

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

**NORMAL VE YÜKSEK GLUKOZ İLE İNDÜKLENMİŞ
DİYABETİK RETİNAL PİGMENT EPİTEL (ARPE-19)
HÜCRELERİNDE GEMSİTABİN VE 5-FU
KOMBİNASYONUNUN OKSİDATİF STRES VE
MİTOKONDRIYAL APOPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Esmâ Seben OK

Referans no: 10253683

EDİRNE – 2021

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

**NORMAL VE YÜKSEK GLUKOZ İLE İNDÜKLENMİŞ
DİYABETİK RETİNAL PİGMENT EPİTEL (ARPE-19)
HÜCRELERİNDE GEMSİTABİN VE 5-FU
KOMBİNASYONUNUN OKSİDATİF STRES VE
MİTOKONDRIYAL APOPTOZ YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Esmâ Seben OK

Destekleyen Kurum : TÜBAP 2019/165

EDİRNE – 2021

Tez No:

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilgi ve tecrübesi ile bana her zaman emek veren danışman hocam sayın Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR başta olmak üzere bilimsel katkıları ile yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, çalışmamızı proje olarak destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP 2019/165) teşekkür ederim.



İTHAF

Beni çok seven melek Babam'a ve her zaman örnek aldığım canım Annem'e

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
DİYABETİK RETİNOPATİ	3
RETİNA VE RETİNAL PİGMENT EPİTELYUM (RPE).....	10
KAN-RETİNA BARIYERİ VE RETİNA PİGMENT EPİTELYUMU.....	12
MİTOKONDRİYAL APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES	15
5-FLOROURASİL (5-FU) ve ETKİ MEKANİZMASI	18
GEMSİTABİN (GEM) ve ETKİ MEKANİZMASI	21
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
BULGULAR	45
TARTIŞMA.....	81
ÖZET	92
SUMMARY	94
KAYNAKLAR.....	96
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ	114
ÖZGEÇMİŞ.....	121

SİMGE VE KISALTMALAR

5-FU	:5-Florourasil
ABCC1	:ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1
ABCC2	:ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2
AO: EB	:Akridin Oranj:Etidyum Bromür
APAF1	:Apoptotic Protease Activating Factor 1
AR	:Aldoz Redüktaz
ARPE-19	:Adult Retinal Pigment Epithelial Cell Line-19
ATCC	:Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATP	:Adenozin Trifosfat
ATPaz	:Adenozin Trifosfataz
BAX	:Bcl2 Associated X
BCL2	:B-Cell Lymphoma 2
CASP3	:Cysteine-Aspartic Acid Protease 3
CASP8	:Cysteine-Aspartic Acid Protease 8
CDA	:Cytidine Deaminase / Sitidin Deaminaz
cDNA	:Complementary DNA / Komplementer DNA
CH₂THF	:Methylenetetrahydrofolate / Metilentetrahidrofolat
CNT	:Concentrative Nucleoside Transporters / Konsantre Nükleosit Taşıyıcıları
DAG	:Diaçilgliserol
dCK	:Deoksisitin Kinaz
dFdC	:Diflorodeoksisitidin

dFdCDP	:Gemcitabine Diphosphate / Gemsitabin Difosfat
dFdcMP	:Gemcitabine Monophosphate / Gemsitabin Monofosfat
dFdCTP	:Gemcitabine Triphosphate / Gemsitabin Trifosfat
dFdU	:Difluorodeoxyuridine / Diflorodeoksiüridin
DHFU	:Dihydrofluorouracil / Dihidroflorourasil
DMÖ	:Diyabetik Maküler Ödem
DMEM	:Dulbecco's Modified Of Eagle's Medium
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
dNTP	:Deoksinükleosid Trifosfat
DPD	:Dihidropirimidin Dehidrojenaz
DR	:Diyabetik Retinopati
dTMP	:Deoksitimidin Monofosfat
dUMP	:Deoksiüridin Monofosfat
EDTA	:Etilendiamintetraasetikasit
ENT	:Equilibrative Nucleoside Transporters / Dengeleyici Nükleosit Taşıyıcıları
EXO1	:Exonuclease 1
FAS	:Fas Cell Surface Death Receptor
FBS	:Fetal Bovine Serum / Fetal Sığır Serum
FdUDP	:Fluorodeoxyuridine Diphosphate / Florodeoksiüridin Difosfat
FdUMP	:Fluorodeoxyuridine Monophosphate / Florodeoksiüridin Monofosfat
FdUrd	:Fluorodeoxyuridine / Florodeoksiüridin
FdUTP	:Fluorodeoxyuridine Triphosphate / Florodeoksiüridin Trifosfat
FGF	:Fibroblast Growth Factor / Fibroblast Büyüme Faktörü
FUDP	:Fluorouridine Diphosphate / Floroüridin Difosfat
FUDR	:Fluorodeoxyuridine / Florodeoksiüridin
FUMP	:Fluorouridine Monophosphate / Floroüridin Monofosfat
FUR/FUrd	:Fluorouridine / Floroüridin
FUTP	:Floroüridin Trifosfat
GAPDH	:Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
GEM	:Gemsitabin
GPX	:Glutasyon Peroksidaz 1

GSH	:Glutasyon
GST	:Glutasyon S-Transferaz
GTS	:Genomic Template Stability / Genomik Kalıp Kararlılığı
hCNT3	:Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 / İnsan Konsantrik Nükleosit Taşıyıcı-3
hENT1	:Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 / İnsan Dengeleyici Nükleosit Taşıyıcı-1
hNT	:Human Nucleoside Transport / İnsan Nükleosit Taşıyıcıları
HSP60	:Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1
HSP70	:Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 2
IC₅₀	:Half Maximal Inhibitory Concentration
IGF-1	:Insulin Like Growth Factor 1 / İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IL-1β	:İnterlokün-1 β
IL-6	:İnterlokün 6
İGSÜ	:İleri Glikasyon Son Ürünleri
KAT	:Katalaz
LDL	:Low-Density Lipoprotein / Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MnSOD	:Manganez Süperoksit Dismutaz
MTT	:3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NAD⁺	:Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	:Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NDPK	:Nucleoside-Diphosphate Kinase / Nükleotit Difosfat Kinaz
NEIL	:Nei Like DNA Glycosylase 1
NF-$\kappa\beta$:Nükleer Faktör Kappa β
NMPK	:Nucleoside-Phosphate Kinase / Nükleosid Monofosfat Kinaz
NT	:Nükleosit Taşıyıcı
OPRT	:Phosphoribosyltransferase / Fosforibozil Transferaz
P53	:Tumor Protein P53
PARP	:Poli ADP-Riboz Polimeraz
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	:Platelet-Derived Growth Factor / Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PDR	:Proliferative Diabetic Retinopathy / Proliferatif Diyabetik Retinopati
PEDF	:Pigment Epithelium-Derived Factor / Pigment Epitel Kaynaklı Faktör

PI	:Propidyum İyodür
PKC	:Protein Kinaz C
PPARα	:Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör α
PPARβ	:Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör β
PPARγ	:Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör γ
PRPP	:Fosforibozil Pirofosfat
qRT-PCR	:Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
RAPD	:Randomly Amplified Polymorphic DNA / Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
R-İGSÜ	:Reseptör İleri Glikasyon Son Ürünleri
RNA	:Ribonükleik Asit
ROT	:Reaktif Oksijen Türleri
RPE	:Retinal Pigment Epitelyum
Rpm	:Revolutions Per Minute
RR	:Ribonükleotit Redüktaz
SDH	:Sorbitol Dehidrojenaz
SITC	:Sitokrom C
SOD	:Süperoksit Dismutaz 1 [Cu-Zn]
TAE	:Tris/Asetik Asit/ EDTA
TCCF	:Total Corrected Cellular Fluorescence Intensity
TGF- β	:Transforming Growth Factor β 1 / Dönüştürücü Büyüme Faktörü β 1
TK	:Timidin Kinaz
TNF-α	:Tümör Nekroz Faktör A
TP	:Timidin Fosforilaz
TRAIL	:TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TS	:Timidilat Sentaz
UK	:Üridin Kinaz
UP	:Üridin Fosforilaz
UV	:Ultraviyole
VEGF	:Vascular Endothelial Growth Factor / Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
YBMD	:Yaşa Bağlı Maküler Dejenerasyon
ZO	:Zonula Okludens

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetik retinopati, 20-74 yaş arası yetişkinler arasında körlük vakalarının en sık görülen nedenidir (1, 2). Tip 1 ve tip 2 diyabetli hastaların, hastalıklarının ilk 20 yılı boyunca %60'dan fazlasında retinopati geliştiği bildirilmiştir (2). 2020 yılında dünya çapında yaklaşık 463 milyon kişinin diyabet hastası olduğu tahmin edilmektedir ve bu sayının 2030 yılına kadar 578 milyona, 2045 yılında ise 700 milyona kadar yükselmesi beklenmektedir (3). Diyabetik retinopati; perisitlerin kaybı, endotel hücrelerin proliferasyonu, endotel hücrelerin arasındaki sıkı bağlantı noktalarının bozulması, bazal membran kalınlaşması, damarlardaki sıvı/makromolekül sızıntısı ve neovaskülarizasyon ile ilişkili olan mikrovasküler bir hastalıktır (4, 5). Diyabetli hastalarda hiperglisemik ortama uzun süreli maruziyet sonucu retina incelmeye, hasar görmeye ve dıştaki kan-retina bariyeri ise bozulmaya başlar (6). Optik nöropatinin edinsel toksik tiplerini ise diyabet ve adjuvant kemoterapi gibi etkiler içermektedir (7). Kanser kemoterapi tedavisi ile meydana gelen bu oküler toksisite ise gözün pek çok anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliğinde önemli hasarlara neden olmaktadır (8).

Gemsitabin+5-Florourasil (GEM+5-Fu) kombine kemoterapi ilaçları baş-boyun, kolorektal, meme, pankreas, safra, dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (9-15). 5-Florourasil, bir antimetabolittir ve urasilin analogu olarak hücrelere girer ve DNA hasarı ile birlikte sitotoksik etki gösterir (16-19). Gemsitabin ise, bir antimetabolik sitotoksindir ve deoksisitidin analogu olarak riboz şekeri üzerindeki hidroksilin yerini alır böylece hücresel DNA sentezini inhibe eder (20-26).

Yapılan çalışmalarda, kemoterapi tedavisi alan hastalarda kemoterapi ajanlarının oküler toksisiteyi ve oftalmolojik çeşitli yan etkileri indüklediği rapor edilmiştir (27-30).

Bu veriler ışığında, bu yüksek lisans tezi kapsamında hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerine uygulanan 5-Florourasil ve Gemitabin kombinasyonunun retinal pigment epitel hücrelerinde hücre canlılığı, DNA hasarı, oksidatif stres, apoptoz ve yara iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılması amaçlandı.



GENEL BİLGİLER

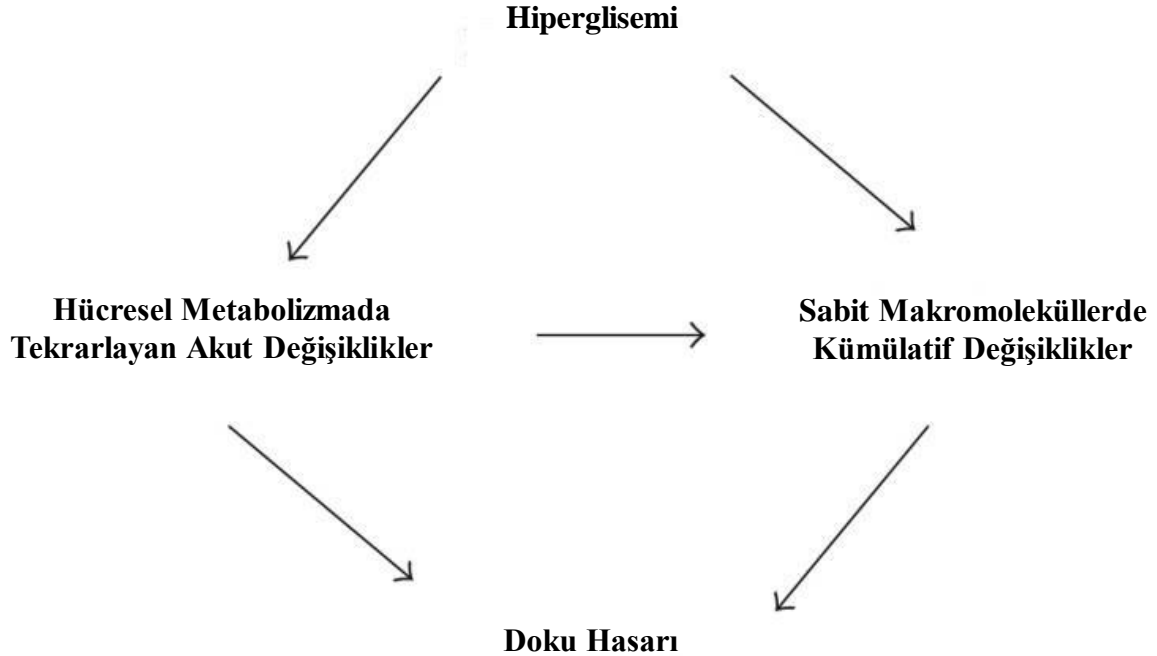
DIYABETİK RETİNOPATİ

Diyabetik Retinopati (DR), 20-74 yaş arası erişkinlerde diyabetin önemli bir komplikasyonu olarak görme kaybının önde gelen nedenidir (31-33). 1990-2010 yılları arasında DR'nin önlenebilir körlüğün ve orta ila şiddetli görme bozukluğunun en sık görülen beşinci nedeni olduğu bildirilmiştir (34). 2017 yılında ise dünya çapında yaklaşık 425 milyon kişinin diyabet hastası olduğu bildirilmiş ve 2040 yılına kadar bu sayının 642 milyona çıkacağı öngörülmüştür (35). Epidemiyolojik çalışmalara göre, diyabet hastası olan yaklaşık üç kişiden birinde DR belirtileri olmakla birlikte bu diyabetik retinopatiler: şiddetli proliferatif olmayan DR veya proliferatif DR (PDR) olarak sınıflandırılmıştır (36, 37). Bunlara ilaveten diyabetik retinopatili hastalarda görülen bir diğer komplikasyon diyabetik maküler ödemdir (DMÖ) (38). Proliferatif diyabetik retinopati, özellikle tip 1 diyabetli hastalarda görmeyi en sık tehdit eden lezyondur. Bununla birlikte, DMÖ diyabetli hastaların yaşadığı görme kaybının en önemli nedenidir (39).

Diyabetli hastalarda uzun süreli hiperglisemik ortam retinada incelmeye ve dıştaki kan-retina bariyerinin bozulmasına neden olmaktadır. Retina metabolik olarak oldukça aktif bir doku olduğundan retinal pigment epitel hücrelerinde bulunan glukoz ve monokarboksilat taşıyıcıları görme fonksiyonu için önemlidir. Buna ilaveten retinoidlerin kan dolaşımından retinaya, retinal pigment epitel hücreleri ile taşınımı normal görme fonksiyonu için temel olarak kabul edilmektedir. Bu taşınımlar retinal pigment epitel hücrelerinin apikal kısmında yerleşmiş olan Na^+ - K^+ -ATPaz tarafından yapılmaktadır (6). Bu nedenle kan-retina bariyeri normal görme fonksiyonunun devamı için önem taşımaktadır. Retinanın dış tabakasında yerleşmiş olan ve

fotoreseptör hücrelerinin onarımını ve rejenerasyonunu sağlayan retinal pigment epitel hücrelerinde meydana gelen hücre kaybı retinal dejenerasyona ve körlüğe neden olabilmektedir (40, 41).

Diyabette devam eden yüksek sirkülasyonlu glikoz, yaşam boyu süren bu hastalıkta birçok akut (ve tekrarlanan) ve uzun süreli kümülatif değişiklikler yoluyla retinaya zarar verebilir (Şekil 1). Retinanın kılcıl damarları, kan-retina bariyerini korumaktan sorumlu olan endotelyal hücrelerle kaplıdır ve buna ek olarak damarlara dayanıklılık sağlamaya yardımcı olan eşit sayıda perisit ile desteklenmekle birlikte diyabette endotelyal hücrelerin perisitlere oranının 4:1 olarak değiştiği bildirilmiştir (42). Buna ilaveten, sürekli yüksek glikoza maruziyet retinanın kan damarlarındaki sızıntılarını önleyen sıkı bağlantı noktalarına zarar verir. Bu durum damarlardan sıvının veya kanın retinaya sızmasına ve böylece retinanın şişmesine neden olur (43). Progresif disfonksiyon nedeniyle, kılcıl damarlar normalden daha erken ölür ve bunu takiben neovaskülarizasyon oluşumu sonrası retina yırtılmasına ve körlüğü takip edilebilen iskemiye yol açar (44).



Şekil 1. Diyabette, glikozun dolaşıma devam etmesi, doku hasarına neden olabilecek birçok akut ve uzun süreli kümülatif değişiklik nedeniyle retinaya zarar verebilir. Bazı akut hasarlar, yaşam boyu bu hastalıkta birçok kez tekrarlandığında, sabit makromoleküllerde kümülatif değişikliklere neden olabilir (45)

Diyabetik Retinopati için Risk Faktörleri

Diyabetik retinopati ve diyabetik maküler ödem birçok yaygın risk faktörünü paylaşmaktadır (46). Bunlar;

Değiştirilemez risk faktörleri: diyabet süresi, ergenlik ve hamilelik

Diyabet süresi: Tip 1 diyabetli hemen hemen tüm hastaların, hastalığa maruz kalma süreleri yeterince uzunsa bir dereceye kadar retinopati geliştirdiği bildirilmiştir (47, 48). Bununla birlikte, hem tip 1 hem de tip 2 diyabette yapılan birçok çalışma, hastalık süresinin DR için önemli bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir (49-51).

Ergenlik ve hamilelik: Ergenlik, tip 1 diyabette DR için bilinen bir risk faktörüdür. Buna ek olarak, ergenlik başlangıcından sonraki diyabet süresinin, diyabetik retinopati gelişimi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu bildirilmiştir (52). DR ve DMÖ, özellikle tip 1 diyabetli hastalarda hamilelik sırasında hızla ilerleyebilmektedir fakat bu ilerleme genellikle geçicidir ve doğum sonrası dönemde hızlı bir şekilde geriler (39).

Değiştirilebilir risk faktörleri: hiperglisemi, hipertansiyon, dislipidemi

Hiperglisemi: Hiperglisemi, DR ve DMÖ için en önemli risk faktörlerinden biridir. Glisemi düzeyi ile retinopati belirtilerinin sıklığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu ve gliseminin kontrolünün retinopati gelişme ve ilerleme riskini azalttığı bildirilmiştir (53-55).

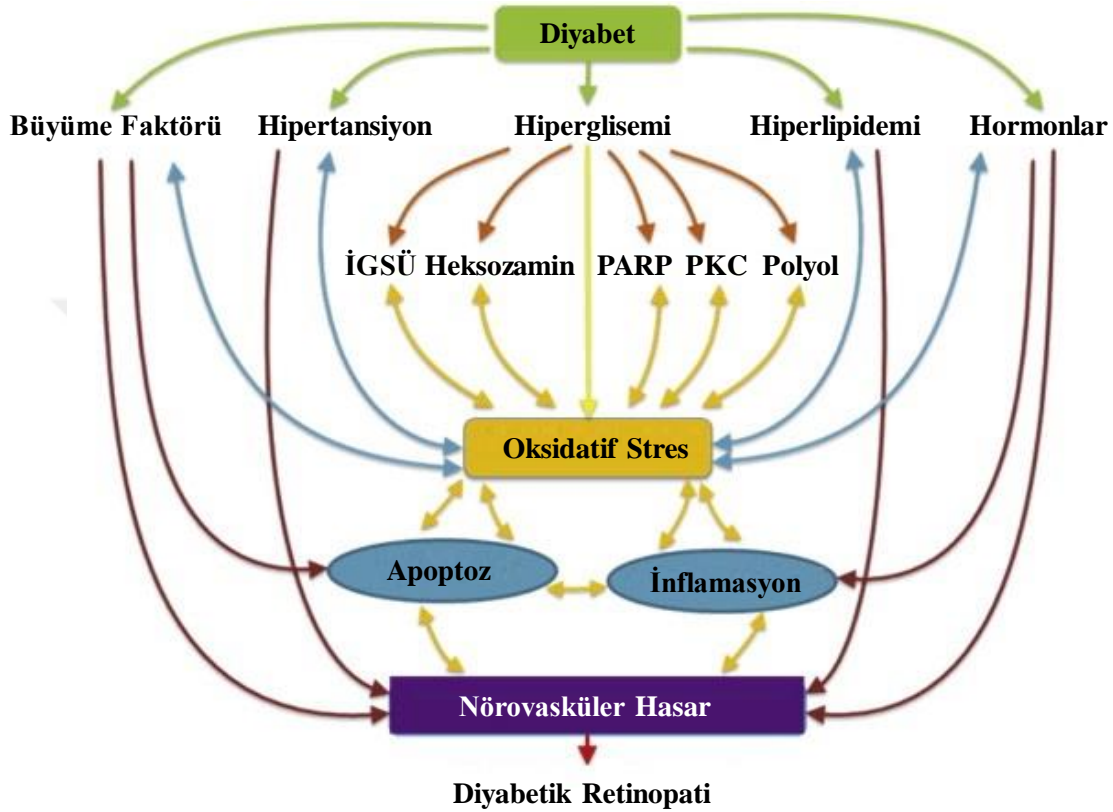
Hipertansiyon: Çoklu epidemiyolojik çalışmalarda hipertansiyon, DR ve DMÖ için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (56, 57). Tip 2 diyabetli hastalarda kan basıncı kontrolünün mikrovasküler hastalık riskini %37, DR'nin ilerleme oranını %34 ve görüş keskinliğinin bozulma riskini %47 oranında azalttığı bildirilmiştir (58).

Dislipidemi: Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol ile DR insidansı arasında bir ilişki olduğu bildirilmekle birlikte DR veya DMÖ'de, tek bir tip lipit ölçümü bulunamadığı bildirilmiştir (51, 59, 60).

Diyabetik Retinopati Patogenezi ve Bazı Mekanizmalar

Diyabet, retina içindeki metabolitlerde bozulma, büyüme faktörleri, enflamatuar moleküller ve adezyon molekülleri de dahil olmak üzere bir dizi aracı molekülün üretim şeklini

değiştirir. Bu durum da artan kan akışı, artan kılcal geçirgenlik, değişen apoptoz ve son olarak artan anjiyogenez ile sonuçlanır. Retinadaki diyabet kaynaklı metabolik değişiklikler ve DR patofizyolojisine dahil olan bir dizi molekülü ve yolağı indükleyen basamaklar Şekil 2’de verilmiştir (61).



Şekil 2. Diyabetik retinopatide diyabet kaynaklı nörovasküler hasar için genel özellikler (61) (İGSÜ: İleri glikasyon son ürünleri, PARP: Poli (ADP-riboz) polimeraz, PKC: Protein Kinaz C)

Hiperglisemi

Hiperglisemi, genellikle çeşitli metabolik yolların aktivasyonu ile DR ile ilişkili retina hasarının anahtar başlatıcısı olarak kabul edilir. Hücrelerdeki yüksek glikoz, protein kinaz C (PKC), polyol, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve heksozamin yollarının aktivasyonunu ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini artırabilir (Şekil 3). Ayrıca, yüksek glikoz enzimatik olmayan glikozilasyonu artırır bu da yüksek seviyede ileri glikasyon son ürünlerine (İGSÜ) yol açar. Hipergliseminin oksidatif stresin artması, apoptoz, enflamatuar yanıt ve anjiyogenezin teşvik edilmesi gibi bir dizi olaya sebep olduğu ve böylece diyabetik retinaya zarar vererek DR'ye yol açtığı bildirilmiştir (45, 62, 63). Buna ek olarak, retinal pigment epitel

hücrelerinin hiperglisemiye bağlı apoptozunun, diyabetik retinopatinin ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir (64).

İleri glikasyon son ürünleri (İGSÜ): Glikozun toksik etkilerine aracılık eden hücre metabolizmanın bir yolu da İGSÜ'lerin üretimidir. İGSÜ'ler, metilglioksal ve glioksal gibi güçlü glikatör dikarbonil bileşiklerinden üretilir ve proteinlerin amino gruplarında, lipidlerde ve DNA'da; glikoz ile enzimatik olmayan glikasyonu içeren birkaç kompleks yolak oluşturabilirler (65). Bu reaksiyonlar sadece proteinlerin yapısını ve fonksiyonunu değiştirmekle kalmaz, aynı zamanda molekül içi ve moleküller arası çapraz bağ oluşumuna da neden olur. Diyabette, retinanın mikrovaskülerinde İGSÜ ve reseptörü R-İGSÜ birikimi artar (66). Retinopatinin ilerleyen aşamalarında, İGSÜ'ler geri dönüşümsüz olarak oluşur ve retinal kılcal damar hücrelerinde birikir. Ayrıca, nükleer transkripsiyonel faktör, NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açan ve hücrelere daha fazla zarar veren İGSÜ yolağı yoluyla daha fazla ROT üretildiği varsayılmaktadır (67). İGSÜ'ler retinal vasküler hücrelerde nitrosatif stresi artırır buda NF- κ B ve kaspaz-3'ün aktivasyonu vasıtasıyla retinal kılcal damar hücrelerinin apoptozuna yol açan bir dizi olayı başlatır (68). Proteinlerin nitrasyonu, mitokondriyal ve sitosolik proteinleri inaktive edebilir böylece proteinlerin düzenlenmesini ve fonksiyonlarını bozarak apoptozu artırır, sonuçta patolojik olarak hücre bileşenlerinin hasar görmesine yol açar (69).

Heksozamin: Heksozamin biyosentez yolağı, hücredeki yüksek glikoz ve süperoksit konsantrasyonlarının bazı toksik etkilerine aracılık edebilecek başka bir yoldur (70). Çeşitli sitoplazmik membran ve nükleer aktivitelere sahip çok fonksiyonlu bir protein olan gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenazın (GAPDH) inhibisyonu, ROT tarafından tüm glikolitik metabolitlerin, transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere, translasyon sonrası modifikasyon için kullanılan bir substrat olan UDP-N-asetil glukozamini üreten heksozamin yolağına sapsmasına neden olur (71). Buna ek olarak GAPDH'nin inhibisyonu, hücre içi İGSÜ öncüsü metilglioksalı aktive ederek İGSÜ yolağını aktive edebilir (72). Buna ek olarak, GAPDH doğrudan glikasyon ve nitrasyon yoluyla modifiye edilebilir. Ayrıca mangan bağımlı süperoksit dismutazın (MnSOD) aşırı ekspresyonu, GAPDH aktivasyonunu azaltır.

PARP (Poli (ADP-riboz) polimeraz): Poli (ADP-riboz) polimerazlar (PARP'lar), ADP-ribozun hedef proteinlere transferini katalize etme yeteneğini paylaşan ilgili enzimler ailesidir (73). Peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör PPAR α , PPAR β ve PPAR γ olmak üzere 3 alt tür tanımlanmıştır (74). Protein PPAR γ , diyabetik hayvanların retinalarında aktive olduğu saptanan ve DNA kırılmaları ile oksidatif stresi şiddetlendiren nükleer bir enzimdir.

PARP aktivasyonu, NAD⁺ substratını tüketir, glikolizi ve mitokondriyal fonksiyonu yavaşlatır ve sonuçta hücre ölümüne yol açar. PARP, diyabetik retinada endotel ve nöronal disfonksiyonun patogenezinde rol oynayan, reaktif oksijen türlerinin üretimini tetikleyen PKC yolağına, heksozamin yolağına ve İGSÜ oluşumunun aktivasyonuna bağlı hiperglisemi akışını artırır (75). Oksidatif stres, PARP'ı aktive eden ve sonuçta NF-k β aktivasyonunu güçlendiren genlerin ekspresyonunun artmasına neden olur (71).

PKC yolağı: PKC'nin aktivasyonu, diyabetik retinopatinin patogenezinde yer alan ana bir yol olarak kabul edilmektedir (76). Yüksek glikoz seviyesi, ROT salınımını ve diaçilgliserol (DAG) sentezini artırarak PKC'nin aktivitesini artırır (77). Aktif PKC ise damar geçirgenliğinin ve kan akışının artmasını, hormonların ve büyüme faktörü reseptörünün geri dönüşümünün değişimini, neovaskülarizasyonun uyarılmasını, endotel proliferasyonunu ve apoptozunu içeren diyabetik retinopatinin çeşitli karakteristik değişikliklerini sağlayabilir, ayrıca VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü), IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü-1) ve TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü β) gibi çeşitli faktörlerin etkisini de düzenleyebilir (78). Buna ilaveten oksidatif stres ve PKC'nin birbiriyle ilişkili olduğu ve PKC'nin ROT aracılı diyabetik komplikasyonlarda rolünün olduğu bildirilmiştir (79).

Bir anjiyogenez indükleyicisi olan VEGF proliferatif ve proliferatif olmayan diyabetik retinopatilerin aracısı ve başlatıcısı olarak, diyabetik retinopatide önemli bir rol oynar (80). VEGF'nin retinal ekspresyonu ROT ile yükselir (81) ve VEGF, PKC ve polyol yolağı gibi retinopatinin gelişimi için önemli olan diğer metabolik yollarla da etkileşime girebilir (82).

IGF-1, artmış proliferasyon, kemotaksi ve anjiyogenez dahil olmak üzere endotelial hücreler üzerinde doğrudan mitojenik etkilere sahip olabilir ve PKC'nin aktivasyonu yoluyla retina mikrovaskülerinde endotelial hücrelere glikoz taşınmasını uyarabilir, buna ilaveten VEGF'nin ekspresyonunu ve aktivitesini modüle edebilir (83). Ayrıca IGF-1'in PKC yolağı yoluyla oksidatif stres ile modüle edilmesi mümkündür (84).

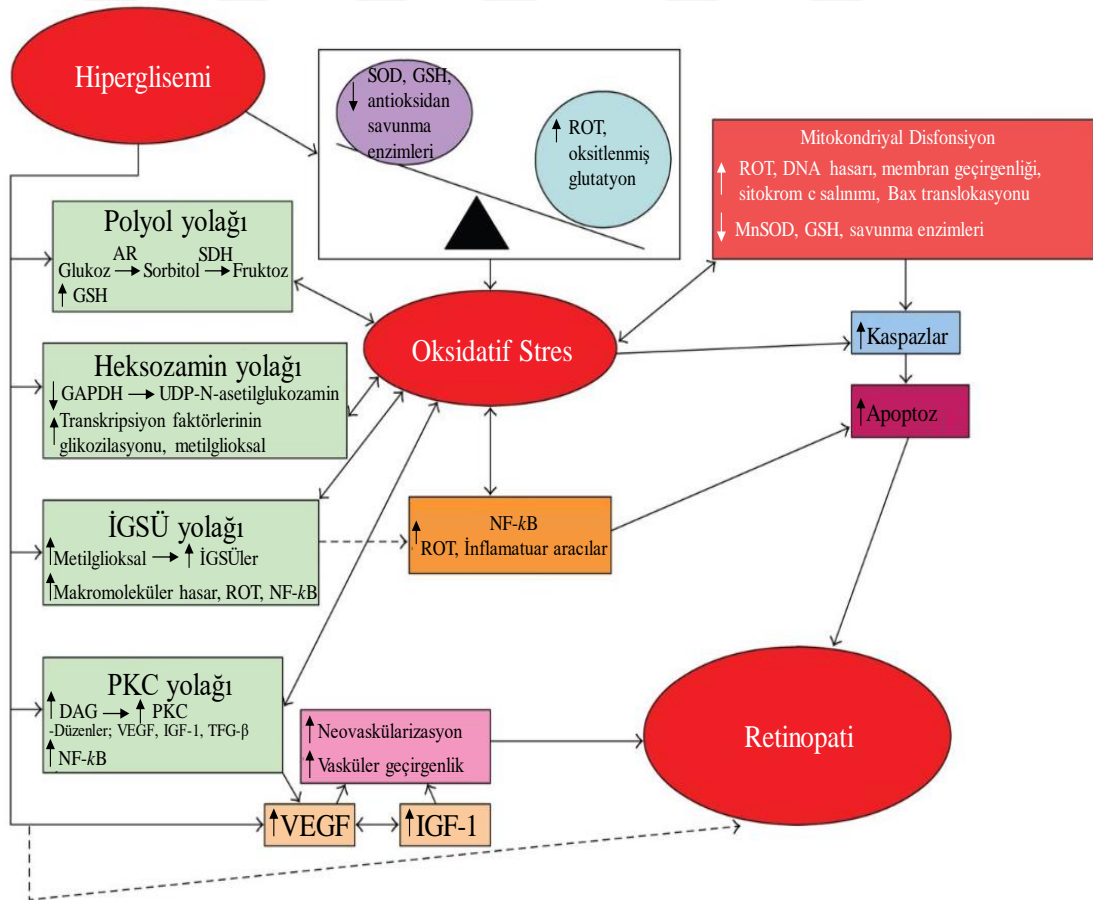
Polyol yolağı: Diyabetik retinopatide hiperglisemiye bağlı metabolik bozulmalardan biri polyol yolağıdır. Polyol yolağı, glikozun sorbitole dönüştürülürken aldoz redüktaz tarafından katalize edilen bir reaksiyondur. Sorbitol daha sonra sorbitol dehidrojenaz tarafından fruktoz oluşturmak üzere oksitlenir. Diyabette artan polyol yolağı oksidatif stresi artırabilir. Bunun nedeni, aldoz redüktazın NADPH gerektirmesidir ve artan polyol yolağı aktivitesinin, NADPH için glutatyon redüktaz ile rekabet ederek, NADPH'yi tükettiği varsayılır. Bu olay, hücre içi antioksidan olan, GSH'ın (glutatyon) yenilenmesi için NADPH'nin kullanılabilme durumunu azaltabilir (85).

Enflamasyon

Enflamasyon, lökositlerin alımı ve aktivasyonu gibi çeşitli fonksiyonel ve moleküler araçları içeren yaralanmaya spesifik olmayan bir yanıttır. Enflamasyona özgü olan molekülerin ve fonksiyonel değişikliklerin çoğu, diyabetik hayvanlardan veya insanlardan gelen retinalarda ve buna ek olarak diyabetik koşullar altındaki retina hücrelerinde tespit edilmiştir (86, 87).

Retinal kılcal damarlarda artmış retinal lökostaz, DR gelişimine yol açan vasküler hasarla ilişkilidir (88).

İleri glikasyon son ürünleri, PKC, polyoller ve oksidatif stres dahil olmak üzere diyabetin neden olduğu çeşitli metabolik faktörler, NF- κ B ve nükleer reseptör süper ailesinin diğer üyeleri gibi proenflamatuar araçları aktive ederek proinflamatuar sitokinler, kemokinler ve diğer enflamatuar aracı proteinleri serbest bırakır (Şekil 3). İnterloklin-1 β (IL-1 β), TNF- α ve interloklin-6 (IL-6) gibi proenflamatuar sitokinlerin, PDR hastalarının vitrözünde anlamlı şekilde daha yüksek olduğu ve PDR'ye yol açan retinal patogenezdaki rolleri bildirilmiştir (89-91). Diyabetik retinada artan IL-1 β , TNF- α ve IL-6 seviyesi, kan-retina bariyerinin yıkımı, retinal lökostaz ve apoptoz DR ile ilişkilidir (92, 93).



Şekil 3. Diyabetik retinopatide oksidatif stres aracılı metabolizma. Hiperglisemiye bağlı oksidatif stres, yüksek glikoz ile diyabetik komplikasyonların gelişmesinde önemli olan bir bağlantı olarak kabul edilir. Retinopatinin gelişiminde diyabetin neden olduğu çeşitli anormallikler oksidatif stresten etkilenir ve birbirleriyle ilişkili olduğu düşünülür (45)

RETİNA VE RETİNAL PİGMENT EPİTELYUM (RPE)

Anatomik olarak, retinal pigment epitelyumu (RPE), nöral retina ve koroid arasında yer alan nöroektodermal kaynaklı, tek tabakalı, kan-retina bariyerinin bir kısmını oluşturan pigmentli hücrelerdir. Ayrıca retinanın yapısal ve işlevsel bütünlüğünün korunmasına da yardımcı olur. RPE, göz ile dolaşım maddelerinin birbiriyle olan kontrolsüz etkileşiminin önlenmesi adına dış kan-retina bariyerini (Bruch membranının yönlendiği tarafa, koryokapillarisine doğru) oluşturur. RPE'nin oluşturduğu iç kan-retina bariyeri ise apikal tarafa, nöral retinaya (fotoreseptör dış segmentlerine) bakar (Şekil 4).

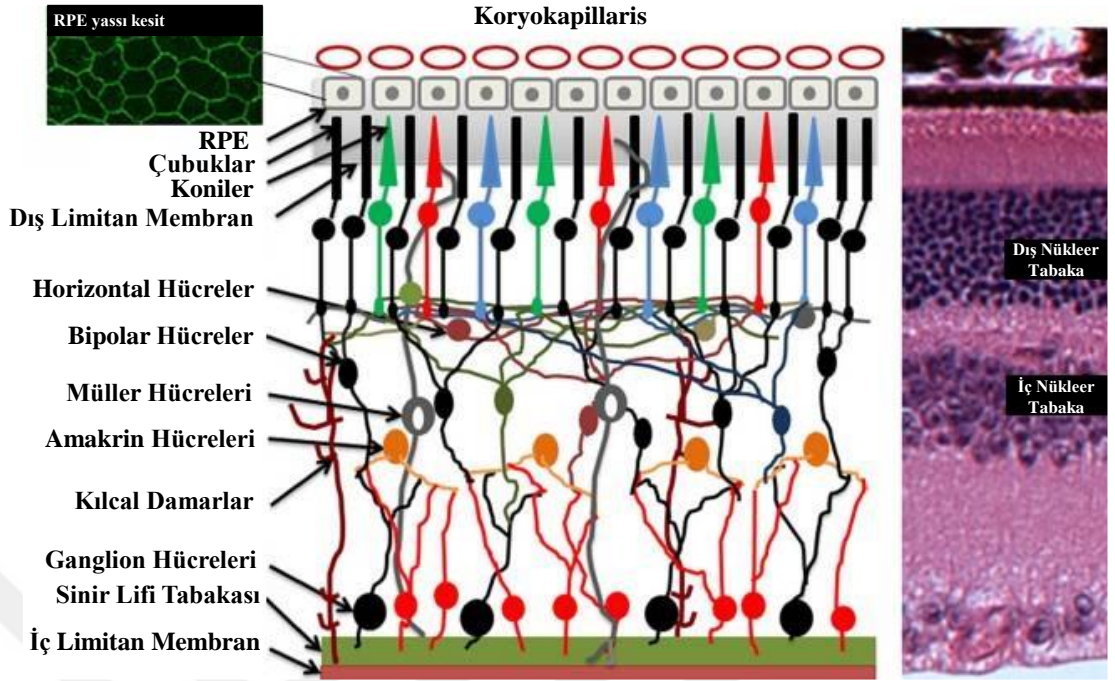
Pigmentli bir hücre tabakası olarak RPE, retinadaki lens aracılığı ile ışık enerjisini soğurur. RPE, iyonları, suyu ve metabolik son ürünleri subretinal boşluktan kana taşıırken; glikoz dahil olmak üzere retinol, yağ asitleri gibi besinlerini de kandan alır ve bu besinleri fotoreseptörlere vererek onları besler. Olgunlaşmış RPE'de gerçekleşen olayların bir kısmı şöyle sıralanabilir (94, 95);

- Işığın soğurulması ve foto-oksidasyona karşı koruma
- Nöral retina (apikal taraf) ile koryokapillaris (bazal taraf) arasındaki besin maddelerinin, iyonların ve suyun düzenlenmesi
- Subretinal boşluktaki iyonların dengesinin sağlanması
- Görsel döngünün sağlanması (fotoreseptörler ve RPE arasında 11-cis retinal ve tüm-trans-retinal değişimi)
- Hasara uğramış fotoreseptörlerin dış segmentlerinin fagositozu
- Büyüme faktörlerinin salınımı

Fotoreseptörlerin ışık tarafından uyarılması halinde sodyum iyonu hücre içerisine girer ve potasyum iyonu ise hücre dışına çıkar. Subretinal boşluk içerisindeki sodyum-potasyum iyon konsantrasyonları arasında yapılan bu değişiklikler RPE tarafından düzenlenmektedir. RPE, fotoreseptör hücrelerinden retinal geri dönüşüm olayını gerçekleştirir ve bu olay görsel döngünün devamlılığı için gereklidir. Işık

tarafından uyarılmış fotoreseptörler foton emiliminden sonra oluşan tüm-trans-retinali tekrar 11-cis-retinal haline getiremez. RPE’de tüm-trans-retinali, 11-cis-retinal'e yeniden izomerlenir ve buradan fotoreseptörlere geri taşınır. Bu süreç retinanın görsel döngüsü olarak bilinir. Ayrıca apikal tarafta bulunan membranın voltaja bağlı şekilde iyonları iletmesi, RPE'nin fotoreseptör uyarılabilirliğinin korunması için gerekli olan subretinal boşlukta bulunan iyon konsantrasyonunun stabilize olmasını sağlar. Buna ek olarak, metabolik olarak aktif olan fotoreseptörler ışığın etkisi altında dış segment membranlarını yenilerler. Dış segmentleri oksitlenmiş, hasar görmüş fotoreseptörler ile dolmuş olan bu membranlar, RPE aracılığı ile geri kazanılmak üzere fagosite edilir. Işığa duyarlı olan bu dış segmentler fotoreseptörlerin tabanından yeniden oluşturulmak için fotoreseptörlere geri gönderilir. Buna ilaveten, RPE, koryokapillaris ve fotoreseptörlerin yapısal bütünlüğünü korumaya yardımcı olan çeşitli büyüme faktörlerini (PDGF, FGF, PEDF gibi) salgılayabilir. Ayrıca, RPE'nin salgı aktivitesi, immünoşüpresif faktörleri salgılayarak gözün bağışıklık ayrıcalığını belirlemede önemli bir rol oynar. Bu basamaklar RPE'nin görsel işlevi için gereklidir. Bu fonksiyonlardan herhangi birinin başarısız olması, retinanın bozulmasına, görsel fonksiyon kaybına ve böylece körlüğe yol açabilir (95).

Proliferatif diyabetik retinopati (PDR), diyabetik maküler ödem (DMÖ) ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon (YBMD) gibi retina hastalıklarında RPE'nin fizyolojik fonksiyonlarında bozulma olduğu görülmektedir. Diyabetik retinopati patogenezinde, iç kan-retina bariyerinin değişen geçirgenliği, perisit kaybı, retinal kapiller oklüzyon, bazal membran kalınlaşması ve nöronal retina anormalliklerinin olduğu bilinmektedir. Buna ilaveten, endotel hücreleri ve RPE tarafından korunan iç ve dış kan-retina bariyerleri değişikliklere uğrayarak pato-fizyolojik ödeme neden olmaktadır (96, 97).

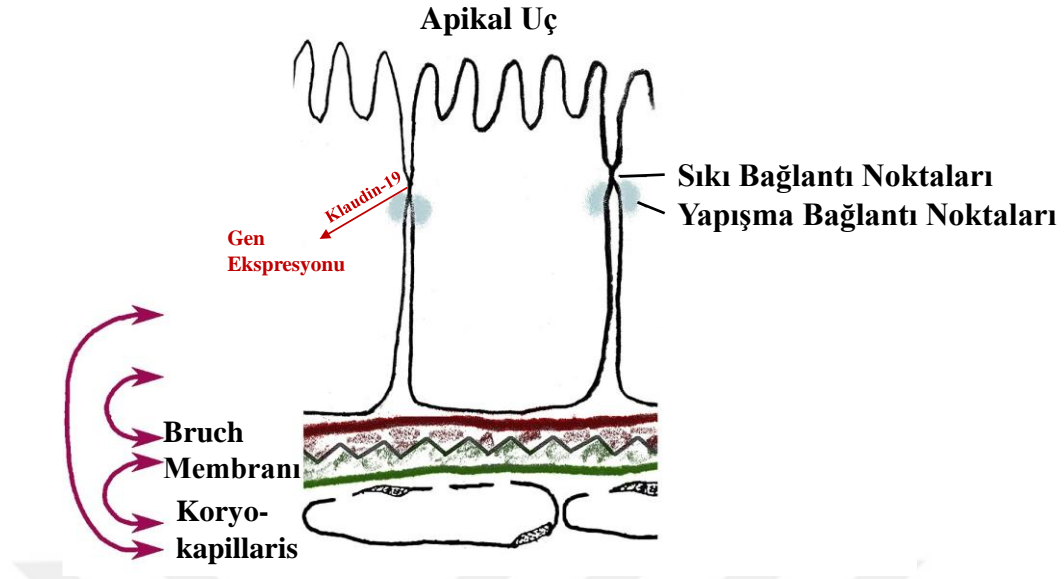


Şekil 4. Memeli retinasının basitleştirilmiş görseli (98)

KAN-RETİNA BARIYERİ VE RETİNA PİGMENT EPİTELYUMU

İç ve dış kan-retina bariyeri olmak üzere iki kısma ayrılan kan-retina bariyeri, kan dolaşımı ve retina arasındaki moleküler sirkülasyonu düzenler (99). İç kan-retina bariyeri, birbirine sıkı bağlantılarla bağlı şekilde tek sıralı vasküler endotel hücrelerinden oluşur. Bu endotel hücrelere bitişik şekilde ise glial hücreler, müller hücreleri, perisitler ve farklılaşmış nöronlar bulunur (100, 101). Dış kan-retina bariyeri ise nöronal retinayı koroidde bulunan kılcal damarlardan ayıran, tek sıralı retina pigment epiteliumundan oluşur (102, 103).

Kan-retina bariyerini oluşturan vasküler endotel ve retina pigment epitel hücreleri arasında sıkı bağlantılar (tight-junctions) vardır (Şekil 5). Bu bağlantılar düşük geçirgenliğe sahip bir mikroçevre oluştururlar (104). Buna ek olarak, retina endotel hücreleri diğer endotel hücrelere göre daha az vezikül taşınımı gerçekleştirir ve böylece retinayı çevreleyen sıvı miktarını sınırlandırılmış olur (104, 105). Ayrıca, kan-retina bariyeri; oküler vasküler tabaka ve retinal dokular arasındaki sıvıları ve moleküler hareketi düzenleyerek makromoleküllerin ve diğer potansiyel olarak zararlı olabilecek ajanların retinaya sızmasını önler (106).



Şekil 5. Retinal pigment epitelyum hücresinde sıkı bağlantı noktaları ve dış kan-retina bariyeri (107)

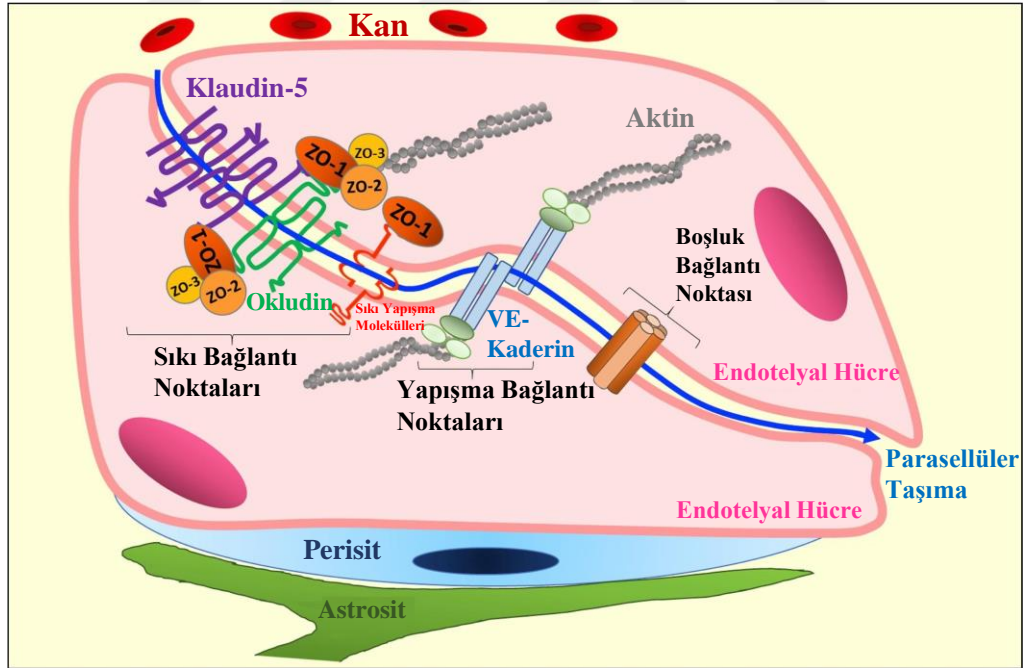
İç kan-retina bariyeri, birbirine komşu olan retinal endotel hücreler arasındaki sıkı bağlantılar (zonula okludens) tarafından oluşturulur (108). Bariyerin başlıca yapısını oluşturan bu aralıksız endotel hücre tabakası; astrositler ve müller hücreleri tarafından kaplanmış bir bazal laminaya dayanır. Ayrıca, endotel hücrelere yakın olacak şekilde bazal laminada perisitler de bulunmaktadır ancak perisitler aralıksız bir tabaka oluşturmadığından dolayı bariyerin difüzyon karakterine katkıda bulunmazlar. Astrositler, müller hücreleri ve perisitlerin, retinal nöronal sirkülasyonun mikroçevresindeki değişiklikleri gösteren endotel hücrelerine düzenleyici sinyaller ileterek retinal endotel hücrelerin ve iç kan-retina bariyerinin aktivitesini etkilediği düşünülmektedir (106).

Dış kan-retina bariyeri, birbirine komşu olan retina pigment epitelyal hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (zonula okludens) tarafından oluşturulur (109). RPE, bitişik lateral hücre duvarları arasındaki sıkı bağlantılar tarafından uçlarına doğru yanal olarak birleştirilen tek bir RPE hücresi tabakasından oluşur. Bruch membranına dayanan RPE, nöral retina'yı koryokapillarısten ayırır ve besin maddelerinin kandan fotoreseptörlere ulaşımını düzenlemenin yanı sıra atık ürünleri ortadan kaldırmada ve retina adezyonunu korumada temel bir rol oynar.

Hem iç hem de dış kan-retina bariyerindeki sıkı bağlantı noktaları, kan ile retina arasındaki sıvıların ve moleküllerin parasellüler hareketini kısıtlar. Buna ek olarak, endotelial hücreler ve RPE hücreleri, içeriye ve dışarıya doğru olan hareketleri aktif olarak düzenler (106).

Bağlantı Proteinleri

Endotelial hücreler arasında bağlantı proteinleri bulunmaktadır ve bu proteinler zonula okludens ve zonula adherens olarak adlandırılmaktadır. Zonula okludens bağlantıları; seçici geçirgen olmakla birlikte, lipidlerin (yağların) ve proteinlerin sızmasını engellemektedir. Bu şekilde bu iki bölüm arasında kimyasal bir gradient oluşmaktadır. Kan-retina bariyerindeki endotel hücreler arasındaki zonula okludens; kladin, okludin ve zonula okludens proteinleri (ZO-1, ZO-2, ZO-3) oluşturmaktadır. Zonula adherens adını alan hücreler arası tutunma (yapışma) bağlantılarında ise kaderinler önemlidir ve zonula adherens proteini olarak VE-kaderinler endotel hücreleri arasında bulunurlar (Şekil 6) (110).



Şekil 6. Kan-retina bariyerinde parasellüler taşıma ve sıkı bağlantı proteinleri (111)

Sıkı bağlantılar iki ana fonksiyonda görev alırlar. Bu fonksiyonlardan biri moleküllerin parasellüler boşluktan geçişini sınırlandıran geçit fonksiyonu, diğeri ise

apikal ve bazolateral (bazal) plazma zarı arasındaki proteinlerin ve lipidlerin hareketini engelleyerek hücre polaritesini sağlayan engel fonksiyonudur (112, 113). Buna ek olarak, hücrenin proliferasyonu, gen ekspresyonu ve farklılaşması gibi çeşitli hücre sinyalizasyon işlemlerinde sıkı bağlantıların rolleri tanımlanmıştır (114, 115).

MİTOKONDRIYAL APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES

Diyabetik Koşullar Altında Oksidatif Stres

Normal fizyolojik şartlar altında, elektron taşıma zincirine giren oksijenin yaklaşık %0,1 ila %5'i bir reaktif oksijen türü (ROT) olan süperoksite indirgenir ve geri kalan oksijen ise metabolik süreçlerde kullanılır. ROT, sitokrom P450, NAD(P)H oksidaz(lar) ve nitrik oksit sentazlar dahil olmak üzere mitokondriyal elektron taşıma zinciri dışındaki diğer kaynaklardan da üretilebilir (116). ROT, normal hücrel fonksiyonların devamlılığına destek vermek için tüm hücrelerde sürekli olarak üretilir. Buna ek olarak, endojen veya ekzojen kaynaklı yüksek seviyedeki ROT üretimi veya ROT'un etkin bir şekilde süpürülmemesi patolojik durumlara neden olabilir. Normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen ROT, antioksidan sistem ile ortadan kaldırılır ancak ROT üretimi ile süpürülmesi arasında oluşan dengesizlik, yüksek seviyede moleküler oksijen veya reaktif oksijen türlerinin artışı ile oksidatif strese neden olur. Kronik oksidatif stres DNA, lipitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik makromoleküllerin zarar görmesi ile hücrel homeostazda bozulma ve klinik olarak pek çok hastalığın gelişimiyle sonuçlanır (117). Diyabetin sonuçlarından biri de yüksek seviyedeki oksidatif strestir ve diyabetik komplikasyonların patogenezinde önemli bir rol oynar (118). Diyabette oksidatif strese neden olabilecek muhtemel kaynaklar arasında, glikozun oto-oksidasyonu, redoks tepkimesindeki dengesizlikler, GSH ve E vitamini gibi düşük molekül ağırlığına sahip antioksidanların dokulardaki konsantrasyonlarında azalma ve süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan savunma enzimlerinin aktivitelerindeki bozulma bulunabilir (119, 120).

Diyabetik Retinopatide Oksidatif Stres

Retina, çoklu doymamış yağ asitleri içeriğine sahiptir ve diğer dokulara göre en yüksek oksijen alımı ve glikoz oksidasyonuna sahiptir. Bu durum retinayı oksidatif strese karşı daha duyarlı hale getirir (121). Oksidatif stres, daha fazla ROT üretimini artırarak makromoleküllerde bir hasar döngüsü oluşturmanın yanı sıra, diyabetik

retinopatinin gelişimine neden olabilecek diğer metabolik yolları da aktive eder. Bunlar arasında polyol yolağı (122), ileri glikasyon son ürünü yolağı (72), protein kinaz-C yolağı (76), heksosamin biyosentez yolağı (70), VEGF (123) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) (83) ekspresyonundaki değişiklikler yer alır. Bu yolların birçoğu oksidatif strese aracılık ederek oksidatif stresle doku hasarını daha da artıran diğer yollarla bağlantı kurabilir (45).

Hayvan çalışmaları, oksidatif stresin yalnızca diyabetik retinopatinin gelişimine katkıda bulunmakla kalmadığını aynı zamanda sıkı glisemik kontrol yeniden başlatıldıktan sonra retinopatinin geri dönüş sürecine de katkıda bulunduğunu göstermiştir (124).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin yüksek seviyelerdeki varlığı ile süpürülmesi arasındaki dengesizliği temsil ettiğinden dolayı hücrenin antioksidan savunma sistemi, bir hücrenin yaşadığı genel oksidatif stresin önemli bir parçasıdır. Diyabette, serbest radikalleri atmaktan ve redoks homeostazının korunmasından sorumlu olan süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan savunma enzimlerinin aktiviteleri azalır (120). Diyabetik retinada, hücre içi antioksidan seviyelerinin azalması (125) ile retinanın metabolizmasından sorumlu olan enzimler tehlikeye atılır (126). Antioksidan savunma enzimlerinin yanı sıra, redoks homeostazının düzenlenmesi için biyolojik olarak mevcut olan C vitamini, E vitamini ve β -karoten gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da hiperglisemiye bağlı oksidatif stres sırasında baskılanır (127).

Diyabette metabolik anormalliklere neden olan oksidatif stresin hem tip 1 hem de tip 2 diyabet için DR patogeneziyle ilişkili en yaygın mekanizma olduğu bilinmektedir. Hücre içi ROT konsantrasyonlarındaki artış, DR patogenezinde yer alan çeşitli mekanizmaların aktivasyonu ile sonuçlanır. Özellikle, glisemi normalleştikten sonra bile oksidatif stresin neden olduğu hasar veya işlev bozukluğu devam etmektedir (128).

Oksidatif Stres ve Mitokondri Disfonksiyonu

Hiperglisemi maruziyeti süresince mitokondriyal membran boyunca gerilim gradientinde bir artış meydana gelerek glikoz oksidasyonu artar. Gerilim gradientinde kritik olan bir eşik değerine ulaşıldığında, elektron taşıma sisteminde bulunan kompleks

III içindeki elektron taşınımı engellenir. Böylece elektronlar koenzim Q'da birikir ve bu elektronlar daha fazla süperoksit oluşturulması için moleküler oksijene verilir (129). Hiperglisemiye bağlı olarak mitokondriyal elektron taşıma zincirinde üretilen yüksek miktardaki süperoksitin, GAPDH aktivitesini inhibe ederek hiperglisemik hasar oluşturacak ana yolları etkinleştirdiği düşünülmektedir. Buna ek olarak, glukoz kaynaklı süperoksit artışının mitokondriyal DNA'da mutasyonlara neden olarak elektron taşıma komplekslerinde hasarlı alt birimlere yol açtığı düşünülmektedir (130, 131).

Mitokondride ROT kaynaklı işlev bozukluklarından biri de antioksidan savunma sistemlerinin bastırılmasıyla retina hücrelerinin oksidatif strese karşı duyarlılığının artış göstermesidir. Bu duyarlılığın sebebi ise reaktif oksijen türlerinin etkin bir şekilde süpürülememesidir. ROT'un neden olduğu bir diğer işlev bozukluğu ise; mitokondriyal lipid zarına ROT tarafından verilen hasarın organelin geçirgenliğini arttırması ve mitokondriyal membranın permeabilizasyonunun modülasyonudur (132). Buna ek olarak, iç mitokondriyal membran boşluğundan sitokrom C'nin sitoplazmaya salınması ve sitosolden mitokondriye Bax'ın translokasyonu, diyabetik retinada ve kılcal damar hücrelerinde hücre apoptozunu arttırabilir (133).

Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Apoptoz

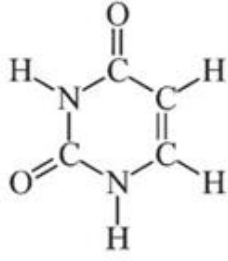
Diyabetik retinopatide retinal hücrelerin apoptozu bilinen bir olgudur. Retinal kapiller hücreler diyabet komplikasyonu ile oluşan herhangi bir histopatolojik değişiklikten önce hızlı bir apoptoz geçirirler (134, 135). Perisitlerin ve endotelial hücrelerin yüksek glikoza maruz bırakılmasıyla oksidatif streste, kaspaz-3'ün aktivasyonunda ve kapiller hücrelerin ölümüne yol açan diğer transkripsiyon faktörlerinde artış olduğu bildirilmiştir (119, 136, 137).

Apoptozun histolojik kanıtı olarak, 3 hafta boyunca yüksek glikozda kültürlenmiş sıçır retinal hücrelerinin pro-apoptotik Bax ekspresyon seviyelerinin, normale kıyasla 2 kat fazla çıktığı bildirilmiştir (138). Oksidatif stresle aktive edilen kaspazların retina hücrelerinin ölümü ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Diyabetik sıçır retinasında kaspaz-3'ün aktivasyonunun normal sıçır retinasındaki kaspaz-3 aktivasyonuna göre %50 daha fazla olduğu, diyabette artmış oksidatif stresin retinal kaspaz-3 aktivasyonunda ve retinal hücrelerin apoptozunda rol oynadığı bildirilmiştir (136).

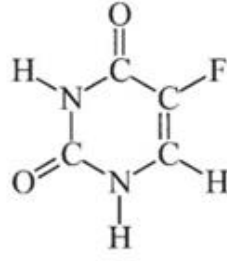
Oksidatif stresin apoptozu artırabileceği birçok karmaşık mekanizma; membran lipit peroksidasyonundaki artışı, hücresel fonksiyonlar için gerekli makromoleküllerin oksidatif hasarını, sinyal iletimindeki değişiklikleri ve gen ekspresyonunu içerir (139, 140). ROT, GSH'nin azalması ve ATP miktarının düşülmesi ile dolaylı olarak hücresel redoks potansiyelini değiştirerek apoptozu indükleyebilir (141). ROT salınımı mitokondriyal por geçirgenliğini artırır, bu da sitokrom C'nin ve retinal mitokondrideki diğer pro-apoptotik faktörlerin salınmasını tetikler (133, 142, 143). ROT kaynaklı mitokondriyal disfonksiyon, sitokrom C'nin salınımına bağlı olarak, DNA'nın parçalanmasından sorumlu kaspaz-3'ü aktive ederek bir dizi olayı başlatan kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanabilir (144).

5-FLOROURASİL (5-FU) ve ETKİ MEKANİZMASI

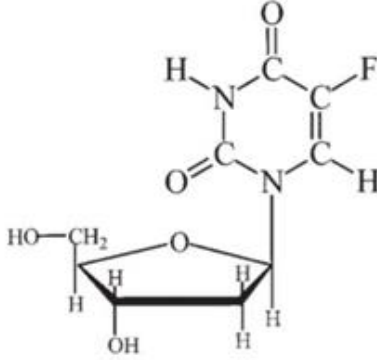
5-Florourasil çok çeşitli katı tümörlerin tedavisini amaçlayan terapötik bir pirimidin analogudur. Ek olarak, kolon, göğüs, baş ve boyun dahil olmak üzere pek çok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır (145). Bir floropirimidin türevidir. 5-Fu, 1957 yılında urasilin rat hepatom (hepatosellüler karsinom) hücreleri tarafından normal intestinal hücrelerine göre daha etkin ve hızlı kullanıldığı belirlenmesi ile, urasil metabolizmasının antimetabolit kanser tedavisinde hedef olabileceği düşünülerek sentezlenmiştir. Antimetabolit ilaçların genel çalışma prensibi, temel biyosentetik süreçleri inhibe etmek ya da DNA/RNA gibi makromoleküllere dahil olarak onların normal işlevlerini engellemektir. 5-Fu ise bu iki çalışma prensibine de sahiptir. 5-Fu, DNA/RNA'da bulunan pirimidin moleküllerine benzer şekilde heterosiklik aromatik bir organik bileşiktir (146). 5-Fu, urasil pirimidininin 5'inci karbonunda yer alan hidrojen atomu yerine bir flor atomu bulundurur (Şekil 7) ve urasil ile aynı taşıma mekanizmasını kullanarak hücreye girer (18).



urasil



5-florourasil



5-floro-2'-deoksiüridin

Şekil 7. Urasil, 5-florourasil ve 5-floro-2'-deoksiüridin yapısı (145)

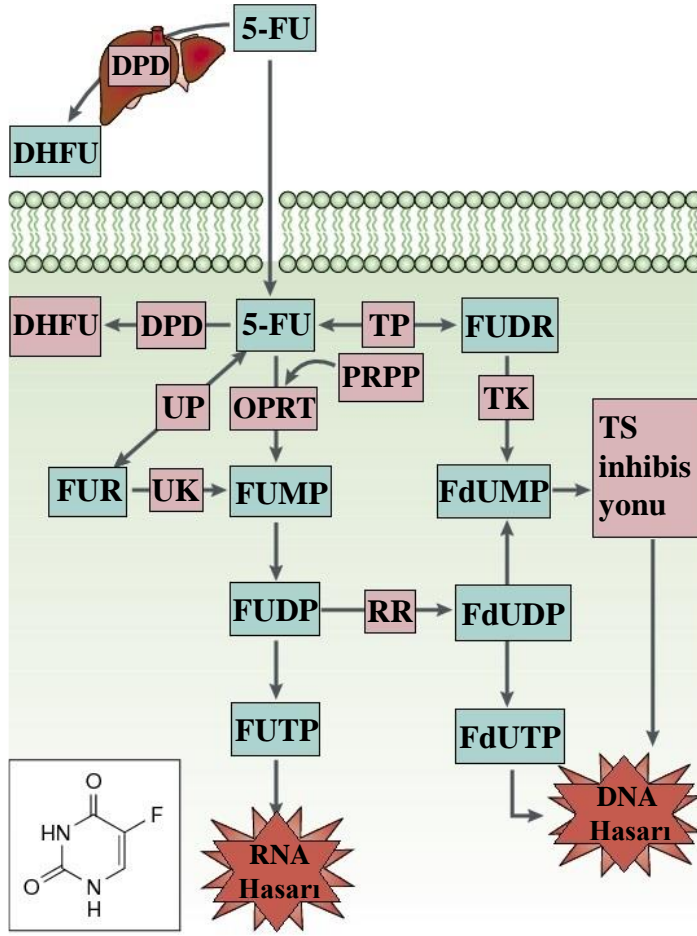
5-Fu, hüresel alım ve metabolik aktivasyon sonucunda sitotoksik etki gösterebilir (145). 5-Fu, hem kolaylaştırılmamış difüzyon ile hemde pürin ve pirimidin bazlarının taşıma sistemi olan kolaylaştırılmış difüzyon ile hücelere kolayca girer (18, 19).

5-Florourasilin Hücre İçi Metabolizması

5-Florourasil'in yapısında, urasilin analogu olarak, C-5 pozisyonundaki hidrojen atomu yerine bir flor atomu bulunmaktadır ve urasil ile aynı hücre giriş mekanizmasına sahiptir (18). 5-Fu'nun deoksiribonükleosid ve ribonükleosid metabolitleri olan 5-floro-2-deoksiüridin (FdUrd) ve 5-floroüridin (FUrd) kolaylaştırılmış nükleosid taşıma sistemi ile hücelere girer ve ardından bu metabolitler çeşitli yollardan sitotoksik etki gösterebilmek için anabolizme uğrarlar. Timidin fosforilazın (TP) trombosit kaynaklı endotel hücre büyüme faktörüne homolog olduğu bilinmektedir ve 5-Fu'nun tersinir olarak FdUrd metabolitine dönüşümünü katalizler (19). Timidin kinaz (TK), deoksiriboz halkasının 5. karbonuna bir fosfat ekleyerek 5-floro-2-deoksiüridin monofosfatı (FdUMP) oluşturur. Timidilat sentaz (TS), 5,10 metilentetrahidrofolat (CH₂THF) ile deoksiüridin monofosattan (dUMP) deoksitimidin

monofosfatın (dTMP) de novo üretimi için gerekli indirgeyici metilasyonu katalizler (147, 148) (Şekil 8).

5-Fu hücre içinde floro deoksiüridin monofosfat (FdUMP) -FdUrd metabolitinden köken alır-, floro deoksiüridin trifosfat (FdUTP) -FdUrd metabolitinden köken alır- ve floroüridin trifosfat (FUTP) -FUrd metabolitinden köken alır- olarak çeşitli aktif metabolitlere dönüştürülür (149).



Şekil 8. 5-Florourasilin hücre içi metabolizmasının şematik gösterimi (17)

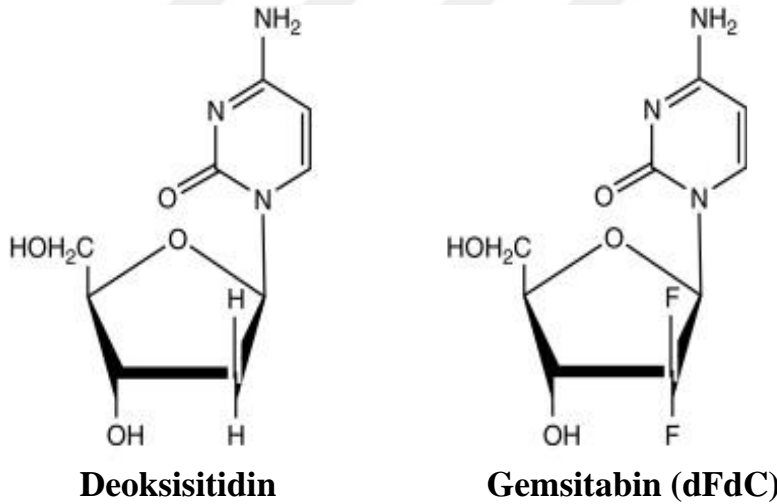
5-Fu'nun hücre içindeki aktivasyonun ana mekanizmasındaki floroüridin monofosfat (FUMP) metabolitine dönüşüm ya fosforibozil pirofosfat (PRPP) kofaktörünün kullanılması ile fosforibozil transferaz (OPRT) tarafından doğrudan gerçekleştirilir ya da üridin fosforilaz (UP) ve üridin kinazın (UK) ardışık etkisi ile floroüridin (FUR) tarafından doğrudan gerçekleştirilir. FUMP ise floroüridin difosfata (FUDP) fosforile edilir ayrıca daha sonra aktif metabolit olan floroüridin trifosfata (FUTP) fosforile edilebilir veya ribonükleotit redüktaz (RR) ile floro deoksiüridin difosfata (FdUDP) dönüştürülür.

Buna ek olarak, FdUDP ise sırasıyla FdUTP ve FdUMP aktif metabolitlerini üretmek için fosforile veya defosforile edilebilir. Alternatif bir aktivasyon yolu olarak 5-Fu'nun, timidin fosforilaz tarafından katalizlenen florodeoksiüridine (FUDR) dönüşümünün ardından timidin kinaz tarafından FdUMP'ye fosforile edilir.

5-Fu'nun dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) aracılı şekilde dihidroflorourasile (DHFU) dönüşümü ise normal ve tümör hücrelerinde 5-Fu katabolizmasının hız sınırlayıcı bir basamağıdır. Uygulama yapılan 5-Fu'nun %80 kadarı ise karaciğerde DPD tarafından parçalanır (17).

GEMSİTABİN (GEM) ve ETKİ MEKANİZMASI

Gemsitabin (2',2'-diflorodeoksisitidin, dFdC) DNA sentezini inhibe eden deoksisitidin bir analogu olarak (24) klinik onkolojide en yaygın kullanılan ilaçlar arasında bulunmaktadır (25). Buna ek olarak gemsitabin, iki flor atomunun riboz şekeri üzerindeki hidroksilin yerini aldığı bir sitidin analogudur (25) (Şekil 9). Gemsitabin özellikle pankreas adenokarsinomunda olmak üzere (150, 151), meme, yumurtalık, mesane ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılır (152, 153).



Şekil 9. Deoksisitidin ve gemsitabin yapısı (154)

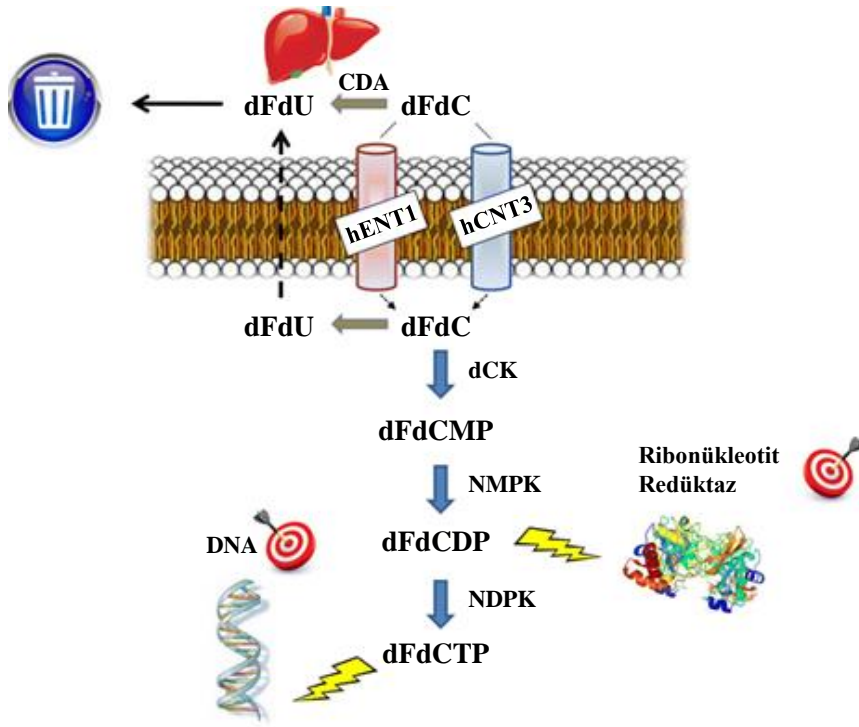
Gemsitabinin ana etkisi, hücrel DNA sentezinin inhibisyonudur (26). Hücrel alımının ardından gemsitabin aktif metabolitleri olan gemsitabin difosfat (dFdCDP) ve gemsitabin trifosfat (dFdCTP) türevlerine deoksisitidin kinaz (dCK) enzimi ile fosforile edilir. Gemsitabin difosfat, DNA'nın sentezi ve onarımı için gerekli ribonükleositlerin deoksinükleosid trifosfatlara (dNTP) dönüşümünden üretiminden sorumlu olan ribonükleotid redüktazı (RR) inhibe eder (155, 156). Hücrel deoksinükleotitlerdeki (özellikle dCTP)

azalma, DNA'ya dahil olmak için dCTP ile rekabet halinde olan gemsitabin trifosfatı destekler. Hücresel dCTP'deki bu azalma, gemsitabin nükleotidinin DNA'ya daha fazla dahil olmasını sağladığı gibi aynı zamanda kendi kendini güçlendiren önemli bir mekanizmadır (156). Gemsitabin trifosfat ise, DNA zincirine dahil olduktan sonra zincire bir deoksinükleotit daha eklenir ve DNA polimerazın ilerlemesi durur (buna maskeli zincir sonlandırma adı verilir) (26) böylece DNA zincirindeki uzama baskılanarak DNA'nın parçalanmasına ve hücre ölümüne neden olur (24). Ayrıca, gemsitabin ribonükleotit redüktazı (RR) baskılayarak hücresel dNTP havuzlarını azaltır böylece dolaylı olarak DNA sentezini inhibe eder. Ek olarak, gemsitabin ile tedavi edilmiş olan hücrelerde parçaların çoğunluğu 50 kb olmak üzere 5 ila 500 kb arasında değişen büyük boyutlu çift zincirli DNA fragmanları ve nükleozomal boyutlu DNA fragmanları olmak üzere iki tip DNA fragmanı belirlenmiştir (26).

Gemsitabinin Hücre İçi Metabolizması

Gemsitabin, vücuda verildikten ve kanser hücresi tarafından alındıktan sonra etkisini göstermek için hücre alımı ve hücre içi fosforilasyonu gerektiren bir ön ilaçtır (157). Gemsitabin, sitotoksik etkisini temel olarak aktif dFdCTP formunda DNA zincirine dahil olarak DNA sentezinin inhibisyonu yoluyla gösterir. Gemsitabinin klirensi çoğunlukla, sitidin deaminaz (CDA) tarafından primer metaboliti olan 2', 2'-difloro-deoksiüridine (dFdU) hızlıca çevrilerek etkisiz hale getirilmesiyle sağlanır. CDA, hem plazmada hem de karaciğerde yüksek oranda eksprese edilir (158).

Uygulama yapıldıktan sonra gemsitabin, hidrofilik yapısından dolayı difüzyonla zardan kolayca geçmez ve zar nükleosid taşıyıcıları tarafından hücrelere taşınır (159). Hücre alımının ardından gemsitabin (dFdC), deoksisitidin kinaz (dCK) ile gemsitabin monofosfata (dFdCMP) fosforile edilir (157). Gemsitabin monofosfat (dFdCMP) ise sırasıyla ribonükleotit redüktazı (RR) ve DNA sentezini inhibe eden aktif difosfat (dFdCDP) ve trifosfat (dFdCTP) metabolitlerine fosforile edilir (160) (Şekil 10).



Şekil 10. Gemcitabin (dFdC) ve etki mekanizmaları (CDA (sitidin deaminaz), dCK (deoksisitidin kinaz), NMPK (nükleosid monofosfat kinaz), NDPK (nükleotit difosfat kinaz), hENT1 (insan dengeleyici nükleosid taşıyıcı-1), hCNT3 (insan konsantrik nükleosit taşıyıcı-3)) (25).

Gemcitabin difosfat (dFdCDP) ve gemcitabin trifosfat (dFdCTP) oluşumunun ve aktivitesinin in vivo dinamikleri karmaşık bir süreçtir. dFdCDP, ribonükleotit redüktazı (RR) inhibe ederek deoksinükleosid trifosfatların hücresel havuzunun tükenmesine neden olur ve de novo DNA sentez yolunu bloke eder (22). dFdCTP ise DNA'ya dahil edilmesinin ardından “maskeli DNA zinciri sonlandırma” adı verilen bir süreçte, 3’5’-eksonükleaz aktivitesi ile DNA onarımını önleyen bir veya daha fazla deoksinükleotit eklenir (161). Bu süreç, S-fazına özgü şekilde hücre döngüsünün durmasına ve programlanmış hücre ölümüne neden olur. Ayrıca, dFdCTP, RNA'ya dahil edilir böylece RNA sentezini inhibe eder (162).

Gemcitabinin hücre zarı boyunca taşınması, hücre plazma zarında bulunan çoklu aktif nükleosit taşıyıcıları (NT'ler) yoluyla gerçekleşir (159). İnsan nükleosit taşıyıcıları (hNT'ler), ya sodyum-bağımlı (konsantre) tip (CNT) ya da sodyum-bağımsız (dengeleyici) tip (ENT) taşıyıcılardır (163). Her iki tip taşıyıcı da gemcitabinin hücre alımında rol oynar (164). Gemcitabin özellikle hENT1 ve hCNT3 için substrattır (159, 164). Gemcitabin alımının çoğuna hENT1 aracılık eder ve hENT1 eksikliği olan hücreler aslında bu nükleosid analoguna karşı oldukça dirençlidir (159).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Çalışma süresince kullanılan cihazlar, markaları ve menşei Tablo 1'de ve kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve menşei Tablo 2'de verildi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve menşei

Kullanılan Cihazlar		
Malzeme	Marka	Ülke
Biyogüvenlik Kabini	Heraeus	Almanya
Karbondioksitli İnkübatör	Heraeus	Almanya
Santrifüj	Centurion Scientific	İngiltere
İnvert Mikroskop	Nikon	Japonya
Otomatik Pipet Seti	Gilson	Fransa
Dijital Pipetör	Thermo Fisher Scientific	ABD
Mikroplate Okuyucu	Thermo Fisher Scientific	ABD
Soğutmalı santrifüj	Hettich	Almanya
Nanodrop	Optizen	Güney Kore
PCR Cihazı	Applied Biosystems	ABD
Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	Applied Biosystems	ABD
Gelişmiş Vorteks Karıştırıcı	WiseMix	Güney Kore
Karıştırıcı Blok	Bioer	Çin
Elektronik tartı	A&D Company	Japonya
4°C Buzdolabı	Vestel	Türkiye
-20°C Derin Dondurucu	Vestel	Türkiye
-80°C Derin Dondurucu	Wisd	Güney Kore
Distile- Ultra Saf Su Cihazı	Tka	ABD
Tali® Sitometre	İnvitrogen	ABD
Tissue Lyser LT	Qiagen	Almanya
Blotlama cihazı	İnvitrogen	ABD
Güç kaynağı	Cleaver	İngiltere
Görüntüleme sistemi	Dnr Bioimaging Systems	İsrail
UV transilluminator	Vilber Lourmat	Güney Kore
TALİ® Image Based Cytometer	Invitrogen	ABD
Floresan mikroskop	ZEISS Observer Z1	ABD

Tablo 2. Çalışmada kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve menşei

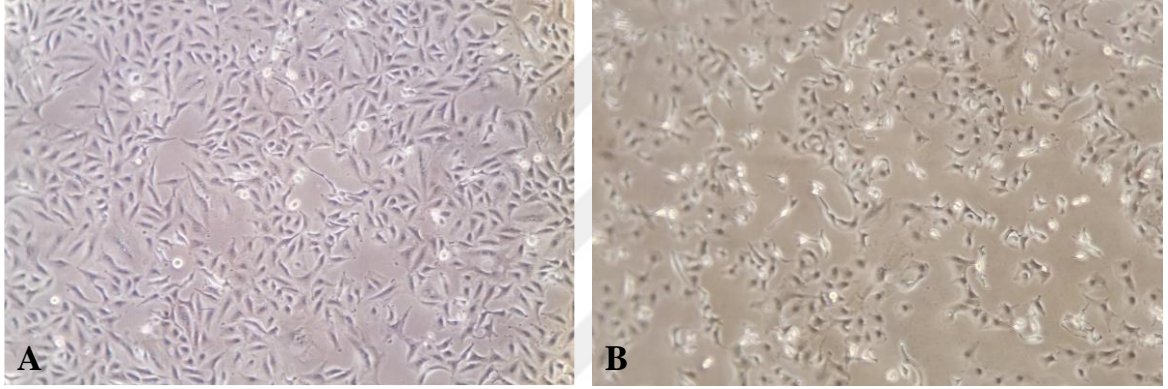
Kullanılan Sarf ve Diğer Malzemeler			
Malzeme	Marka	Ülke	
DMEM	Gibco	ABD	
%0.25 Tripsin EDTA	Gibco	ABD	
Penisilin/Streptomisin	Diagnovum	Almanya	
Fetal Sığır Serum	Gibco	ABD	
D-Glikoz	Sigma	ABD	
Etanol	Merck	ABD	
Gemcitabin	Koçak Farma	Türkiye	
5-Florourasil	Koçak Farma	Türkiye	
MTT	Biomatik	Kanada	
Dimetil Sülfoksit	Merck	ABD	
PBS Tablet	Life Technologies	ABD	
Dnase/Rnase İçermeyen Su	Life Technologies	ABD	
25-75 cm ² 'lik Hücre Kültür Kabı	Nest	ABD	
24-96 Kuyucuklu Hücre Kültür Kabı	Nest	ABD	
384 Kuyucuklu PCR Reaksiyon Plakası	Life Technologies	ABD	
Serolojik Pipet	Nest	ABD	
Kriyojenik Vial	Nest	ABD	
0,2 ml PCR Strip Tüpleri	Thermo Fisher Scientific	ABD	
15-50 ml'lik Flakon Tüpler	Nest	ABD	
1.5 ve 2 ml'lik Tüpler	Eppendorf	Almanya	
RNA İzolasyon Kiti	Life Technologies	ABD	
cDNA Revers Transkripsiyon Kiti	Life Technologies	ABD	
Genomik DNA Mini Kit	İnvitrogen	ABD	
SYBR Green Master Mix	Life Technologies	ABD	
AmpliTağ Gold PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific	ABD	
Western Blot Kiti	Life Technologies	ABD	
DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	ABD	
Tali [®] Apoptozis Kiti	Life Technologies	ABD	
NucBlue [®] Live ReadyProbes [®] Reaktifi	Thermo Fisher Scientific	ABD	
Akridin Oranj	Sigma	ABD	
Etidyum Bromür	Vivantis	Malezya	
CM-H ₂ DCFDA (Genel Oksidatif Stres Göstergesi)	Thermo Fisher Scientific	ABD	
Steril Eldiven	Broche	Türkiye	
Cam malzemeler	Lamtek	Türkiye	

GEREÇLER

Hücre Hattı

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Hücre Kültürü, Moleküler Genetik ve Görüntüleme laboratuvarlarında yürütüldü.

Çalışmada Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen insan göz retinal pigment epitel ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) hücre hattı kullanıldı (Şekil 11). ARPE-19, 1986 yılında 19 yaşındaki bir erkeğin sağlıklı gözlerinden Amy Aotaki-Keen tarafından türetilmiş bir retina pigment epiteli (RPE) hücre hattıdır.



Şekil 11. Normal (A) ve diyabetik (B) ARPE-19 insan göz hücrelerinin invert ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (20X büyütme ile)

Hücre Besi Yeri

ARPE-19 hücre hattı için normal ve yüksek glikoz içerikli olmak üzere iki farklı besi yeri hazırlandı. Normal glikoz (1g/L, 5,5 mM) içerikli besiyeri (*Gibco*® *DMEM* (Dulbecco's Modified Eagle Medium), ABD); %7 Fetal Sığır Serum (FBS) (*Gibco*®, ABD) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Diagnovum, Almanya) antibiyotik karışımı içerecek şekilde hazırlandı.

Yüksek glikoz içerikli besiyeri ise 3151g/L, 17.5 mM DMEM/Ham's F-12 besiyeri içerisine 25 mM olacak şekilde glikoz eklenerek hazırlandı. Yüksek glikoz içeren bu besiyerine %7 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin antibiyotik karışımı eklendi. Hazırlanan besiyerleri kontaminasyon riskini en aza indirmek için 50 ml hacminde falkon tüplere bölündü ve 4°C sıcaklıkta dolapta saklandı.

Normal ARPE-19 hücreleri 5,5 mM normal glikoz içeren besiyerinde, diyabetik ARPE-19 hücreleri ise 25 mM yüksek glikoz içeren besiyerinde 5 kez pasajlanmasının ardından uygulama yapılmaya başlandı.

YÖNTEMLER

Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması

Hücreler donmuş olarak tedarik edildi ve donmuş haldeki hücreler kültüre alınarak çalışmalara başlandı.

Donmuş olarak tedarik edilen hücrelerin kültüre alınması;

- 1) Donmuş haldeki hücreler oda sıcaklığında çözdürüldü.
- 2) Kullanılacak flask içerisine önceden etüvde 37°C sıcaklığa getirilmiş uygun besiyeri eklendi.
- 3) Çözülmüş olan hücreler, içerisinde besiyeri olan flasklara ekildi ve tüm flask yüzeyine eşit şekilde dağılması sağlandı.
- 4) Hücre ekimi yapılan flasklar 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde inkübe edildi.
- 5) Hücreler birkaç saat sonra flask yüzeyine tutunduğunda dondurulma işlemi için kullanılan dimetil sülfoksitin (DMSO) uzaklaştırılması için besiyeri değiştirildi.
- 6) Ardından flasklar 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde inkübe edilmeye devam edildi.

Kültüre alınan hücreler belirli bir yoğunluğa ulaşmış flask yüzeyini kapladığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

Kültüre alınan hücrelerin pasajlanması;

- 1) Yeterli yoğunluktaki hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak üzerine bir miktar PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) eklenerek yıkandı.
- 2) Ardından PBS uzaklaştırıldı ve 37°C'de olan Tripsin-EDTA ile flask yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin, 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde birkaç dakika beklenerek flask yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- 3) Flask yüzeyinden ayrılan hücreler santrifüj edilmek üzere serolojik pipet ile 15 ml'lik falkon tüplere alındı.
- 4) Hücre-tripsin süspansiyonu 1.250 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edildi.

- 5) Hücre pelleti üzerindeki tripsin uzaklaştırıldı ve pellet üzerine bir miktar uygun besiyeri eklendikten sonra çalkalandı.
- 6) Birbiri içinde karışan hücre ve besiyeri karışımının içerisinde bir miktar alınarak yeni bir 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Bir önceki kültürden daha az yoğunlukta olması istenen bu hücrelerin alındığı yeni falkon tüpe bir miktar uygun besiyeri eklendi ve falkon tüp alt üst edildi.
- 7) Falkon tüpü içerisindeki hücre-besiyeri karışımı yeni bir flaska ekildi ve invert ışık mikroskopunda yoğunluğu kontrol edildi.

Uygulama sonrası saklanmak istenen hücreler donduruldu. Flask içerisinde kültüre edilmiş hücrelerin dondurulması;

- 1) Yeterli yoğunluktaki hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak üzerine bir miktar PBS eklenerek yıkandı.
- 2) Ardından PBS uzaklaştırıldı ve önceden 37°C sıcaklığa getirilmiş olan Tripsin-EDTA ile flask yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin, 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde birkaç dakika beklenerek, flask yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- 3) Flask yüzeyinden ayrılan hücreler santrifüj edilmek üzere serolojik pipet ile 15 ml'lik falkon tüplere alındı.
- 4) Hücre-tripsin süspansiyonu 1.250 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edildi.
- 5) Hücre pelleti üzerindeki tripsin uzaklaştırıldı ve pellet üzerine %10 DMSO içeren uygun besiyeri eklendikten sonra çalkalandı.
- 6) Bu hücre-besiyeri-%10 DMSO karışımı 2 ml'lik kriyojenik viallere bölünerek -80°C'de saklanmaya uygun hale getirildi.

İlaç Doz Belirleme Çalışmaları

Gemsitabin+5-Fu kombine tedavisi kolorektal, pankreas, safra, meme, baş ve boyun dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kullanılmaktadır (165). Yapılan literatür araştırmalarına göre cerrahi müdahale yapılamayan veya metastatik safra yolu/safra kesesi karsinomu, ileri/metastatik pankreas adenokarsinom hastalarında uygulanan GEM+5-Fu dozunun GEM 1000 mg/m² ve 5-Fu 600 mg/m² olduğu belirlenmiştir (166, 167). Çalışmamızda literatür araştırmaları sonucunda belirlenen doz in vitro hücre kültürü ortamında simüle edilerek uygulandı.

İn Vitro Hücre Kültürü İçin Kemoterapi İlaçlarının Dozlarının Hesaplanması;

Sitotoksik kemoterapi, terapötik ve toksik etkilerde önemli değişkenlik ile karakterize edilmektedir. Bu değişkenliği azaltmak için çoğu kemoterapi dozu hastanın vücut yüzey alanına (VYA) göre kişiselleştirilerek hesaplanır (168). Vücut yüzey alanı kemoterapi tedavilerinde sitotoksik ilaçların dozunun belirlenmesinde en sık kullanılan ölçü olmayı sürdürmektedir (168, 169).

Sparreboom ve Verweij (170) yaptıkları çalışmada, Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü (EORTC) veri tabanında 1990'dan 1998'e kadar 3000 kanser hastası üzerinden elde edilen verilere göre belirlenen, bir insanın ortalama vücut yüzey alanını $1,73 \text{ m}^2$ olarak varsaymışlardır. Sacco ve ark. (171) yaptığı çalışmada ise baş, boyun, yumurtalık, akciğer, pankreas, meme ve kolorektal kanserleri nedeniyle kemoterapi alan toplam 3613 hastanın ortalama vücut yüzey alanını; erkekler için $1,91 \text{ m}^2$ ve kadınlar için $1,71 \text{ m}^2$ olarak hesaplamışlardır.

Bu çalışmada, insan VYA ortalaması $1,7 \text{ m}^2$ kabul edildi ve kemoterapi ajanlarının uygulama dozları göz önüne alınarak insan ortalama kan hacmine (6 L) bölünmesiyle bulunan değerler ARPE-19 hücre hattına hücre kültürü ortamında uygulandı. Hücre kültür ortamı için kemoterapi dozları aşağıdaki şekilde hesaplandı;

Gemsitabin 1000 mg/m^2 ve 5-Fu 600 mg/m^2 ve insan ortalama VYA'sı $1,7 \text{ m}^2$ olacak şekilde; $1,7 \text{ m}^2$ 'ye denk düşen ilaç miligramı hesaplandığında GEM için 1700 mg; 5-Fu için 1020 mg bulundu. Bulunan her bir ilaç miligram değeri insan ortalama kan hacmi olan 6000 mL (6 L) 'ye bölünerek, ilacın bir insan kanındaki miktarı mg/ml cinsinden değeri GEM için; $0,283 \text{ mg/L}$ ve 5-Fu için; $0,17 \text{ mg/L}$ olarak bulundu.

Gemsitabin ve 5-Fu molekül ağırlıkları sırası ile $263,198 \text{ g/mol}$ ve $130,077 \text{ g/mol}$ 'dür. Gemsitabin (Koçak Farma, Türkiye) ve 5-Fu (Koçak Farma, Türkiye) flakon konsantrasyonu sırasıyla $1000 \text{ mg}/25 \text{ ml}$ ve $1000 \text{ mg}/20 \text{ ml}$ 'dir. Buna göre, GEM ve 5-Fu flakon mM'ı sırası ile; $151,97 \text{ mM}$ ve $384,3 \text{ mM}$ 'dir. İnsan kanının içerdiği $0,283 \text{ mg/L}$ GEM $1070 \text{ }\mu\text{M}$ iken $0,17 \text{ mg}$ 5-Fu ise $1300 \text{ }\mu\text{M}$ 'dir.

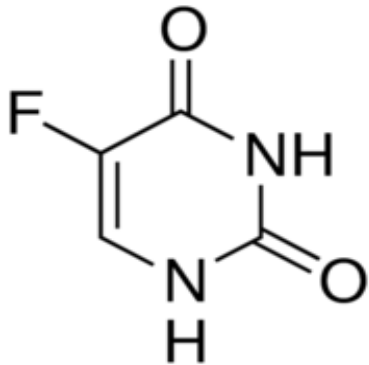
Hesaplanan dozlara ek olarak ilaçların plazma tepe noktaları da göz önüne alınarak ilaç dozları revize edildi. Buna ek olarak, plazma tepe noktası, 5-Fu infüzyonunda 1 mM 'dir (165). Hesaplanan 5-Fu dozu bu aralıkta olduğundan in vitro hücre kültürü ortamında kemoterapi dozunu yansıtacaktır.

Plazma tepe noktası, GEM infüzyonunda mg/m^2 ye göre değişim göstermekte olup, baz alınan kemoterapi dozu ($1000 \text{ mg}/\text{m}^2$) GEM için $32 \text{ } \mu\text{M}$ olarak bildirilmiştir (25). Buna göre; $1,7 \text{ m}^2$ alınan insan VYA ortalamasına $1000 \text{ mg}/\text{m}^2$ cinsinden GEM'in plazma tepe noktası $54,4 \text{ } \mu\text{M}$ olacaktır. Hesaplanan GEM dozu in vitro hücre kültürü ortamında kemoterapi dozunu yansıtacaktır.

5-Florourasil Stok ve Uygulama Dozlarının Hazırlanması

Sıvı halde tedarik edilen 5-Florourasil (Koçak Farma, Türkiye) (Şekil 12) oda sıcaklığında saklandı. Stok solüsyonları hazırlamak için çözücü olarak $3650 \text{ } \mu\text{L}$ H_2O 'ya $1350 \text{ } \mu\text{L}$ 5-Fu (Flakon; $1000\text{mg}/20\text{ml}$) eklenerek 5 ml 'lik 104 mM 'lık bir ara stok hazırlandı. Bu ara stoktan son konsantrasyon 26 mM olacak şekilde seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak 26 mM 'lik bir 5-Fu ana stok solüsyonu hazırlandı.

Kombine olarak uygulanacak olan 5-Fu ve GEM uygulama sırasında ve birbiri içerisinde seyreleceğinden ana stok ilk dozun 20 katı fazla hazırlandı. Hücrelere $1300 \text{ } \mu\text{M}$, $650 \text{ } \mu\text{M}$, $325 \text{ } \mu\text{M}$, $162,50 \text{ } \mu\text{M}$, $81,25 \text{ } \mu\text{M}$, $40,62 \text{ } \mu\text{M}$, $20,31 \text{ } \mu\text{M}$, $10,15 \text{ } \mu\text{M}$ ve $5,08 \text{ } \mu\text{M}$ konsantrasyonlarda olacak şekilde 5-Fu, GEM ile kombine olarak uygulandı.

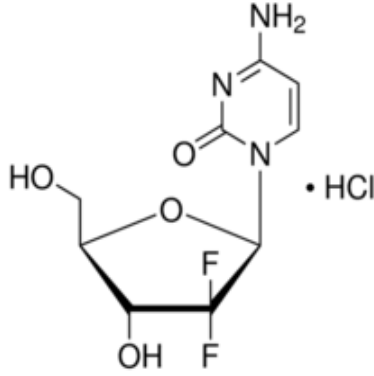


Şekil 12. 5-Florourasilin kimyasal yapısı (Sigma)

Gemcitabin (GEM) Stok ve Uygulama Dozlarının Hazırlanması

Toz halde tedarik edilen GEM (Şekil 13) (Koçak Farma, Türkiye) çözücü flakonu ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında saklandı. Stok solüsyonları hazırlamak için çözücü olarak $2180 \text{ } \mu\text{L}$ H_2O 'ya $2820 \text{ } \mu\text{L}$ GEM (Flakon; $1000\text{mg}/25\text{ml}$) eklenerek 5 ml 'lik $85,6 \text{ mM}$ 'lık bir ara stok hazırlandı. Bu ara stoktan son konsantrasyonu $1088 \text{ } \mu\text{M}$ olacak şekilde seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak $1088 \text{ } \mu\text{M}$ 'lik bir GEM ana stok solüsyonu hazırlandı.

Kombine olarak uygulanacak olan 5-Fu ve GEM uygulama sırasında ve birbiri içerisinde seyreceğinden ana stok ilk dozun 20 katı fazla hazırlandı. Hücrelere 54,4 µM, 27,2 µM, 13,6 µM, 6,8 µM, 3,4 µM, 1,7 µM, 0,85 µM, 0,42 µM ve 0,21 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde GEM, 5-Fu ile kombine olarak uygulandı.



Şekil 13. Gempitabinin kimyasal yapısı (Sigma)

MTT Hücre Canlılık Testi

MTT hücre canlılığı testi için hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekildi ve ilaç uygulaması yapıldı.

Hücrelerin flask yüzeyinden tripsinize edilerek ayrılması ve 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekimi şöyledir;

- 1) Yeterli yoğunluktaki hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak üzerine bir miktar PBS eklendi.
- 2) Ardından PBS uzaklaştırıldı ve önceden 37°C sıcaklığa getirilmiş olan Tripsin-EDTA ile flask yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin, 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde birkaç dakika beklenerek, flask yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- 3) Flask yüzeyinden ayrılan hücreler santrifüj edilmek üzere serolojik pipet ile 15 ml'lik falkon tüplere alındı.
- 4) Hücre-tripsin süspansiyonu 1.250 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edildi.
- 5) Hücre pelleti üzerindeki tripsin uzaklaştırıldı ve pellet üzerine bir miktar uygun besiyeri eklendikten sonra çalkalandı.
- 6) Hücre-besiyeri karışımı rezervuara alınarak çoklu pipet (12'li) ile 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna ~10.000 hücre gelecek şekilde 90 µL ekildi.

- 7) Hücrelerin plaka yüzeyine yapışması için 24 saat beklendi ardından 5-Fu ve GEM kombinasyonunun her uygulama dozu altı kuyucuğa gelecek şekilde kombine olarak 10 µL uygulandı.
- 8) Kontrol grubuna ise yalnızca çözücü madde uygulaması yapıldı.
- 9) Uygulamadan sonra 24 ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakılan hücrelerin canlılık oranları belirlendi.
- 10) MTT hücre canlılık testi için MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) maddesi PBS içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı.
- 11) Uygulamadan 24 ve 48 saat sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna çoklu pipet (12'li) ile 10 µL MTT solüsyonu pipetlendi.
- 12) MTT solüsyonunun canlı hücrelerin mitokondrilerinde metabolize olması için plakalar temel hücre kültürü koşullarında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- 13) İnkübasyon sonunda besiyeri-MTT solüsyonu karışımı hücre kültürü plakalarından çekilerek uzaklaştırıldı.
- 14) Canlı hücreler tarafından metabolize edilen MTT'nin çözünerek görünür hale gelmesi için kuyucuklara 100 µl DMSO pipetlendi ve 1 saat beklendi.
- 15) Ardından absorbanslar 492 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu (Thermo Multiskan GO) ile belirlendi.

MTT testi ile hücre sağkalım analizlerinin yapılmasının ardından kontrol grubundan elde edilen canlılık değeri %100 kabul edilerek karşılaştırmalı olarak hücre sağkalım-ölüm oranı belirlendi ve %100 toplam değer üzerinden sonuçlar hesaplandı. Konsantrasyonlar ve ölüm oranları baz alınarak SPSS 18 yazılımı ile Log10 tabanında logaritmik probit analizi yapıldı. Böylece moleküllerin tek tek ve karışımlarının oluşturdukları IC₅₀ konsantrasyonları belirlendi.

RNA İzolasyonu

MTT hücre canlılığı testi ile ilaç dozları belirlendikten sonra hücreler T25 hücre kültürü flasklarına ekildi. İlaç uygulaması yapılan hücrelerden 48 saatlik uygulama süresinin sonunda Ambion® RNA Kiti (Life Technologies) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

RNA izolasyon kiti protokolüne göre izolasyon aşağıdaki şekilde yapıldı;

- 1) %1 (2)-merkaptöetanol içeren taze lizis tamponu hazırlandı.

- 2) T25 flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak her bir flaskın içerisine 300 µL lizis tamponu eklendi ve yarım saat beklendi.
- 3) Lizis olan hücreler flasklarından toplanarak 1:1 oranında %70'lik etanol eklendi ve hiç bekletilmeden vortekslendi.
- 4) Bu karışım spin kolonlara aktarıldı ve 12.000 g'de 15 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi ve alt tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- 5) Kolon üzerine 700 µl birinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g'de 15 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi ve santrifüj sonrası kolonların alt tüpleri içindeki sıvıyla birlikte uzaklaştırıldı.
- 6) Yeni tüplere alınan kolonların üzerine ikinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g'de 15 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi ve alt tüpte kalan sıvı uzaklaştırıldı (2 kez).
- 7) Kolon membranının kuruması için kolonlar 12.000 g'de 2 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi ve alttaki tüpler atıldı.
- 8) Yeni ependorf tüpe alınan kolonların membranlarının tam ortasına 50 µL RNaz içermeyen su pipetlendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolonlar 12.000 g'de 2 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- 9) Santrifüj sonunda alt tüpte kalan RNAların miktarlarını ve saflıklarını ölçmek için Nanodrop cihazı (Optizen, Nano Q) kullanılarak ölçüm yapıldı ve örnekler -80°C derin dondurucuda saklandı.

cDNA Sentezi

İlaç uygulaması yapılmış ARPE-19 hücrelerinden elde edilmiş olan tek zincirli RNA'ların tamamlayıcı DNA'sının oluşturulması ve çift zincirli hale getirilmesi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanıldı. Kit protokolüne göre uygulama basamak sırası şöyledir;

- 1) Her bir PCR stribine 10 µl örnek pipetlendi.
- 2) Her bir örneğin üzerine Tablo 3'te verilen cDNA karışımı (10 µl) eklendi (Tablo 3).
- 3) Stripler içerisindeki reaksiyon karışımları PCR cihazında (Applied Biosystems) 25°C'de 10 dk; 37°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk tutularak cDNA sentezlendi.
- 4) Elde edilen cDNA'lar, daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tablo 3. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları (1 örnek için)

Malzeme	Miktar
10X Ters transkripsiyon tamponu	2 µl
25X dNTP karışımı (100 mM)	0,8 µl
10X Ters transkripsiyon rastgele primerleri	2 µl
Multi Scribe™ Ters transkriptaz	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4,2 µl
Toplam	10 µl

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PCR) Analizleri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde, 5-Fu ve GEM kombine olarak kontrol, IC₅₀ dozu ve kemoterapi dozu uygulamaları sonucunda mitokondriyal (içsel) apoptoz yolağı proteinlerinden p53 (Tumor protein p53), BCL2 (B-cell lymphoma 2), BAX (BCL2 Associated X), SIT-C (Cytochrome c), APAF1 (Apoptotic protease activating factor 1), Kaspaz 3 (Cysteine-aspartic acid protease 3), dışsal apoptoz yolağı proteinlerinden TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), FAS (Fas Cell Surface Death Receptor), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), Kaspaz 8 (Cysteine-aspartic acid protease 8), şaperon protein ailesinden HSP60 (Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1), HSP70 (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 2), oksidatif stres proteinlerinden SOD (Superoxide Dismutase 1 [Cu-Zn]), SOD2 (Superoxide dismutase 2 [Mn]), KAT (Katalaz), GPX (Glutathione Peroxidase 1), detoksifikasyon proteinlerinden ABCC1 (ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1), ABCC2 (ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2), GST (Glutathione S-transferase), gen tamir proteinlerinden ise EXO (Exonuclease 1), NEIL (Nei Like DNA Glycosylase 1) sentezinden sorumlu gen ifadelerindeki değişimler qRT-PZR yöntemi ile Tablo 4'te dizileri verilen primerler kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak ise GAPDH (gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz) ifadesi kullanıldı.

Tablo 4. qRT PCR için kullanılan primer çiftleri, dizileri ve uzunlukları

Gen Adı		Primer Dizisi		Primer Uzunluğu (bp)
GAPDH	F	5' CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	3'	24
	R	5' AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	3'	24
BCL2	F	5' ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	3'	20
	R	5' ACAGTTCACAAAGGCATCC	3'	20
BAX	F	5' ATGGACGGGTCCGGGGAG	3'	18
	R	5' TCAGCCCATCTTCTTCCA	3'	18
SIT-C	F	5' AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTTACA	3'	28
	R	5' TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAGA	3'	28
APAF1	F	5' GATATGGAATGTCTCAGATGGCC	3'	23
	R	5' GGTCTGTGAGGACTCCCA	3'	19
Kaspaz 3	F	5' GTGGAATTGATGCGTGATGT	3'	20
	R	5' ACAGGTCCATTTGTTCCAAAA	3'	21
TRAIL	F	5' ATGGCTATGATGGAGTCCAG	3'	20
	R	5' TTGTCCTGCATCTGCTTCAGC	3'	21
FAS	F	5' TCTAACTTGGGGTGGCTTTGTCTTC	3'	25
	R	5' GTGTCATACGCTTCTTTCCAT	3'	22
Kaspaz 8	F	5' AGAGTCTGTGCCAAATCAAC	3'	21
	R	5' GCTGCTTCTCTTTGCTGAA	3'	21
p53	F	5' CACGAGCGCTGCTCAGATAGC	3'	21
	R	5' ACAGGCACAAACACGCACAAA	3'	21
HSP60	F	5' GTCGCGCCCCGTTAGCAC	3'	18
	R	5' CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT	3'	22
HSP70	F	5' CGAGETCGACGCATTGTTTG	3'	20
	R	5' GAGTGGATCCGCCGACGAGTA	3'	21
CuZn-SOD	F	5' TCTGAAGAAGGCCATCGAGT	3'	20
	R	5' GCAGATAGTAGGCGTGCTCC	3'	20
Mn-SOD	F	5' GTTCGGTGACAACACCAATG	3'	20
	R	5' GGAGTCGGTGATGTTGACCT	3'	20
KAT	F	5' TACGAGCAGGCCAAGAAGTT	3'	20
	R	5' ACCTTGTACGGGCAGTTCAC	3'	20
GS	F	5' TGGGACCAGCAAGTAAAACC	3'	20
	R	5' TCGCGAATGTAGAACTCGTG	3'	20
GPX	F	5' CCAAGCCTCATCACCTGGTCT	3'	21
	R	5' TCGATGTCAATGGTCTGGAA	3'	20
GST	F	5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC	3'	23
	R	5' TCACCGGATCATGGCCAGCA	3'	20
ABCC1	F	5' CTACCTCCTGTGGCTGAATCTG	3'	22
	R	5' CATCAGCTTGATCCGATTGTCT	3'	22
ABCC2	F	5' TGCACAAGCAACTGCTGAAC	3'	20
	R	5' AGGCAGGGTGCATCCACT	3'	19
EXO	F	5' GACCATTTCACCACCCACTTT	3'	21
	R	5' TGAGACTCATCGTCACTGGACTC	3'	23
NEIL	F	5' ATGCTTGGCACCTGTAAAG	3'	20
	R	5' CCTTCAGAGGAGTATTACC	3'	19

qRT-PCR cihazında reaksiyon; 1 döngü 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, ardından 40 döngü denatürasyon (95°C 15 sn) ve annealing (primer eşleşmesi) ve elongasyon (primer uzaması) (60°C 'de 1 dakika) olacak şekilde başlatıldı.

DNA İzolasyonu

İlaç uygulaması yapılmış normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinden DNA izolasyonu PureLink™ Genomik DNA Mini Kit (Invitrogen™) protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı;

- 1) Flasklardaki besiyerleri 15 ml'lik falkon tüplere alındı ardından tripsinle kaldırılan hücreler kendi gruplarına ait falkon tüplere alındı (falkon tüplerdeki besiyerlerinin üzerine eklendi) ve 1250 rpm'de 1,5 dk santrifüjlendi.
- 2) Santrifüj sonunda pellet halinde kalan hücrelerin üzerindeki besiyeri ve tripsin atıldı ve pelletler 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı.
- 3) Hücre pelletlerinin üzerine kit içerisinde bulunan Genomik Digestion Buffer'dan 180 µl eklendi ve vortekslendi.
- 4) Ardından örneklerin üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi ve iyice vortekslendi.
- 5) Örnekler çalkalamalı inkübatör üzerinde 55 °C' de 30 dakika boyunca 300 rpm'de inkübe edildikten sonra 20 µl RNaz A eklendi, iyice vortekslendi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 6) Elde edilen karışımın üzerine 200 µl Genomik Lizis/Binding Buffer eklendi ve homojen oluncaya kadar vortekslendi.
- 7) Ardından 200 µl %96'lık etanol eklendi, vortekslendi ve 1,5 ml'lik tüp içinde olan bu karışım, kit içerisinde bulunan spin kolonlara aktarıldı.
- 8) Kolonlar 10000 g'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi ve kolonların altında kalan tüp içerisindeki sıvı ile birlikte atılarak, kolonlar yeni tüplere alındı.
- 9) Kolonlara 500 µl birinci yıkama tamponu eklendi ve 10000 g'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi
- 10) Kolonlara 500 µl ikinci yıkama tamponu eklendi ve en yüksek hızda, 3 dk oda ısısında santrifüj edildi.
- 11) Kolonlar yeni 1,5 ml'lik tüplere alındı, üzerine 50 µl Genomik Elution Buffer eklendi ve 1 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra en yüksek hızda, 1 dk oda ısısında santrifüj edildi

12) Santrifüj sonunda, altta kalan sıvı kısım genomik DNA'yı içermektedir. Elde edilen genomik DNA'ların miktarlarını ve saflıklarını ölçmek için Nanodrop cihazı (Optizen, Nano Q) kullanılarak ölçüm yapıldı ardından +4°C'de saklandı.

RAPD Yöntemi (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RAPD-PCR için önceden izole edilmiş genomik DNA'lar, PCR reaksiyonu öncesi DNaz/RNaz içermeyen su ile 100 ng/µl konsantrasyona eşitlendi ve kalıp DNA olarak kullanıldı. RAPD-PCR analizi için standart 50 µL PCR reaksiyonu (kalıp DNA, AmpliTaq Gold PCR Master Mix, primer ve nükleaz içermeyen su) hazırlandı, Applied Biosystems® ProFlex™ PCR cihazında reaksiyon 1 döngü 3 dakika 95 °C, 40 döngü 30 saniye 95 °C, 40 döngü 30 saniye 37 °C, 40 döngü 90 saniye 72 °C, 1 döngü 30 dakika 72 °C olacak şekilde reaksiyon başlatıldı.

- 1) Çalışmada 9-11 bazlık toplam sekiz farklı RAPD primeri kullanıldı (Tablo 5) ve anlamlı bant veren dört primer analizlerde kullanıldı.
- 2) RAPD yöntemi ile elde edilen bant değişikliklerini değerlendirmek amacı ile genomik kalıp kararlılığının (GKK) yüzde değeri ($GKK\% = (1 - [(a + b) / n]) \times 100$, a ve b; sırasıyla yeni oluşan ve kaybolan bantlar, n; kontroldeki toplam bant sayısı) hesaplandı.

Tablo 5. RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer İsmi	Baz Dizisi
SP1	5' CAG GCC TCC G-3'
OPA8	5' GTG ACG TAG G-3'
OPC18	5' AAG CCT CGT C-3'
4OPA	5' AAT CGG GCT G-3'
14OPC	5' CTC ACC GTC C-3'
S-237	5' ACC GGC TTG T-3'
AP5	5' TCC CGCTGC G-3'
7OPA	5' GAA ACG GGT G-3'

Agaroz Jel Elektroforezi

RAPD-PCR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel elektroforezi uygulaması basamak sırası ile şöyledir;

- 1) 2X TAE (Tris 1.6 M, asetik asit 0.8 M, EDTA 40 mM) tamponu ile %2'lik agaroz jel hazırlandı ve içerisine Etidyum Bromid eklendi.
- 2) Jel, kaset içerisine döküldükten sonra taraklar takıldı ve donmaya bırakıldı.
- 3) Tarakları çıkartılan kaset tanka yerleştirildi ve üzeri 2X TAE ile tamamlandı.

- 4) İlk ve son kuyucuklara marker olarak 100 bp DNA Ladder, diğer kuyucuklara örnekler pipetlendi.
- 5) Tank güç kaynağına bağlandı ve 60 V'da 3 saat kadar yürütüldü.
- 6) Elde edilen bantlar UV transilluminator (Infinity Capture, Vilber Lourmat) ile fotoğraflandı ve moleküler ağırlık (baz çifti) analizleri yapıldı.

Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi

Tali görüntü tabanlı sitometre ile apoptoz tayin çalışmaları Tali® Apoptosis Kit-Anneksin V (AlexaFluor® 488) ve Propidyum iyodid (Life Technologies) kullanılarak, kit prosedürüne göre yapıldı. Anneksin V yalnızca apoptotik hücrelere bağlanan ve yeşil floresanda ışımaya yapan, propidyum iyodid ise yalnızca ölü hücrelerin zarlarından geçen ve kırmızı ve/veya sarı ışımaya veren bir moleküldür.

Tali sitometre ile apoptoz tayin çalışması için hücre kültürü laboratuvarı ortamında normal ve diyabetik ARPE-19 hücre grupları kendi aralarında kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozu olarak adlandırılarak T25'lik flasklara ekildi. Ardından falkon tüplere önce üstte kalan besiyeri ardından tripsinize edilmiş hücre yığınları eklendi ve falkonlar 2 dakika boyunca 1000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edildi, üstte kalan sıvı atıldı. Böylece hücreler pellet halinde Tali apoptoz tayin kiti ile çalışmaya uygun hale getirildi.

Tali sitometre ile apoptoz tayin çalışması için kullanılan kit protokolüne göre uygulama basamak sırası şöyledir;

- 1) Kit içerisinde bulunan Annexin bağlama tamponu (5X), deiyonize su ile seyreltilerek 1X Annexin bağlama tamponu elde edildi.
- 2) Falkonların içerisinde pellet halinde bulunan hücrelerin üzerine 100 µl Annexin bağlama tamponu eklendi ve pellet mikropipet yardımıyla çözdürüldü.
- 3) Bu karışımın her 100 µl'si için 5 µl Annexin V ilave edildi, hemen vortekslendi.
- 4) Hücre-Annexin V karışımını oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.
- 5) Ardından bu karışım 1500g'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 6) Pelletin üzerine 100 µl 1X Annexin bağlama tamponu eklendi, vortekslendi.
- 7) Bu karışıma 1 µl Propidyum iyodid solüsyonu eklenerek karanlık ortamda 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 8) İnkübasyon sonrasında tüpler içerisindeki hücre karışımından 25 µl alınarak TALİ® kiti ile alınan özel lamlara pipetlendi ve Tali sitometre cihazı (Invitrogen, TALİ® Image Based Cytometer) ile analizi yapıldı.

Yara İyileşme Deneyi

Yara iyileşme deneyi hücre flasklarının tek tabakalı hücreler ile %90'a yakın dolmasıyla birlikte flask yüzeyinde bir yara açılması ve bu yaranın iyileşme takibi esasına dayanmaktadır. Yara iyileşme deneyi için normal ve diyabetik ARPE-19 hücreleri T25 flaska ekildi. Deney için flask yüzeyinin %90 oranında hücre doluluğuna ulaşması beklendi. Daha sonra flask yüzeyleri pipet uçları ile tabana zarar verilmeden üç farklı noktadan düz bir çizgi çizilerek yara oluşturuldu. Çizilmeden dolayı flask yüzeyinden kalkan hücreleri uzaklaştırmak ve hazırlanan ilaçlı besiyerlerini eklemek için besiyerleri flasklardan uzaklaştırıldı ve flasklar PBS ile yıkandı. Flasklar kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozu olarak 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu flaskları içerisine kemoterapi ilaçların çözücüsü olan su (DNaz/RNaz içermeyen su) eklendi. IC₅₀ grubu flaskları içerisine daha önce MTT testi ile belirlenen dozda ilaç uygulaması yapıldı. Kemoterapi grubu flaskları içerisine daha önce belirlenen dozda ilaç uygulaması yapıldı. Yaranın oluşturulduğu saat 0 kabul edilerek, 0. saatten itibaren her 6 saatte bir, 30. saate kadar floresan mikroskopunda (ZEISS Observer Z1) flaskların fotoğrafı çekildi.

Western Blot Protein Analizi

Çalışmamızda BCL2, Kaspaz 3, BAX ve β-Aktin proteinlerinin ifade seviyeleri Western blot yöntemi ile analiz edildi. Western blot basamakları sırası ile şöyledir;

a) Protein İzolasyonu

Western Blot deneyi için normal ARPE-19 ve diyabetik ARPE-19 hücreleri T75 flaska ekildi. Deney için flasklar kontrol, IC₅₀ dozu ve kemoterapi dozu olarak 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu flaskları içerisine kemoterapi ilaçların çözücüsü olan su (DNaz/RNaz içermeyen su) eklendi. IC₅₀ grubu flaskları içerisine daha önce MTT testi ile belirlenen dozlarında ilaç uygulaması yapıldı. Kemoterapi grubu flaskları içerisine daha önce belirlenen dozlarda ilaç uygulaması yapıldı.

İlaç uygulamasından 48 saat sonra protein izolasyonuna başlandı. Protein izolasyon basamakları sırası ile şöyledir;

- 1) Flasklar içerisindeki ilaçlı besiyerleri dökülerek uzaklaştırıldı, flasklar PBS ile yıkandı.
- 2) Her flaska tripsin eklendi ve flask yüzeyine tutunmuş haldeki hücrelerin kalkması sağlandı.

- 3) Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15 ml'lik falkon tüplere toplanarak 1250 rpm'de 1.5 dk santrifüj edildi.
- 4) Santrifüj sonunda hücre pelleti üzerindeki tripsin uzaklaştırıldı ve pellet 1,5 ml'lik tüplere alındı.
- 5) 10 µl PMSF solüsyonu, 10 µl sodyum orthovanadate solüsyonu, 10 µl proteaz inhibitörü karıştırılarak RIPA buffer hazırlandı.
- 6) 1,5 ml'lik tüp içerisindeki hücre pelletleri üzerine hazırlanan RIPA Buffer'dan 200 µl eklendi.
- 7) Örnekler doku parçalama cihazında (Tissue Lyser LT, Qiagen) 50 devirde 20 dk parçalandı, 13.000 g'de 20 dk +4°C'de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar yeni 1,5 ml'lik tüplere alındı.
- 8) Elde edilen protein miktarları Nanodrop cihazı (Optizen, Nano Q) ile belirlendi ve kullanılmıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

b) Denatürasyon

- 1) Önceden izole edilmiş ve miktarları bilinen proteinler su (DNaz/RNaz içermeyen su) ile eşitlendi.
- 2) Eşitlenmiş olan protein örnekleri 0,2 ml hacimli strip tüplere 20 µl pipetlendi.
- 3) Protein karışımının üzerine 7,5 µl lityum dodesil sülfat (LDS) örnek tamponu (4x) NuPAGE ve 3 µl Örnek indirgeme ajanı (10x) Bolt™ pipetlendi.
- 4) Hazırlanan bu karışım PCR cihazında 80°C'de 12 dakika denatüre edildi.
- 5) Denatürasyon işlemi sonrası örneklerin soğuk blok üzerinde soğumaları sağlandı.

c) Jele Yükleme ve Elektroforez

- 1) Koşurma tamponu (1x) çözeltisi için 20 ml koşurma tamponu 1 L'ye tamamlandı.
- 2) Elektroforez tankının içine koşurma tamponu dolduruldu.
- 3) Jeller paketlerinden çıkartıldı, tarak dikkatlice jelden ayrıldı ve jeller tanka yerleştirildi.
- 4) Jellerin ilk kuyucuğuna marker olarak Magic Marker XP'den 7 µl ve See Blue Plus 2'den 5 µl yüklendi.
- 5) Ardından denatüre edilmiş olan protein örneklerinden 17 µl diğer kuyucuklara sırayla yüklendi.
- 6) Tank, güç kaynağına bağlandı ve jeller 80 V'da 60 dk yürütüldü.

d) Jelden Membrana Aktarma

- 1) Yürütme işleminden sonra jel kasetleri tanktan çıkarılarak spatula yardımı ile yanlardan dikkatlice kaldırıldı, alt ve üst taraflarından kesilen jel kasetleri kurumaması için saf su içerisine alındı.
- 2) Blotlama cihazının kapak kısmına sünger takıldı. En alt tarafına ise anot tabakası yerleştirildi.
- 3) Su içerisinde bulunan jel kasetlerinden jeller dikkatlice alınarak anot tabakasının üzerine yerleştirildi.
- 4) Rulo yardımı ile anot tabakası ve jeller arasında kalan hava boşlukları giderildi.
- 5) Aktarımın yapılacağı membran saf suda tamamen ıslatıldı ve jellerin üzerine yerleştirildi.
- 6) Membranın üzeri katot tabakası ile örtüldü.
- 7) Blotlama cihazı 7 dakika boyunca jelden membrana aktarım için çalıştırıldı.
- 8) İşlem bitiminde jelden membrana aktarım gerçekleştirildi.
- 9) Membranlar kenarlarından bisturi yardımıyla kesilerek kurumaması için saf su içerisinde bekletildi.

e) Blotlama ve Birincil Antikor Bağlanması

- 1) Blotlama solüsyonu 14 ml ultra saf su, 4 ml Blocking Diluent Past A ve 2 ml Blocking Diluent Past B karıştırılarak hazırlandı.
- 2) Membranların içinde beklediği su uzaklaştırılarak hazırlanan bloklama solüsyonu eklendi ve çalkalamalı inkübatörde 300 devirde 1 saat bekletildi.
- 3) Ardından membranlar çalkalamalı inkübatör üzerinde 3 kez 5 dakika boyunca saf su ile yıkandı.
- 4) Kaspaz 3 antikor 1:200, BCL2 antikor 1:400, β -Aktin antikor 1:4000, BAX antikor ise 1:200 oranında bloklama solüsyonu ile seyreltilerek 10 ml birincil antikorlar hazırlandı.
- 5) Membranların üzerine birincil antikorlar eklendi ve +4 °C'de, çalkalamalı inkübatörde 150 devirde bir gece boyunca inkübe edildi.

f) Yıkama ve İkincil Antikor Bağlanması

- 1) Yıkama solüsyonu 150 ml ultra saf su ve 10 ml Antibody Wash Solution (16X) karıştırılarak hazırlandı.
- 2) Bir gece inkübe edilen membranların üzerindeki birincil antikorlar falkon tüplerine toplandı.

- 3) Membranlar 3 kez 5 dakika boyunca çalkalamalı inkübatör üzerinde yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 4) Ardından 3 kez 5 dakika boyunca saf su ile yıkandı.
- 5) İkincil antikor çözeltileri membranların üzerine eklendi, membranlar oda sıcaklığında 1 saat boyunca 300 devirde çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.
- 6) İkincil antikor bağlanması sonunda antikorlar falkon tüplerine toplandı.
- 7) Membranlar 3 kez 5 dakika boyunca çalkalamalı inkübatör üzerinde yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 8) Ardından bir kez 5 dakika boyunca ultra saf su ile yıkandı.

g) Kemilüminesans Bağlanması ve Görüntüleme

- 1) Bir membran için 2,375 ml kemilüminesans substratı ve 0,125 ml sinyal artırıcı bir falkon tüpü içerisinde karıştırılarak hazırlandı.
- 2) Membran, görüntüleme cihazının haznesine alındıktan sonra kemilüminesans çözeltisi tüm yüzeye yayılarak uygulandı.
- 3) 4 dakika inkübasyonun ardından görüntüleme gerçekleştirildi.

Moleküler Floresans Boyama

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre hatlarına ilaç uygulaması yapıldıktan sonra uygulanan bu ilaçların hücrelerin çekirdek yapısındaki değişimi (NucBlue® Live ReadyProbes® Reaktif), apoptotik aktivitelerini (akridin oranj ve etidyum bromür) ve reaktif oksijen türlerinin etkisini (CM-H₂DCFDA) araştırmak üzere floresan mikroskobu (ZEISS Observer Z1) kullanılarak analizler yapıldı.

Moleküler floresans boyama yöntemi uygulaması basamak sırası şöyledir;

- 1) Normal ve diyabetik ARPE-19 hücreleri 24 kuyucuklu hücre kültür kabına ayrı ayrı kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozu uygulamalarına göre gruplanarak ekildi.
- 2) Hücrelerin kültür kabına yapışması için bir gece boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde inkübe edildi.
- 3) Kültür kabına yapışan hücelere gruplarına göre taşıt madde veya ilaç uygulaması yapıldı.
- 4) İlaç uygulamasının ardından hücreler 24 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde inkübe edildi.
- 5) İnkübasyon süresinin ardından kültür kabında her uygulama grubunda NucBlue® Live ReadyProbes® Reaktif (2 damla/kuyucuk) ile CM-H₂DCFDA

(5 µl/kuyucuk) ve başka bir sıraya akridin oranj ve etidyum bromür boyaarı birlikte uygulandı.

- 6) Hücreler boyanmaları için 30 dakika boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde inkübe edildi.
- 7) Hücreler görüntülenmeden önce besiyeri uzaklaştırılarak kuyucuklar 3 kez PBS ile yıkandı.
- 8) Ardından floresan mikroskopunda (ZEISS Observer Z1), DAPI (mavi), FITC (yeşil) ve RED (kırmızı) filtreleri kullanılarak görüntüleme gerçekleştirildi.
- 9) Genel oksidatif stres göstergesi olan CM-H₂-DCFDA'nın toplam düzeltilmiş hücresel floresans yoğunluğu, TCCF= entegre yoğunluk - (seçilen hücrenin alanızemin okumalarının ortalama floresansı), formülüne göre analiz edildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizi, Trakya Üniversitesi lisanslı SPSS 18 ve SPSS 20 (IBM, ABD) programı ile yapıldı.

Tali analizinde yazılım ile elde edilen canlı, ölü ve apoptotik hücre değerleri ve qRT-PZR gerçek zamanlı gen ifadesi çalışmalarında $\Delta\Delta C_t$ metodu ile elde edilen ekspresyon değerlerinin arasındaki farklar tek yönlü ANOVA analizi ile karşılaştırıldı. Elde edilen "p" değerleri 0.05'ten küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

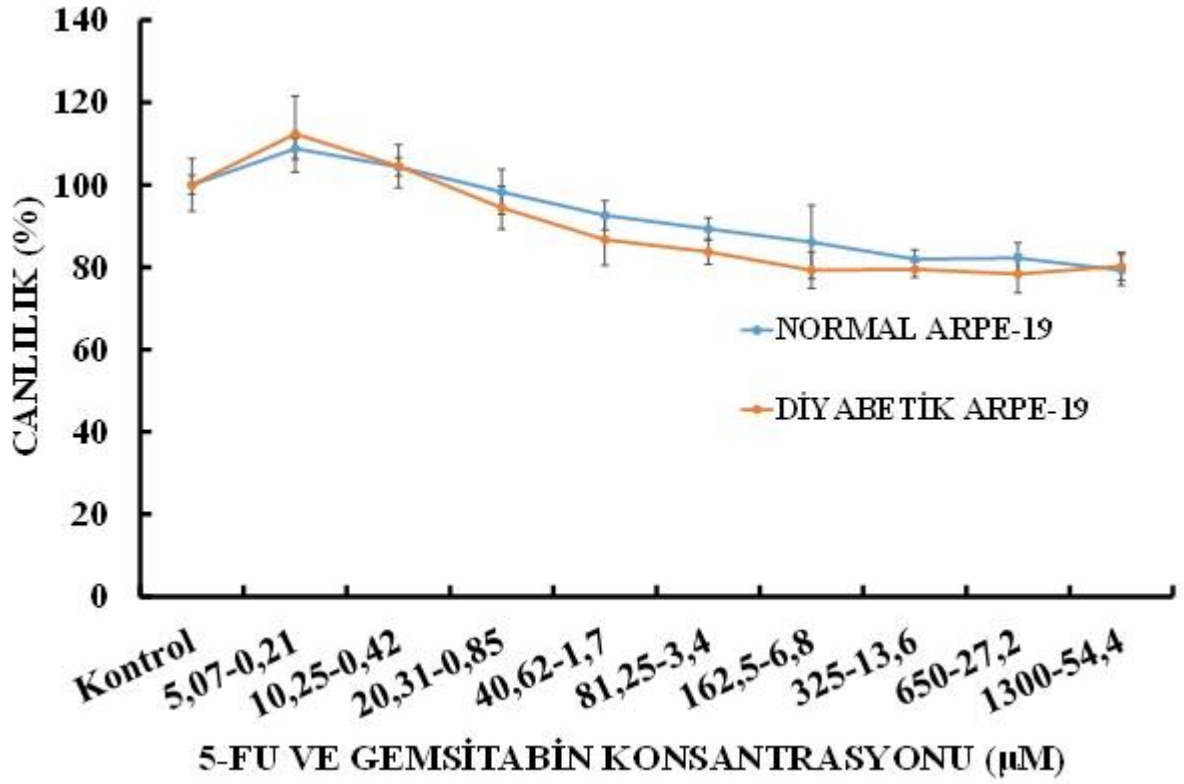
MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ

Çalışma kapsamında normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerine 5-Florourasil (5-Fu) ve Gemsitabin (GEM) kombine uygulamasında uygulanacak konsantrasyonların belirlenmesi için MTT testi yapıldı.

5-Florourasilin (5-Fu) ve Gemsitabinin (GEM) Kombine Uygulanması

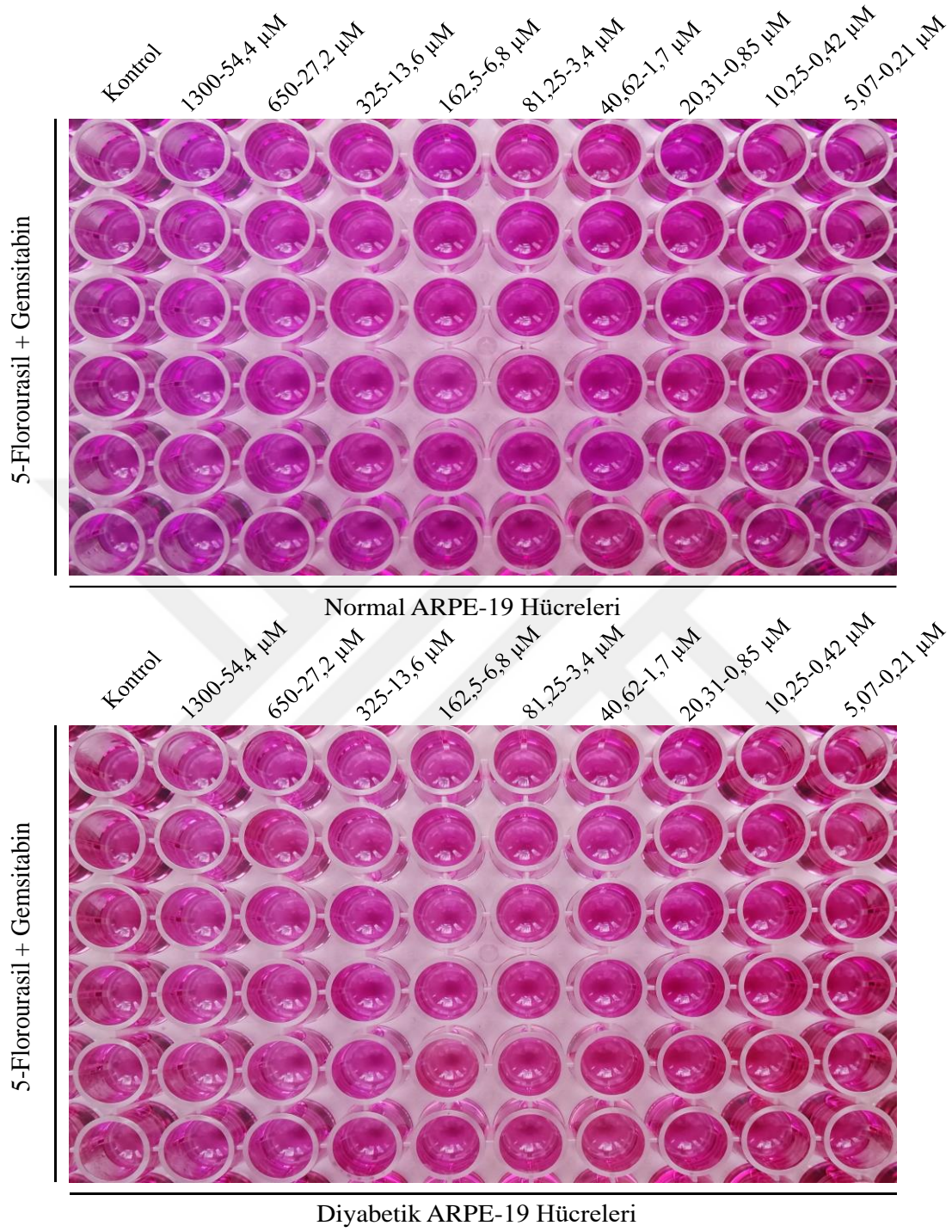
5-Florourasil (1300-5,07 μ M) ve Gemsitabin (54,4-0,21 μ M) kombine uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde uygulamadan 24 saat sonraki % hücre canlılık etkileri Şekil 14'te verildi.

Buna göre hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde en yüksek hücre canlılığı 5,07 μ M 5-Fu ile 0,21 μ M GEM konsantrasyonunda (Normal %108,77 \pm 2,51; Diyabetik %112,36 \pm 9,22), en düşük hücre canlılığı ise 1300 μ M 5-Fu ile 54,4 μ M GEM konsantrasyonunda belirlendi (Normal %79,26 \pm 3,71; Diyabetik %80,21 \pm 3,39). Her iki uygulama konsantrasyonunda da normal ve diyabetik hücrelerin canlılık oranlarının birbirinden istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptandı (5,07 μ M 5-Fu+0,21 μ M GEM F=10,019; sd=5,737-10; P=0,380, T-testi) (1300 μ M 5-Fu+54,4 μ M GEM F=0,035, sd=9,919-10; P=0,655, T-testi).



Şekil 14. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saatlik 5-Fu ve GEM (1300-54,4 µM) uygulanan gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=6, ortalama±standart hata.

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 1300-5,07 µM ve 54,4-0,21 µM doz aralıklarında 5-Fu ve GEM uygulamasının 24. saatinde MTT testi plağı Şekil 15'te verildi. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin belirtilen doz aralıklarında 24 saat sürelik uygulamasında IC₅₀ değeri belirlenemedi.



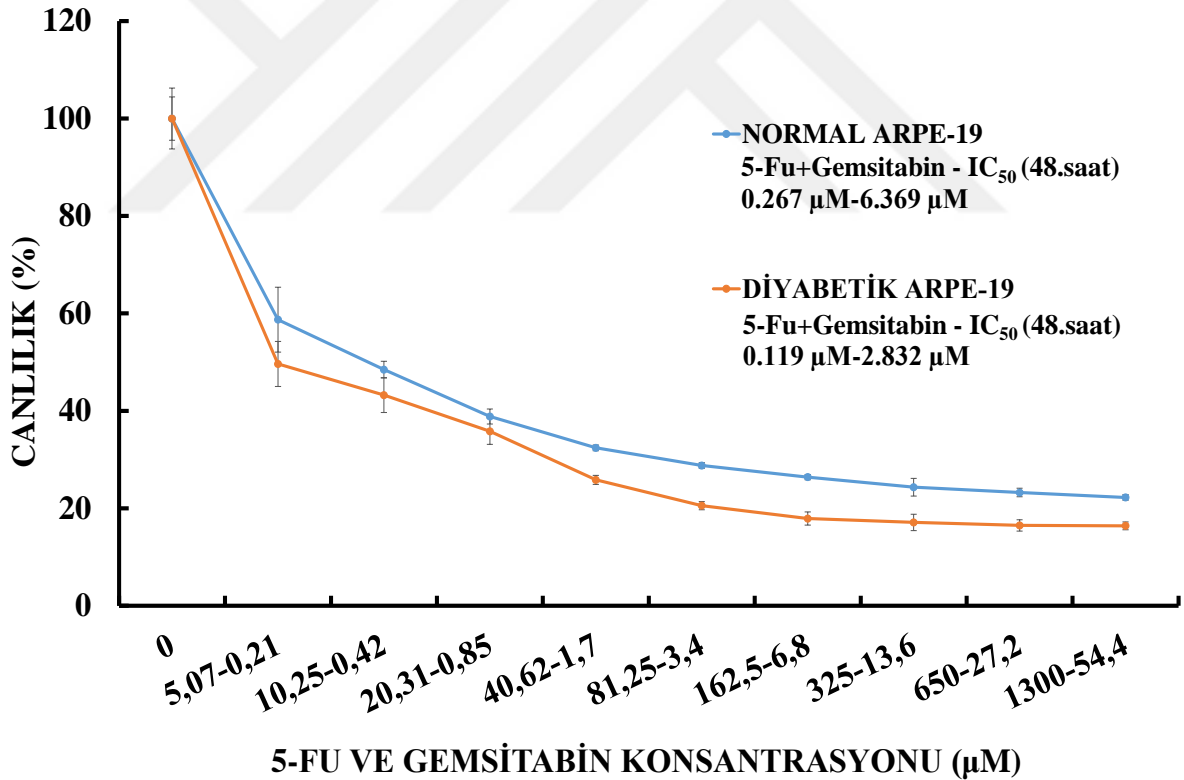
Şekil 15. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saat süreyle 1300-5,07 μM ve 54,4-0,21 μM doz aralıklarında 5-Fu ve GEM uygulamasının hücre canlılığına etkisi MTT testi plağı ile gösterildi

5-Florourasil (1300-5,07 μM) ve Gemcitabin (54,4-0,21 μM) kombine uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde uygulamadan 48 saat sonra % hücre canlılık

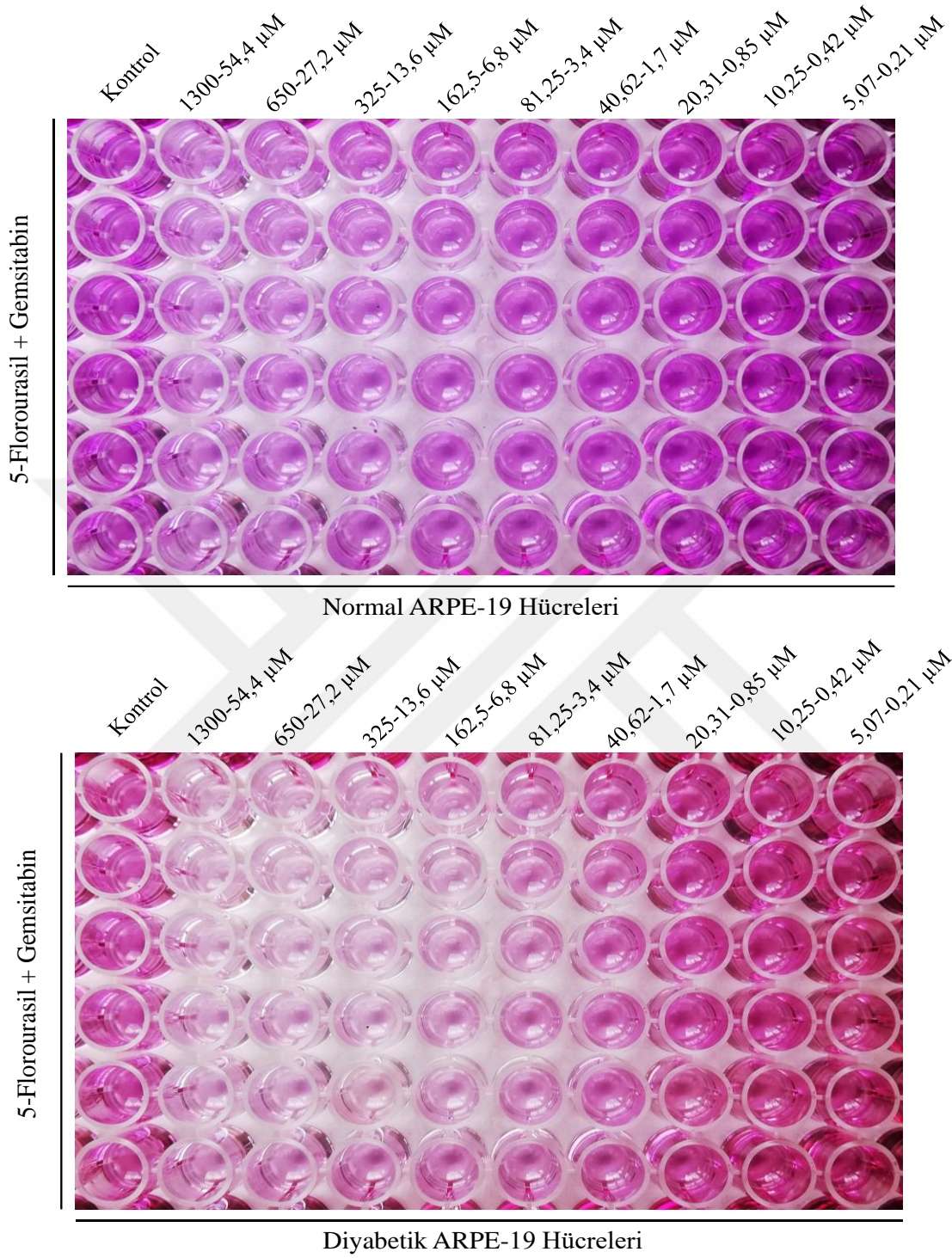
etkileri Şekil 16’da verildi. Buna göre hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde en yüksek hücre canlılığı 5,07 μM 5-Fu ile 0,21 μM GEM konsantrasyonunda belirlendi (Normal %58,71 \pm 6,66; Diyabetik %49,62 \pm 4,63). Bununla birlikte normal hücrelerin canlılık oranının diyabetik hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı (F=0,239; sd=8,914-10; $P\leq 0,05$, T-testi). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde en düşük hücre canlılığı ise 1300 μM 5-Fu ile 54,4 μM GEM konsantrasyonunda belirlendi (Normal %22,21 \pm 0,58; Diyabetik %16,40 \pm 0,80).

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde, 1300-5,07 μM ve 54,4-0,21 μM doz aralıklarında 5-Fu ve GEM uygulamasının 48. saatinde MTT testi plağı Şekil 17’de verildi.

Normal ARPE-19 hücrelerinin belirtilen doz aralıklarında 48 saat süreli uygulamasında IC₅₀ değeri 5-Fu için 0,267 μM ve GEM için 6,369 μM iken diyabetik ARPE-19 hücrelerinde IC₅₀ değeri 5-Fu için 0,119 μM ve GEM için 2,832 μM olarak belirlendi.



Şekil 16. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik 5-Fu ve GEM (1300-54,4 μM) uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=6, ortalama \pm standart hata.



Şekil 17. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saat süreyle 1300-5,07 μ M ve 54,4-0,21 μ M doz aralıklarında 5-Fu ve GEM uygulamasının hücre canlılığına etkisi MTT testi plağı ile gösterildi

Normal ve Diyabetik ARPE-19 Hücre Serisinde 48 Saatlik 5-Fu ve GEM (1300-54,4 µM) Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Farklı konsantrasyon ve sürelerde 5-Fu ve GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde belirlenen % canlılık oranları Tablo 6’da verildi. Tablo 6 incelendiğinde en yüksek canlılık oranının 24 saatlik 5-Fu ve GEM uygulamasında, en düşük canlılık oranının ise 48 saatlik 5-Fu ve GEM uygulamasında olduğu belirlendi. Ayrıca, artan 5-Fu ve GEM konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu saptandı.

Tablo 6. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 1300 µM-54,4 µM doz aralıklarında 5-Fu ve GEM kombine uygulamasının hücre canlılığına etkisi. N=6, ortalama±standart hata. *Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, $P \leq 0.05$)

		Hücre Canlılığı (%)			
		24 Saat		48 Saat	
Doz (µM)	N	Normal	Diyabetik	Normal	Diyabetik
Kontrol	6	100,00±2,35	100,00±6,39	100,00±6,24 ^g	100,00±4,45 ^f
5,078-0,2125	6	108,77±2,51	112,36±9,22	58,71±6,66 ^f	49,62±4,63 ^e
10,25-0,425	6	104,37±2,21	104,50±5,21	48,46±1,72 ^e	43,23±3,57 ^d
20,3125-0,85	6	98,28±5,45	94,43±5,26	38,83±1,53 ^d	35,78±2,68 ^c
40,625-1,7	6	92,58±3,51	86,69±6,23	32,40±0,59 ^c	25,82±0,91 ^b
81,25-3,4	6	89,27±2,73	83,72±3,04	28,78±0,60 ^{b, c}	20,53±0,83 ^a
162,5-6,8	6	86,10±8,9	79,26±4,41	26,39±0,52 ^{a, b}	17,89±1,34 ^a
325-13,6	6	81,95±2,29	79,46±1,95	24,33±1,81 ^{a, b}	17,09±1,68 ^a
650-27,2	6	82,21±3,68	78,35±4,60	23,23±0,88 ^{a, b}	16,48±1,15 ^a
1300-54,4	6	79,26±3,71	80,21±3,39	22,21±0,58 ^a	16,40±0,80 ^a

RAPD DNA POLİMORFİZMİ

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 48 saatlik 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozları uygulamasının ardından DNA polimorfizmlerinin belirlenmesinde anlamlı sonuç veren 8 farklı primere ait agaroz jel görüntüsü Şekil 18'de verildi.

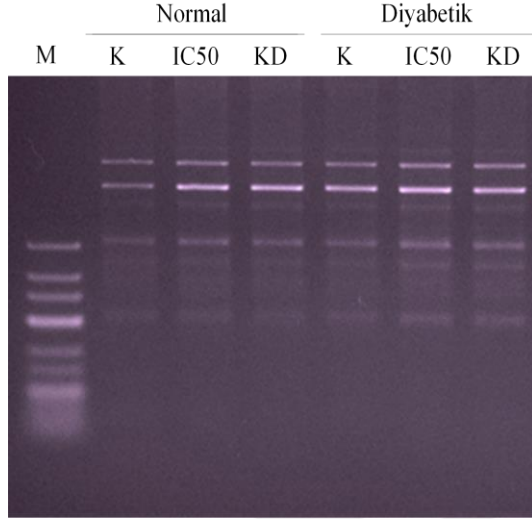


Şekil 18. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM uygulamasını takiben farklı primerler ile yapılan RAPD-PCR sonrası agaroz jel görüntüsü

K: Kontrol grubu, **IC₅₀:** IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD:** Kemoterapi dozu uygulama grubu.

SP1 Primeri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi doz uygulamasının 48. saatinde SP1 primerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 19'da verildi.



Şekil 19. SP1 primerine ait jel görüntüsü **K:** Kontrol grubu, **IC₅₀**; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD;** Kemoterapi dozu uygulama grubu.

Yapılan analizler sonucunda 5-Fu+GEM uygulamasının normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol gruplarına göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptandı ve bu bantların baz çifti (bç) değerleri Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde SP1 primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

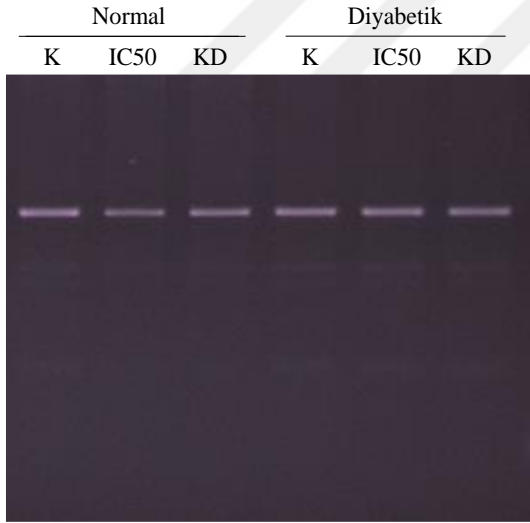
SP1									
Normal				Diyabetik (diyabetik kontrole göre)				Diyabetik (normal kontrole göre)	
Kontrol		IC ₅₀	KD	Kontrol		IC ₅₀	KD	IC ₅₀	KD
142;197; 322;488	Y	239;371; 411;442	150;207; 239;371; 442	150;207; 338;371; 442;512	Y	253;389; 411	253;389; 428;455	150;207; 253;338; 389;411; 512	150;207; 253;338; 389;428;455; 512
	K	-	142;197		K	371;442	371;442	142;197; 322;488	142;197; 322;488

IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD;** Kemoterapi dozu uygulama grubu. **Y:** Yeni oluşan, **K:** Kaybolan.

Tablo 7'ye göre SP1 primerinde normal ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 142-488 baz çifti arasında 4 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre 4 adet yeni bandın oluştuğu, kemoterapi dozunda ise 5 adet yeni bandın oluştuğu, 2 adet bandın kaybolduğu belirlendi. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 150-512 baz çifti arasında 6 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre 3 adet yeni bandın oluştuğu, 2 adet bandın kaybolduğu, kemoterapi grubunda 4 adet yeni bandın oluştuğu ve 2 adet bandın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin bant profili normal ARPE-19 hücrelerinin kontrolü ile karşılaştırıldığında IC₅₀ dozu grubunda 7 adet yeni oluşan bant ve 4 adet kaybolan bant ile toplam 11 adet bant değişimi olduğu ve kemoterapi dozu grubunda 8 adet yeni bant oluşumu ve 4 adet bant kaybı ile toplam 12 adet bant değişimi olduğu belirlendi.

OPA8 Primeri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozları uygulamasının 48. saatinde OPA8 primerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 20'de verildi.



Şekil 20. OPA8 primerine ait jel görüntüsü K: Kontrol grubu, **IC₅₀**; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu.

Yapılan analizler sonucunda 5-Fu+GEM uygulamasının normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol gruplarına göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptandı ve bu bantların baz çifti (bç) değerleri Tablo 8'de verildi.

Tablo 8. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde OPA8 primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

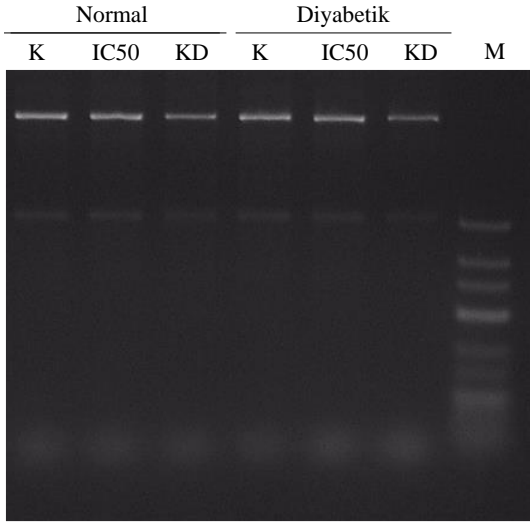
OPA8									
Normal				Diyabetik (diyabetik kontrole göre)				Diyabetik (normal kontrole göre)	
Kontrol		IC ₅₀	KD	Kontrol		IC ₅₀	KD	IC ₅₀	KD
253;389; 428;608	Y	-	-	253;389; 428;608	Y	-	411	-	411
	K	428	428		K	-	428	-	428

IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu. **Y**: Yeni oluşan, **K**: Kaybolan.

Tablo 8'e göre OPA8 primerinde normal ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 253-608 baz çifti arasında 4 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre 1 adet bandın kaybolduğu, kemoterapi dozu grubunda 1 adet bandın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 253-608 baz çifti arasında 4 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre yeni oluşan veya kaybolan bant saptanmazken kemoterapi dozu grubunda 1 adet yeni bandın oluştuğu ve 1 adet bandın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin bant profili normal ARPE-19 hücrelerinin kontrolü ile karşılaştırıldığında IC₅₀ grubunda yeni oluşan ve kaybolan bant saptanmazken kemoterapi dozu grubunda 1 adet yeni bant oluşumu ve 1 adet bant kaybı ile toplam 2 adet bant değişimi olduğu belirlendi.

OPC18 Primeri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozları uygulamasının 48. saatinde OPC18 primerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 21'de verildi.



Şekil 21. OPC18 primeri agaroz jel görüntüsü K: Kontrol grubu, IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, KD; Kemoterapi dozu uygulama grubu.

Yapılan analizler sonucunda 5-Fu+GEM uygulamasının normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol gruplarına göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptandı ve bu bantların baz çifti (bç) değerleri Tablo 9’da verildi.

Tablo 9. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde OPC18 primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

OPC18									
Normal				Diyabetik (diyabetik kontrole göre)				Diyabetik (normal kontrole göre)	
Kontrol		IC ₅₀	KD	Kontrol		IC ₅₀	KD	IC ₅₀	KD
7636;3511; 464	Y	-	3341	7636;3341; 464	Y	-	-	3341	3341
	K	-	3511		K	-	-	3511	3511

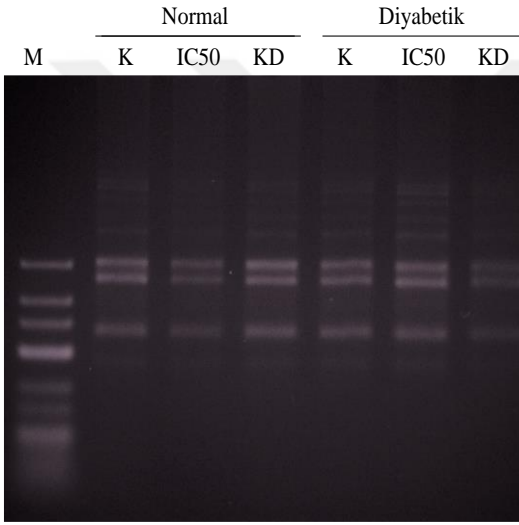
IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu. **Y**: Yeni oluşan, **K**: Kaybolan.

Tablo 9’a göre OPC18 primerinde normal ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 7636-464 baz çifti arasında 3 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre yeni oluşan veya kaybolan bant saptanmazken, kemoterapi dozu grubunda 1 adet yeni bantın oluştuğu ve 1 adet bantın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 7636-464 baz çifti arasında 3 adet bant saptandı. IC₅₀ ve kemoterapi dozu grubunda kontrole göre yeni bant oluşumu ve bant kaybı saptanmadı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin bant profili normal

ARPE-19 hücrelerinin kontrolü ile karşılaştırıldığında IC₅₀ dozu grubunda 1 adet yeni oluşan ve 1 adet kaybolan bant ile toplam 2 adet bant değişimi olduğu ve kemoterapi dozu grubunda 1 adet yeni oluşan ve 1 adet kaybolan bant ile toplam 2 adet bant değişimi olduğu saptandı.

4OPA Primeri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozları uygulamasının 48. saatinde 4OPA primerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 22'de verildi.



Şekil 22. 4OPA primeri jel görüntüsü K: Kontrol grubu, IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, KD; Kemoterapi dozu uygulama grubu.

Yapılan analizler sonucunda 5-Fu+GEM uygulamasının normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol gruplarına göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptandı ve bu bantların baz çifti (bç) değerleri Tablo 10'da verildi.

Tablo 10. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 4OPA primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

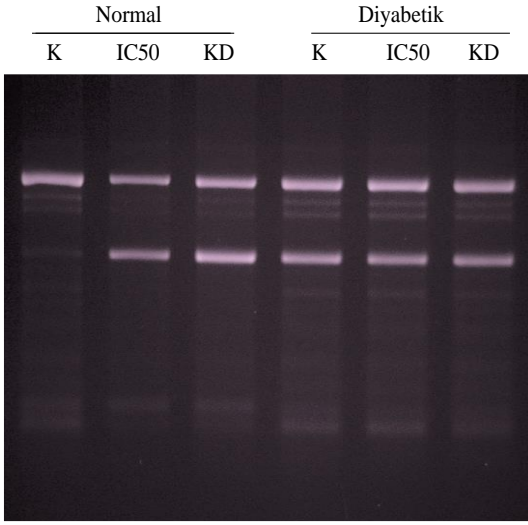
4OPA									
Normal				Diyabetik (diyabetik kontrole göre)				Diyabetik (normal kontrole göre)	
Kontrol		IC ₅₀	KD	Kontrol		IC ₅₀	KD	IC ₅₀	KD
4438;3144; 2366;1000; 900	Y	3000	3000	3000;2194; 1000;900	Y	-	-	3000;1500	3000;1500
	K	4438;3144; 900	4438;3144		K	-	-	4438;3144; 2366	4438;3144; 2366

IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu. **Y**: Yeni oluşan, **K**: Kaybolan.

Tablo 10'a göre 4OPA primerinde normal ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 4438-900 baz çifti arasında 5 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre 1 adet yeni bandın oluştuğu, 3 adet bandın kaybolduğu, kemoterapi dozu grubunda 1 adet yeni bandın oluştuğu ve 2 adet bandın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 3000-900 baz çifti arasında 4 adet bant saptandı. IC₅₀ ve kemoterapi dozu gruplarında kontrole göre yeni oluşan veya kaybolan bant saptanmadı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin bant profili normal ARPE-19 hücrelerinin kontrolü ile karşılaştırıldığında IC₅₀ dozu grubunda 2 adet yeni oluşan ve 3 adet kaybolan bant ile toplam 5 adet bant değişimi olduğu ve kemoterapi dozu grubunda 2 adet yeni oluşan ve 3 adet kaybolan bant ile toplam 5 adet bant değişimi olduğu saptandı.

14OPC Primeri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozları uygulamasının 48. saatinde 14OPC primerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 23'te verildi.



Şekil 23. 14OPC primeri jel görüntüsü K: Kontrol grubu, **IC₅₀**; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu.

Yapılan analizler sonucunda 5-Fu+GEM uygulamasının normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol gruplarına göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptandı ve bu bantların baz çifti (bç) değerleri Tablo 11’de verildi.

Tablo 11. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 14OPC primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

14OPC									
Normal				Diyabetik (diyabetik kontrole göre)				Diyabetik (normal kontrole göre)	
Kontrol		IC ₅₀	KD	Kontrol		IC ₅₀	KD	IC ₅₀	KD
7333	Y	5278;1342	5278;1000	7333;6278; 5278;1000	Y	-	960	6278;5278; 1000	6278;5278; 960
	K	-	-		K	-	1000	-	-

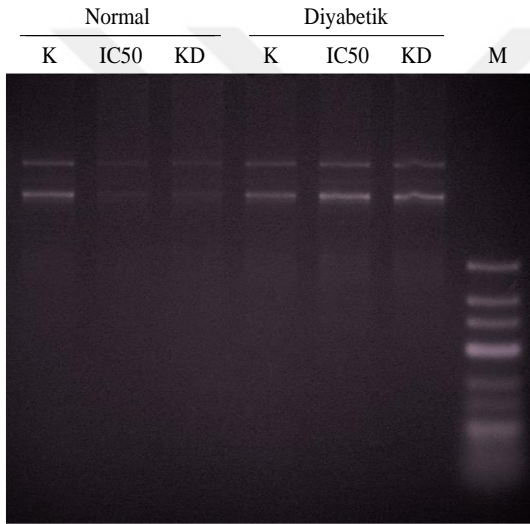
IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu. **Y**: Yeni oluşan, **K**: Kaybolan.

Tablo 11’e göre 14OPC primerinde normal ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 7333 baz çifti olmak üzere 1 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre 2 adet yeni bandın oluştuğu ve kemoterapi dozu grubunda 2 adet yeni bandın oluştuğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 7333-1000 baz çifti arasında 4 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre yeni oluşan veya kaybolan bant saptanmazken kemoterapi dozu grubunda 1 adet yeni bandın oluştuğu ve 1 adet bandın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin bant profili normal ARPE-19 hücrelerinin kontrolü ile karşılaştırıldığında IC₅₀

dozu grubunda yeni oluşan 3 adet bant ile toplam 3 adet bant değişimi olduğu ve kemoterapi dozu grubunda yeni oluşan 3 adet bant ile toplam 3 adet bant değişimi olduğu saptandı.

S-237 Primeri

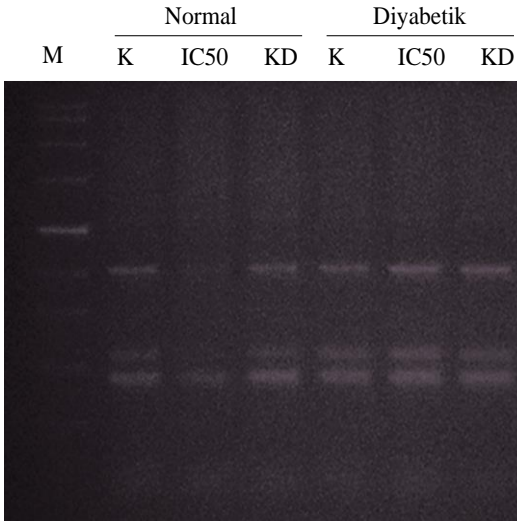
Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozları uygulamasının 48. saatinde S-237 primerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 24'te verildi. Yapılan analizler sonucunda 5-Fu+GEM uygulamasının normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol gruplarına göre yeni bant oluşumu veya kaybolan bant olmadığı saptandı. Bununla birlikte, normal hücrelerde uygulama yapılan gruplarda kontrolde olan bantların yoğunluğunun azaldığı görüldü.



Şekil 24. S-237 primeri jel görüntüsü. K: Kontrol grubu, IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, KD; Kemoterapi dozu uygulama grubu.

AP5 Primeri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozları uygulamasının 48. saatinde AP5 primerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 25'te verildi.



Şekil 25. AP5 primeri jel görüntüsü K: Kontrol grubu, IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, KD; Kemoterapi dozu uygulama grubu.

Yapılan analizler sonucunda 5-Fu+GEM uygulamasının normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol gruplarına göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptandı ve bu bantların baz çifti (bç) değerleri Tablo 12’de verildi.

Tablo 12. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde AP5 primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

AP5									
Normal				Diyabetik (diyabetik kontrole göre)				Diyabetik (normal kontrole göre)	
Kontrol		IC ₅₀	KD	Kontrol		IC ₅₀	KD	IC ₅₀	KD
700;517; 478	Y	-	-	700;517; 478	Y	821	821	821	821
	K	517	517		K	-	-	-	-

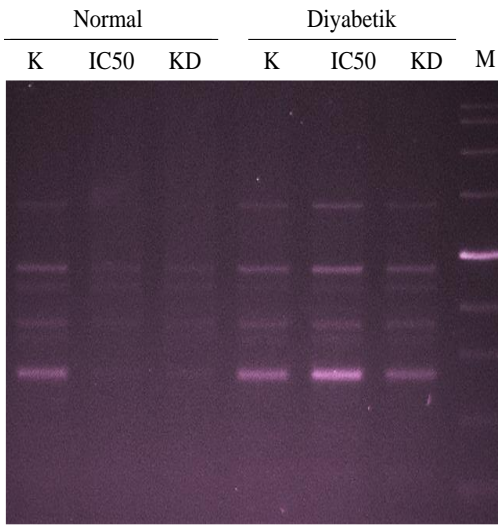
IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu. **Y**: Yeni oluşan, **K**: Kaybolan.

Tablo 12’ye göre AP5 primerinde normal ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 700-478 baz çifti arasında 3 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre 1 adet bandın kaybolduğu, kemoterapi dozu grubunda 1 adet bandın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 700-478 baz çifti arasında 3 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre 1 adet yeni bandın oluştuğu, kemoterapi dozu grubunda 1 adet yeni

bandın oluştuğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin bant profili normal ARPE-19 hücrelerinin kontrolü ile karşılaştırıldığında IC₅₀ dozu grubunda 1 adet yeni oluşan bant ile toplam 1 adet bant değişimi olduğu ve kemoterapi dozu grubunda 1 adet yeni oluşan bant ile toplam 1 adet bant değişimi olduğu saptandı.

7 OPA Primeri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozları uygulamasının 48. saatinde 7OPA primerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 26'da verildi.



Şekil 26. 7OPA primeri jel görüntüsü. K: Kontrol grubu, IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, KD; Kemoterapi dozu uygulama grubu.

Yapılan analizler sonucunda 5-Fu+GEM uygulamasının normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol gruplarına göre yeni bantların oluşumuna veya var olan bantların kaybolmasına neden olduğu saptandı ve bu bantların baz çifti (bç) değerleri Tablo 13'te verildi.

Tablo 13. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 7OPA primerinde her grup için kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)

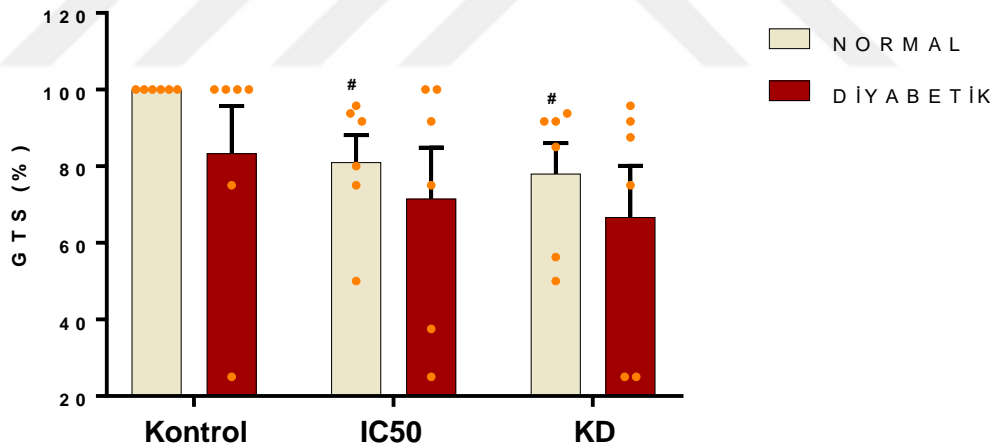
7OPA									
Normal				Diyabetik (diyabetik kontrole göre)				Diyabetik (normal kontrole göre)	
Kontrol		IC ₅₀	KD	Kontrol		IC ₅₀	KD	IC ₅₀	KD
907;770; 736;655; 620;560	Y	-	-	907;770;	Y	-	-	-	-
	K	620	620;907	736;655; 620;560	K	-	620	-	620

IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu. **Y**: Yeni oluşan, **K**: Kaybolan.

Tablo 13'e göre 7OPA primerinde normal ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 907-560 baz çifti arasında 6 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre 1 adet bandın kaybolduğu, kemoterapi dozu grubunda 2 adet bandın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda 907-560 baz çifti arasında 6 adet bant saptandı. IC₅₀ dozu grubunda kontrole göre yeni oluşan veya kaybolan bant saptanmazken kemoterapi dozu grubunda 1 adet bandın kaybolduğu saptandı. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin bant profili normal ARPE-19 hücrelerinin kontrolü ile karşılaştırıldığında IC₅₀ grubunda fark olmadığı, kemoterapi dozu grubunda 1 adet kaybolan bant ile toplam 1 adet bant değişimi olduğu saptandı.

GENOMİK KALIP KARARLILIĞI VE GEN TAMİR YOLAKLARI

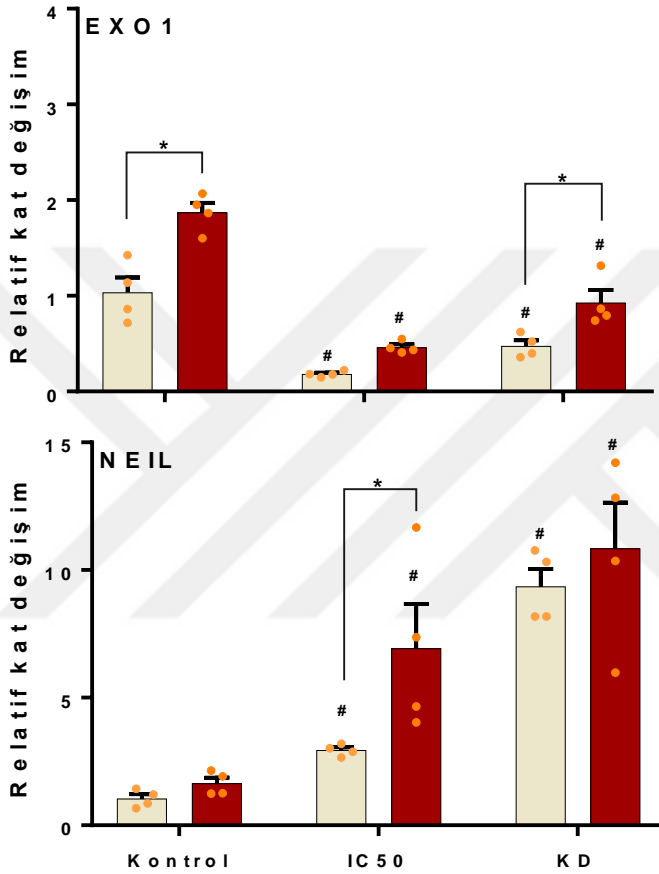
Çalışmamızda DNA hasarının belirlenmesi amacı ile RAPD-PCR yöntemi ile elde edilen bant değişiklikleri kullanılarak genomik kalıp kararlılığı hesaplandı (Şekil 27). Buna ilaveten gen tamir yollarından DNA ekzonükleaz ve uyuşmazlık onarım işlevli EXO1 ve hasarlı DNA'nın baz eksizyon onarımı işlevli NEIL genlerinin ifadeleri de belirlendi (Şekil 28).



Şekil 27. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası genomik kalıp kararlılığı (% GTS) değerleri. n=6, veriler ortalama±standart hata, #Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. K: Kontrol; IC50: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM

Şekil 27'den de görüldüğü gibi, normal ARPE-19 hücrelerinde genomik kalıp kararlılığının her iki uygulama dozunda da kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma

gösterdiği ($P \leq 0.05$), diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği saptandı ($P=0,753$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin genomik kalıp kararlılıkları karşılaştırıldığında hem kontrol hem de ilaç uygulanan grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olmadığı saptandı ($P=0,484$).



Şekil 28. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası qRT-PCR ile belirlenen EXO1 ve NEIL gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $P \leq 0.05$, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.05$. K: Taşıt kontrol; IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM

EXO1 gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma

gösterdiği belirlendi (Şekil 28; $P \leq 0.01$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde EXO1 gen ifadesi karşılaştırıldığında kontrol ve kemoterapi dozu uygulamasında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek gen ifadesine sahip olduğu saptandı ($P \leq 0.05$).

NEIL gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlendi. ($P \leq 0.05$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde NEIL gen ifadesi karşılaştırıldığında IC₅₀ uygulamasında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek gen ifadesine sahip olduğu belirlendi ($P=0,029$).

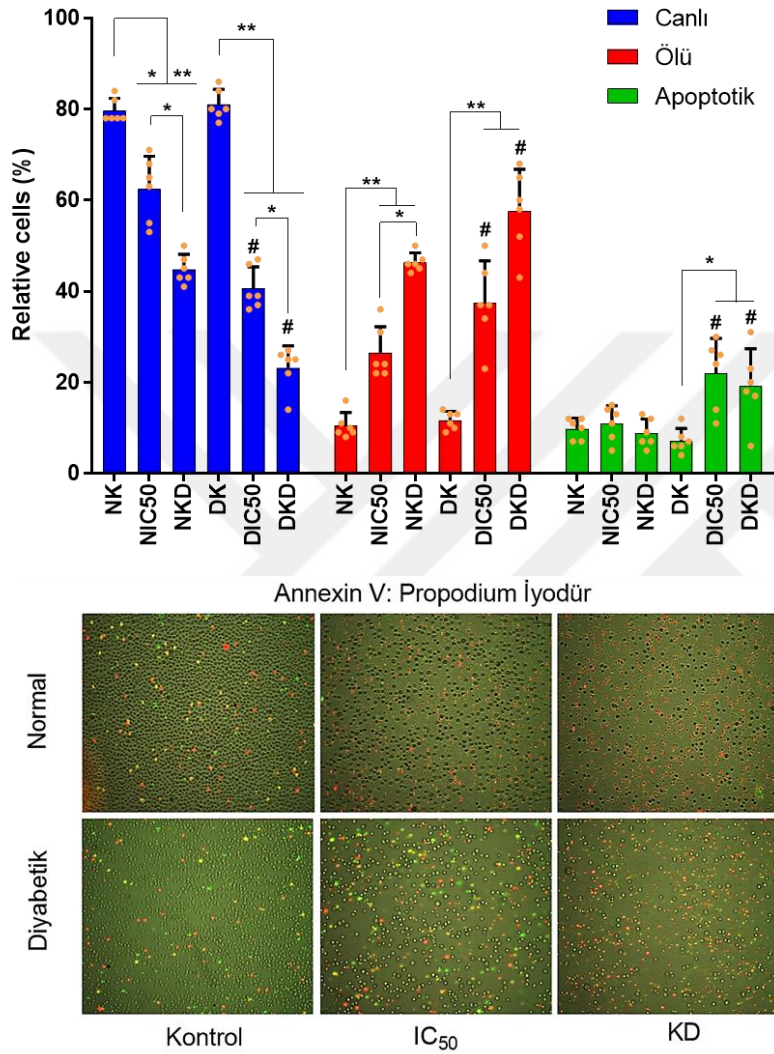
TALI GÖRÜNTÜ TABANLI SİTOMETRE ANALİZİ

Çalışma kapsamında 5-Fu ve GEM kemoterapi ilaçlarının kombine olarak uygulandığı normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin canlı, ölü ve apoptotik hücre oranına etkisi Tali Görüntü Tabanlı Sitometre ile analiz edildi. Bu yöntemle göre Anneksin V ve Propidyum iyodid ile muamele edilen normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol ve uygulama gruplarındaki hücreler canlı, ölü ya da apoptotik olma durumlarına göre boyandı. Canlı hücreler bu boyalar tarafından boyanmazken, ölü hücreler Anneksin V ve Propidyum iyodid ile boyanarak kırmızı (Anneksin V-/PI+) veya sarı (Anneksin V+/PI+) sinyal verdi. Apoptotik hücreler ise yeşil sinyal (Anneksin V+/PI-) verdi.

5-Florourasil ve Gemsitabin kemoterapi ilaçlarının kombine olarak uygulandığı normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde uygulama dozlarının 48 saat sonraki canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdelere etkisi Şekil 29'da verildi. Tali görüntü tabanlı sitometre analizi ile yapılan çalışma sonucu boyanan hücreler daire şeklinde gösterildi. Şekilde canlı hücreler mavi daire, ölü hücreler kırmızı veya sarı daire ve apoptotik hücreler yeşil daire ile gösterildi.

Yapılan analiz sonucunda normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin canlı, ölü ve apoptotik hücre oranlarının kontrol grubunda birbirinden istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği saptandı. IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında ise canlı hücre oranının normal ARPE-19 hücrelerinde diyabetiklere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek, ölü ve apoptotik hücre oranının ise düşük olduğu saptandı (Şekil 29). En fazla ölü hücre oranının diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kemoterapi dozu uygulama grubunda (%57,66±9,09) ve en düşük oranın ise normal ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda (%10,50±2,88) olduğu belirlendi.

Apoptotik hücre oranları incelendiğinde yüksek apoptotik hücre oranının diyabetik ARPE-19 hücrelerinin IC₅₀ dozu uygulama grubunda (%22±7,66) ve en düşük apoptotik hücre oranının diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda (%7,16±2,71) olduğu saptandı.



Şekil 29. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu ve GEM kombinasyonunun uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu ışına vermeyen canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. N=6, ortalama±standart hata. *Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤0.05, #Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. NK, NKD: Taşıt kontrol; NIC50, DIC50: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; NKD, DKD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyaması sonucu boyanan hücrelerin gösterimi

Tali görüntü tabanlı sitometre analizi ile yapılan çalışma sonucu 5-Fu ve GEM kombinasyon uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 48 saat sonraki uygulama sonucu boyanan hücrelerin toplam sayılan hücrelere oranla canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdelerinin tablo olarak gösterimi Tablo 14’te verildi.

Tablo 14. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM kombinasyonunun uygulandığı gruplarda Tali sitometre ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri (n=6, ortalama±SH)

		% Canlı	% Ölü	% Apoptotik	Toplam Hücre Sayısı
Normal	Kontrol	79,66±2,65	10,50±2,88	9,83±2,31	12723
	IC ₅₀	62,50±7,14	26,50±5,71	11,00±3,84	15842
	KD	44,83±3,25	46,33±2,06	8,83±3,12	8206
Diyabetik	Kontrol	81,00±3,34	11,66±1,96	7,16±2,71	9378
	IC ₅₀	40,66±4,67	37,50±9,18	22,00±7,66	4340
	KD	23,16±4,79	57,66±9,09	19,16±8,18	2380

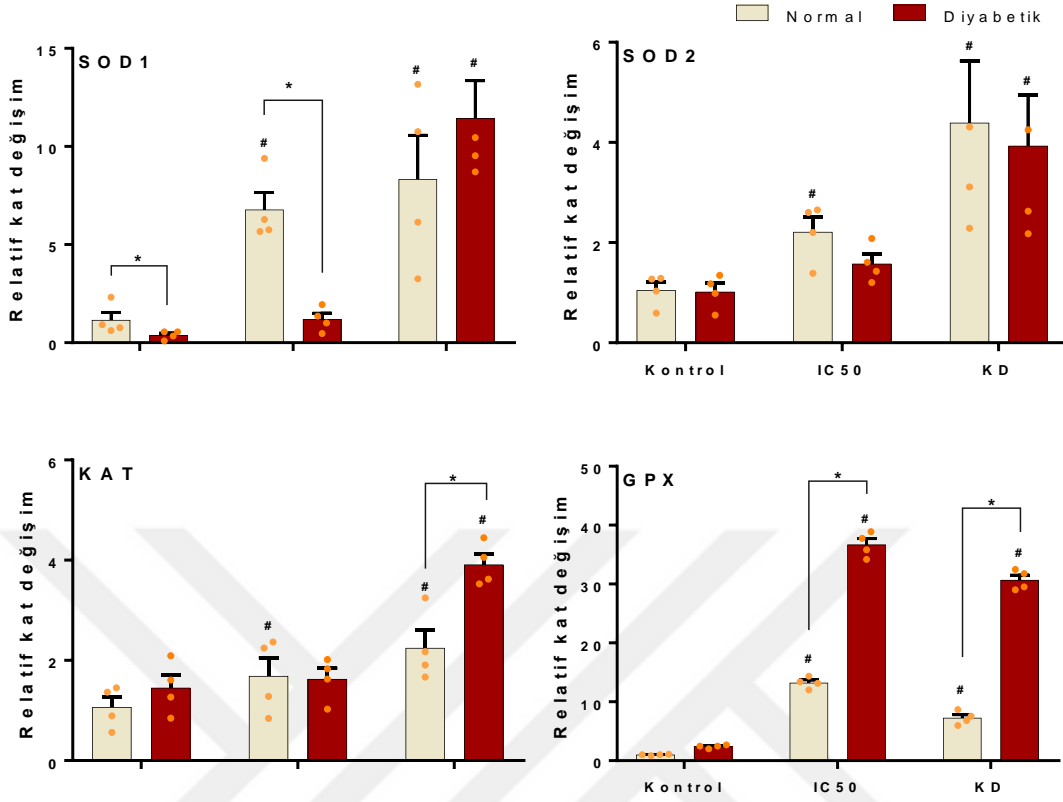
IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, **KD**; Kemoterapi dozu uygulama grubu.

GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

Çalışmamızda normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM kombinasyonunun uygulandığı gruplarda SOD, SOD2, KAT, GPX, GST, ABCC1, ABCC2, HSP60, HSP70, p53, BCL2, BAX, SIT-C, APAF1, KASPAZ3, TNF- α , FAS, TRAIL, KASPAZ8 gen ifadelerinde meydana gelen değişimler kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) metodu ile belirlendi. Madde uygulaması yapılan grupların gen ifadelerinde kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi doz grupları kendi aralarında kıyasla belirlenen değişiklikler (4 tekrar olmak üzere) çalışmaya alındı ve istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı. Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklı olarak ifade edildi (ANOVA, Tukey HSD testi, $P \leq 0.05$) Endojen kontrol geni olarak GAPDH geni kullanıldı.

Antioksidan Enzim (SOD1, SOD2, KAT, GPX) Gen İfadeleri

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM uygulaması ile SOD1, SOD2, KAT, GPX genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 30’da verildi.



Şekil 30. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen SOD1, SOD2, KAT ve GPX gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤0.05, *Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. IC₅₀: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM

SOD1 gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise sadece kemoterapi dozunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptandı (P≤0.01). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde SOD1 gen ifadesi karşılaştırıldığında, kontrol ve IC₅₀ dozlarında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük gen ifadesine sahip olduğu görüldü (P≤0.01). SOD2 gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise sadece kemoterapi dozunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptandı (P≤0.05). Normal ve

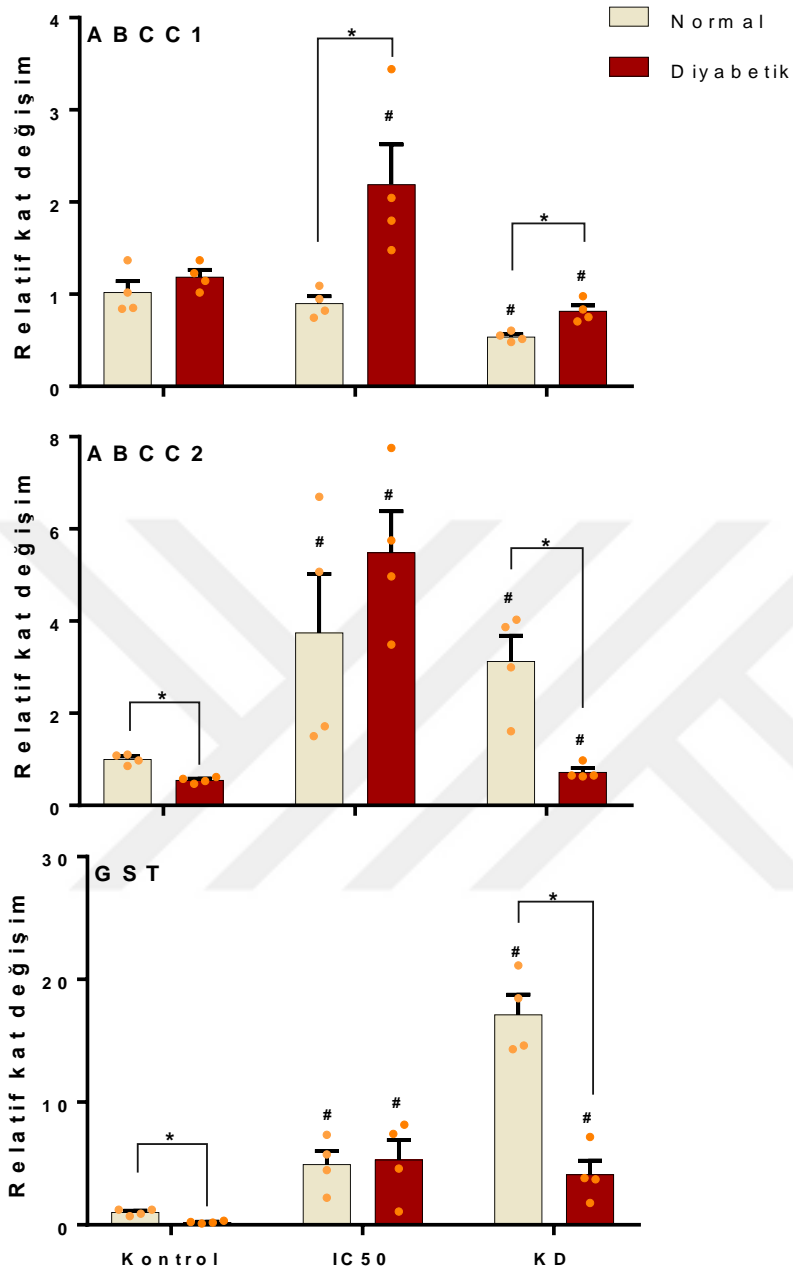
diyabetik ARPE-19 hücrelerinin SOD2 gen ifadesi karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Katalaz gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama grubunda da kontrole göre anlamlı artış gösterirken, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise sadece kemoterapi dozunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($P \leq 0.01$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde KAT gen ifadesi karşılaştırıldığında kemoterapi dozu uygulamasında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek gen ifadesine sahip olduğu belirlendi ($P \leq 0.05$).

Glutasyon peroksidaz gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre anlamlı artış gösterdiği belirlendi ($P \leq 0.01$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde GPX gen ifadesi karşılaştırıldığında, her iki uygulama grubunda da diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek gen ifadesine sahip olduğu saptandı ($P \leq 0.01$).

Detoksifikasyon Pompaları ABCC1, ABCC2, GST Gen İfadesi

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM uygulaması ile ABCC1, ABCC2, GST genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 31’de verildi.



Şekil 31. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen ABC1, ABC2, GST gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, #Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤0.05, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. IC₅₀: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM

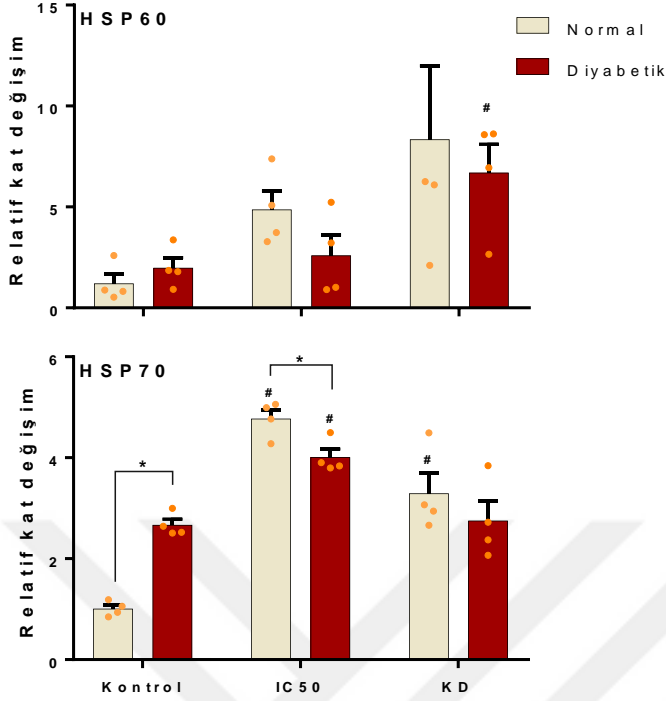
ABCC1 gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde IC₅₀ dozunda kontrole göre fark göstermediği, kemoterapi dozu uygulanan grupta ise kontrolden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı (Şekil 31; $P \leq 0.05$). Diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise gen ifadesinin IC₅₀ dozu uygulamasında kontrole göre anlamlı artış gösterirken, kemoterapi dozunda kontrole göre azaldığı belirlendi ($P \leq 0.05$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ABCC1 gen ifadesi karşılaştırıldığında IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ABCC1 gen ifadesine sahip olduğu saptandı ($P \leq 0.05$).

ABCC2 gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptandı (Şekil 31; $P \leq 0.05$). Buna ilaveten diyabetik hücrelerin normal hücrelerden anlamlı düzeyde düşük ABCC2 gen ifadesine sahip olduğu belirlendi ($P \leq 0.05$).

GST gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlendi (Şekil 31; $P \leq 0.05$). Buna ilaveten kontrol ve kemoterapi dozunda diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerinden anlamlı düzeyde düşük gen ifadesine sahip olduğu saptandı ($P \leq 0.01$).

Isışok Proteinleri HSP60, HSP70 Gen İfadesi

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM uygulaması ile HSP60 ve HSP70 genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 32’de verildi.

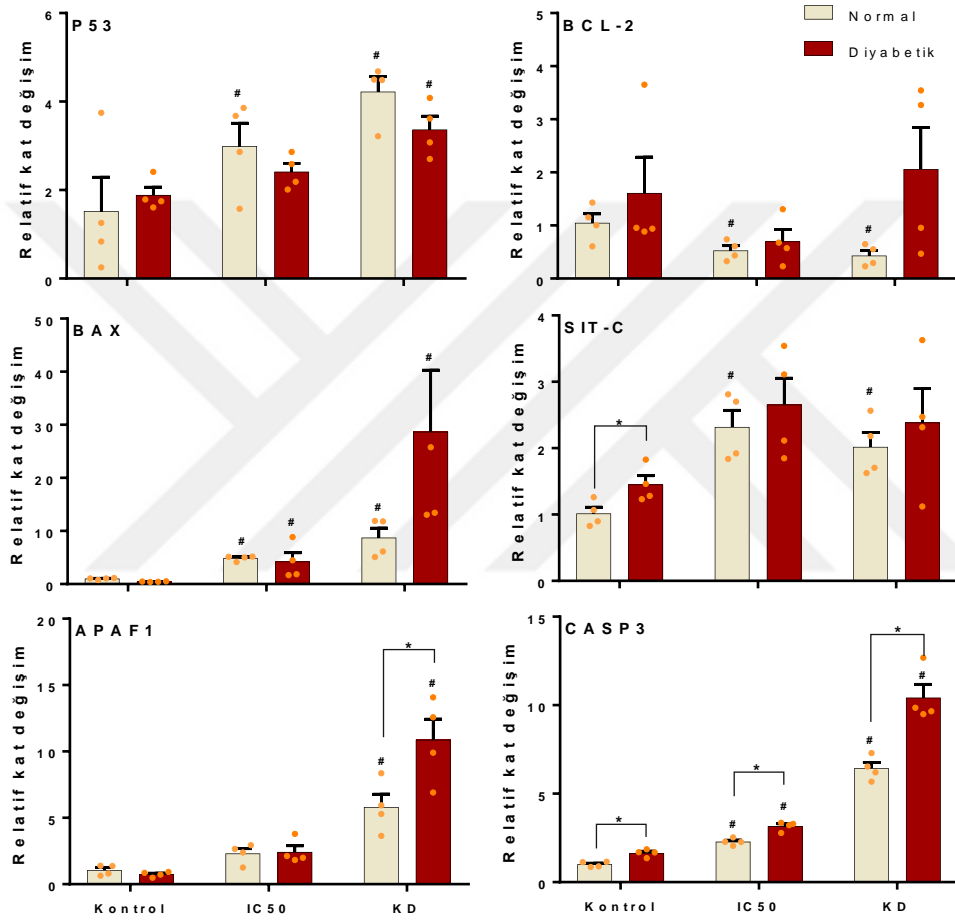


Şekil 32. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen HSP60, HSP70 gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤0.05, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. IC₅₀: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM

HSP60 gen ifadesinin diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kemoterapi dozu uygulamasında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi ($P \leq 0.05$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin HSP60 gen ifadesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. HSP70 gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken, diyabetik hücrelerde ise sadece IC₅₀ uygulamasında anlamlı artış saptandı ($P \leq 0.01$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde HSP70 gen ifadesi karşılaştırıldığında, diyabetik ARPE-19 hücrelerinin kontrol grubunda normal hücrelerden anlamlı düzeyde yüksek ve IC₅₀ grubunda ise düşük gen ifadesine sahip olduğu belirlendi ($P \leq 0.05$).

Mitokondriyal Apoptoz Yolağı Proteinleri P53, BCL-2, BAX, SIT-C, APAF-1, CASP3 Gen İfadesi

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM uygulaması ile P53, BCL-2, BAX, SIT-C, APAF-1, CASP3 genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 33'te verildi.



Şekil 33. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen P53, BCL-2, BAX, SIT-C, APAF-1, CASP3 gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤0.05, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. IC₅₀: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM

P53 gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış (Şekil 33; $P \leq 0.05$), diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise sadece kemoterapi dozunda kontrole göre anlamlı düzeyde artış belirlendi ($P \leq 0.05$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin p53 gen ifadelerinin birbirinden anlamlı bir fark göstermediği saptandı.

BCL2 gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu, diyabetik hücrelerde ise kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi ($P \leq 0.05$). Buna ilaveten normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin BCL2 gen ifadeleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Şekil 33).

BAX gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda da kendi kontrollerine göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlendi ($P \leq 0.05$). BAX ifadesinin en yüksek değerinin kemoterapi dozu uygulanan diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrole göre 28 kat olduğu saptandı. Bununla birlikte normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin BAX gen ifadesi karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 33).

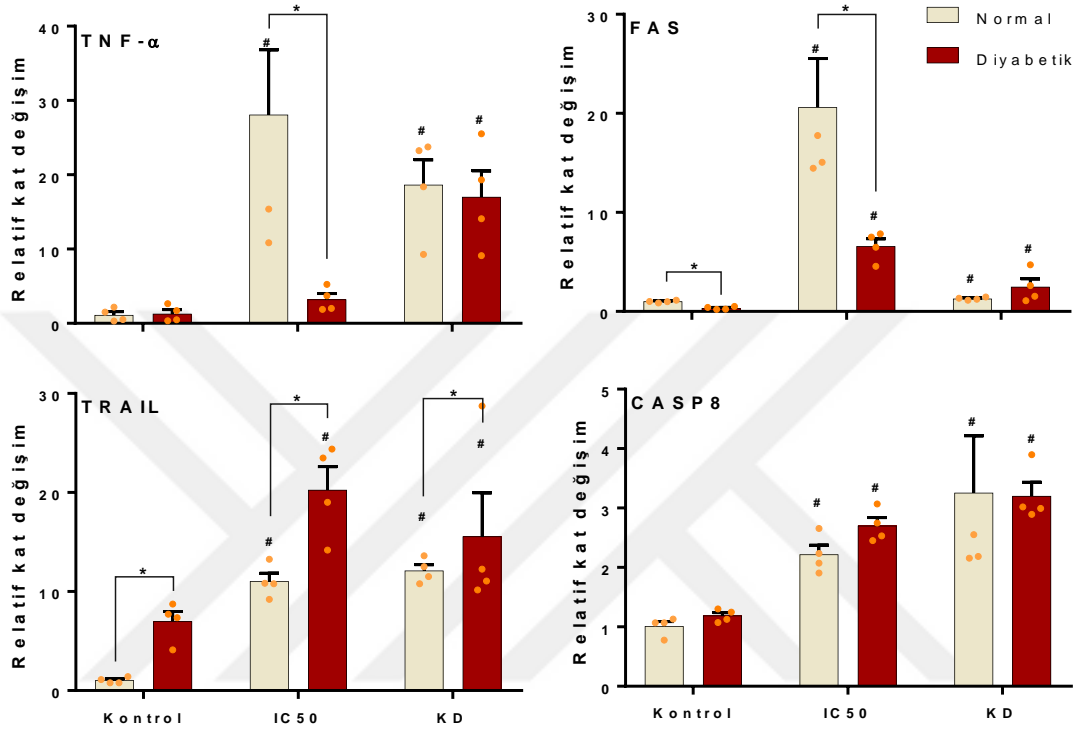
SIT-C gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi ($P \leq 0.05$). Kontrol uygulamasında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin SIT-C gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($P \leq 0.05$).

APAF1 gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kemoterapi dozunda kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlendi (sırası ile 5,80 kat ve 10,86 kat; $P \leq 0.01$). Buna ilaveten normal ve diyabetik hücrelerin gen ifadelerinde sadece kemoterapi dozunda istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal hücrelere göre yüksek APAF1 gen ifadesine sahip olduğu saptandı (Şekil 33; $P \leq 0.05$).

Kaspaz 3 gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi ($P \leq 0.01$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kaspaz 3 gen ifadesi karşılaştırıldığında diyabetik hücrelerin normal hücrelere göre anlamlı düzeyde yüksek gen ifadesine sahip olduğu ve tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptandı ($P \leq 0.05$).

Dışsal Apoptoz Yolağı Proteinleri TNF- α , FAS, TRAIL, CASP8 Gen İfadesi

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM uygulaması ile TNF- α , FAS, TRAIL, CASP8 genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 34'te verildi.



Şekil 34. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen TNF- α , FAS, TRAIL, CASP8 gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P \leq 0.05, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P \leq 0.05. IC₅₀: 0.267-6.369 μ M:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μ M:5-Fu-GEM

TNF- α gen ifadesinin normal ARPE-19 hücrelerinde hem IC₅₀ (kontrole göre 28 kat) hem de kemoterapi (kontrole göre 18.6 kat) dozunda anlamlı artış gösterdiği belirlendi (P \leq 0.05). Diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise sadece kemoterapi dozunda kontrole göre 17 kat olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (P \leq 0.05). Normal ve diyabetik

hücreler karşılaştırıldığında, IC₅₀ dozunda normal hücrelerde TNF- α gen ifadesinin diyabetik hücreden anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($P \leq 0.05$).

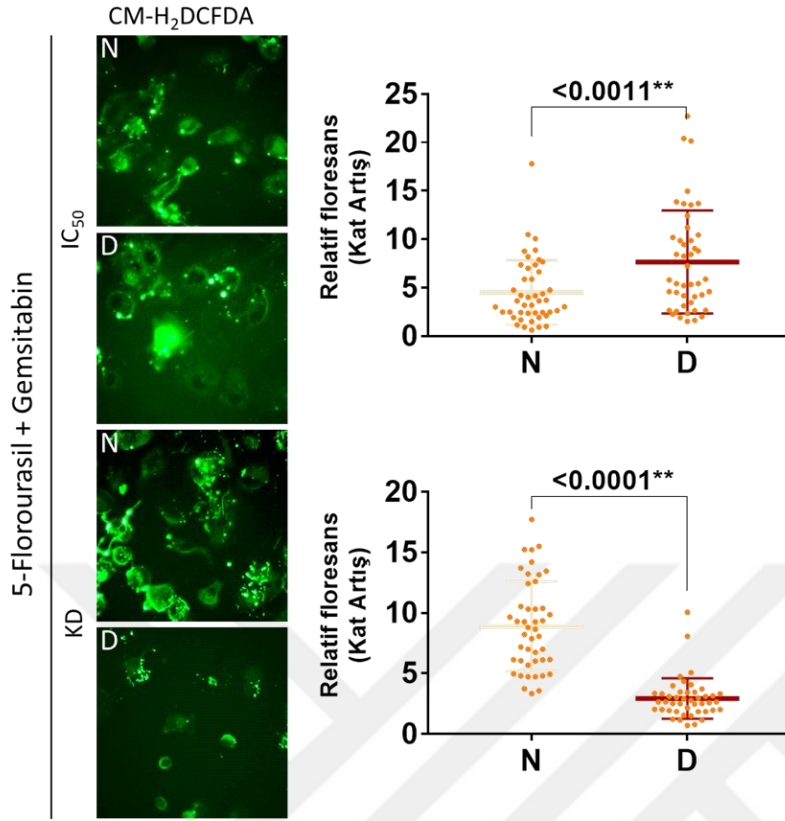
FAS gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($P \leq 0.05$). Normal ve diyabetik hücrelerin FAS gen ifadesi karşılaştırıldığında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre kontrol ve IC₅₀ uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük gen ifadesine sahip olduğu belirlendi ($P \leq 0.05$).

TRAIL gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptandı ($P \leq 0.01$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde TRAIL gen ifadesi karşılaştırıldığında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin tüm konsantrasyonlarda normal ARPE-19 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek gen ifadesine sahip olduğu belirlendi ($P \leq 0.05$).

Kaspaz-8 gen ifadesinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde her iki uygulama konsantrasyonunda kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptandı ($P \leq 0.01$). Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin Kaspaz-8 gen ifadesi karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi.

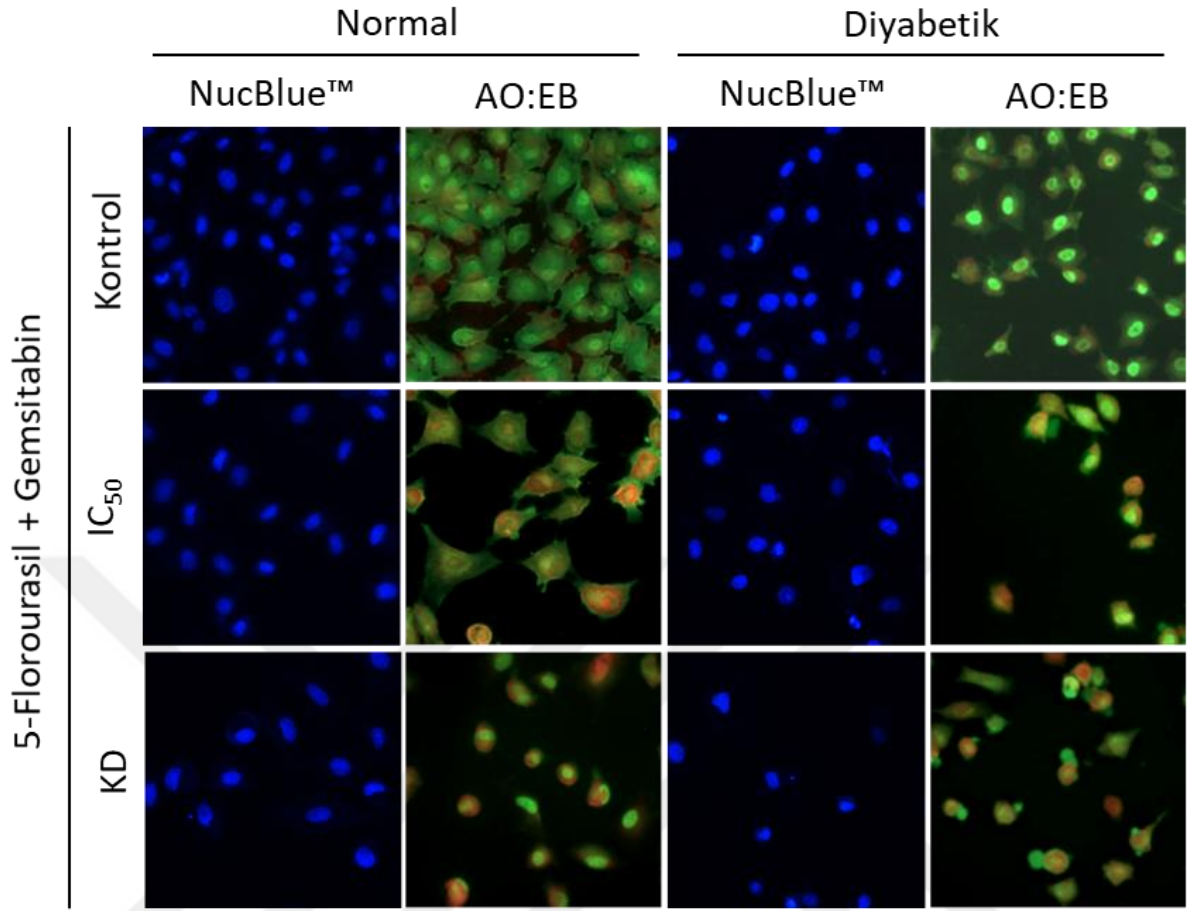
FLORESAN MİKROSKOP ANALİZLERİ

Çalışmamızda oksidatif stres ve apoptoz moleküler düzeyde belirlenmiş buna ilaveten moleküler problemler kullanılarak floresans mikroskopi ile de gösterilmiştir (Şekil 35 ve 36). Bu amaçla yapılan CM-H₂-DCFDA boyamasında kontrol ve uygulama gruplarında reaktif oksijen türleri hem morfolojik hem de kantitatif olarak Şekil 35’te görülmektedir. Buna göre diyabetik hücrelerin reaktif oksijen türlerinin IC₅₀ dozunda normal hücrelere göre anlamlı düzeyde yüksek, kemoterapi dozunda ise düşük olduğu saptandı (independent sample T-testi, $P \leq 0.01$).



Şekil 35. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası oksidatif stres seviyelerinin tespiti (CM-H₂-DCFDA ile yeşile boyandı) ve toplam düzeltilmiş hücresel floresans (TCCF) yoğunluğu, kontrol grubu seviyeleri ile normalize edildi ve kat artışı olarak gösterildi. N=45, veriler ortalama±standart hata. ** Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.01. N: Normal ARPE-19 hücresi; D: Diyabetik ARPE-19 hücresi; IC₅₀: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM

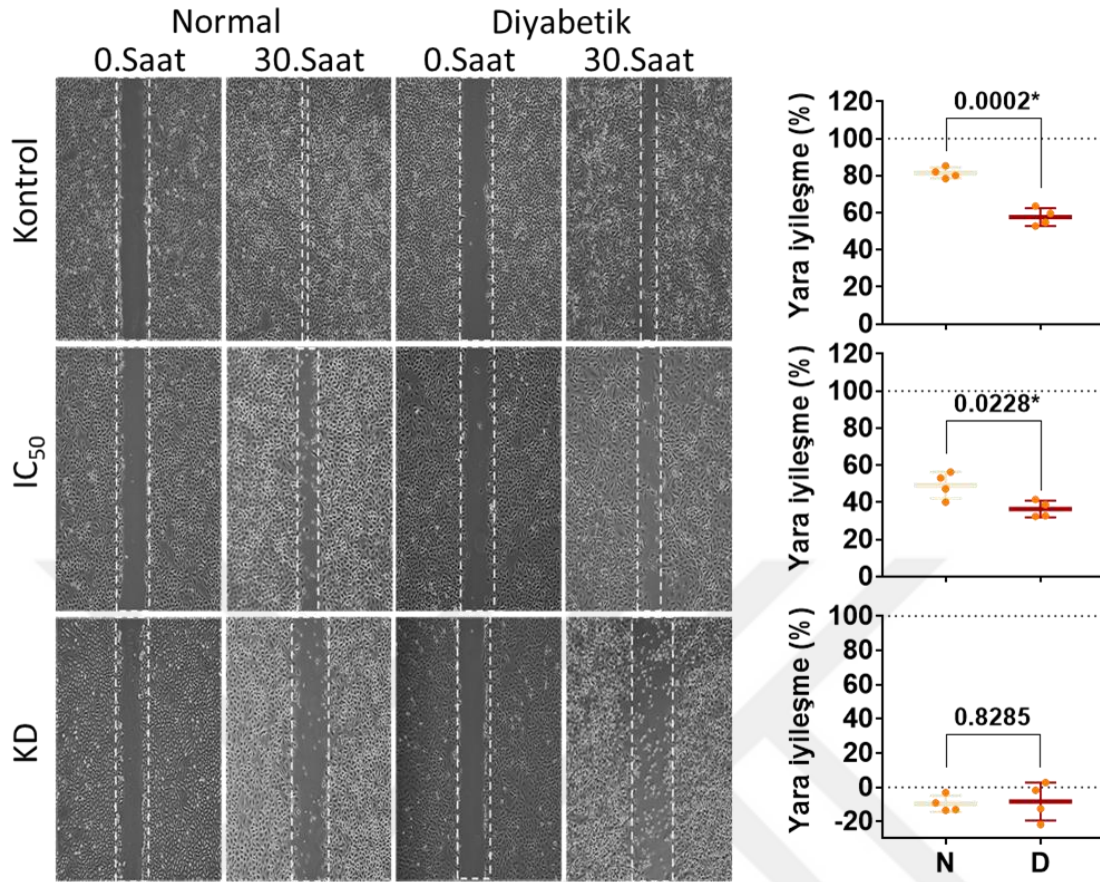
Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerindeki 24 saatlik süreyle 5-Fu+GEM'in IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında uygulanması sonrası apoptotik hücrelerdeki yoğunlaşmış çekirdekleri ayırt etmek için NucBlueTM ve apoptotik hücrelerdeki temel morfolojik değişiklikler ile birlikte aynı zamanda apoptotik ve nekrotik hücreleri ayırt etmek için AO:EB floresan boyaları kullanıldı (Şekil 36). Şekil 36'da normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulamasına bağlı apoptotik hücrelerdeki yoğunlaşmış çekirdek yapıları ve hücre membranında meydana gelen değişiklikler ile birlikte apoptotik cisimlerin oluşumu görülmektedir.



Şekil 36. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası NucBlue™ ile maviye boyanan apoptotik hücre çekirdeklerinin ve AO:EB ile kırmızı boyanan apoptotik hücrede bozulan membran bütünlüğünün ve yeşile boyanan apoptotik cisimlerin floresan mikroskobu ile gösterimi. IC₅₀: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM

YARA İYİLEŞME DENEYİ

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerine 5-Fu+GEM'in IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında uygulanması sonrası çizik ile yara oluşturulmuş flasklar 0. saatten itibaren 30. saate kadar her 6 saatte bir mikroskop altında görüntülenerek fotoğraf çekimi yapıldı (Şekil 37).

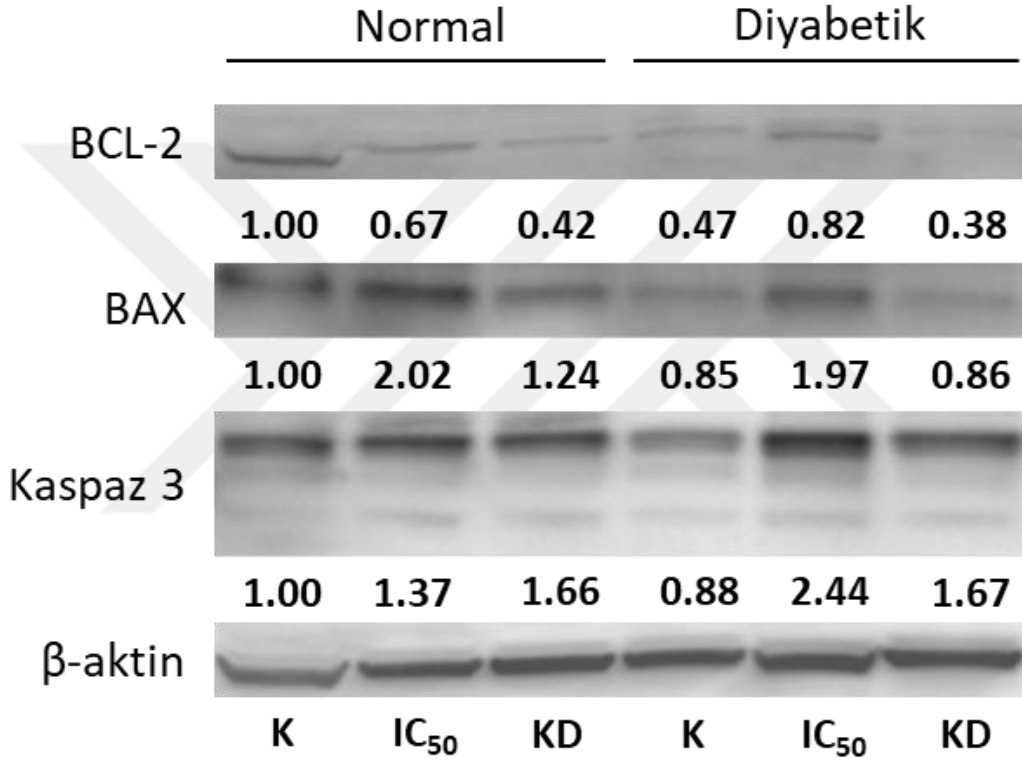


Şekil 37. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası 0. ve 30. saatlerinde göç eden hücrelerin hücre göçü görüntüleri ve hücre göçü yüzdesi. n=4, veriler ortalama±standart hata. * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.05$. IC₅₀: 0.267-6.369 μ M:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μ M:5-Fu-GEM

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinin taşıt madde uygulanan kontrol gruplarında yara iyileşmesi incelendiğinde normal hücrelerde 30. saatte yara iyileşmesinin %81,49±1,46 iken, diyabetik hücrelerde %57,74±2,42 olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu saptandı (independent sample T-testi, $P \leq 0.01$). Yine IC₅₀ dozunda 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik hücrelerde yara iyileşmesi oranının istatistiksel olarak anlamlı fark ve normal hücrelerde %49,23±3,57 iken diyabetik %36,39±2,25 olduğu belirlendi (independent sample T-testi, $P \leq 0.05$). Kemoterapi dozu uygulama grubunda 30. saatte hem normal hem de diyabetik hücrelerde yara iyileşmesi olmadığı saptandı.

WESTERN BLOT PROTEİN ANALİZİ

Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 48 saatlik 5-Fu+GEM'in kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozlarının uygulandığı gruplarda BAX, BCL2 ve Kaspaz3 proteinlerinin ifade seviyelerini belirlemek amacı ile endojen kontrol olarak β-Aktin kullanılarak yapılan Western blot analizinde BCL2, BAX, Kaspaz3 protein ifadelerindeki değişimler Şekil 38 ve Şekil 39'da verildi.

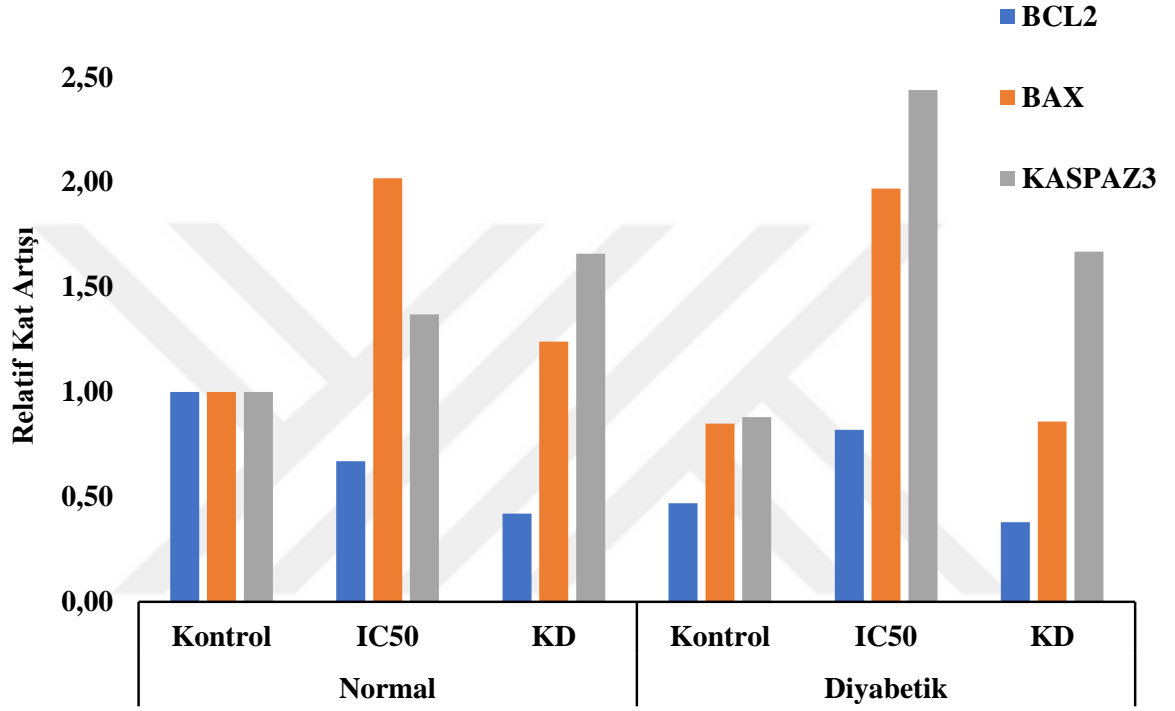


Şekil 38. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu+GEM'in uygulandığı kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozu gruplarında β-Aktin, BCL2, BAX, Kaspaz3 protein bantlarının görüntüsü K: Kontrol grubu, IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, KD; Kemoterapi dozu uygulama grubu

Buna göre, BCL2 protein ifadesinin normal hücrelerde uygulama gruplarında kontrole göre azaldığı, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise IC₅₀ konsantrasyonunda kendi kontrolüne göre arttığı, kemoterapi dozunda ise değişmediği belirlendi.

BAX protein seviyelerinde normal ARPE-19 hücrelerinde hem IC₅₀ hem de kemoterapi dozu uygulamalarında kontrole göre artış diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise sadece IC₅₀ uygulamasında artış saptandı.

Kaspaz3 protein seviyelerinin ise hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde IC₅₀ ve kemoterapi dozu uygulamalarında kontrole göre artış gösterdiği belirlendi.



Şekil 39. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM kombinasyonlarının uygulandığı kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozu gruplarında BCL2, BAX, Kaspaz3 protein seviyelerinin relatif kat artış grafiği IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, KD; Kemoterapi dozu uygulama grubu

TARTIŞMA

Kanser tedavisinde tek bir ajan ile kemoterapi tedavisi uygulanmasının düşük etkinlikte olması halinde kombine tedaviler tercih edilmektedir. Günümüzde, bu kombine tedavilerin başarılı sonuçlar verdiği bilinmektedir (172). Gemcitabin+5-Florourasil (GEM+5-Fu) kombine tedavisi kolorektal, pankreas, safra, meme, baş ve boyun dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kullanılmaktadır (165). Bir floropirimidin analogu ve antimetabolit olan 5-Fu hücre döngüsünün S ve G₂ fazında DNA ve RNA'ya dahil olarak nükleik asitlerin normal fonksiyonlarını seçici olarak inhibe eder (16). Buna ek olarak, 5-Fu deoksinükleotit havuzunda bir dengesizlik meydana getirerek DNA sentezini ve DNA'nın onarımını bozarak öldürücü DNA hasarına neden olabilmektedir (17). GEM ise DNA'yı oluşturan nükleotidlerin oluşumunu engellediği bilinen bir antimetabolik sitotoksindir (20). Nükleosid analogları, her bir ilacın trifosfatından sonra DNA iplikçiğinin uzamasını doğrudan sona erdirerek ve ribonükleotid redüktazı inhibe ederek hücresel dNTP'leri azaltır böylece hücresel DNA sentezini inhibe ederler (21-23). Sistemik antikanser ilaçları toksik maddeler olup korunmuş bir bölge olarak kabul edilen gözler, bu sitotoksik ajanlara karşı yüksek seviyede hassasiyet göstermektedirler. Kanser kemoterapi tedavisi tarafından meydana getirilen bu oküler toksisite gözün anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinde önemli hasarlara neden olmaktadır (8). Diyabetli hastalarda uzun süreli hiperglisemik ortama maruz kalan retina incelmeye başlar ve dolayısıyla dıştaki kan-retina bariyeri zarar görür. Retina metabolik olarak oldukça aktif bir doku olduğundan retinal pigment epitel hücrelerinde bulunan glukoz ve monokarboksilat taşıyıcıları görme fonksiyonu için önemlidir (173). Bununla birlikte diyabet ve adjuvant kemoterapi gibi etkiler optik nöropatinin edinsel toksik tiplerini içermektedir (174). Buna ilaveten, retinal vasküler bir hastalık olarak kabul edilen diyabetik retinopati ise 40 yaş ve üstü diyabetli hastaların yaklaşık %40'ında görülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar tip 1 diyabetli

hastaların %70'inde 30 yıl içerisinde proliferatif diyabetik retinopatinin görülebileceğini bildirmektedir (175). Gemsitabin+5-Fu'nun kombine olarak uygulandığı safra yolları ve ileri pankreas kanseri tedavisinde; GEM 1000 mg/m² ve 5-Fu 600 mg/m² dozlarında intravenöz olarak kullanılmaktadır (166, 167, 176). Bununla birlikte bu iki kemoterapi ajanının tek başına olacak şekilde kullanımının hem diyabet hastası olmayan hem de diyabetik bireylerde oküler dokularda yan etkilerinin olduğu gösterilmiştir (16, 177-180). Bu çalışmada GEM ve 5-Fu'nun kombine olarak kullanımının diyabetik ve normal insan retinal pigment epitel hücrelerinde (ARPE-19) hücre canlılığı, DNA polimorfizmi, genomik kalıp kararlılığı, oksidatif stres ve mitokondriyal apoptoz gen/protein ekspresyonları ve yara iyileşmesi üzerine etkisinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda ilk olarak normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu ve Gemsitabin kombine uygulamasının IC₅₀ değeri belirlendi. Buna göre, normal ARPE-19 hücrelerinde IC₅₀ değerleri 5-Fu ve GEM için sırası ile 0,267 µM ve 6,369 µM, diyabetik hücrelerde ise 0,119 µM ve 2,832 µM olarak hesaplandı (Şekil 16). Uygulama süresinin belirlenmesi için 24 ve 48 saatlik uygulamaların sonunda istatistiksel değerlendirme sonucunda en etkili uygulama süresinin 48 saat olduğu saptandı ve çalışmalara 48 saatlik uygulama yapılarak devam edildi.

Yapılan çalışmalarda retina pigment epitel hücrelerinde paklitakselin IC₅₀ değeri 3.0 nM olarak bildirilmiştir (181). Yine ARPE-19 hücre hattına Sisplatin+5-Fu kombinasyonu uygulanmış ve IC₅₀ değeri 5-Fu için 56,42 µM, sisplatin için 2,45 µM olarak bulunmuştur (182). Buna ilaveten, RPE hücrelerine uygulanan topotekan, etoposid, doksorubisin ve daunorubisin kemoterapi ilaçlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.1–1, 1–10, <0.1, ve <0.1 µg/ml olarak bildirilmiştir (183). Başka bir çalışmaya göre ise 5-Fu uygulamasının ARPE-19 hücrelerindeki IC₅₀ değeri 20 µM olarak bulunmuştur (184).

Çalışmamızda normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerine ait IC₅₀ ve kemoterapi dozu uygulamalarının canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan TALİ görüntü tabanlı sitometri analizi ile kontrol ve uygulama gruplarındaki canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri belirlendi (Şekil 29).

Çalışmamızda 5-Fu ve GEM kombinesinin uygulandığı normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde, TALİ görüntü tabanlı sitometri analizi ile kullanılan canlı, ölü, apoptotik hücre oranlarında değişim gözlenmekle birlikte en etkili uygulama dozunun kemoterapi dozu olduğu görüldü. Buna göre, normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde IC₅₀ dozu uygulamasında canlı hücre oranı sırasıyla %62,50±7,14 ve %40,66±4,67, ölü hücre oranı sırasıyla %26,50±5,71 ve

%37,50±9,18, apoptotik hücre oranı sırasıyla %11,00±3,84 ve %22,00±7,66 olarak saptandı. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kemoterapi dozu uygulamasında canlı hücre oranı sırasıyla %44,83±3,25 ve %23,16±4,79 olarak, ölü hücre oranı sırasıyla %46,33±2,06 ve %57,66±9,09 olarak, apoptotik hücre oranı sırasıyla %8,83±3,12 ve %19,16±8,18 olarak saptandı. TALİ görüntü tabanlı sitometri analizi çalışmasında elde edilen veriler doğrultusunda diyabetik ARPE-19 hücrelerinde normal ARPE-19 hücrelerine göre her uygulama grubunda, canlı hücre oranının daha düşük olduğu, ölü ve apoptotik hücre oranlarının ise daha yüksek olduğu görüldü (Tablo 14). Bu veriler ışığında 5-Fu ve GEM kombine uygulamasının normal ARPE-19 hücrelerine göre diyabetik ARPE-19 hücrelerinde daha etkili olduğu düşünüldü.

Çalışmamızda antioksidan enzimlerden SOD1, SOD2, KAT ve GPX gen ifadelerinin IC₅₀ dozunda normal hücrelerde arttığı, diyabetik hücrelerde ise sadece GPX ekspresyonunun arttığı belirlendi (Şekil 30). Kemoterapi dozunda ise hem normal hem diyabetik ARPE-19 hücrelerinin antioksidan enzim gen ifadelerinde anlamlı artışlar saptandı.

Retinal pigment epitel hücrelerinin reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda ve oksidatif hasardan korunmada etkili bir antioksidan savunma sistemine sahip olduğu özellikle Mn-SOD, Cu-Zn-SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon-S-transferazlar gibi antioksidan enzimler bakımından zengin olduğu bildirilmiştir (185-187). Katalaz ve SOD, süperoksitlere ve H₂O₂'ye karşı koruma mekanizmaları için önemlidir çünkü bu enzimler reaktif türleri doğrudan dışarıya atarlar (188). Yapılan çalışmalarda insan korneal epitel hücresinde SOD1 gen ifadesinin Zidovudin antiviral ilacı ile artış gösterdiği bildirilmiştir (189). Kanwar ve ark. (132) streptozotosinin, diyabetik ve normal farelerin retinalarından izole edilmiş mitokondrilerde süperoksit seviyelerine etkisini araştırmış ve diyabetik retina mitokondrilerinde süperoksit seviyelerinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Diyabette artan MnSOD ekspresyonunun, retinayı diyabetik koşullar altında artan oksidatif hasardan koruduğu rapor edilmiştir (142, 190).

Bizim çalışmamızda normal ve diyabetik retinal pigment epitel hücrelerinde antioksidan enzimlerin gen ifadelerinde meydana gelen değişimler yapılan uygulamalar sonucunda hücrelerde artan reaktif oksijen türlerinin zararsız hale getirilmesi için antioksidan sistemin aktive olduğunu düşündürdü. Buna ilaveten diyabetik hücrelerde SOD1, KAT ve GPX gen ifadelerinin normal hücrelere göre anlamlı düzeyde daha yüksek olması bu hücrelerin maruz kaldığı yüksek glisemik ortam sonucunda daha yüksek oranda strese maruz kaldığını düşündürdü. SOD2 yani mitokondriyal MnSOD gen ifadesinin ise normal ve diyabetik

hücrelerde benzer ekspresyon göstermesi her iki hücrenin de benzer düzeyde mitokondriyal oksidatif strese maruz kaldığını düşündürdü. Buna ilaveten reaktif oksijen türlerinin floresan mikroskopik görüntü analizinde IC₅₀ dozu uygulamasında normal retinal pigment epitel hücrelerinin reaktif oksijen tür düzeyinin diyabetik hücrelerden daha düşük olduğu, kemoterapi dozunda ise daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 35). Bu durumun TALİ görüntü temelli sitometre analizlerinde de görüldüğü gibi diyabetik hücrelerde kemoterapi dozu uygulamasında ölü hücre sayısının normal hücrelere göre daha yüksek ve canlı hücre sayısının daha düşük olması nedeni ile daha düşük floresan vermesinden kaynaklandığı düşünüldü.

Çalışmamızda detoksifikasyon pompalarından ABCC1, ABCC2 ve GST genlerinin ifadeleri belirlendi (Şekil 31). IC₅₀ dozunda ABCC2 ve GST gen ifadelerinde normal ARPE-19 hücrelerinde kontrole göre anlamlı artışlar belirlenirken, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde tüm genlerin ifadelerinde anlamlı artışlar belirlendi. Kemoterapi dozunda ise hem normal hem diyabetik ARPE-19 hücrelerinin ABCC2 ve GST gen ifadelerinde anlamlı artışlar saptandı. Retina pigment epitel hücreleri nöral retinayı sistemik olarak dolaşan ksenobiyotiklerden korumaktadır. ATP bağlayıcı kaset (ABC) ailesinin proteinleri (p-glikoprotein gibi), ilaçları hücrelerden hücre dışı boşluğa pompalar (191). P-glikoprotein (P-gp), kanser terapötikleri dahil olmak üzere çeşitli ilaçlara direnç sağlar (191, 192). Proliferatif vitreoretinopati tedavisinde intravitreal olarak kullanılan daunorubisinin epiretinal membranlarda çoklu ilaç direnci ile ilişkili P-glikoprotein ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada, intravitreal daunorubisine önceden maruz kalan 10 hastanın tümünde P-glikoprotein ekspresyonunun belirlendiği, buna ilaveten uygulamadan sonra sekiz ay içinde güçlü ekspresyonun devam ettiği bildirilmiştir (193). Güçlü vd. tarafından yapılan bir çalışmada ise 5-Fu ve sisplatin kombine uygulamasının retinal pigment epitel hücrelerinde GST gen ifadesinde önemli artışlara neden olduğu rapor edilmiştir (182).

ABCC1 ve ABCC2 ATP-bağlayıcı kaset tip taşıyıcı süper ailesinin üyeleridir. Bunlar hem kanser hem de normal hücrelerde dışarı ilaç pompalayan ATP-bağımlı pompa işlevi görürler. GST'de yine ATP-bağlayıcı kaset tip taşıyıcılarının c sınıfına ait bir çoklu ilaç direnci pompasıdır (194). Bu pompalar hücre içine giren toksik maddelerin detoksifiye edilmesinde aktif görev alırlar. Çalışmamızda GST gen ifadesinin kemoterapi dozu uygulamasında normal hücrelerde diyabetik hücrelere göre yüksek olmasının nedeninin bu hücrelerde diyabetik hücrelerden daha etkili bir detoksifikasyon mekanizmasının olduğu ve diyabetik hücrelerde detoksifikasyon mekanizmasının zarar görmüş olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda ısışok proteinlerinden HSP60 ve HSP70 genlerinin ifadeleri belirlendi (Şekil 32). IC₅₀ dozunda HSP70 gen ifadesinde normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrole göre anlamlı artışlar belirlendi. Kemoterapi dozunda ise normal ARPE-19 hücrelerinde HSP70 gen ifadesinde, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise HSP60 gen ifadesinde anlamlı artışlar saptandı.

Isı şok proteinleri çeşitli stresler sonucunda hücrelerde meydana gelen yanlış katlanmış protein cevabında görev alırlar (187). Bu proteinler yanlış katlanmış proteinlerin tanınmasında, tamirinde veya yıkım için ubiquitinlenmesinde işlev görürler. Stres sonucu meydana gelen bu “yanlış katlanmış protein cevabı” ısı şok proteinleri ile oluşur (25). Ayrıca HSP’ler katlanmamış proteinlerin hücresel hasarını önlemek için moleküler şaperonlar olarak işlev görebilir (195). HSP60 ve HSP70, nükleer genler tarafından kodlanan mitokondriyal proteinlerin taşınmasına ve katlanmasına aracılık eder. Mitokondriyal proteinler ise HSP70 ile taşınır ve sonra HSP60 mitokondriyal protein katlanmasına aracılık eder (196, 197). Böylelikle HSP ekspresyonlarındaki bu değişimler aynı zamanda bozulmuş stres mekanizmalarına bir yanıt olarak mitokondriyal biyogenezi de temsil etmiş olurlar. Yapılan çalışmalarda, 5-Fu ve sisplatin kombinasyonunun uygulandığı ARPE-19 hücrelerinde HSP70 gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir (182).

Çalışmamızda HSP60 ve HSP70 gen ifadelerinde meydana gelen artışların hücrelerde 5-Fu+GEM uygulamasının proteinlerin yanlış katlanmasına sebep olması sonucu olabileceği düşünüldü. Buna ilaveten uygulama yapılan gruplarda diyabetik hücrelerde gen ifadelerinin normal hücrelerden daha düşük düzeyde olmasının nedeninin normal hücrelerde daha güçlü bir ısı şok protein cevabının olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Hücresel stres ve hücre ölümü olayları bağlantılı olmakla birlikte strese yanıt olarak indüklenen HSP’ler, apoptozun kontrolünde kilit düzenleyici noktalarda işlev görmektedir. Apoptozda mitokondriyal (içsel) yolak ve ölüm reseptörü (dışsal) yolağı olmak üzere iki ana yolak bulunmaktadır (198-200). Sistein proteazlarının kaspaz ailesi, apoptozun kritik etkenleridir. Mitokondriyal ve ölüm reseptörü aracılı yolaklar, farklı apikal kaspazları (sırasıyla kaspaz-9 ve -8), kaspaz-3’ün proteolitik aktivasyonunu aktive eder. HSP’lerin birçoğu ise antiapoptotiktir ve kaspazların aktivasyonunu doğrudan inhibe edebilir (201, 202). Örneğin, HSP70, apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1’e (APAF-1) bağlanarak kaspaz-9’un aktivasyonunu önleyebilir (203, 204). Bu verilere ek olarak, retina pigment epitel hücrelerinde yapılan çalışmalarda oksidatif stresin kaspaz-3’ün aktivasyonu yolu ile apoptozu indüklediği bildirilmiştir (205, 206).

Çalışmamızda içsel apoptoz yolağı proteinlerinden p53, BCL-2, BAX, Sitokrom-C, APAF-1 ve Kaspaz-3 genlerinin ifadeleri belirlendi (Şekil 33). IC₅₀ dozunda p53, BAX, Sitokrom-C ve Kaspaz-3 gen ifadelerinde normal ARPE-19 hücrelerinde kontrole göre anlamlı artışlar saptanırken, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde sadece BAX ve Kaspaz-3 gen ifadelerinde anlamlı artışlar saptandı. Kemoterapi dozunda ise normal hücrelerde p53, BAX, Sitokrom-C, APAF-1 ve Kaspaz-3 gen ifadelerinde önemli artışlar belirlenirken, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde p53, BAX, APAF-1 ve Kaspaz-3 gen ifadelerinde önemli artışlar belirlendi. Çalışmamızda ayrıca normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrol ve uygulama dozları grupları arasındaki BCL-2, BAX, Kaspaz3 protein seviyelerindeki değişimler western blot ile belirlendi. IC₅₀ dozunda BAX, Kaspaz3 protein seviyelerinde hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücrelerinde kontrole göre anlamlı artışlar saptandı. Kemoterapi dozunda ise BAX, Kaspaz3 protein seviyesi normal ARPE-19 hücrelerinde artarken, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise yalnızca Kaspaz-3 protein seviyesinde artış saptandı (Şekil 38 ve 39).

Mitokondri, apoptozu düzenlemede anahtar rol oynar. Reaktif oksidanlar, mitokondriyi sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktörü serbest bırakması için tetikleyebilir ve artan lipid peroksidasyonun mitokondriyal membran potansiyeline zarar vermesiyle apoptozu başlatabilir (207, 208). Sitokrom C'nin mitokondriden salınmasıyla kaspaz-3'ü aktive eden ve DNA'nın parçalanmasıyla sonuçlanan bir dizi olaylar zincirini başlatan kaspaz-9 aktive edilir (141). Kaspaz-3'ten yoksun hücrelerin apoptoza dirençli olduğu rapor edilmiştir (209), bununla beraber kaspaz-3'ün tek başına aktivasyonunun bile kalp kasında hücre ölümüne neden olduğu da bildirilmiştir (210). Proapoptotik bir protein olan Bax, mitokondriye translokalize olur ve mitokondriyal geçirgenliği indükleyerek sitokrom c salınımını artırır (211, 212). Yapılan çalışmalarda, diyabetik retinada ve yüksek glukoz ortamında inkübe edilmiş retina perisitlerinde, Bax ekspresyonunun arttığını ve retinal perisitlerdeki bu artan ekspresyonun apoptoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (136). Buna ek olarak, Bcl-2'nin apoptotik hücre ölümüne karşı koruma sağladığı ve birçok hücreyel olaya dahil olan önemli bir hücreyel bileşen olduğu bilinmektedir. Apoptozun inhibisyonun Bcl-2'nin regülasyonu ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (213, 214). Yapılan bir çalışmada, çeşitli uyarılar (simüle edilmiş iskemi, eksitotoksisite ve HSP27 antikoru ile kültürleme) ile indüklenen retina pigment epitel hücrelerinin apoptotik sürecinde, uyarının çeşidi fark etmeksizin, Bcl-2 ekspresyonunda azalma ve Bax ekspresyonunda artış bildirmiştir (215).

Çalışma sonuçlarımıza göre diyabetik ARPE-19 hücrelerinin APAF-1 ve Kaspaz3 genlerinin yüksek seviyede gen ifadesine sahip olması ve TALİ analiz sonuçları diyabetik ARPE-19 hücrelerinin ölümünün apoptoza bağlı olarak gerçekleştiği bulguları ile desteklendi.

Elde edilen veriler ışığında, gerçekleşen apoptozun APAF-1 oluşumu ile Kaspaz-3 aracılı olduğu düşünüldü. Buna ek olarak, western blot protein analizi sonuçları karşılaştırıldığında normal ARPE-19 hücrelerine göre diyabetik ARPE-19 hücrelerinin Kaspaz-3 protein seviyesindeki artış gen ifadesi seviyesindeki artış ile uyum gösterdi.

Çalışmamızda dışsal apoptoz yolağı proteinlerinden TNF- α , FAS, TRAIL ve Kaspaz-8 genlerinin ifadeleri belirlendi (Şekil 34). IC₅₀ dozunda tüm enzimlerin gen ifadelerinde normal ARPE-19 hücrelerinde kontrole göre anlamlı artışlar belirlenirken, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde FAS, TRAIL ve Kaspaz-8 genlerinin ifadelerinde anlamlı artışlar saptandı. Kemoterapi dozunda ise hem normal hem diyabetik ARPE-19 hücrelerinin tüm gen ifadelerinde anlamlı artışlar belirlendi. Kaspazların aktivasyonu, ölüm reseptör yolağı veya mitokondriyal yolağı gibi farklı yollardan plazma membranında başlatılabilir (216). CD95 (APO-1/Fas) veya TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörleri gibi tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesinin ölüm reseptörlerini uyarması, apoptozu başlatıcı kaspaz-8'in aktivasyonu ile sonuçlanır (217). Fas'ın (CD95 ve ligandı CD95L) hücrelerin yüzeyinde bulunan CD95 reseptörünün trimerizasyonu ile apoptozu aracılık ettiği bilinmektedir (218). Yapılan bir çalışmada, oksidatif strese maruz kalan retina pigment epitel hücrelerinde apoptozun FAS aracılı şekilde indüklendiği bildirilmiştir (219). Başka bir çalışmada ise, daunorubisin uygulaması yapılmış retina pigment epitel hücrelerinde apoptozun CD95 ve ligandı CD95L ile modüle edildiği bildirilmiştir (220). Çalışmamızda normal ARPE-19 hücrelerine göre diyabetik ARPE-19 hücrelerinin yüksek seviyede TRAIL gen ifadesine sahip olduğu saptandı. Buna göre, mitokondriyal (içsel) apoptozu ek olarak, TRAIL aracılı apoptozunda Kaspaz-3'ü aktive ederek hücreleri ölüme götürdüğü düşünüldü.

Antimetabolit bir kemoterapötik bir ajan olan 5-Fu, DNA ve RNA gibi makromoleküllere dahil olarak onların fonksiyonlarını bozmaktadır (146). GEM ise sitotoksik etkisini DNA zincirine dahil olarak DNA sentezininin inhibisyonu yoluyla gösterir (158). Bu kemoterapi ilaçlarının etki yolları DNA/RNA'nın sentezinin, uzamasının ve stabilitesinin hasar görmesi ile kesişmektedir (221, 222). Bu nedenle çalışmamızda, değişen RAPD bant profilleri ve buna ilaveten genomik kalıp kararlılığı değeri ile gen tamir mekanizmalarının gen ifade seviyeleri belirlendi (Şekil 27,28). Çalışmamızda genomik kalıp kararlılıklarının hem normal hem de diyabetik hücrelerde 5-Fu+GEM uygulaması ile azaldığı, en düşük düzeyinin ise diyabetik hücrelerde kemoterapi dozu uygulamasında olduğu belirlendi. Buna ilaveten diyabetik hücrelerin genomik kalıp kararlılığının hem kontrol hem de uygulama gruplarında normal hücrelerden daha düşük düzeyde olduğu saptandı. Çalışma sonuçlarımıza

paralel olarak 5-Fu+sisplatin uygulanmış ARPE-19 hücrelerinde, genomik kalıp kararlılığının anlamlı düzeyde azaldığı rapor edilmiştir (182). Genomik kalıp kararlılığı, DNA hasarının seviyesi, DNA'nın onarımı ve replikasyonu ile ilgilidir (223). Bant profil değişikliğinde RAPD ürününün kaybı (bant kaybı), DNA'daki tek ve çift sarmal kırılmalar, DNA-protein çapraz bağları, nokta mutasyonları dahil olmak üzere DNA hasarını ve genotoksinlerin neden olduğu kromozomal yeniden düzenlemeleri gibi olaylar ile ilişkilendirilebilir (223-226). Bant profil değişikliğinde RAPD yeni ürünü, yeni bağlanmaların gerçekleşmesi, iki bağlanma bölgesinin yaklaşması veya homolog rekombinasyon (primer ile eşleşen iki sekansın yan yana gelmesi) gibi mutasyonlara bağlı olarak DNA sekansındaki değişiklikleri temsil edebilir (227).

Çalışmamızda DNA tamir mekanizmalarında yer alan EXO1 ve NEIL1 gen ifadelerinin hem normal hem diyabetik hücrelerde gen ifadelerinde artışa neden olduğu ve diyabetik hücrelerde normal hücrelerden anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (Şekil 28). Bunun diyabetik hücrelerde daha fazla DNA hasarının meydana gelmiş olması nedeni ile olabileceği düşünüldü.

İnsan ekzonükleaz 1 (EXO1, 5' → 3'), hücre döngüsü kontrol noktalarının, replikasyon çatalının ve replikatif DNA onarım yollarının düzenlenmesine katkıda bulunur. Buna ilaveten, yanlış eşleşme onarımı, çift sarmal kırılmasının onarımı gibi DNA replikasyon stresinin azaltılmasında rol oynayan birkaç DNA onarım yolağında da görev alır. Bu işlemler, replikasyon stresine ve replikasyon çatalının çökmesine yol açabilecek durdurulmuş veya bloke edilmiş DNA replikasyonunun çözülmesi için gereklidir. DNA replikasyon sürecinin yeniden başlatılmaması, çift sarmal kırılmalarına, hücre döngüsünün durmasına veya hücre ölümüne neden olabilir (228-230). Oksidatif metabolizmanın bir yan ürünü olarak oluşan yüksek derecede reaktif radikaller, potansiyel mutajenik ve sitotoksik pirimidin lezyonları dahil olmak üzere pek çok oksidasyona uğramış DNA bazı üretir (231). Reaktif oksijen türlerinin genotoksisitesi, DNA ile reaksiyona girerek çok sayıda DNA baz lezyonu ve iplik kopmaları meydana getirmesi ile sonuçlanır. Çift iplikli kırılmalar dışındaki tüm bu lezyonlar, ökaryotlarda temel baz eksizyon onarımı (BER) yolu ile onarılır (232). Endojen ve çevresel olarak indüklenen reaktif oksijen türlerinin baz oksidasyonu, tek iplikli DNA kalıbının replikasyonunda meydana gelir ve mutajenik baz lezyonlarının prereplikatif onarımını gerektirir. Replikasyonu engellemeyen bu tür baz lezyonlarının, tek iplikli DNA kalıbının replikasyon onarımı için nasıl işaretlendiği bilinmemektedir. Buna ilaveten, onarımı başlatan, S-fazı sırasında aktive olan Nei-benzeri 1 (NEIL) DNA glikozilazıdır. NEIL, baz lezyonuna bağlanır ancak eksize etmez, replikasyon çatalının ilerlemesini engeller (kalıp DNA zincirini bölerek öldürücü bir çift iplik kopmasına yol açar) ve daha sonra lezyon onarımına izin vermek için geri çekilir (233, 234).

Bu çalışmada sonuç olarak, meme, pankreas, baş ve boyun gibi çeşitli kanser türlerinde kullanılan 5-Fu+GEM kombine tedavisinin hem normal hem de diyabetik ARPE-19 hücreleri üzerindeki etkisi araştırıldı. MTT hücre canlılık testi sonucuna göre 48 saatlik 5-Fu+GEM uygulamasında diyabetik ARPE-19 hücrelerinin IC₅₀ değerinin normal ARPE-19 hücrelerine kıyasla daha düşük olması diyabetik retinopati hastalarında kemoterapötik ajan uygulamasının retinal pigment epitel hücrelerine daha yüksek seviyede hasar vereceğini düşündürdü. TALİ analizinde, uygulama yapılan gruplarda diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre canlı hücre oranında yaklaşık %20 azalma, ölü hücre oranında yaklaşık %10 artış ve apoptotik hücre oranında yaklaşık %10 artış meydana geldiği saptandı. Elde edilen veriler doğrultusunda diyabetik ARPE-19 hücrelerinde meydana gelen hücre ölümlerinin apoptotik yollar ile meydana geldiği düşünüldü.

Enzoly ve ark. (235) dosetaksel-doksorubisin-siklofosfamid tedavisi alan bir hastada kistoid maküler ödem geliştiğini ve bunun kemoterapinin dosetaksel içermesi ile ilgili olduğunu ve kemoterapinin olası oftalmolojik yan etkileri için yeni değerlendirmelere ihtiyaç olduğunu da bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, oksaliplatin ile tedavi edilen ileri kolorektal kanserli hastanın kemoterapi sonrası görme kaybı, görüşte renk değişimi ve nörolojik semptomlardan şikayet etmesiyle oküler ve nörolojik toksisite şüphesi ile antineoplastik tedavi durdurulmuştur. Yapılan testler sonucunda retina pigment epitelinde ciddi bozulmalar meydana geldiği bildirilmiştir. Bu vaka bulguları ile oksaliplatin kemoterapötik ajanının daha önce bildirilmemiş olan retina pigment epitelindeki toksisitesini göstermişlerdir. Oksaliplatinin kemoterapötik kullanımı ile gelişebilecek toksisiteye dikkat çekmişlerdir (236).

Sonuç olarak çalışma sonucunda elde edilen veriler literatür verilerini destekler nitelikte çeşitli kanser tedavilerinde kombine olarak kullanılan 5-Fu ve GEM kemoterapötik ajanlarının oküler toksisiteyi indüklediğini buna ilaveten diyabetik hastalarda kemoterapinin oküler toksisitesinin daha yüksek olduğunu gösterdi. Literatür verileri ve çalışma bulgularımız ışığında, elde edilen verilerin daha kapsamlı çalışmalar ile desteklenmesi halinde 5-Fu ve GEM kombine ilaçlarının hem normal hem de diyabetik retinal pigment epiteli üzerine oftalmolojik yan etkilerinin daha iyi anlaşılacağı ve bu verilerin kanser tedavisi gören diyabetik retinopatili hastaların tedavisine yeni bir yaklaşım getireceği düşünüldü.

SONUÇLAR

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan 5-Fu ve GEM'in kombine kullanımının normal hem de yüksek glikoz ile indüklenerek oluşturulan diyabetik ARPE-19 hücrelerinde hücre canlılığı, RAPD-DNA polimorfizmi, genomik kalıp kararlılığı, oksidatif stres, apoptoz ve yara iyileşmesi üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışma sonucunda;

1. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerine uygulanan 5-Fu+GEM'in en etkili uygulama süresinin 48 saat olduğu ve IC₅₀ dozunun normal ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu için 0,267 µM ve GEM için 6,369 µM, diyabetik ARPE-19 hücrelerinde ise 5-Fu için 0,119 µM ve GEM için 2,832 µM olduğu belirlendi.
2. TALİ görüntü temelli sitometre analizinde, 5-Fu+GEM uygulaması sonucunda diyabetik ARPE-19 hücrelerinin normal ARPE-19 hücrelerine göre daha fazla apoptoza uğradığı ve floresan mikroskop görüntülerinin de bu durumu desteklediği görüldü. Apoptozun gen ve protein ifadesi ile incelenmesi sonucunda diyabetik ARPE-19 hücrelerinde dışsal ve içsel apoptoz yolak gen ifadelerinin daha yüksek ifade olduğu ve protein ifadelerinin de gen ifadeleri ile paralel olduğu belirlendi.
3. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinin antioksidan enzim gen ifadelerinin genel olarak normal hücrelerden daha yüksek olduğu belirlendi.
4. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinde detoksifikasyon gen ifadelerinin IC₅₀ dozunda normal hücrelerden daha yüksek, kemoterapi dozunda ise daha düşük olduğu, ısışok protein gen ifadelerinin ise her iki dozda da daha düşük ifade olduğu saptandı.

5. Diyabetik ARPE-19 hücrelerinde DNA hasarının göstergesi olan genomik kalıp kararlılığının normal hücrelere göre daha düşük ve tamir genlerinden EXO1 ve NEIL gen ifadelerinin de daha yüksek olduğu saptandı.



ÖZET

Diyabetik retinopati, erişkinlerde diyabetin önemli bir komplikasyonu olarak görme kaybının önde gelen nedenidir. Retina, kan-retina bariyeri olarak görme fonksiyonunun devamlılığını sağlamaktadır. Diyabetik hastalarda, retinanın uzun süre hiperglisemik ortama maruziyeti retinaya hasar vermektedir. Retina pigment epitel hücrelerinde meydana gelen hasar hücre kaybına, retinal dejenerasyona ve körlüğe neden olabilmektedir.

5-Florourasil+Gemsitabin kombinasyon tedavisi baş, boyun, meme gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. 5-Florourasil, DNA ve RNA'ya, Gemsitabin ise DNA zincirine dahil olarak makromoleküllerin fonksiyonlarını bozmaktadır. Böylelikle 5-Florourasil+Gemsitabin, DNA zincirinin sentezlenmesine ve uzamasına hasar vermektedir. Çeşitli kanser türlerinde kullanılan 5-Florourasil+Gemsitabin kombine tedavisinin retinal pigment epitel hücrelerinde önemli hücresel sinyal yollarına etkisi belirlenmemiştir.

Bu çalışmada, 5-Florourasil ve Gemsitabin kombinasyonunun normal ve diyabetik insan retinal pigment epitel (ARPE-19) hücrelerinde hücre canlılığı, yara iyileşmesi, DNA hasarı, oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve normal ve diyabetik hücrelerin kemoterapi ilaçlarına verdikleri hücresel ve moleküler tepkilerin karşılaştırılması amaçlandı.

5-Florourasil ve Gemsitabin kombinasyonunun normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerindeki hücre canlılığına olan etkileri MTT ve Tali görüntü temelli sitometre ile, genomik kalıp kararlılığına olan etkileri rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analizi ile belirlendi. Ayrıca DNA hasar yanıtı EXO1 ve NEIL genlerinin ifadesi ile, oksidatif stres tepkisi reaktif oksijen türlerinin CM-H₂-DCFDA moleküler floresan boyaması ve antioksidan

enzimlerin gen ifadeleri ile, hücrel apoptoz yolağındaki gen/protein ifadeleri ve floresan mikroskopik boyama ile belirlendi.

Çalışma sonuçlarına göre, 5-Florourasil+Gemsitabin uygulamasının diyabetik hücrelerde IC₅₀ değerinin daha düşük konsantrasyonda olduğu belirlendi. Kombine kemoterapi uygulamasının diyabetik hücrelerde yüksek DNA hasarı ile genomik kalıp kararlılığının daha düşük olmasına ve DNA tamir genlerinin daha yüksek ifade olmasına neden olduğu saptandı. Buna ilaveten hem normal hem diyabetik hücrelerde artan reaktif oksijen türlerinin düzeyi ile oksidatif stres meydana geldiği ve diyabetik hücrelerde antioksidan enzimlerin gen ifadelerinde daha belirgin artış olduğu belirlendi. Kemoterapi toksisitesinin hücrelerde içsel ve dışsal apoptoz yolağını aktive ettiği ve diyabetik hücrelerde apoptozun daha yüksek olduğu saptandı.

Retinal pigment epitel hücrelerinin görme için birçok vital ve koruyucu rolü vardır. Bu nedenle bu hücrelerde uzun süreli hiperglisemik ortam ve kemoterapi sitotoksitesi sonucu meydana gelen hasar görme bozukluklarına neden olabilmektedir. Çalışmamızda 5-Florourasil ve Gemsitabin uygulamasının hem hücrel hem de moleküler düzeyde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin diyabetik hücrelerde daha belirgin olması nedeni ile diyabetik hastalarda bu yan etkilerin göz önünde bulundurulması gerektiği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Diyabetik retinopati, ARPE-19, 5-Florourasil, Gemsitabin

EFFECT OF GEMCITABINE AND 5-FU COMBINATION ON OXIDATIVE STRESS AND MITOCHONDRIAL APOPTOSIS PATHWAY IN NORMAL AND HIGH GLUCOSE-INDUCED DIABETIC RETINAL PIGMENT EPITHELIUM (ARPE-19) CELLS

SUMMARY

Diabetic retinopathy is a leading cause of vision loss in adults as a major complication of diabetes. The retina provides the continuity of visual function as a blood-retinal barrier. In diabetic patients, prolonged exposure to hyperglycemic environment damages to the retina. Damage to retinal pigment epithelial cells can cause cell loss, retinal degeneration and blindness.

5-Fluorouracil+Gemcitabine combination therapy is used in the treatment of various types of cancer such as head, neck and breast. 5-Fluorouracil is incorporated into DNA and RNA, and Gemcitabine also, incorporated into the DNA and damage functions of macromolecules. Thus, 5-Fluorouracil+Gemcitabine damages the synthesis and elongation of the DNA chain. The effect of 5-Fluorouracil+Gemcitabine combine therapy, used in various cancer types, on important cellular signaling pathways in retinal pigment epithelial cells has not been determined.

In this study, we aimed to determine the effects of 5-Fluorouracil and Gemcitabine combination on cell viability, wound healing, DNA damage, oxidative stress and apoptosis in normal and diabetic human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells, and compare the cellular and molecular responses of normal and diabetic cells to chemotherapy drugs.

The effects of 5-Fluorouracil and Gemcitabine combination on cell viability in normal and diabetic ARPE-19 cells were determined by MTT and Tali image-based cytometers, and the effects on genomic template stability by random amplified polymorphic DNA analysis. In addition, DNA damage response was determined by expression of EXO1 and NEIL genes, oxidative stress response by CM-H₂-DCFDA molecular fluorescent staining of reactive oxygen species and gene expression of antioxidant enzymes, gene/protein expressions in the cellular apoptosis pathway and fluorescence microscopic staining.

According to the results of the study, it was determined that diabetic cells had a lower IC₅₀ value response to 5-Fluorouracil+Gemcitabine treatment. It was determined that combined chemotherapy administration caused higher DNA damage, lower genomic template stability and higher expression of DNA repair genes in diabetic cells. In addition, it was determined that oxidative stress through the increased reactive oxygen species in both normal and diabetic cells and higher increase in the gene expression of antioxidant enzymes in diabetic cells. It was determined that chemotherapy toxicity activates the intrinsic and extrinsic apoptosis pathway in cells and apoptosis was higher in diabetic cells.

Retinal pigment epithelial cells have many vital and protective roles for vision. Therefore, damage to these cells as a result of long-term hyperglycemic environment and chemotherapy cytotoxicity can cause vision disturbances. In our study, due to the cytotoxic and genotoxic effects of 5-Fluorouracil and Gemcitabine at both cellular and molecular levels were more pronounced on diabetic cells, it was thought that these side effects should be considered in diabetic patients.

Keywords: Diabetic retinopathy, ARPE-19, 5-Fluorouracil, Gemcitabine

KAYNAKLAR

1. Flaxman SR, Bourne RR, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2017;5(12):e1221-e34.
2. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Retinopathy in diabetes. *Diabetes care*. 2004;27(suppl 1):s84-s7.
3. Rajalakshmi R, Prathiba V, Arulmalar S, Usha M. Review of retinal cameras for global coverage of diabetic retinopathy screening. *Eye*. 2020:1-11.
4. Kowluru RA. Diabetic retinopathy, metabolic memory and epigenetic modifications. *Vision research*. 2017;139:30-8.
5. Li C, Miao X, Li F, Wang S, Liu Q, Wang Y, et al. Oxidative stress-related mechanisms and antioxidant therapy in diabetic retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017.
6. Le W, Liang S, Hu Y, Deng K, Bao H, Zeng C, et al. Long-term renal survival and related risk factors in patients with IgA nephropathy: results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult population. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;27(4):1479-85.
7. O'Neill EC, Danesh-Meyer HV, Connell PP, Trounce IA, Coote MA, Mackey DA, et al. The optic nerve head in acquired optic neuropathies. *Nature Reviews Neurology*. 2010;6(4):221-36.
8. Kashmiri Z, Sastry M. Ocular Toxicity after an antineoplastic drug cyclophosphamide in male rat *Rattus Norvegicus*. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*. 2015;3(1):75-7.
9. Burris H, Storniolo AM. Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *European journal of cancer*. 1997;33:S18-S22.

10. Li C-P, Chao Y, Chi K-H, Chan W-K, Teng H-C, Lee R-C, et al. Concurrent chemoradiotherapy treatment of locally advanced pancreatic cancer: gemcitabine versus 5-fluorouracil, a randomized controlled study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2003;57(1):98-104.
11. Crane CH, Abbruzzese JL, Evans DB, Wolff RA, Ballo MT, Delclos M, et al. Is the therapeutic index better with gemcitabine-based chemoradiation than with 5-fluorouracil-based chemoradiation in locally advanced pancreatic cancer? *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2002;52(5):1293-302.
12. Tsavaris N, Kosmas C, Skopelitis H, Gouveris P, Kopteridis P, Loukeris D, et al. Second-line treatment with oxaliplatin, leucovorin and 5-fluorouracil in gemcitabine-pretreated advanced pancreatic cancer: A phase II study. *Investigational new drugs*. 2005;23(4):369-75.
13. Alberts SR, Al-Khatib H, Mahoney MR, Burgart L, Cera PJ, Flynn PJ, et al. Gemcitabine, 5-fluorouracil, and leucovorin in advanced biliary tract and gallbladder carcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase II trial. *Cancer*. 2005;103(1):111-8.
14. Landry J, Catalano PJ, Staley C, Harris W, Hoffman J, Talamonti M, et al. Randomized phase II study of gemcitabine plus radiotherapy versus gemcitabine, 5-fluorouracil, and cisplatin followed by radiotherapy and 5-fluorouracil for patients with locally advanced, potentially resectable pancreatic adenocarcinoma. *Journal of surgical oncology*. 2010;101(7):587-92.
15. Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, et al. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *Plos One*. 2015;10(2):e0115686.
16. Bukhari DA, Alessa SK, Beheiri SI. Corneal Epithelial Hyperplasia after 5-Fluorouracil Injection. *Case reports in ophthalmology*. 2018;9(1):254-6.
17. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews cancer*. 2003;3(5):330-8.
18. Wohlhueter RM, McIvor RS, Plagemann PG. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *Journal of cellular physiology*. 1980;104(3):309-19.
19. Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, Yamada Y, et al. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer research*. 1995;55(8):1687-90.
20. Ostruszka LJ, Shewach DS. The role of DNA synthesis inhibition in the cytotoxicity of 2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemoth Pharm*. 2003;52(4):325-32.
21. Gandhi V, Plunkett W. Modulation of arabinosyl nucleoside metabolism by arabinosyl nucleotides in human leukemia cells. *Cancer research*. 1988;48(2):329-34.

22. Heinemann V, Xu Y-Z, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey G, et al. Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2', 2'-difluorodeoxycytidine. *Molecular pharmacology*. 1990;38(4):567-72.
23. Parker WB, Bapat A, Shen J-X, Townsend AJ, Cheng Y. Interaction of 2-halogenated dATP analogs (F, Cl, and Br) with human DNA polymerases, DNA primase, and ribonucleotide reductase. *Molecular pharmacology*. 1988;34(4):485-91.
24. Noble S, Goa KL. Gemcitabine. *Drugs*. 1997;54(3):447-72.
25. Ciccolini J, Serdjebi C, Peters GJ, Giovannetti E. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemoth Pharm*. 2016;78(1):1-12.
26. Huang P, Plunkett Jr WK, editors. Induction of apoptosis by gemcitabine. *Seminars in oncology*; 1995: WB Saunders Ltd.
27. Nghiem-Bufferet S, Cohen SY, Giocanti-Auregan A. Docetaxel retinopathy: a case report. *Case Reports in Ophthalmology*. 2017;8(1):21-5.
28. Yokoe T, Fukada I, Kobayashi K, Shibayama T, Miyagi Y, Yoshida A, et al. Cystoid macular edema during treatment with paclitaxel and bevacizumab in a patient with metastatic breast cancer: a case report and literature review. *Case Reports in Oncology*. 2017;10(2):605-12.
29. Rahman HT, Yeh S, Bergstrom CS. Cystoid macular edema without leakage secondary to nab-Paclitaxel (Abraxane): clinical experience with intravitreal bevacizumab. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. 2013;29(3):360-2.
30. Noor A, Desai A, Singh M. Reversible ocular toxicity of oxaliplatin: a case report. *Cureus*. 2019;11(5).
31. Cheung N, Wong TY. Diabetic retinopathy and systemic vascular complications. *Progress in retinal and eye research*. 2008;27(2):161-76.
32. Control CfD, Prevention. National Diabetes Statistics Report, 2020. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, US Dept of Health and Human Services. 2020.
33. Shankar K, Zhang Y, Liu Y, Wu L, Chen C-H. Hyperparameter tuning deep learning for diabetic retinopathy fundus image classification. *IEEE Access*. 2020;8:118164-73.
34. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic analysis. *The lancet global health*. 2013;1(6):e339-e49.
35. Arcadu F, Benmansour F, Maunz A, Willis J, Haskova Z, Prunotto M. Deep learning algorithm predicts diabetic retinopathy progression in individual patients. *NPJ digital medicine*. 2019;2(1):1-9.
36. Bellemo V, Lim G, Rim TH, Tan GS, Cheung CY, Sadda S, et al. Artificial intelligence screening for diabetic retinopathy: the real-world emerging application. *Current Diabetes Reports*. 2019;19(9):72.

37. Spencer BG, Estevez JJ, Liu E, Craig JE, Finnie JW. Pericytes, inflammation, and diabetic retinopathy. *Inflammopharmacology*. 2020;28(3):697-709.
38. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care*. 2012;35(3):556-64.
39. Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye and vision*. 2015;2(1):17.
40. Majji AB, Cao J, Chang KY, Hayashi A, Aggarwal S, Grebe RR, et al. Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(12):3936-42.
41. Li K-r, Zhang Z-q, Yao J, Zhao Y-x, Duan J, Cao C, et al. Ginsenoside Rg-1 protects retinal pigment epithelium (RPE) cells from cobalt chloride (CoCl₂) and hypoxia assaults. *Plos One*. 2013;8(12).
42. Robison W, Kador PF, Kinoshita J. Early retinal microangiopathy: prevention with aldose reductase inhibitors. *Diabetic Medicine*. 1985;2(3):196-9.
43. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(7):1206-37.
44. Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, LaNoue KF, Levison SW, Group PSRR. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Survey of ophthalmology*. 2002;47:S253-S62.
45. Kowluru RA, Chan P-S. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research*. 2007;2007.
46. Ding J, Wong TY. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Current diabetes reports*. 2012;12(4):346-54.
47. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BE. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXII: the twenty-five-year progression of retinopathy in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology*. 2008;115(11):1859-68.
48. Broe R, Rasmussen ML, Frydkjaer-Olsen U, Olsen BS, Mortensen HB, Peto T, et al. The 16-year incidence, progression and regression of diabetic retinopathy in a young population-based Danish cohort with type 1 diabetes mellitus: the Danish cohort of pediatric diabetes 1987 (DCPD1987). *Acta diabetologica*. 2014;51(3):413-20.
49. Thomas RL, Dunstan F, Luzio SD, Chowdury SR, Hale SL, North RV, et al. Incidence of diabetic retinopathy in people with type 2 diabetes mellitus attending the Diabetic Retinopathy Screening Service for Wales: retrospective analysis. *Bmj*. 2012;344:e874.
50. Jones CD, Greenwood RH, Misra A, Bachmann MO. Incidence and progression of diabetic retinopathy during 17 years of a population-based screening program in England. *Diabetes care*. 2012;35(3):592-6.

51. Salinero-Fort MA, San Andrés-Rebollo FJ, de Burgos-Lunar C, Arrieta-Blanco FJ, Gomez-Campelo P, Group M. Four-year incidence of diabetic retinopathy in a Spanish cohort: the MADIABETES study. *Plos One*. 2013;8(10).
52. Olsen BS, Sjølie AK, Hougaard P, Johannesen J, Marinelli K, Jacobsen BB, et al. The significance of the prepubertal diabetes duration for the development of retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*. 2004;18(3):160-4.
53. Wong TY, Liew G, Tapp RJ, Schmidt MI, Wang JJ, Mitchell P, et al. Relation between fasting glucose and retinopathy for diagnosis of diabetes: three population-based cross-sectional studies. *The Lancet*. 2008;371(9614):736-43.
54. Group UPDS. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The lancet*. 1998;352(9131):837-53.
55. Control D, Group CTR. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England journal of medicine*. 1993;329(14):977-86.
56. Stratton I, Kohner E, Aldington S, Turner R, Holman R, Manley S, et al. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*. 2001;44(2):156-63.
57. Tudor SM, Hamman RF, Baron A, Johnson DW, Shetterly SM. Incidence and progression of diabetic retinopathy in Hispanics and non-Hispanic whites with type 2 diabetes. San Luis Valley Diabetes Study, Colorado. *Diabetes Care*. 1998;21(1):53-61.
58. Group UPDS. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ: British Medical Journal*. 1998;317(7160):703.
59. Raman R, Rani PK, Kulothungan V, Racheppalle SR, Kumaramanickavel G, Sharma T. Influence of serum lipids on clinically significant versus nonclinically significant macular edema: SN-DREAMS Report number 13. *Ophthalmology*. 2010;117(4):766-72.
60. Rema M, Srivastava B, Anitha B, Deepa R, Mohan V. Association of serum lipids with diabetic retinopathy in urban South Indians—the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES) Eye Study—2. *Diabetic medicine*. 2006;23(9):1029-36.
61. Ola MS, Nawaz MI, Siddiquei MM, Al-Amro S, El-Asrar AMA. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *Journal of diabetes and its complications*. 2012;26(1):56-64.
62. G Obrosova I, F Kador P. Aldose reductase/polyol inhibitors for diabetic retinopathy. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2011;12(3):373-85.
63. Yamagishi S-i, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2010;3(2):101-8.

64. Wan T-T, Li X-F, Sun Y-M, Li Y-B, Su Y. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2015;74:145-7.
65. Glomb MA, Monnier VM. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(17):10017-26.
66. Stitt AW. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Experimental and molecular pathology*. 2003;75(1):95-108.
67. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP. The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. *Biofactors*. 1999;10(2-3):157-67.
68. Kowluru RA. Effect of advanced glycation end products on accelerated apoptosis of retinal capillary cells under in vitro conditions. *Life Sciences*. 2005;76(9):1051-60.
69. Cowell RM, Russell JW. Nitrosative injury and antioxidant therapy in the management of diabetic neuropathy. *Journal of investigative medicine*. 2004;52(1):33-44.
70. Du X-L, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(22):12222-6.
71. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(7):1049-57.
72. Beisswenger PJ, Howell SK, Smith K, Szwegold BS. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2003;1637(1):98-106.
73. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2014;24(1).
74. SENOL SP, Tunçtan B. Peroksizom Proliferatör ile Etkinleştirilen Reseptörlerin İnsülin Direnci ve Septik Şok Patojenezindeki Rolü. *Clinical and Experimental Health Sciences*.5(4):247-58.
75. Zheng L, Kern TS. Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Front Biosci*. 2009;14:3974-87.
76. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859-66.
77. Stäubli B, Boscoboinik D, Tasinato A, Azzi A. Modulation of Activator Protein-1 (AP-1) Transcription Factor and Protein Kinase C by Hydrogen Peroxide and d- α -Tocopherol in Vascular Smooth Muscle Cells. *European journal of biochemistry*. 1994;226(2):393-402.

78. Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, et al. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(9):2018-26.
79. Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont AC, Isshiki K, et al. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase C β -null mice. *Diabetes*. 2006;55(11):3112-20.
80. Aiello LP, Wong J-S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney International*. 2000;58:S113-S9.
81. Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, et al. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(6):1219-24.
82. Aiello LP, Bursell S-E, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, et al. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective β -isoform-selective inhibitor. *Diabetes*. 1997;46(9):1473-80.
83. DeBosch BJ, Baur E, Deo BK, Hiraoka M, Kumagai AK. Effects of insulin-like growth factor-1 on retinal endothelial cell glucose transport and proliferation. *Journal of neurochemistry*. 2001;77(4):1157-67.
84. Yano K, Bauchat JR, Liimatta MB, Clemmons DR, Duan C. Down-regulation of protein kinase C inhibits insulin-like growth factor I-induced vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and gene expression. *Endocrinology*. 1999;140(10):4622-32.
85. Miwa K, Nakamura J, Hamada Y, Naruse K, Nakashima E, Kato K, et al. The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes research and clinical practice*. 2003;60(1):1-9.
86. Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol*. 2008;30(2):65-84.
87. Jousen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J*. 2004;18(12):1450-2.
88. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, Kohner EM. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2007;3(1):3-14.
89. Adamiec-Mroczek J, Oficjalska-Mlynczak J, Misiuk-Hojlo M. Roles of endothelin-1 and selected proinflammatory cytokines in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy: Analysis of vitreous samples. *Cytokine*. 2010;49(3):269-74.
90. Huang H, Gandhi JK, Zhong X, Wei Y, Gong J, Duh EJ, et al. TNF α is required for late BRB breakdown in diabetic retinopathy, and its inhibition prevents leukostasis and protects vessels and neurons from apoptosis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(3):1336-44.
91. Noma H, Funatsu H, Mimura T, Harino S, Hori S. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in macular edema with central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*. 2009;116(1):87-93.

92. Adamis AP, Berman AJ, editors. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Seminars in immunopathology*; 2008: Springer.
93. Bertoni AG, Burke GL, Owusu JA, Carnethon MR, Vaidya D, Barr RG, et al. Inflammation and the incidence of type 2 diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes care*. 2010;33(4):804-10.
94. Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier—implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *BioMed Research International*. 2010;2010.
95. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*. 2005;85(3):845-81.
96. Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*. 2016;51:156-86.
97. Joussen AM, Smyth N, Niessen C. Pathophysiology of diabetic macular edema. *Diabetic Retinopathy*. 39: Karger Publishers; 2007. p. 1-12.
98. Xu H-Z, Song Z, Fu S, Zhu M, Le Y-Z. RPE barrier breakdown in diabetic retinopathy: seeing is believing. *Journal of ocular biology, diseases, and informatics*. 2011;4(1-2):83-92.
99. Mannermaa E, Reinisalo M, Ranta V-P, Vellonen K-S, Kokki H, Saarikko A, et al. Filter-cultured ARPE-19 cells as outer blood–retinal barrier model. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2010;40(4):289-96.
100. Lee J, Kim J, Kim K, Hong S, Han S, Kubota Y, et al. Plastic roles of pericytes in the blood–retinal barrier. *Nature communications*. 2017;8(1):1-16.
101. Kent D, Viores SA, Campochiaro PA. Macular oedema: the role of soluble mediators. *British journal of ophthalmology*. 2000;84(5):542-5.
102. Stefánsson E. Physiology of vitreous surgery. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 2009;247(2):147-63.
103. Williams CD, Rizzolo LJ. Remodeling of junctional complexes during the development of the outer blood-retinal barrier. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 1997;249(3):380-8.
104. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Mitamura Y, Ohguro H, et al. Glial Cell–Derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2007;56(5):1333-40.
105. Sagatias M, Raviola G, Schaeffer S, Miller C. The structural basis of the inner blood-retina barrier in the eye of *Macaca mulatta*. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1987;28(12):2000-14.
106. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *European journal of ophthalmology*. 2011;21(6_suppl):3-9.

107. Fields M, Del Priore LV, Adelman RA, Rizzolo LJ. Interactions of the choroid, Bruch's membrane, retinal pigment epithelium, and neurosensory retina collaborate to form the outer blood-retinal-barrier. *Progress in retinal and eye research*. 2019;100803.
108. Shakib M, Cunha-Vaz J. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier: IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. *Experimental eye research*. 1966;5(3):229-IN16.
109. Peyman GA, Bok D. Peroxidase diffusion in the normal and laser-coagulated primate retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1972;11(1):35-45.
110. Klaassen I, Hughes JM, Vogels IM, Schalkwijk CG, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Experimental eye research*. 2009;89(1):4-15.
111. Díaz-Coránguez M, Ramos C, Antonetti DA. The inner blood-retinal barrier: cellular basis and development. *Vision research*. 2017;139:123-37.
112. Mandel LJ, Bacallao R, Zampighi G. Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature*. 1993;361(6412):552-5.
113. van Meer G, Simons K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *The EMBO journal*. 1986;5(7):1455-64.
114. Osanai M, Takasawa A, Murata M, Sawada N. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2017;469(1):55-67.
115. Takano K, Kojima T, Sawada N, Himi T. Role of tight junctions in signal transduction: an update. *EXCLI journal*. 2014;13:1145.
116. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002;82(1):47-95.
117. CUTLER RG. Oxidative stress profiling: part I. Its potential importance in the optimization of human health. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1055(1):93-135.
118. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(4):405-12.
119. Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia: VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes*. 2001;50(8):1938-42.
120. Haskins K, BRADLEY B, POWERS K, FADOK V, FLORES S, LING X, et al. Oxidative stress in type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1005(1):43-54.
121. Anderson RE, Rapp LM, Wiegand RD. Lipid peroxidation and retinal degeneration. *Current eye research*. 1984;3(1):223-7.

122. Engerman R, Kern T, Larson M. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia*. 1994;37(2):141-4.
123. Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress. *Current drug targets*. 2005;6(4):511-24.
124. Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrative stress in diabetic rats. *Diabetes*. 2003;52(3):818-23.
125. Kern TS, Kowluru RA, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia: ATPases and glutathione. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1994;35(7):2962-7.
126. Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(4):587-92.
127. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*. 2003;52(9):2346-52.
128. Wu Y, Tang L, Chen B. Oxidative stress: implications for the development of diabetic retinopathy and antioxidant therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014.
129. Young TA, Cunningham CC, Bailey SM. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;405(1):65-72.
130. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
131. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
132. Kanwar M, Chan P-S, Kern TS, Kowluru RA. Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(8):3805-11.
133. Kowluru RA, Abbas SN. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(12):5327-34.
134. Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(12):2883-90.
135. Kern TS, Tang J, Mizutani M, Kowluru RA, Nagaraj RH, Romeo G, et al. Response of capillary cell death to aminoguanidine predicts the development of retinopathy: comparison of diabetes and galactosemia. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(12):3972-8.

136. Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, Chen S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free radical research*. 2003;37(11):1169-80.
137. Kowluru RA, Koppolu P. Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. *Free Radical Research*. 2002;36(9):993-9.
138. Podesta F, Romeo G, Liu W-H, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *The American journal of pathology*. 2000;156(3):1025-32.
139. Matsura T, Kai M, Fujii Y, Ito H, Yamada K. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Free radical research*. 1999;30(1):73-83.
140. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J-i, Matsuoka T-a, Fujitani Y, Umayahara Y, et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*. 1999;48(12):2398-406.
141. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Does the redox status of cytochrome C act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(5):697-703.
142. Kowluru RA, Kowluru V, Xiong Y, Ho Y-S. Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;41(8):1191-6.
143. Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(11-12):1581.
144. Kristal BS, Koopmans SJ, Jackson CT, Ikeno Y, Park B-J, Byung PY. Oxidant-mediated repression of mitochondrial transcription in diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(5):813-22.
145. Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Investigational new drugs*. 2000;18(4):299-313.
146. Rutman RJ, Cantarow A, Paschkis KE. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Research*. 1954;14(2):119-23.
147. Sommer H, Santi DV. Purification and amino acid analysis of an active site peptide from thymidylate synthetase containing covalently bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and methylenetetrahydrofolate. *Biochemical and biophysical research communications*. 1974;57(3):689-95.
148. Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*. 1974;13(3):471-81.
149. RB D, BE H. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*. 1989;16(4):215-37.

150. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Madiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*. 1997;15(6):2403-13.
151. Sandler A, Ettinger DS. Gemcitabine: single-agent and combination therapy in non-small cell lung cancer. *The oncologist*. 1999;4(3):241-51.
152. Kroep J, Giaccone G, Tolis C, Voorn D, Loves W, Van Groeningen C, et al. Sequence dependent effect of paclitaxel on gemcitabine metabolism in relation to cell cycle and cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cell lines. *British journal of cancer*. 2000;83(8):1069.
153. Shelley MD, Jones G, Cleves A, Wilt TJ, Mason MD, Kynaston HG. Intravesical gemcitabine therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): a systematic review. *BJU international*. 2012;109(4):496-505.
154. Martino R, Gilard V, Malet-Martino M. Fluorine-19 or phosphorus-31 NMR spectroscopy: a powerful technique for biofluid metabolic studies and pharmaceutical formulation analysis of fluorinated or phosphorylated drugs. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*: Elsevier; 2008. p. 369-406.
155. Fan H, Villegas C, Wright JA. Ribonucleotide reductase R2 component is a novel malignancy determinant that cooperates with activated oncogenes to determine transformation and malignant potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(24):14036-40.
156. Plunkett W, Huang P, Gandhi V. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anti-cancer drugs*. 1995;6:7-13.
157. Ueno H, Kiyosawa K, Kaniwa N. Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy? *Br J Cancer*. 2007;97(2):145-51.
158. Serdjebi C, Milano G, Ciccolini J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2015;11(5):665-72.
159. Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer research*. 1998;58(19):4349-57.
160. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*. 2006;17(suppl_5):v7-v12.
161. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer research*. 1991;51(22):6110-7.
162. van Haperen VWR, Veerman G, Vermorken JB, Peters GJ. 2', 2'-Difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochemical pharmacology*. 1993;46(4):762-6.
163. Griffith DA, Jarvis SM. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 1996;1286(3):153-81.

164. Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, et al. Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Molecular membrane biology*. 2001;18(1):65-72.
165. Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, et al. Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *Plos One*. 2015;10(2).
166. Gennatas C, Michalaki V, Mouratidou D, Tsavaris N, Andreadis C, Photopoulos A, et al. Gemcitabine combined with 5-fluorouracil for the treatment of advanced carcinoma of the pancreas. *In Vivo*. 2006;20(2):301-5.
167. Alberts SR, Al-Khatib H, Mahoney MR, Burgart L, Cera PJ, Flynn PJ, et al. Gemcitabine, 5-fluorouracil, and leucovorin in advanced biliary tract and gallbladder carcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase II trial. *Cancer*. 2005;103(1):111-8.
168. Kaestner S, Sewell GJ. Chemotherapy dosing part I: scientific basis for current practice and use of body surface area. *Clin Oncol-Uk*. 2007;19(1):23-37.
169. Dooley MJ, Singh S, Michael M. Implications of dose rounding of chemotherapy to the nearest vial size. *Supportive care in cancer*. 2004;12(9):653-6.
170. Sparreboom A, Verweij J. Paclitaxel pharmacokinetics, threshold models, and dosing strategies. *Journal of clinical oncology*. 2003;21(14):2803-4.
171. Sacco JJ, Botten J, Macbeth F, Bagust A, Clark P. The average body surface area of adult cancer patients in the UK: a multicentre retrospective study. *Plos One*. 2010;5(1):e8933.
172. Plastaras JP, Cengel KA. Combination therapy with gemcitabine and 5-fluorouracil: Unblocking the pathways to survivin? *Cancer biology & therapy*. 2006;5(11):1566-8.
173. Le W, Liang S, Hu Y, Deng K, Bao H, Zeng C, et al. Long-term renal survival and related risk factors in patients with IgA nephropathy: results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult population. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011;27(4):1479-85.
174. O'Neill EC, Danesh-Meyer HV, Connell PP, Trounce IA, Coote MA, Mackey DA, et al. The optic nerve head in acquired optic neuropathies. *Nature Reviews Neurology*. 2010;6(4):221.
175. Querques G, Lattanzio R, Querques L, Del Turco C, Forte R, Pierro L, et al. Enhanced depth imaging optical coherence tomography in type 2 diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(10):6017-24.
176. Cascinu S, Silva RR, Barni S, Labianca R, Frontini L, Piazza E, et al. A combination of gemcitabine and 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer, a report from the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD). *Br J Cancer*. 1999;80(10):1595-8.
177. Dasanu CA. Gemcitabine: vascular toxicity and prothrombotic potential. *Expert opinion on drug safety*. 2008;7(6):703-16.

178. Fraunfelder F, Meyer SM. Ocular toxicity of antineoplastic agents. *Ophthalmology*. 1983;90(1):1-3.
179. Banach MJ, Williams GA. Purtscher retinopathy and necrotizing vasculitis with gemcitabine therapy. *Archives of Ophthalmology*. 2000;118(5):726-7.
180. Tran THC, Desauw C, Rose C. Gemcitabine-induced retinopathy in a diabetic patient. *Acta ophthalmologica*. 2009;87(1):114-5.
181. Tame MA, Manjón AG, Belokhvostova D, Raaijmakers JA, Medema RH. TUBB3 overexpression has a negligible effect on the sensitivity to taxol in cultured cell lines. *Oncotarget*. 2017;8(42):71536.
182. Güçlü H, Doganlar ZB, Gürlü VP, Özal A, Dogan A, Turhan MA, et al. Effects of cisplatin-5-fluorouracil combination therapy on oxidative stress, DNA damage, mitochondrial apoptosis, and death receptor signalling in retinal pigment epithelium cells. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2018;37(3):291-304.
183. Kuo H-K, Wu P-C, Yang P-M, Chen Y-H, Wu Y-C, Hu D-N. Effects of topoisomerase II inhibitors on retinal pigment epithelium and experimental proliferative vitreoretinopathy. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. 2007;23(1):14-20.
184. Hou J, Li Y, Zhou Z, Valiaeva N, Beadle JR, Hostetler K, et al. Antiproliferative property of hexadecyloxypropyl 9-[2-(phosphonmethoxy) ethyl] guanine (HDP-PMEG) for unwanted ocular proliferation. *Molecular vision*. 2011;17:627.
185. Newsome D, Dobard E, Liles M, Oliver P. Human retinal pigment epithelium contains two distinct species of superoxide dismutase. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1990;31(12):2508-13.
186. Marques C, Guo W, Pereira P, Taylor A, Patterson C, Evans PC, et al. The triage of damaged proteins: degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones. *The FASEB journal*. 2006;20(6):741-3.
187. Beatty S, Koh H-H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology*. 2000;45(2):115-34.
188. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research*. 1998;39(8):1529-42.
189. Liu H, Gambino Jr F, Algenio C, Bouchard C, Qiao L, Bu P, et al. Zidovudine protects hyperosmolarity-stressed human corneal epithelial cells via antioxidant pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;499(2):177-81.
190. Kowluru RA, Atasi L, Ho Y-S. Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(4):1594-9.
191. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64:138-53.

192. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1976;455(1):152-62.
193. Esser P, Tervooren D, Heimann K, Kociok N, Bartz-Schmidt KU, Walter P, et al. Intravitreal daunomycin induces multidrug resistance in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1998;39(1):164-70.
194. Güçlü O, Doğanlar O, Yüksel V, Doğanlar ZB. FOLFIRI-mediated toxicity in human aortic smooth muscle cells and possible amelioration with curcumin and quercetin. *Cardiovascular Toxicology*. 2020;20(2):139-54.
195. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of cellular physiology*. 2002;192(1):1-15.
196. Ryan MT, Pfanner N. Hsp70 proteins in protein translocation. *Advances in protein chemistry*. 2001;59:223-42.
197. Voos W, Röttgers K. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2002;1592(1):51-62.
198. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*. 1999;68(1):383-424.
199. Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases—controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000;1477(1-2):299-306.
200. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(29):20049-52.
201. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;286(3):433-42.
202. Xanthoudakis S, Nicholson DW. Heat-shock proteins as death determinants. *Nature Cell Biology*. 2000;2(9):E163-E5.
203. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature cell biology*. 2000;2(8):469-75.
204. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature cell biology*. 2000;2(8):476-83.
205. Cai J, Wu M, Nelson KC, Sternberg P, Jones DP. Oxidant-induced apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999;40(5):959-66.

206. Jin G-F, Hurst JS, Godley BF. Hydrogen peroxide stimulates apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Current eye research*. 2001;22(3):165-73.
207. Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(3):367-73.
208. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2002;282(2):R423-R30.
209. Yang X-H, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-and etoposide-induced apoptosis. *Cancer research*. 2001;61(1):348-54.
210. Wu W, Lee W-L, Wu YY, Chen D, Liu T-J, Jang A, et al. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(51):40113-9.
211. Ishii H, Adachi M, Fernández-Checa JC, Cederbaum AI, Deaciuc IV, Nanji AA. Role of apoptosis in alcoholic liver injury. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2003;27(7):1207-12.
212. Karpinich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(19):16547-52.
213. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney international*. 1999;56(6):2147-59.
214. Wang S, Wang Z, Boise L, Dent P, Grant S. Loss of the bcl-2 phosphorylation loop domain increases resistance of human leukemia cells (U937) to paclitaxel-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;259(1):67-72.
215. Tezel Gln, Wax MB. Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli in vitro. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999;40(11):2660-7.
216. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
217. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Experimental cell research*. 2000;256(1):58-66.
218. Sträter J, Mariani SM, Walczak H, Rucker FG, Leithäuser F, Krammer PH, et al. CD95 ligand (CD95L) in normal human lymphoid tissues: a subset of plasma cells are prominent producers of CD95L. *The American journal of pathology*. 1999;154(1):193-201.
219. Jiang S, Wu M-WH, Sternberg P, Jones DP. Fas mediates apoptosis and oxidant-induced cell death in cultured hRPE cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(3):645-55.

220. Hueber A, Weller M, Welsandt G, Kociok N, Kirchhof B, Esser P. Characterization of daunorubicin-induced apoptosis in retinal pigment epithelial cells: modulation by CD95L. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(7):2851-7.
221. van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *European journal of cancer*. 2004;40(7):939-50.
222. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of oncology*. 2006;17:v7-v12.
223. Atienzar FA, Cordi B, Donkin ME, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic Toxicology*. 2000;50(1-2):1-12.
224. Atienzar F, Conradi M, Evenden A, Jha A, Depledge M. Qualitative assessment of genotoxicity using RAPD: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo (a) pyrene. *Environ Toxicol Chem*. 1999;18:2275-82.
225. White JJ, Neuwirth H, Miller CD, Schneider EL. DNA alterations in prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia: detection by DNA fingerprint analyses. *Mutation Research/DNAging*. 1990;237(1):37-43.
226. Welsh J, Petersen C, McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic acids research*. 1991;19(2):303-6.
227. Bowditch BM, Albright DG, Williams JG, Braun MJ. [21] Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods in enzymology*. 224: Elsevier; 1993. p. 294-309.
228. Keijzers G, Bakula D, Petr MA, Madsen NGK, Teklu A, Mkrtychyan G, et al. Human Exonuclease 1 (EXO1) regulatory functions in DNA replication with putative roles in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(1):74.
229. Keijzers G, Liu D, Rasmussen LJ. Exonuclease 1 and its versatile roles in DNA repair. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2016;51(6):440-51.
230. Bolderson E, Tomimatsu N, Richard DJ, Boucher D, Kumar R, Pandita TK, et al. Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*. 2010;38(6):1821-31.
231. Wallace SS. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiation research*. 1998;150(5s):S60-S79.
232. Hazra TK, Izumi T, Boldogh I, Imhoff B, Kow YW, Jaruga P, et al. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(6):3523-8.
233. Hegde ML, Hegde PM, Bellot LJ, Mandal SM, Hazra TK, Li G-M, et al. Prereplicative repair of oxidized bases in the human genome is mediated by NEIL1 DNA glycosylase together

with replication proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(33):E3090-E9.

234. Das A, Wiederhold L, Leppard JB, Kedar P, Prasad R, Wang H, et al. NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells. *DNA repair*. 2006;5(12):1439-48.

235. Enzsoly A, Kammerer K, Nemeth J, Schneider M. Bilateral cystoid macular edema following docetaxel chemotherapy in a patient with retinitis pigmentosa: a case report. *BMC ophthalmology*. 2015;15(1):1-5.

236. Mesquida M, Sanchez-Dalmau B, Ortiz-Perez S, Pelegrín L, Molina-Fernandez JJ, Figueras-Roca M, et al. Oxaliplatin-related ocular toxicity. *Case reports in oncology*. 2010;3(3):423-7.



ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. Diyabette, glikozun dolaşıma devam etmesi, doku hasarına neden olabilecek birçok akut ve uzun süreli kümülatif değişiklik nedeniyle retinaya zarar verebilir. Bazı akut hasarlar, yaşam boyu bu hastalıkta birçok kez tekrarlandığında, sabit makromoleküllerde kümülatif değişikliklere neden olabilir4
- Şekil 2. Diyabetik retinopatide diyabet kaynaklı nörovasküler hasar için genel özellikler6
- Şekil 3. Diyabetik retinopatide oksidatif stres aracılı metabolizma. Hiperglisemiye bağlı oksidatif stres, yüksek glikoz ile diyabetik komplikasyonların gelişmesinde önemli olan bir bağlantı olarak kabul edilir. Retinopatinin gelişiminde diyabetin neden olduğu çeşitli anormallikler oksidatif stresten etkilenir ve birbirleriyle ilişkili olduğu düşünülür..... 10
- Şekil 4. Memeli retinasının basitleştirilmiş görseli 12
- Şekil 5. Retinal pigment epitelyum hücresinde sıkı bağlantı noktaları ve dış kan-retina bariyeri 13
- Şekil 6. Kan-retina bariyerinde parasellüler taşıma ve sıkı bağlantı proteinleri 14
- Şekil 7. Urasil, 5-florourasil ve 5-floro-2'-deoksiüridinin yapısı..... 19
- Şekil 8. 5-Florourasilin hücre içi metabolizmasının şematik gösterimi20

Şekil 9. Deoksisitidinin ve gemsitabinin yapısı	21
Şekil 10. Gemsitabin (dFdC) ve etki mekanizmaları	23
Şekil 11. Normal (A) ve diyabetik (B) ARPE-19 insan göz hücrelerinin invert ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (20X büyütme ile).....	27
Şekil 12. 5-Florourasilin kimyasal yapısı	31
Şekil 13. Gemsitabinin kimyasal yapısı	32
Şekil 14. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saatlik 5-Fu ve GEM (1300-54,4 µM) uygulanan gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=6, ortalama±standart hata.....	46
Şekil 15. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saat süreyle 1300-5,07 µM ve 54,4-0,21 µM doz aralıklarında 5-Fu ve GEM uygulamasının hücre canlılığına etkisi MTT testi plağı ile gösterildi	47
Şekil 16. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik 5-Fu ve GEM (1300-54,4 µM) uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=6, ortalama±standart hata.....	48
Şekil 17. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saat süreyle 1300-5,07 µM ve 54,4-0,21 µM doz aralıklarında 5-Fu ve GEM uygulamasının hücre canlılığına etkisi MTT testi plağı ile gösterildi	49
Şekil 18. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu+GEM uygulamasını takiben farklı primerler ile yapılan RAPD-PCR sonrası agaroz jel görüntüsü	51
Şekil 19. SP1 primerine ait jel görüntüsü	52
Şekil 20. OPA8 primerine ait jel görüntüsü	53
Şekil 21. OPC18 primeri agaroz jel görüntüsü.....	55
Şekil 22. 4OPA primeri jel görüntüsü	56
Şekil 23. 14OPC primeri jel görüntüsü.	58

Şekil 24. S-237 primeri jel görüntüsü.....	59
Şekil 25. AP5 primeri jel görüntüsü.....	60
Şekil 26. 7OPA primeri jel görüntüsü.....	61
Şekil 27. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC ₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası genomik kalıp kararlılığı (% GTS) değerleri. n=6, veriler ortalama±standart hata, #Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. K: Kontrol; IC50: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM	62
Şekil 28. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC ₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası qRT-PCR ile belirlenen EXO1 ve NEIL gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤0.05, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. K: Taşıt kontrol; IC50: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM	63
Şekil 29. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 5-Fu ve GEM kombinasyonunun uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu ışına vermeyen canlı, ölü, apoptotik hücrelerin yüzdesi. N=6, ortalama±standart hata. *Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤0.05, #Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, P≤0.05. NK, NKD: Taşıt kontrol; NIC50, DIC50: 0.267-6.369 µM:5-Fu-GEM; NKD, DKD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 µM:5-Fu-GEM. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyaması sonucu boyanan hücrelerin gösterimi	65
Şekil 30. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC ₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen SOD1, SOD2, KAT ve GPX gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, P≤0.05,	

*Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.05$. IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM 67

Şekil 31. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen ABCC1, ABCC2, GST gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, #Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $P \leq 0.05$, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.05$. IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM 69

Şekil 32. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen HSP60, HSP70 gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $P \leq 0.05$, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.05$. IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM 71

Şekil 33. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen P53, BCL-2, BAX, SIT-C, APAF-1, CASP3 gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $P \leq 0.05$, * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.05$. IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM..... 72

Şekil 34. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 48 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası, qRT-PCR ile belirlenen TNF- α , FAS, TRAIL, CASP8 gen ifadelerine ait relatif kat değişim değerleri. Tüm veriler GAPDH mRNA ifadesi ile normalize edilmiştir. n=4, veriler ortalama±standart hata, # Uygulama vs Kontrol karşılaştırması, veriler istatistik olarak farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi, $P \leq 0.05$,

* Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.05$. IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM 74

Şekil 35. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası oksidatif stres seviyelerinin tespiti (CM-H₂-DCFDA ile yeşile boyandı) ve toplam düzeltilmiş hücresel floresans (TCCF) yoğunluğu, kontrol grubu seviyeleri ile normalize edildi ve kat artışı olarak gösterildi. N=45, veriler ortalama±standart hata. ** Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.01$. N: Normal ARPE-19 hücresi; D: Diyabetik ARPE-19 hücresi; IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM..... 76

Şekil 36. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 24 saatlik süreyle IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası NucBlue™ ile maviye boyanan apoptotik hücre çekirdeklerinin ve AO:EB ile kırmızı boyanan apoptotik hücrede bozulan membran bütünlüğünün ve yeşile boyanan apoptotik cisimlerin floresan mikroskobu ile gösterimi. IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM 77

Şekil 37. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozlarında 5-Fu ve GEM uygulaması sonrası 0. ve 30. saatlerinde göç eden hücrelerin hücre göçü görüntüleri ve hücre göçü yüzdesi. n=4, veriler ortalama±standart hata. * Normal vs Diyabet karşılaştırması, ortalamalar istatistik olarak farklıdır, independent sample T-testi, $P \leq 0.05$. IC50: 0.267-6.369 μM :5-Fu-GEM; KD: kemoterapi dozu: 1300-54.4 μM :5-Fu-GEM 78

Şekil 38. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu+GEM'in uygulandığı kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozu gruplarında β -Aktin, BCL2, BAX, Kaspaz3 protein bantlarının görüntüsü K: Kontrol grubu, IC₅₀; IC₅₀ dozu uygulama grubu, KD; Kemoterapi dozu uygulama grubu..... 79

Şekil 39. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM kombinasyonların uygulandığı kontrol, IC₅₀ ve kemoterapi dozu gruplarında BCL2, BAX, Kaspaz3 protein seviyelerinin relatif kat artış grafiği..... 80

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve menşei	25
Tablo 2. Çalışmada kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve menşei	26
Tablo 3. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları (1 örnek için).....	35
Tablo 4. qRT PCR için kullanılan primer çiftleri, dizileri ve uzunlukları.....	36
Tablo 5. RAPD analizinde kullanılan primerler ve baz dizileri	38
Tablo 6. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 1300 µM-54,4 µM doz aralıklarında 5-Fu ve GEM kombine uygulamasının hücre canlılığına etkisi. N=6, ortalama±standart hata. *Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, P ≤0.05)	50
Tablo 7. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde SP1 primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)	52
Tablo 8. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde OPA8 primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)	54
Tablo 9. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde OPC18 primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)	55
Tablo 10. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 4OPA primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)	57
Tablo 11. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 14OPC primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)	58

Tablo 12. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde AP5 primerinde tüm gruplar için hem normal hem diyabetik kontrol gruplarına göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti)60

Tablo 13. 5-Fu+GEM uygulaması yapılan normal ve diyabetik ARPE-19 hücrelerinde 7OPA primerinde her grup için kontrole göre yeni oluşan (Y) ve kaybolan (K) bantlar (baz çifti) ...61

Tablo 14. Normal ve diyabetik ARPE-19 hücre serisinde 5-Fu ve GEM kombinasyonunun uygulandığı gruplarda Tali sitometre ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri (n=6, ortalama±SH).....66



ÖZGEÇMİŞ

1996 yılında İstanbul'un Üsküdar ilçesinde doğdum. Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde 2014 tarihinde başladığım lisans eğitimimi 2018 yılında tamamladım. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Eğitimim sırasında bir yıl süre ile Prof.Dr. Oğuzhan Doğanlar'ın yürütücülüğünü yaptığı "Beyin Tümör Hücre Serilerinde Pestisitler Tarafından İndüklenen Çoklu İlaç Direncinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması" başlıklı 217Z268 nolu TÜBİTAK-1002 projesinde proje bursiyeri olarak çalıştım.

Yayın ve Projelerim

1. Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Kurtdere, A. K., Chasan, T., & Ok, E. S. (2020). Chronic exposure of human glioblastoma tumors to low concentrations of a pesticide mixture induced multidrug resistance against chemotherapy agents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110940 (SCI)
2. Esmâ Seben OK, Zeynep Banu DOĞANLAR. Diyabetik retinal pigment epitel (ARPE-19) hücrelerinde gempitabin ve 5-Fu kombinasyonunun DNA hasarı ve mitokondriyal apoptoz üzerine etkisi. 3rd Union of Thrace Universities International Health Sciences Congress. 24-26 October 2019, Çanakkale/Turkey. Tam metin bildiri.

3. Normal ve yüksek glukoz ile indüklenmiş diyabetik retinal pigment epitel (ARPE-19) hücrelerinde Gemcitabine ve 5-Fu kombinasyonunun oksidatif stres ve mitokondriyal apoptoz yolağı üzerine etkisi. Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP: 2019/165). Yardımcı araştırmacı.

Sertifikalar

1. Pedagojik Formasyon Sertifikası, Biyoloji Öğretmenliği. Bartın Üniversitesi Eğitim Fakültesi, 2018.
2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi, A Kategorisi 1.Grup, 2018.

