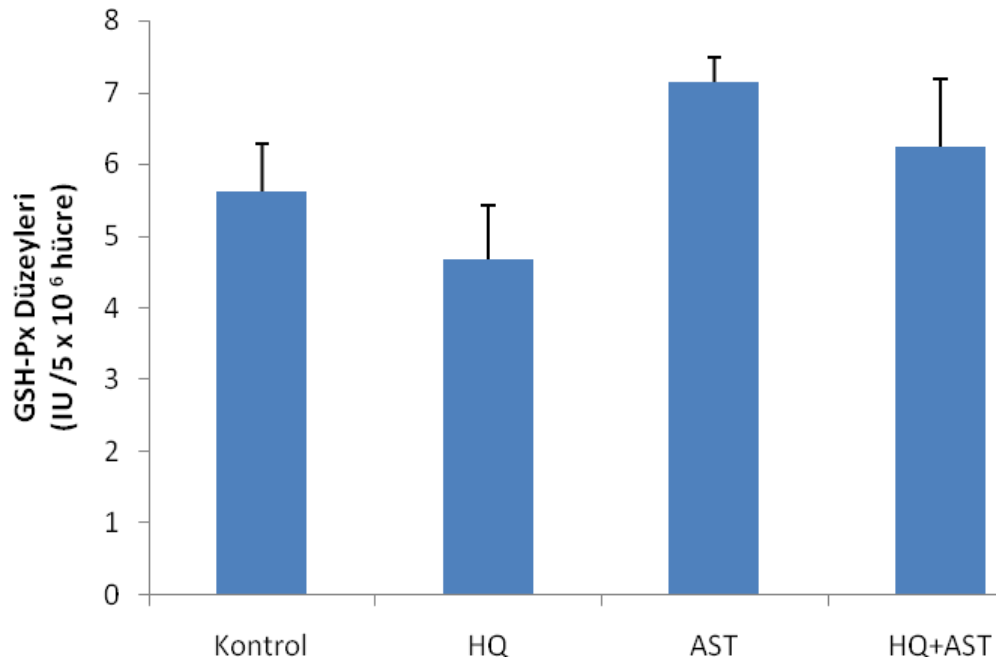
Lipid peroksidasyon düzeyleri Grafik 1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde lipid peroksidasyon düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla HQ grubunda istatistiksel olarak artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). ARPE-19 hücreleri AST ile HQ ve AST gruplarında kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişiklik olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$).

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



Grafik 2. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında GSH düzeylerine etkileri

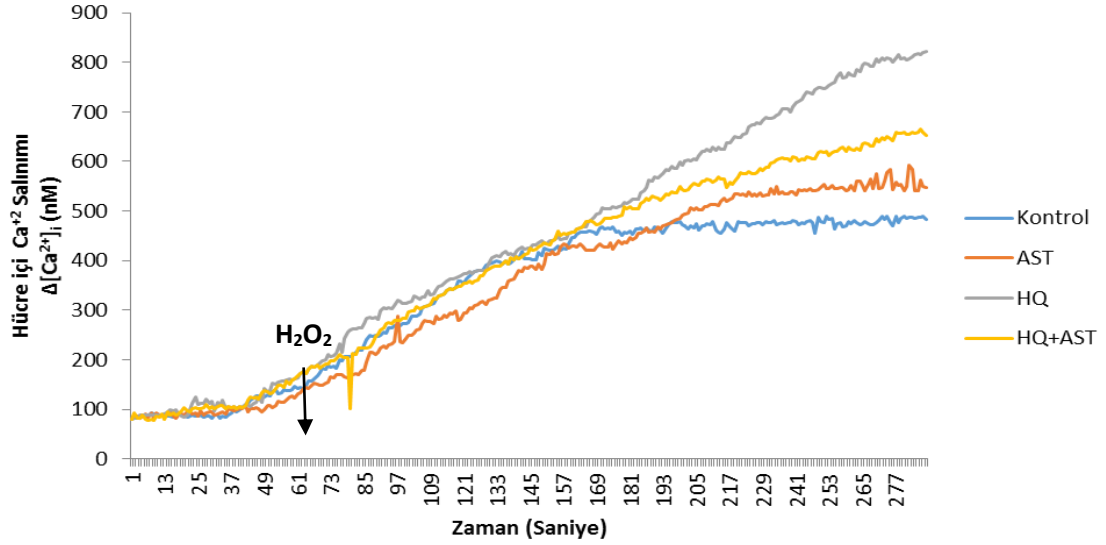
GSH düzeyleri Grafik 2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde GSH düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla AST grubunda istatistiksel olarak arttığı, HQ ve AST grubunda ise önemli düzeyde artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). ARPE-19 hücreleri HQ ile inkübe edildiğinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$).



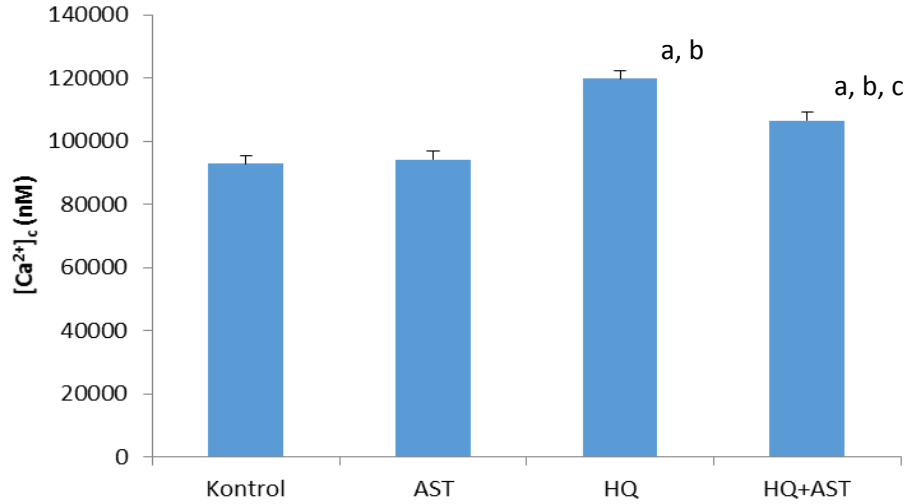
Grafik 3. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında GSH-Px düzeylerine etkileri

GSH-Px düzeyleri Grafik 3'te gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde GSH-Px düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla AST grubunda daha fazla olmakla birlikte HQ ve AST grubunda da istatistiksel olarak artış olduğu gözlenirken ($p < 0.05$) HQ grubunda azalma olduğu gözlemlendi ($p > 0.05$).

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



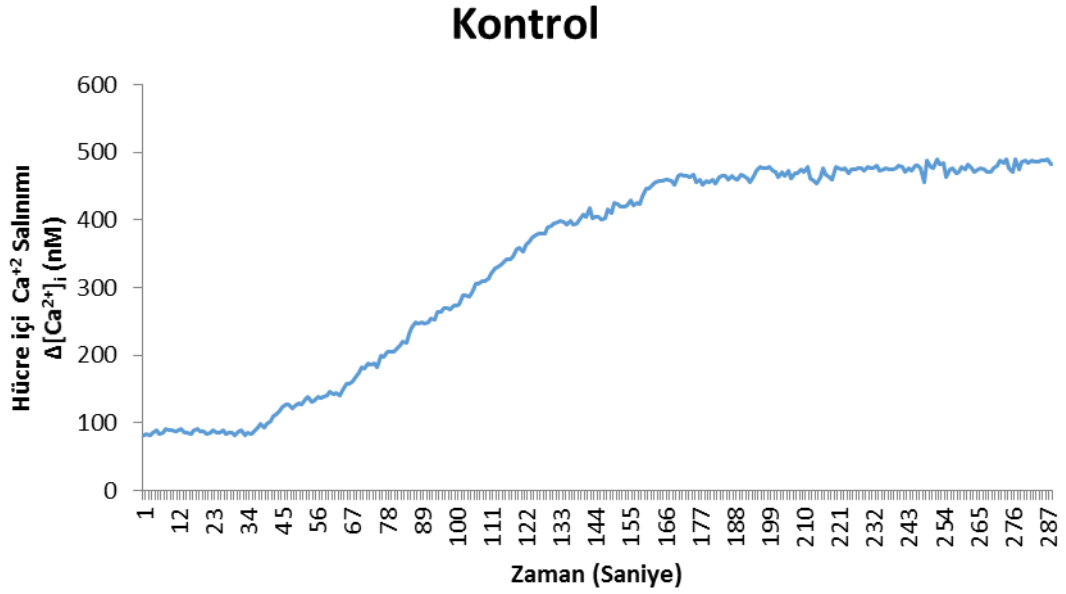
Grafik 4. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında sitozole Ca^{+2} salınımının zaman akım grafiği.



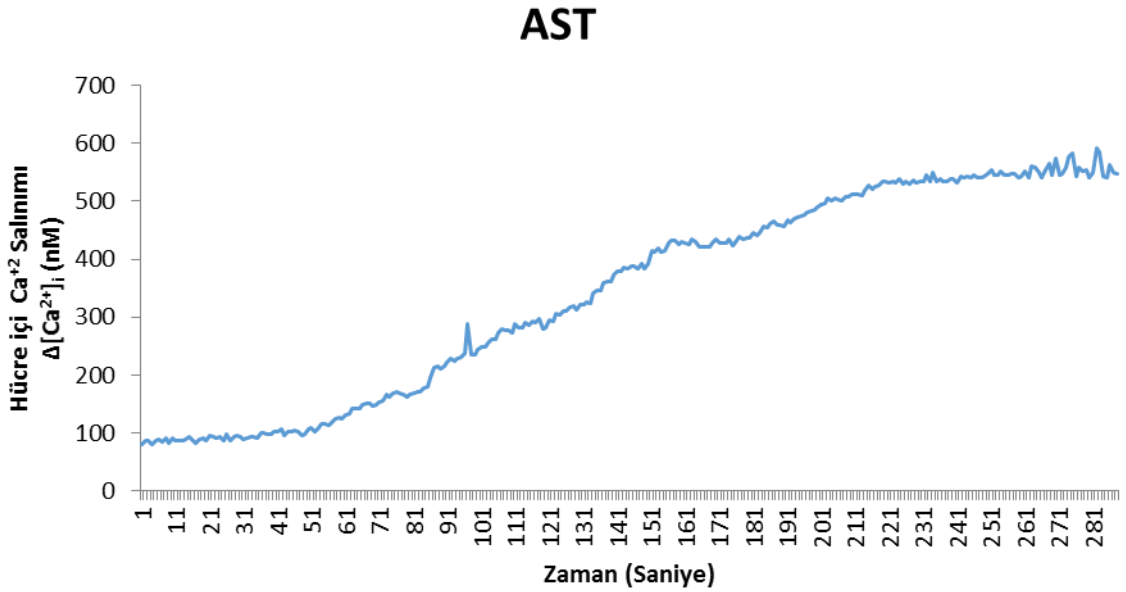
Grafik 5. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında sitozole Ca^{+2} salınımı üzerindeki etkileri. ^a $p < 0.05$ vs Kontrol, ^b $p < 0.05$ vs AST, ^c $p < 0.001$ vs HQ

Hücre içi Ca^{+2} salınım düzeyleri Grafik 5'te gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde astaksantin uygulamasında kontrole kıyasla herhangi bir değişimin olmadığı belirlendi. Ancak hidrokuinon uygulamasının Ca^{+2} salınımını hem kontrol grubuna hem de astaksantin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

artırdığı belirlendi ($p < 0.05$). Bu durum astaksantin uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltılmıştır ($p < 0.001$).

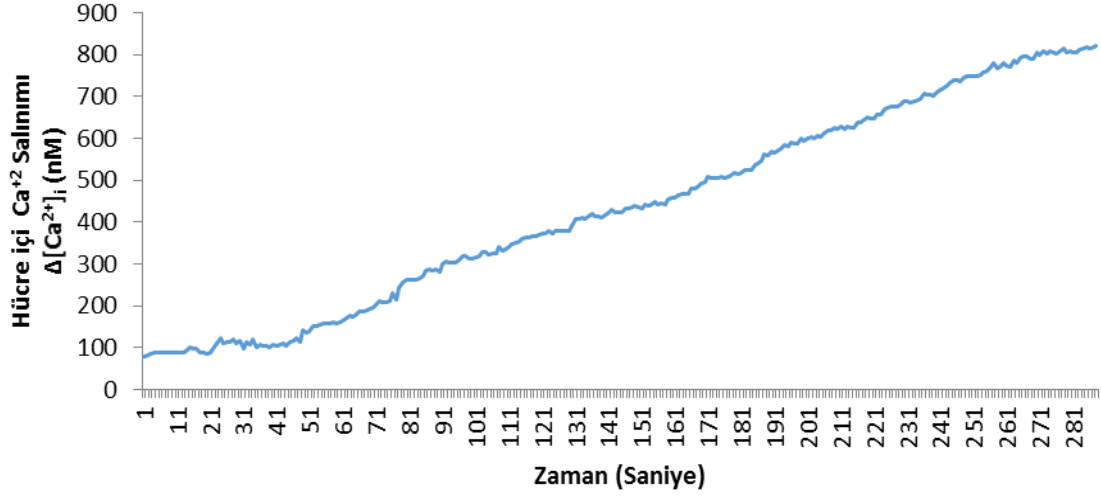


Grafik 6. Kontrol grubu ARPE-19 hücrelerinde sitozole Ca²⁺ salınımı düzeyleri.



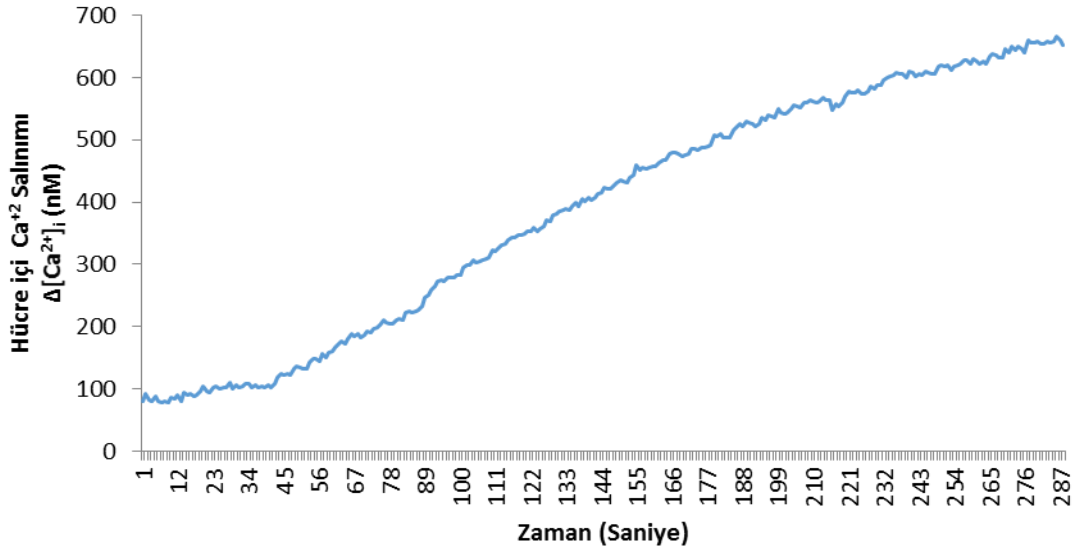
Grafik 7. Astaksantin grubu ARPE-19 hücrelerinde sitozole Ca²⁺ salınımı üzerindeki etkileri.

HQ



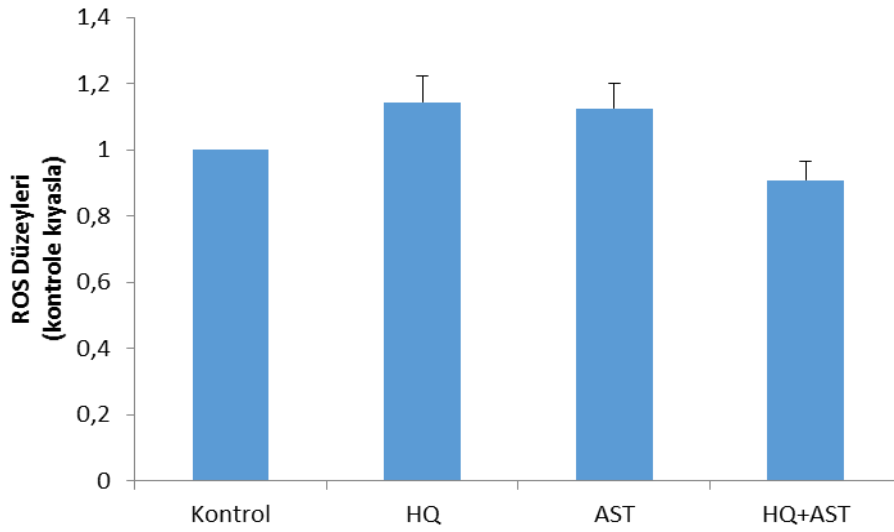
Grafik 8. Hidrokuinon grubu ARPE-19 hücrelerinde sitozole Ca⁺² salınımı üzerindeki etkileri.

HQ+AST



Grafik 9. Hidrokuinon ve Astaksantin kombinasyon grubu ARPE-19 hücrelerinde sitozole Ca⁺² salınımı üzerindeki etkileri.

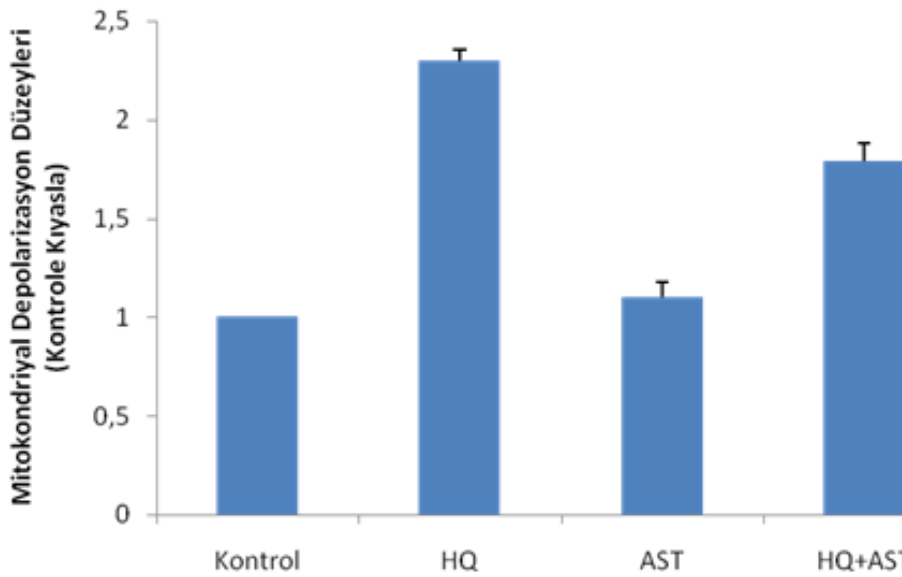
4.4. ARPE-19 Hücrelerinde ROT Düzeyleri



Grafik 10. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında ROT düzeylerine etkileri

ROT düzeyleri Grafik 10'da gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde ROT düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla HQ ve AST grubunda istatistiksel olarak artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). ARPE-19 hücreleri HQ ve AST ile inkübe edildiğinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$).

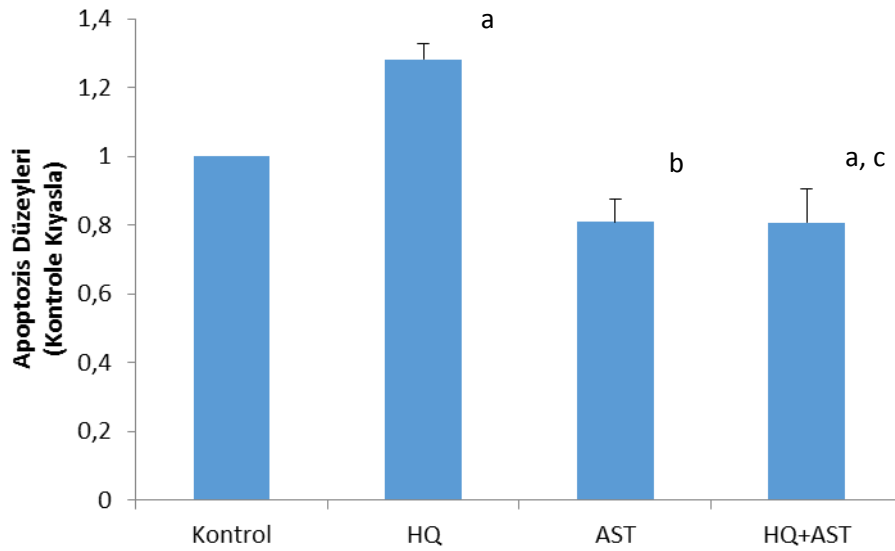
4.5. ARPE-19 Hücrelerinde Mitokondriyal Depolarizasyon Düzeyleri



Grafik 11. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında mitokondriyal depolarizasyon düzeylerine etkileri

Mitokondriyal depolarizasyon düzeyleri Grafik 11’ de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde mitokondriyal depolarizasyon düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla HQ grubunda önemli düzeyde artış olduğu gözlenirken ($p<0.05$) AST ilavesiyle HQ+AST grubunda düşüş ortaya çıkmıştır. AST grubunda ise istatistiksel olarak mitokondriyal depolarizasyon düzeylerinin azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$).

4.6. ARPE-19 Hücrelerinde Apoptozis Düzeyleri



Grafik 12. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında apoptozis düzeylerine etkileri

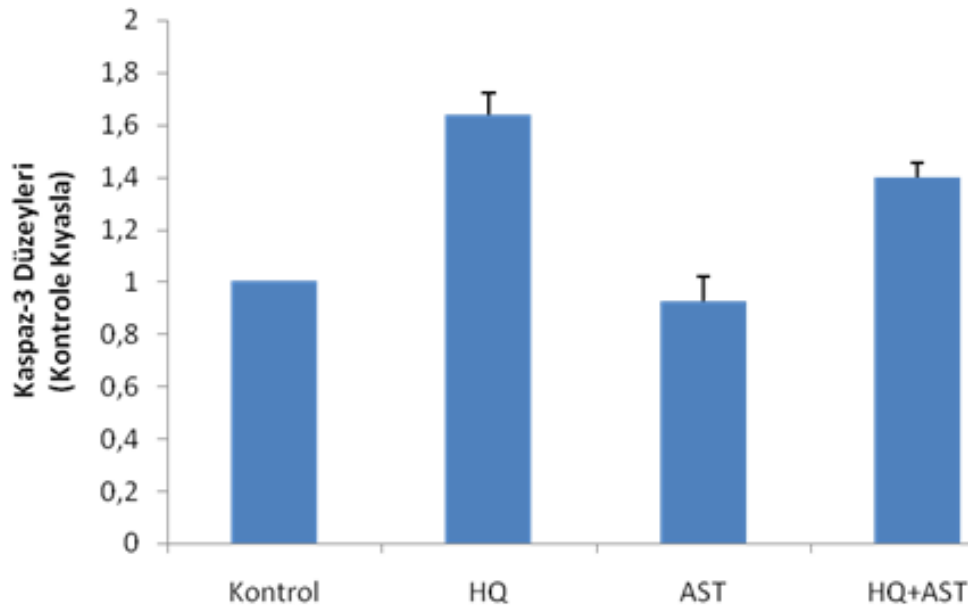
^a $p<0.05$ vs Kontrol

^b $p<0.05$ vs HQ

^c $p<0.05$ vs AST

Apoptozis düzeyleri Grafik 12’ de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde apoptozis düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla HQ grubunda önemli düzeyde artış olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). ARPE-19 hücreleri AST, HQ ve AST ile inkübe edildiğinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Diğer bir ifade ile AST’ nin ARPE-19 hücrelerinde apoptozis üzerine koruyucu etkinliği tespit edildi.

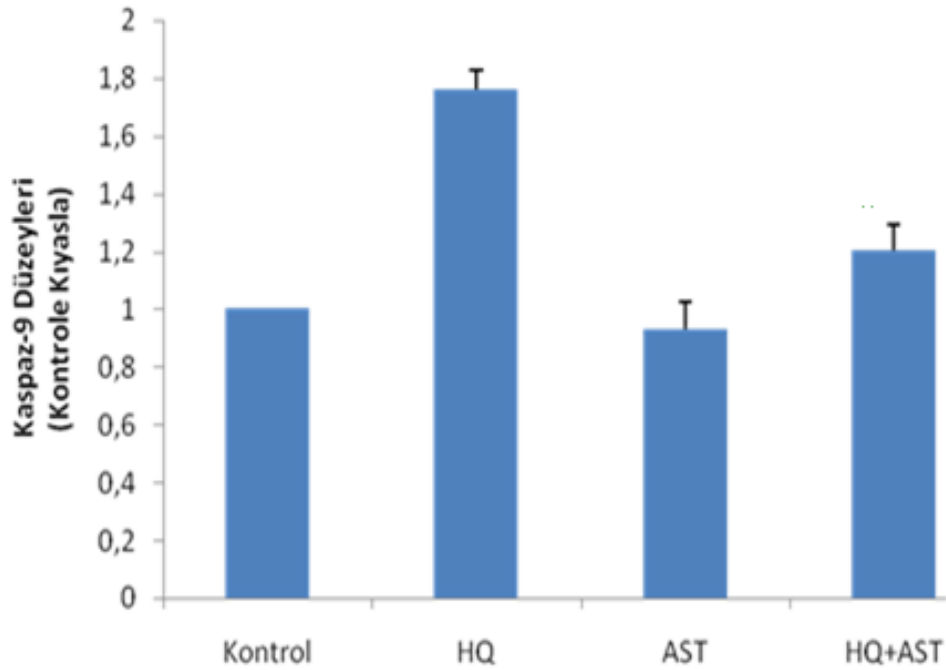
4.7. ARPE-19 Hücrelerinde Kaspaz-3 Düzeyleri



Grafik 13. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında kaspaz-3 düzeylerine etkileri

Kaspaz 3 düzeyleri Grafik 13'te gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde kaspaz 3 düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla HQ grubunda önemli düzeyde artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). ARPE-19 hücreleri AST ile inkübe edildiğinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$), HQ ve AST ile inkübe edildiğinde ise HQ grubuna göre daha düşük değerler elde edildi.

4.8. ARPE-19 Hücrelerinde Kaspaz-9 Düzeyleri



Grafik 14. Hidrokuinon ve Astaksantin ARPE-19 hücre gruplarında kaspaz-9 düzeylerine etkileri

Kaspaz 9 düzeyleri Grafik 14'te gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde kaspaz 9 düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla HQ grubunda önemli düzeyde artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). HQ ve AST ile inkübe edildiğinde ise değerlerin azaldığı görüldü. AST grubunda kaspaz 9 düzeyleri kontrol grubundan daha düşük elde edildi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda ARPE-19 hücrelerine astaksantin ve hidrokuinon maruziyetinin glutatyon (GSH), glutayon peroksidaz (GSH-Px) ve lipid peroksidasyon gibi antioksidan enzimler üzerine, sitozole Ca^{+2} salınımı, hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) miktarı, mitokondriyal depolarizasyon düzeyleri, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri ve apoptozis üzerine etkilerini araştırıp alınan sonuçlarda astaksantin'in etki mekanizması aydınlatılarak sigara içen bireylerin yaşlılık dönemlerinde meydana gelebilecek yaşa bağlı makula dejenerasyonunda (YBMD) astaksantin'in koruyucu bir ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağına hücre kültürü ortamında araştırılması amaçlandı. Çalışmamız astaksantin ve hidrokuinon kombinasyonunun ARPE-19 hücrelerinde oksidatif stresin tetiklediği hücre içi kalsiyum salınım mekanizmaları ve mitokondriyal aktivite üzerine olan etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır.

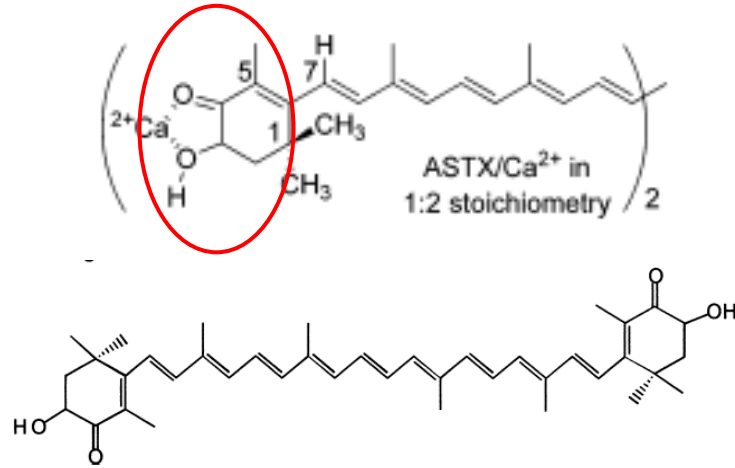
YBMD yaşlılarda meydana gelebilecek körlüğün temel nedenlerinden birisi olarak karşımıza çıkmakta ve önem arz etmektedir (121). Sigara içen bireylerde oksidatif stresin artması ilerleyen yaşla birlikte YBMD gelişimi açısından önemli bir sebep teşkil etmektedir. Bu durum makulada RPE ve fotoreseptör hücrelerinde progresif dejenerasyona zemin hazırlamaktadır (30,122). Sigara kullanımı ile YBMD' de oksidatif stresin artmış olması sonucu RPE dejenerasyonu meydana gelir ve okuler hücrelerde apoptozis tetiklenir (123-126). Görülebilir ışık spektrumunun bileşenleri RPE hücrelerindeki biyolojik kromoforlar tarafından absorbe olabilir, bu da hücrel disfonksiyona ve hücrel ölüme neden olabilir (127).

Astaksantin, deniz kabuklularında yüksek oranda bulunan ve karotenoidler arasında yer alan kırmızı renkli bir pigmenttir (128). Astaksantin ilk defa 1975 yılında Basil Wheedon ve ekibi tarafından sentezlenerek elde edilmiştir. Güncel olarak yapılan çalışmalar astaksantin'in çok güçlü bir antioksidan olduğunu gösterir niteliktedir (129). Otsuka ve arkadaşları beş günlük 8.000 lüks şiddetinde ışığa maruz bıraktıkları erkek ratların retina hasarına karşı yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri elektoretinogram sonuçlarında dış nükleer tabakanın kalınlaşmasına karşın astaksantin'in etkili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada apoptotik hücre sayısı ve reaktif oksijen ürünleri miktarlarını tayin etmişler ve 100 mg/kg dozunda

uygulanan astaksantinin koruyucu etkinliklerini bildirmişlerdir (129). Astaksantin bu etkisinin güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olmasından dolayı kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu özelliğini reaktif radikal ürünlerini etkisiz hale getirerek gösterdiği iddia edilmiştir. Ayrıca, hücre içi, antioksidan sistemlerini güçlendirici transkripsiyon faktörü olan NRF-2 yolağını desteklediği belirtilmiştir (130). Astaksantin, aynı zamanda transitozis yolu ile kan-beyin bariyerini geçebilen tek ketokarotenoid ailesi üyesidir (130).

Astaksantin immunomodulator aktivitesinin yanısıra, karaciğere ve pankreastaki islet- β hücrelerine koruyucu birtakım biyolojik aktiviteye sahiptir. Ayrıca hipertansiyon ve iskemi-nedenli hafıza kaybına karşı koruyucu etkisiyle hastalıkları önlemede kullanılabilir. AST diğer karotenoidler ve E vitaminine göre daha güçlü antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür. Doğada karotenoidler all-trans yapıda bulunur. Geometrik izomerlerin cis/ trans yapısı toplam moleküler şekli büyük oranda etkiler. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar AST' nin, oksidatif stres ve Ca^{+2} un neden olduğu lens hasarını önlediğini ve bu koruyucu etkiden AST' nin fazla miktardaki Ca^{+2} iyonlarını bağlama kapasitesinden olabileceğini ileri sürmüştür (Resim 4) (131). Ca^{+2} ve Ca^{+2} -bağımlı enzimler katarakt, bilişsel bozukluk ve insulin direnci gibi hastalıklar ve bu hastalıkların semptomlarının ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (132-135).

AST/ Ca^{+2} kompleksinin oluşumuyla iki kalsiyum iyonunun AST'nin her iki ucuna bağlanmasıyla iyon transferi azalır ve all-trans yapısı oluşur. Trans-AST'nin iki tane kalsiyum iyonu bağlama kapasitesi bulunur ve bu durum kalsiyum kaynaklı UV-absorbansında hafif artışa sebep olur. Ana şelate eden kısım α -hidroksikloheksenondur. Vücut sıcaklığında (37 °C) Ca^{+2} varlığında AST izomerizasyonu 13-cis formunu değiştirmez. Dolayısıyla AST'nin diyet ile alımı sonrasında insan plazmasında 9-cis ve all-trans forma göre 13-cis izomeri daha fazladır.



Resim 4. Astaksantin (3,3'-dihydroxy-β, β'-carotene-4,4'-dione)

Çalışmamız, AST'nin ARPE-19 hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} düzeylerine etkilerini değerlendiren ilk moleküler çalışma olması nedeniyle özellik arz etmektedir. Elde ettiğimiz veriler yukarıdaki yazılı olan veriler ışığında değerlendirildiğinde gayet ciddi öneme sahiptir ve YBMD patofizyolojisinde daha ileri çalışmaları aydınlatacak niteliktedir. Çalışmamız sonucunda AST, ARPE-19 hücrelerinde, hücre içi Ca^{+2} salınım düzeylerini istatistiksel olarak önemli düzeyde azaltmıştır. AST ile inkübe olmayan, HQ grubunda hücre içi Ca^{+2} salınım düzeyleri en yüksek miktarda belirlenmiştir. AST'nin bu etkisini, elde ettiğimiz veriler ışığında değerlendirdiğimizde, antioksidan özelliğinden kaynaklandığını rahatlıkla söyleyebiliriz. Ayrıca antioksidan etkisine ek olarak, iyon kanal aktivitesini de düzenlediğini düşünmekteyiz. Ancak, AST izomerizasyonu ve biyolojik aktivitesinin insanlarda sınırlı olması nedeniyle AST'nin diyetel desteğinin YBMD hastalarında faydalı olabileceği ileri sürülmektedir.

Oksidatif stres, canlı vücudunda normal fizyolojik süreçte bile oluşabilen reaksiyonlar zinciri ürünlerin oksidan ajanlar lehine bozulduğu denge durumunu ifade eden bir terimdir. Superoksit radikali, hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil radikalleri oksidan ajanların ana medyatörleridirler. Hücresel solunum mekanizmalarının meydana geldiği mitokondriler doğal olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT) ilk hedefi olmakta ve en büyük hasara maruz kalan organel olarak adlandırılmaktadırlar. Mitokondrilerde meydana gelen aşırı ROT artışı hücrede apoptozis diye adlandırılan programlı hücre ölümünü tetiklemektedir. Elektron taşıma zinciri ve trisiklik karboksilik asit (TCA) döngüsünü bünyesinde barındırması

nedeniyle mitokondriler hücre canlılığı açısından ciddi öneme sahiptirler. ARPE-19 hücrelerinde yaptığımız çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz veriler yukarıda yazılı olan verileri destekler niteliktedir. Astaksantin ile inkübasyon sonucunun ROT' lerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığını saptadık. Hücre içerisinde ROT' lerinin aşırı düzeyde tolere edilemeyecek şekilde artması mitokondri ve hücre zarında depolarizasyon sürecini tetiklemekte, hücre içi depolardan Ca^{+2} iyon salınımını artırmakta ve dolaylı olarak ROT' lerini artırmaktadır. Bu süreç dönüşümlü olarak devam etmekte ve her artan ROT miktarı hücre içerisinden daha da fazla Ca^{+2} salınımını tetiklemektedir. Mitokondriler hücre içerisinde aynı zamanda Ca^{+2} iyonlarının depolandığı organeller olarak görev yapmaktadır (136,137).

Mitokondriler, kendilerine has bir özellik olarak, birbirinden bağımsız iki duvar bulundurmaktadırlar. Mitokondri zarında meydana gelecek depolarizasyon sürecinde geri dönüşüm artmış ROT' ler tarafından engellenebilmekte ve hücre içerisinde Ca^{+2} miktarları, depolarizasyon sürecine bağlı olarak artmaktadır. Hücre içerisinde artmış Ca^{+2} miktarlarını tamponlama sistemleri yetersiz kaldıklarında hücre apoptozise gitmektedir (138).

Hücre içerisinde meydana gelen ani iyon artışı ve tamponlama sistemlerinin yetersiz kalmalarının sonuçlarından birisi de, hücre içerisindeki reaktif oksijen ürünlerinin artmasıdır. Aynı zamanda artan ROT'leri mitokondri zarında membran potansiyel düzeylerini değiştirmektedir.

Lin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, rat serebral korteks hücrelerinin depolarizasyonu tetikleyerek hücre içerisinde iyon konsantrasyon dengesini bozup, sinir hücrelerinde depolarizasyonu tetikleyen bir ajan olan 4-AP ile inkübasyonundan 10 dakika öncesinde 50 mikromolar dozda AST inkübasyonunun membran potansiyelinde herhangi bir değişiklik yapmadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda AST'nin, depolarizasyonun neden olduğu hücre içi Ca^{+2} iyonlarının artışını da düzenlediği bildirilmiştir (139).

Yapılan çalışmalar AST'nin hücrelerde tek başına hücre zarı elektriksel aktivitesini bozmadığını belirtmiştir. Kobayların serebral korteks hücrelerinin 50 mikromolar AST ve yüksek Ca^{+2} düzeyleri ile inkübasyonunun herhangi bir

değişikliğe neden olmaması, AST'nin hücre zarı üzerine koruyucu / düzenleyici etkilerinin kanıtı olarak karşımıza çıkmaktadır (140). Bu etkisini N, P ve Q tipi Ca^{+2} kanalları üzerine etkinliğini göstererek yaptığını bildirmişlerdir. AST'nin glutamat salınımının üzerine de etkin olabileceği bildirilmiştir. Aşırı glutamat sentezi, hücrelerde Ca^{+2} salınımını tetikleyen temel unsurlardandır (141).

AST bu etkileri sayesinde, hücreleri apoptotik yoldan korumaktadır. Hücre apoptozisi ölüm reseptör aracılı ya da mitokondri aracılı yoldan tetiklenmektedir (142,143).

Mitokondriler farklı stres faktörleri için intrasellüler hedef organel olarak karşımıza çıkmaktadır. Mitokondri ROT üretiminde ana kaynak olarak bilinmektedir. ROT ürünlerinin toksisitesi hücre içerisinde hücrel antioksidan savunma mekanizmasını çok ciddi düzeyde azaltmaktadır. Mitokondriyal homeostazisin tekrar sağlanmasındaki başarısızlık ROT ve oksidatif streste progresif artışa neden olmaktadır. Oksidatif stresin, özellikle ROT' lerinin hücre apoptozisini tetiklemedeki rolü, sitozolik ortamdaki miktarlarına bağlı olarak gelişmektedir. Oksidatif stresin tetiklediği lipid peroksidasyonunun artması sonucu apoptozis kaçınılmaz olmaktadır ve böylece mitokondriyal fonksiyonlarında bozukluklar ve mitokondriyal membran potansiyelinde kayıp oluşmaktadır (144).

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz mitokondriyal membran depolarizasyon düzeylerindeki değişiklikler de yukarıda yazılı olan bilgileri destekler niteliktedir. HQ uygulaması mitokondri depolarizasyonunda gruplar arasında istatistiki olarak önemli düzeyde azalmalara neden olmuştur. AST ile inkübasyon bu değişimleri normal düzeylere getirmeye önemli düzeyde katkıda bulunmuştur. AST'nin tek başına uygulandığı grupta bu düzeylerde herhangi olumsuz bir etki gözlemlenmemiştir.

Artan oksidan ajanlar mitokondri kaynaklı ölüm sinyallerinin üretilmesine neden olmaktadır. Bu ölüm sinyallerinden bazıları kaspaz (cysteine-aspartic proteases ya da cysteine-dependent aspartate-directed proteases) ailesi olarak adlandırılmaktadır. Kaspaz-3 ve -9 bu ailenin üyelerinden birkaç tanesidir. Hücre ölüm mekanizmasını tetikleyen oksidatif stres sinyal yolağı kaspaz ailesinin aktivasyonunu da içermektedir. Kim ve arkadaşları (2009) hidrojen peroksitle (H_2O_2)

fare sinir hücrelerinde oluşturdukları oksidatif stres modelinde AST'nin kaspaz-3 ve -9 aktivitelerini istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir (145).

Apoptotik yolağı tetikleyen proteinlerden PARP ve Cyt-C miktarlarının da istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında yüksek antioksidan potansiyeli sahip AST, bu özelliği sayesinde kaspaz yolağını düzenlemektedir. AST'nin kısa süreli etkinliği antiapoptotik özellik olarak da neticelenebileceğini ortaya koymuş olduk. Yaptığımız çalışmalarda ROT aracılı olarak meydana gelen hücre hasarının önemli düzeyde azaldığını gözlemledik.

AST ile inkübasyon kaspaz-3 ve -9 aktivitesini önemli düzeyde azalttı. Bulgularımızı destekler nitelikteki çalışmada, AST'nin apoptotik proteinlerden hücre Bax ve p38 düzeylerini önemli düzeyde azalttığı ve hücrelerin ATP'ye karşı duyarlılıklarını önemli düzeyde iyileştirdiği tespit edilmiştir (145).

Yukarıda yazdığımız bilgilere ilave olarak, antioksidanlar hücre büyümesi, sitotoksosite, muhtemel redoks sistemi düzenleyici ve kimyasal toksisiteyi içeren transformasyon gibi düzenleyici görevlere sahiptir (146).

Yaptığımız çalışma sonucunda AST ile inkübasyonun istatistiksel olarak LP düzeylerinde anlamlı azalmanın yanı sıra antioksidan enzimlerde GSH ve GSH-Px düzeylerinde anlamlı artmanın olması ROT düzeyleri ile orantılı olarak karşımıza çıkmıştır. Bu sonuçlar birbirlerini destekler niteliktedir. Lu ve ark. yetişkin rat hipokampus (CA3) nöronlarında AST uygulayarak yapmış oldukları çalışmada, LP düzeylerinde anlamlı azalma tespit ederlerken GSH ve GSH-Px düzeylerinde de anlamlı artma tespit etmeleri, bizim elde ettiğimiz verilerle örtüşmektedir (147).

Lu ve ark. ayrıca kaspaz-3 ve cyt-c düzeylerinde de istatistiksel önem arz eden azalma tespit etmişler ve AST'nin bu etkinliğini antioksidan özelliğinden dolayı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, AST'nin oksidatif hasara bağlı olarak kaynaklanan hücre ölümünü, hücre zarı bütünlüğünü koruyarak arttırdığını bildirmişlerdir (147). Yine Lu ve ark. yaptıkları çalışmalarında iskemi modeli ile oluşturdukları oksidatif stres modelinde AST ile yapılan ön tedavi sürecinin ROT düzeylerini önemli düzeyde azalttığını bildirmişlerdir (148).

Ghissi ve ark. ratlarda yaptıkları çalışmada kolistin tetiklediği nefrotoksisite modelinde AST'nin GSH düzeylerini artırarak etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir (149).

Gamma ışınları ile oluşturulan bir başka oksidatif stres modelinde ise yine AST ile GSH-Px aktivitesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı ve LP düzeylerinin önemli düzeyde düştüğü tespit edilmiştir (150).

Xuan ve ark. yaptıkları çalışmalarında ratlardaki preeklamsi modelinde AST ile yapılacak tedavinin güçlendirilmesinin LP düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğünü tespit etmişlerdir (151).

Ancak, özellikle antioksidan olarak AST'nin biyokimyasal görevleri henüz tam olarak ortaya çıkarılmamıştır. Çalışmamız AST'nin ARPE-19 hücrelerinde koruyucu etkisini belirtmeye yöneliktir.

Elde ettiğimiz kaynaklar değerlendirildiğinde ARPE-19 hücrelerinde hidrokuinon ile deneysel olarak oluşturulan oksidatif stres modelinde AST uygulamalarının hücre içi kalsiyum düzeyleri, oksidatif stres, kaspaz-3 ve-9 düzeyleri, apoptozis, mitokondriyal depolarizasyon ve reaktif oksijen ürünleri düzeyleri üzerine etkilerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulgular, HQ ile inkübe edilen ARPE-19 hücrelerinde artmış oksidan ürünler ve bozulmuş (Ca^{+2})i düzeylerini ancak AST ile inkübasyon sonrasında bozulan değerlerin düzeldiğini gösterdi. Bu etkinliği nedeniyle AST, oksidatif stresin neden olduğu ve birincil etken olarak da gösterildiği YBMD tedavisinde kullanılabilir. Ancak, bu etkinliğini ilaç piyasasına dönüştürmek ya da daha etkin bir tedavi yöntemi izlemek için detaylandırılmış çalışmalara ihtiyaç duyulabilir.

ÖZET

Astaksantin, ARPE-19 Hücrelerinde Sigara Dumanı Bileşenlerinden Hidrokuinon ile Oluşturulan Oksidatif Stres Modelinde Antioksidan Parametreler (GSH, GSH-PX, MDA),

Ca⁺² Sinyali ve Apoptosis Düzeyleri Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması

Bu çalışmanın amacı antioksidan bir molekül olan astaksantin (AST), sigara içerisinde yüksek oranda bulunan hidrokuinon (HQ) ile oluşturulan oksidatif stres modelinde ARPE-19 hücreleri üzerine koruyucu etkinliğini, oksidatif stres parametrelerinden MDA düzeyleri ile antioksidan moleküllerden GSH ve GSH-Px düzeyleri inceleyerek ve hücre içerisindeki Ca⁺² salınım miktarı ve apoptotik yolağın tetikleyicilerinden kaspaz ailesine ait proteinlerin tayini yapılarak, araştırmaktır.

ARPE-19 hücreleri; Kontrol, Astaksantin, Hidrokuinon, Astaksantin+ Hidrokuinon olmak üzere dört ana gruba ayrıldı.

Lipid peroksidasyon (LP) (MDA) düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla HQ grubunda istatistiksel olarak artış olduğu (p<0.05), AST ile HQ ve AST gruplarında ise önemli bir değişiklik olmadığı gözlemlendi (p<0.05).

GSH düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla AST grubunda istatistiksel olarak arttığı, HQ ve AST grubunda ise önemli düzeyde artış olduğu gözlemlendi (p<0.05). ARPE-19 hücreleri HQ ile inkübe edildiğinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi (p<0.05).

GSH-Px düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla AST ile HQ ve AST grubunda istatistiksel olarak artış olduğu gözlemlendi (p<0.05). ARPE-19 hücreleri HQ ile inkübe edildiğinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişiklik olmadığı gözlemlendi (p<0.05).

Hücre içi Ca⁺² salınım düzeylerinde astaksantin uygulamasında kontrole kıyasla herhangi bir değişiklik olmadığı belirlendi. Ancak hidrokuinon uygulamasının Ca⁺² salınımını hem kontrol grubuna hem de astaksantin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı belirlendi (p<0.05). Bu durum astaksantin uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltılmıştır (p<0.001).

Mitokondriyal depolarizasyon ve ROT düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla HQ grubunda istatistiksel olarak artış olduğu gözlemlendi (p<0.05). ARPE-19 hücreleri AST ile tek başına inkübe edildiğinde kontrol grubuna kıyasla ROT düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi. HQ+AST ile inkübasyonunda HQ grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi (p<0.05).

Apoptosis düzeyleride yukarıda yazılan sonuçlara benzer özellik göstererek HQ ile inkübasyonun hücre apoptozisini istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığını ve AST ile inkübasyonun sonucunda apoptozis düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığını gösterdi.

Sonuç olarak bu çalışmada AST' in ARPE-19 hücrelerinde oksidatif stres etkisi karşısında koruyucu etkisinin olduğu gösterilmektedir. Bu özelliği nedeniyle

AST, ilerlemiş yaşla birlikte zayıflayan antioksidan savunma sistemini güçlendirmede önemli etkinliğe sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: ARPE-19 Hücreleri, Astaksantin, Ca^{+2} salınım mekanizması, Hidrokuinon, Oksidatif stres.

ABSTRACT

Effects of Astaxanthin on Antioxidant Parameters (GSH, GSH-Px, MDA), Ca²⁺ signaling and Apoptosis Levels in ARPE-19 cells on Cigarette Smoke-Related Hydroquinone Induced Oxidative Stress Model

In this study, the protective effect of Astaxanthin (AST) will be evaluated in ARPE-19 cells exposed to hydroquinone (HQ) found high amounts in cigarette. MDA, GSH and GSH-Px levels were also determined. In addition to this, intracellular calcium release levels and caspase-3 and -9 activities were determined.

ARPE-19 cells were divided into four groups as defined; Control, Astaxanthin, Hydroquinone, Astaxanthin+ Hydroquinone.

Lipid peroxidation (LP) (MDA) levels; were significantly increased in HQ group compared to control group ($p < 0.05$). However, we did not determine any statistical significant difference between AST and AST+HQ groups compared to the control group ($p < 0.05$).

GSH levels were significantly increased in AST and AST+HQ groups ($p < 0.05$) when compared to control group. GSH levels were significantly decreased in HQ group, when compared to control group ($p < 0.05$).

GSH-Px activities were also increased in AST and AST+HQ groups when compared to control group. However; HQ administration significantly decreased GSH-Px activities compared to control group ($p < 0.05$).

Intracellular Ca²⁺ release levels were also determined. We did not determine any significant differences between AST and control group samples. However, we determined that HQ administration significantly increased intracellular Ca²⁺ release ($p < 0.001$). Moreover, AST administration regulated and decreased the intracellular Ca²⁺ release after HQ administration.

Mitochondrial depolarization and ROS levels were significantly increased after incubation with HQ compared to control group samples ($p < 0.05$). AST administration did not alter ROS levels. But, ROS levels were significantly decreased in AST+HQ group compared to HQ group samples.

Apoptosis levels; statistically increased in HQ group, on the contrary decreased in AST group.

In conclusion, we evaluated the protective effects of an antioxidant molecule AST against HQ induced oxidative stress model in ARPE-19 cells. That's why AST is able to support reduced antioxidant defence system by age.

Keywords: ARPE-19 cells, Astaxanthin, Hydroquinone, Intracellular Ca²⁺ release, Oxidative stress.

KAYNAKLAR

1. Thumann G, Hoffman S, Hinton DR. Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium. In: Ryan SJ. Retina. Fourth ed: Elsevier&Mosby; 2006.
2. Bron AJ, Tripathi R, Tripathi B. Wilff's Anatomy of the Eye and Orbit. 8th ed. London: Chapman and Hall; 1997.
3. Panda-Jonas S, Jonas JB, Jakobczyk-Zmija M. Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes. *Am J Ophthalmol.* 1996;121(2):181-9.
4. Schmidt SY, Peisch RD. Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27(7):1063-7.
5. Weiter JJ, Delori FC, Wing GL, Fitch KA. Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27(2):145-52.
6. Marshall J. The ageing retina: physiology or pathology. *Eye (Lond).* 1987;1 (Pt 2):282-95.
7. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (Lond).* 1995;9 (Pt 6):763-71.
8. Forrester J, Dick A, McMenamin P, et al. The Eye. Basic Sciences in Practice. London: WB Saunders; 1996.
9. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85(3):845-81.
10. Wenkel H, Streilein JW. Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(11):3467-73.
11. Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* 2002;42(4):487-95.
12. Bertram KM, Baglolle CJ, Phipps RP, Libby RT. Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related makular degeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(5):C1200-10.
13. Velilla S, Garcia-Medina JJ, Garcia-Layana A, Dolz-Marco R, Pons-Vazquez S, Pinazo-Duran MD, et al. Smoking and age-related makular degeneration: review and update. *J Ophthalmol.* 2013:895147.
14. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related makular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2000;45(2):115-34.
15. Feher J, Kovacs I, Artico M, Cavallotti C, Papale A, Balacco Gabrieli C. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related makular degeneration. *Neurobiol Aging.* 2006;27(7):983-93.

16. Pons M, Marin-Castano ME. Cigarette smoke-related hydroquinon dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium in vitro and in vivo. *PLoS One*.6(2):e16722.
17. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates JR, Bradley M, et al. Smoking and age related makular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol*. 2006;90(1):75-80.
18. Thornton J, Edwards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I, Kelly SP. Smoking and age-related makular degeneration: a review of association. *Eye (Lond)*. 2005;19(9):935-44.
19. Deisinger PJ, Hill TS, English JC. Human exposure to naturally occurring hydroquinon. *J Toxicol Environ Health*. 1996;47(1):31-46.
20. DeCaprio AP. The toxicology of hydroquinon--relevance to occupational and environmental exposure. *Crit Rev Toxicol*. 1999;29(3):283-330.
21. Ramirez C, Pham K, Franco MF, Chwa M, Limb A, Kuppermann BD, et al. Hydroquinon induces oxidative and mitochondrial damage to human retinal Muller cells (MIO-M1). *Neurotoxicology*. 2013;39:102-8.
22. Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(2):185-96.
23. Piermarocchi S, Saviano S, Parisi V, Tedeschi M, Panozzo G, Scarpa G, et al. Carotenoids in Age-related Maculopathy Italian Study (CARMIS): two-year results of a randomized study. *Eur J Ophthalmol*. 2013;22(2):216-25.
24. Solmaz A, Akyol S. *Retina Embriyogenezi-Fizyolojisi, Muyane Yöntemleri, Retina Dejeneresanslar*. 2. Baskı. O'Dwyer P. Ankara: Günes Kitabevi; 2010.
25. Albert D, Jakobiec FA. *Clinical Practice Principles and Practice of Ophthalmology*. W.B. Saunders Company; 1994.
26. Yanoff M, Duker JS. *Ophthalmology*. Second ed. Mosby: St.Louis; 2004.
27. Karaçorlu S, Karaçorlu M. *Makula Hastalıkları*. 2. Baskı. O'Dwyer P, Akova YA. Ankara: Günes Kitabevi; 2010.
28. Bengisu Ü. *Göz Hastalıkları*. 4. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 1989.
29. Kanski J. *Klinik Oftalmoloji*. 4. Baskı. Oraglı KM, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001.
30. Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P, Jr., Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res*. 2000;19(2):205-21.
31. Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polysiklik aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res*. 1982;42(12):4875-917.
32. Patton WP, Routledge MN, Jones GD, Lewis SE, Archer DB, Davies RJ, et al. Retinal pigment epithelial cell DNA is damaged by exposure to benzo[a]pyrene, a constituent of cigarette smoke. *Exp Eye Res*. 2002;74(4):513-22.

33. Burke JM. Epithelial phenotype and the RPE: is the answer blowing in the Wnt? *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(6):579-95.
34. Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Reengineering of aged Bruch's membrane to enhance retinal pigment epithelium repopulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(9):3337-48.
35. Hollborn M, Vogler S, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A, Kohen L. Regulation of the hyperosmotic induction of aquaporin 5 and VEGF in retinal pigment epithelial cells: involvement of NFAT5. *Mol Vis.* 2015;21:360-77.
36. Werner JS, Keltner JL, Zawadzki RJ, Choi SS. Outer retinal abnormalities associated with inner retinal pathology in nonglaucomatous and glaucomatous optic neuropathies. *Eye (Lond).* 2011;25(3):279-89.
37. Spaide RF, Curcio CA. Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina.* 2011;31(8):1609-19.
38. Fine BS. Limiting membranes of the sensory retina and pigment epithelium. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol.* 1961;66:847-60.
39. Hudspeth AJ, Yee AG. The intercellular junctional complexes of retinal pigment epithelia. *Invest Ophthalmol.* 1973;12(5):354-65.
40. Alam S, Zawadzki RJ, Choi S, Gerth C, Park SS, Morse L, et al. Clinical application of rapid serial fourier-domain optical coherence tomography for makular imaging. *Ophthalmology.* 2006;113(8):1425-31.
41. Simo R, Villarroel M, Corraliza L, Hernandez C, Garcia-Ramirez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2010:190724.
42. Krohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, Friedlander DF, Lehmann M, Dorsey AL, et al. Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(2):96-109.
43. Fatt I, Shantinath K. Flow conductivity of retina and its role in retinal adhesion. *Exp Eye Res.* 1971;12(2):218-26.
44. Hamann S. Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol.* 2002;215:395-431.
45. Stamer WD, Bok D, Hu J, Jaffe GJ, McKay BS. Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2803-8.
46. Gundersen D, Orłowski J, Rodriguez-Boulan E. Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1991;112(5):863-72.
47. Burke JM, McKay BS, Jaffe GJ. Retinal pigment epithelial cells of the posterior pole have fewer Na/K adenosine triphosphatase pumps than peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(7):2042-6.

48. Okami T, Yamamoto A, Omori K, Takada T, Uyama M, Tashiro Y. Immunocytochemical localization of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in rat retinal pigment epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 1990;38(9):1267-75.
49. Baehr W, Wu SM, Bird AC, Palczewski K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res.* 2003;43(28):2957-8.
50. Hargrave PA. Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):3-9.
51. Bosch E, Horwitz J, Bok D. Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(2):253-63.
52. Steinberg RH. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol.* 1985;60(4):327-46.
53. Nguyen-Legros J, Hicks D. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol.* 2000;196:245-313.
54. Bibb C, Young RW. Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments. *J Cell Biol.* 1974;61(2):327-43.
55. Galvan I, Alonso-Alvarez C. An intracellular antioxidant determines the expression of a melanin-based signal in a bird. *PLoS One.* 2008;3(10):e3335.
56. Li CM, Clark ME, Chimento MF, Curcio CA. Apolipoprotein localization in isolated drusen and retinal apolipoprotein gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(7):3119-28.
57. Hayes KC, Lindsey S, Stephan ZF, Brecker D. Retinal pigment epithelium possesses both LDL and scavenger receptor activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(2):225-32.
58. Ishida BY, Duncan KG, Bailey KR, Kane JP, Schwartz DM. High density lipoprotein mediated lipid efflux from retinal pigment epithelial cells in culture. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(5):616-20.
59. Curcio CA, Millican CL, Bailey T, Kruth HS. Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):265-74.
60. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc.* 1987;46(1):13-26.
61. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49(3):481-93.
62. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119(6):598-620.
63. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41(12 Pt 2):1819-28.
64. Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem.* 2000;35:1-62.

65. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-208.
66. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40.
67. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
68. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12365-7.
69. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007;18(9):567-79.
70. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, et al. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev*. 1999;31(1):117-39.
71. Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(9):1471-83.
72. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. 1997;24(5):287-96.
73. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30(2):145-58.
74. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med*. 1988;5(5-6):341-8.
75. Juranek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys*. 2005;24(3):263-78.
76. Mason RP, Stolze K, Flitter WD. Free radical reactions with DNA and its nucleotides. *Basic Life Sci*. 1990;52:119-25.
77. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg*. 1989;5(1):79-84.
78. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(1):1-14.
79. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot*. 2003;91:179-94.
80. Peskin AV. Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep*. 1997;17(1):85-9.
81. Peskin AV. Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;62(12):1341-7.

82. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*. 2002;65(4):305-11.
83. Naziroglu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-riboz. *Neurochem Res*. 2007;32(11):1990-2001.
84. Gutteridge JM, Maitt L, Poyer L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem J*. 1990;269(1):169-74.
85. Naziroglu M, Kutluhan S, Uguz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ. Topiramate and vitamin e modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redoks system in pentylentetrazol-induced seizure of rats. *J Membr Biol*. 2009;229(3):131-40.
86. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(2):201-9.
87. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res*. 2001;34(4):325-36.
88. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron*. 1998;21(1):13-26.
89. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):517-29.
90. Petersen CC, Petersen OH, Berridge MJ. The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*. 1993;268(30):22262-4.
91. Petersen CC, Berridge MJ. The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinaz C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 1994;269(51):32246-53.
92. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, et al. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):57-61.
93. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(1):11-21.
94. Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol*. 2002;12(16):R563-5.
95. Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisfosfat receptors without inositol 1,4,5-trisfosfat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(11):7320-2.
96. Betto R, Teresi A, Turcato F, Salviati G, Sabbadini RA, Krown K, et al. Sphingosylphosphocholine modulates the ryanodine receptor/calcium-release channel of cardiac sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem J*. 1997;322 (Pt 1):327-33.

97. Lee HC. A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: siklik ADP-riboz and NAADP. *Biol Chem.* 1999;380(7-8):785-93.
98. Smith MT. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. *Annu Rev Public Health.* 2010;31:133-48.
99. Pons M, Cousins SW, Csaky KG, Striker G, Marin-Castano ME. Cigarette smoke-related hydrokuinon induces filamentous actin reorganization and heat shock protein 27 phosphorylation through p38 and extracellular signal-regulated kinaz 1/2 in retinal pigment epithelium: implications for age-related makular degeneration. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1198-213.
100. Gill DP, Ahmed AE. Covalent binding of [14C]benzene to cellular organelles and bone marrow nucleic acids. *Biochem Pharmacol.* 1981;30(10):1127-31.
101. Gaskell M, McLuckie KI, Farmer PB. Genotoxicity of the benzene metabolites para-benzokuinon and hydrokuinon. *Chem Biol Interact.* 2005;153-154:267-70.
102. North M, Tandon VJ, Thomas R, Loguinov A, Gerlovina I, Hubbard AE, et al. Genome-wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. *PLoS One.* 2011;6(8):e24205.
103. Smith MT. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environ Health Perspect.* 1996;104 Suppl 6:1219-25.
104. Bertanha CS, Januario AH, Alvarenga TA, Pimenta LP, Silva ML, Cunha WR, et al. Kuinon and hydrokuinon metabolites from the ascidians of the genus *Aplidium*. *Mar Drugs.* 2012;12(6):3608-33.
105. Miyashita K. Function of marine carotenoids. *Forum Nutr.* 2009;61:136-46.
106. Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. *Mar Drugs.* 2014;12(1):128-52.
107. Palozza P, Krinsky NI. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch Biochem Biophys.* 1992;297(2):291-5.
108. Wolf AM, Asoh S, Hiranuma H, Ohsawa I, Iio K, Satou A, et al. Astaxanthin protects mitochondrial redoks state and functional integrity against oxidative stress. *J Nutr Biochem.* 2010;21(5):381-9.
109. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 2003;21(5):210-6.
110. Naziroglu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res.* 2009;34(12):2181-91.
111. Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol.* 2009;232(1-3):15-23.

112. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25(1):192-205.
113. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;71(4):952-8.
114. Bejarano I, Terron MP, Paredes SD, Barriga C, Rodriguez AB, Pariente JA. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem.* 2007;296(1-2):77-84.
115. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440-50.
116. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem.* 1966;16(2):359-64.
117. Tok L, Naziroglu M, Uguz AC, Tok O. Elevated hydrostatic pressures induce apoptosis and oxidative stress through mitochondrial membrane depolarization in PC12 neuronal cells: A cell culture model of glaucoma. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014;34(5):410-6.
118. Akpınar A, Uguz AC, Naziroglu M. Agomelatine and duloxetine synergistically modulates apoptotic pathway by inhibiting oxidative stress triggered intracellular calcium entry in neuronal PC12 cells: role of TRPM2 and voltage-gated calcium channels. *J Membr Biol.* 2014;247(5):451-9.
119. Argun M, Tok L, Uguz AC, Celik O, Tok OY, Naziroglu M. Melatonin and amfenac modulate calcium entry, apoptosis, and oxidative stress in ARPE-19 cell culture exposed to blue light irradiation (405 nm). *Eye (Lond).* 2014;28(6):752-60.
120. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
121. Chen C, Cano M, Wang JJ, Li J, Huang C, Yu Q, et al. Role of unfolded protein response dysregulation in oxidative injury of retinal pigment epithelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(14):2091-106.
122. Liang FQ, Godley BF. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related makular degeneration. *Exp Eye Res.* 2003;76(4):397-403.
123. Mainster MA. Light and makular degeneration: a biophysical and clinical perspective. *Eye (Lond).* 1987;1 (Pt 2):304-10.
124. Smith BT, Belani S, Ho AC. Ultraviolet and near-blue light effects on the eye. *Int Ophthalmol Clin.* 2005;45(1):107-15.
125. Wang RJ. Lethal effect of "daylight" fluorescent light on human cells in tissue-culture medium. *Photochem Photobiol.* 1975;21(5):373-5.
126. Wu J, Seregard S, Spangberg B, Oskarsson M, Chen E. Blue light induced apoptosis in rat retina. *Eye (Lond).* 1999;13 (Pt 4):577-83.

127. Godley BF, Shamsi FA, Liang FQ, Jarrett SG, Davies S, Boulton M. Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280(22):21061-6.
128. Igielska-Kalwat J, Goscianska J, Nowak I. [Carotenoids as natural antioxidants]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015;69:418-28.
129. Otsuka T, Shimazawa M, Nakanishi T, Ohno Y, Inoue Y, Tsuruma K, et al. Protective effects of a dietary carotenoid, astaxanthin, against light-induced retinal damage. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(3):209-18.
130. Song X, Wang B, Lin S, Jing L, Mao C, Xu P, et al. Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II in vivo and in vitro through the ROS-dependent mitochondrial signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2014;18(11):2198-212.
131. Wu TH, Liao JH, Hou WC, Huang FY, Maher TJ, Hu CC. Astaxanthin protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation. *J Agric Food Chem.* 2006;54(6):2418-23.
132. Chen CS, Wu SH, Wu YY, Fang JM, Wu TH. Properties of astaxanthin/Ca²⁺ complex formation in the deceleration of cis/trans isomerization. *Org Lett.* 2007;9(16):2985-8.
133. Reijo T, Mikko B, Antti S, Timo S. Serum calcium and prediction of cognitive decline in old age. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56(8):1573-4.
134. Kim CJ, Choi SK. Analysis of aqueous humor calcium and fosfat from cataract eyes with and without diabetes mellitus. *Korean J Ophthalmol.* 2007;21(2):90-4.
135. Sun G, Vasdev S, Martin GR, Gadag V, Zhang H. Altered calcium homeostasis is correlated with abnormalities of fasting serum glucose, insulin resistance, and beta-cell function in the Newfoundland population. *Diabetes.* 2005;54(11):3336-9.
136. Rimessi A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondrial Ca(2+) Remodeling is a Prime Factor in Oncogenic Behavior. *Front Oncol.* 2015;5:143.
137. Baliotti M, Giannubilo SR, Giorgetti B, Solazzi M, Turi A, Casoli T, et al. The effect of astaxanthin on the aging rat brain: gender-related differences in modulating inflammation. *J Sci Food Agric.* 2015.
138. Kowluru RA, Kowluru A, Mishra M, Kumar B. Oxidative stress and epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2015.
139. Lin TY, Lu CW, Wang SJ. Astaxanthin inhibits glutamate release in rat cerebral cortex nerve terminals via suppression of voltage-dependent Ca(2+) entry and mitogen-activated protein kinaz signaling pathway. *J Agric Food Chem.* 2010;58(14):8271-8.
140. Barrie AP, Nicholls DG, Sanchez-Prieto J, Sihra TS. An ion channel locus for the protein kinaz C potentiation of transmitter glutamate release from guinea pig cerebrocortical synaptosomes. *J Neurochem.* 1991;57(4):1398-404.

141. Yamagishi R, Aihara M. Neuroprotective effect of astaxanthin against rat retinal ganglion cell death under various stresses that induce apoptosis and necrosis. *Mol Vis*. 2014;20:1796-805.
142. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. 2004;95(10):957-70.
143. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*. 2010;188(2):319-33.
144. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003;8(2):115-28.
145. Kim JH, Choi W, Lee JH, Jeon SJ, Choi YH, Kim BW, et al. Astaxanthin inhibits H₂O₂-mediated apoptotic cell death in mouse neural progenitor cells via modulation of P38 and MEK signaling pathways. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19(11):1355-63.
146. Lee SR, Bar-Noy S, Kwon J, Levine RL, Stadtman TC, Rhee SG. Mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2521-6.
147. Lu Y, Xie T, He XX, Mao ZF, Jia LJ, Wang WP, et al. Astaxanthin rescues neuron loss and attenuates oxidative stress induced by amygdala kindling in adult rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 2015;597:49-53.
148. Li J, Wang F, Xia Y, Dai W, Chen K, Li S, et al. Astaxanthin Pretreatment Attenuates Hepatic Ischemia Reperfusion-Induced Apoptosis and Autophagy via the ROS/MAPK Pathway in Mice. *Mar Drugs*. 2015;13(6):3368-87.
149. Ghilissi Z, Hakim A, Sila A, Mnif H, Zeghal K, Rebai T, et al. Evaluation of efficacy of natural astaxanthin and vitamin E in prevention of colistin-induced nephrotoxicity in the rat model. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;37(3):960-6.
150. Zhao W, Jing X, Chen C, Cui J, Yang M, Zhang Z. [Protective effects of astaxanthin against oxidative damage induced by ⁶⁰Co gamma-ray irradiation]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2011;40(5):551-4.
151. Xuan R-r, Gao X, Wu W, Chen HM. [Effect of astaxanthin on preeclampsia rat model]. *Yao Xue Xue Bao*. 2014;49(10):1400-5.