

**T.C.**

**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İNTRAKAMERAL KARBAKOLUN KORNEADA  
OKSİDATİF STRES VE APOPİTOZİSE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ömer Faruk YILMAZ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Ali AKAL**

**ŞANLIURFA**

**2015**

**T.C.**  
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İNTRAKAMERAL KARBAKOLUN KORNEADA OKSİDATİF STRES  
VE APOPİTOZİSE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ömer Faruk YILMAZ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Ali AKAL**

**Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü  
tarafından 14092 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ŞANLIURFA**

**2015**

## TEŞEKKÜR

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Halit OĞUZ ve tez yazım süresince yardımını ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ali AKAL başta olmak üzere asistanlık süresi boyunca bilgi, beceri ve yeteneklerini bizlere sunan kıymetli Hocalarım Prof. Dr. Sevin Söker ÇAKMAK, Prof. Dr. Mustafa GÜZEY, Yrd. Doç. Dr. Tuğba GÖNCÜ ve Yrd. Doç. Dr. Fatih Mehmet ADIBELLİ 'ye

Aynı şartlarda beraber çalıştığımız ve aynı yükün altına beraber girdiğimiz asistan arkadaşlarıma,

Berber görev yaptığım tüm Göz Hastalıkları Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan başta Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nurten AKSOY ve Öğretim Görevlisi Abdullah TAŞKIN'a, Patoloji Ana Bilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Sezen KOÇASLAN'a,

Asistanlığa başlarken bizi karşılayan ve her türlü idari işimize koşturan başta Sayın Tevrat ZERAY ve Sayın Mehmet Murat ALKAN olmak üzere tüm Dekanlık personeline,

Tezimde katkıları olan abilerim Prof. Dr. Mustafa YILMAZ ve Prof. Dr. Mehmet YILMAZ başta olmak üzere değerli annem ve kardeşlerime,

Teşekkürü borç bilirim.

Dr. Ömer Faruk YILMAZ

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA NO

TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	V
RESİMLER LİSTESİ	VI
KISALTMALAR ve SİMGELER	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kornea Anatomisi	3
2.1.1. Boyutlar	3
2.1.1.1. Korneanın Beslenmesi	4
2.1.2. Korneanın İnnervasyonu	4
2.1.3. Tabakalar	4
2.2. Karbakol	10
2.3. Apoptozis	12
2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem	21
2.4.1. Antioksidan Maddeler	21
2.4.2. Reaktif Oksijen Metabolitleri	23
2.4.3. Total Oksidatif Stres (TOS)	24
2.4.4. Total Antioksidatif Stres (TAS)	25

2.4.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	26
2.4.6. Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE)	26
2.4.7. Oksidatif Durumun Saptanması: Erel Yöntemi	27
2.5. Materyal Metod	27
2.5.1. Hayvanlar ve Deney Grupları	27
2.5.2. Cerrahi İşlemler ve Doku Hazırlama	28
2.5.3. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 Boyama	31
2.5.4. Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçümü	31
2.5.5. Total Oksidan Durum (TOS) Ölçümü	32
2.5.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması	32
2.5.7. Parakosonaz Enzim Aktivitesi Ölçümü	32
2.5.8. Arilesteraz Aktivitesi Ölçümü	33
3. YAPILAN İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	34
4. BULGULAR	35
4.1. Rat serumlarında oksidatif stres ile ilgili bulgular	35
4.2. Rat kornealarında oksidatif stres ile ilgili bulgular	36
4.3. Rat kornealarında apoptozis ile ilgili sonuçlar	37
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ	46
KAYNAKLAR	47

## ŒEKİLLER LİSTESİ

## SAYFA NO

<b>Œekil-1:</b> Kornea tabakaları ve dua tabakası	5
<b>Œekil-2:</b> Gözyaşı film tabakası	7
<b>Œekil-3:</b> Karbakolun kimyasal yapısı	11
<b>Œekil-4:</b> Apoptozis ve nekroz	13
<b>Œekil-5:</b> Apoptozis morfolojisi	16
<b>Œekil-6:</b> Apoptoziste intrinsek ve ekstrinsek yol	19
<b>Œekil-7:</b> Apoptoziste Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 in rolü	20
<b>Œekil-8:</b> Reaktif oksijen moleküllerinin oluşumu	23

## TABLolar LİSTESİ

## SAYFA NO

<b>Tablo-1:</b> Apoptozis ve nekroz farkları	13
<b>Tablo-2:</b> Başlıca antioksidan maddeler	22
<b>Tablo-3:</b> Reaktif oksijen ürünleri	24
<b>Tablo-4:</b> Deney grubları	28
<b>Tablo-5:</b> Kaspaz boyama değerlendirmesi	31
<b>Tablo-6:</b> Ratların serumunda oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması	35
<b>Tablo-7:</b> Ratların korneasında oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması	36
<b>Tablo-8:</b> Kaspaz 3 boyanma sonuçları	37
<b>Tablo-9:</b> Kaspaz 8 boyanma sonuçları	37

## RESİMLER LİSTESİ

## SAYFA NO

<b>Resim-1:</b> Yarıklı lamba biyomikrobisinde kornea	3
<b>Resim-2:</b> Sham grubundaki rat korneası (yüzeyel epitel hücreleri)	6
<b>Resim-3:</b> Sham grubundaki rat korneası (stroma tabakası)	9
<b>Resim-4:</b> İntrakameral enjeksiyon uyguladığımız rat görüntüsü	30
<b>Resim-5:</b> Ratın vena kava inferiorundan kan alma görüntüsü	30
<b>Resim-6:</b> Kaspaz 8 -: İntrakameral karbakol uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 8 ile negatif boyanma görüntüsü	38
<b>Resim-7:</b> Kaspaz 8 + : İntrakameral BSS uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 8 ile + boyanma görüntüsü	38
<b>Resim-8:</b> Kaspaz 8 ++ : İntrakameral BSS uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 8 ++ görüntüsü	39
<b>Resim-9:</b> Kaspaz 8 +++ : İntrakameral karbakol uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 8 ile +++ pozitif boyanma görüntüsü	39
<b>Resim-10:</b> Kaspaz 3 - : İntrakameral karbakol uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 3 ile - negatif boyanma görüntüsü	40
<b>Resim-11:</b> Kaspaz 3 + : Sham grubunda bir rat korneasının kaspaz 3 ile + pozitif boyanma görüntüsü	40
<b>Resim-12:</b> Kaspaz 3 ++ : İntrakameral BSS uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 3 ile ++ pozitif boyanma görüntüsü	41
<b>Resim-13:</b> Kaspaz 3 +++ : İntrakameral BSS uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 3 ile +++ pozitif boyanma görüntüsü	41



## KISALTMALAR ve SİMGELER

<b>ABTS</b>	: 2,2'-azibonis (3 etylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<b>ADP</b>	: Adenozin Di Fosfat
<b>APAF</b>	: Proteaz Aktive edici Faktör
<b>ARE</b>	: Arilesteraz
<b>ATP</b>	: Adenozin Tri Fosfat
<b>AU</b>	: Arbitrary Unit (Özel Birim)
<b>BSS</b>	: Balanced Salt Solution =Dengeli Tuz Solüsyonu
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>D</b>	: Dioptri
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DR</b>	: Death Reseptör (Ölüm Reseptörü)
<b>EDAR</b>	: Ectodysplasin A Receptor
<b>FADD</b>	: Fas-associated death domain
<b>G</b>	: Gauge
<b>GİB</b>	: Göz içi basınç
<b>HDL</b>	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
<b>IOP</b>	: Intraocular pressure
<b>İV</b>	: İntravenöz
<b>Kaspaz</b>	: Cysteine Aspartate Specific ProteASEs
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>OCT</b>	: Optical Coherens Tomography

<b>OSİ</b>	: Oksidatif Stres İndeksi
<b>PON</b>	: Paraoksonaz
<b>TAS</b>	: Toplam Antioksidan Seviye
<b>TNF</b>	:Tümör Nekroz Faktör
<b>TRADD</b>	: TNFR-Associated Death Domain
<b>TRAILR</b>	: TNF-Related Apoptosis-İnducing Ligand Reseptör
<b>TOS</b>	: Toplam Oksidatif Seviye
<b>UV</b>	: Ultraviyole
$\chi^2$	: Ki-kare testi

## ÖZET

### Ratlarda İntrakameral Karbakolun Korneada Oksidatif Stres ve Apoptozise Etkisinin Araştırılması

**Dr. Ömer Faruk YILMAZ**

#### **Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi**

**Giriş:** Katarakt cerrahisinden sonra erken dönemde göz içi basınç (GİB) artışı sık gözlenen bir bulgudur. Postoperatif GİB artışını azaltmak için intraoperatif viskoelastiklerin temizlenmesinin yanısıra intrakameral karbakol kullanımında önemlidir. Alınan tüm önlemlere rağmen artmış olan intraoküler basınç optik sinirde kalıcı hasara yol açabilir. Katarakt ameliyatı esnasında intrakameral karbakol verilen hastalarda postoperatif ilk gün düşük intraoküler basınç görülmektedir. İntrakameral karbakol ilaç etkisinin uzun sürmesi istendiği durumlarda asetilkoline tercih edilmektedir.

Organizma oksidantlara sürekli maruz kalmaktadır. Oluşan oksidan moleküller hücrelere ve dokularda zarara neden olur. Oksidatif stres, ilaçlar, toksik ajanlar, kimyasalların etkisi, virüsler, serbest radikaller, sitokin ve hormonlar gibi çeşitli uyarılar kaspazlar üzerinden apoptozisi aktive etmektedir. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılara sekonder olarak gerçekleşen genetik kontrol altında olan programlanmış hücre ölümüdür.

Literatür araştırmasında, intrakameral karbakolun korneada mikroskobik ve makroskobik etkileri ile ilgili sınırlı çalışmalar mevcuttur. Fakat intrakameral karbakolun korneada oksidatif stres ve endotelial apoptozis üzerine etkileri ile ilgili çalışmaya rastlamadık.

**Amaç:** Bu çalışmada, ratlarda intrakameral karbakol'un korneada oksidatif stres ve apoptozise etkisini araştırmayı planladık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda 4-8 haftalık, 180-200 gram ağırlığında toplam 28 adet Wistar albino rat kullanılmıştır. Sham, Balanced Salt Solution (BSS) ve karbakol grubu olmak üzere üç grubu oluşturuldu. Sham grubu 10, BSS grubu 9 ve karbakol grubu 9 rattan

oluşturuldu. Laboratuvar ortamında, anestezi altında BSS grubuna 0.01 cc BSS ve karbakol grubuna 0.01cc karbakol intrakameral uygulandı. Sham grubuna herhangi bir ilaç verilmedi. Bir hafta sonra ratların korneaları ve kan örnekleri alındı. Apoptozisi immunohistokimyasal olarak saptamak için kornea endotelinde kaspaz 3 ve kaspaz 8 bakıldı. Oksidatif stresi değerlendirmek için korneada ve serumda Total Oksidan Seviye (TOS), Total Antioksidan Seviye (TAS), Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) ve Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE) seviyelerine bakıldı.

**Bulgular:** Rat serumlarında Karbakol grubunda OSİ değerleri Sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p=0.05$ ). Karbakol grubundaki OSİ değerleri BSS grubuna göre daha düşüktür ve anlamlılık düzeyi daha fazladır ( $p=0,004$ ). Rat serumlarında Karbakol grubunun TOS değerleri, BSS grubuna göre düşük bulunmuş olup yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık göstermiştir ( $p=0,001$ ).

Sham, BSS ve karbakol gruplarındaki ratların kornealarında TAS, TOS, OSİ, PON ve ARE düzeyleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

Karbakol, Sham ve BSS grupları arasında kaspaz-3 boyanması açısından yapılan karşılaştırmada, karbakol grubunda tüm rat korneaları negatif boyanmış olup, gruplar arasında yüksek düzeyde istatistiksel anlamlı farklılık bulunmuştur ( $P=0.002$ ).

Karbakol, Sham ve BSS grupları arasında kaspaz-8 boyanması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0.094$ ).

**Sonuç:** Karbakol, rat serumlarında BSS ve sham gruplarına göre oksidatif stresi azaltmakta ve oksidatif strese karşı koruyucu rol oynamaktadır. Korneada ise karbakol, sham ve BSS gruplarına göre oksidatif stresi artırmamaktadır. İmmunohistokimyasal inceleme karbakolün apoptozisi artırıcı etkisi olmadığını, aksine koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız intrakameral olarak uygulanan karbakolün korneada oksidatif stres ve apoptozis üzerine artırıcı etkisi olmadığını ve güvenli bir ilaç olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Karbakol, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kornea, Oksidatif stres

## ABSTRACT

### **Investigation of the effects of intracameral carbachol on oxidative stress and apoptosis in rats cornea.**

**Ömer Faruk YILMAZ, MD**

**Specialty Thesis, Department of Ophthalmology**

**Introduction:** Intraocular pressure (IOP) elevation is frequently observed in early period after cataract surgery. Use of intracameral carbachol and cleaning intraoperative viscoelastic is important to reduce postoperative IOP. Nevertheless, increased intraocular pressure may result in permanent damage to the optic nerve. Lower intraocular pressure was observed the patients given intracameral carbachol during the cataract surgery at postoperative first day. Intracameral carbachol may be preferred to acetylcholine when desired to take long effects of drugs.

Organisms are continuously exposed to the oxidant. Oxidant molecules causes damage to cells and tissues. Oxidative stress, free radicals, drugs, toxic agents, chemicals, viruses, cytokine, or various stimuli such as hormones activates apoptosis through caspases. Apoptosis is a programmed cell death that stems from physiological or pathological secondary stimuli under genetic control.

Literature review reveals that there are limited investigations on the microscopic and macroscopic effect of intracameral carbachol on cornea. There is no study, however, about effects of intracameral carbachol on corneal endothelial oxidative stress and apoptosis.

**Purpose:** The aim of this study is to investigate the effect of intracameral carbachol on oxidative stress and apoptosis in rats cornea.

**Materials and Methods:** In this study, 28 Wistar albino rats, weighing 180-200 grams and 4-8 weeks, were used. Sham, BSS, and carbachol groups were consisted of 10, 9, 9 rats, respectively. 0.01 cc intracameral carbachol and 0.01 cc BSS were injected to the rat groups of carbachol and BSS, respectively, in the conditions of anesthesia. No drug was injected into

sham group of rats. A week later, the cornea and blood samples of rats were taken. Caspase 3 and caspase 8 were investigated to determine apoptosis as immunohistochemical method in corneal endothelial. Oxidative stress (TOS), total antioxidant status (TAS), oxidative stress index (OSI), paraoxonase (PON) and arylesterase (ARE) levels were measured to determine oxidative stress at corneal endothelial tissue and serum.

**Results:** In the rat serum, OSI values in the carbachol group were significantly lower compared to the sham group ( $p=0.05$ ). OSI values in the carbachol group were very lower compared to the BSS group ( $p=0,004$ ). TOS values in the carbachol group were very lower compared to the BSS group ( $p=0,001$ ).

statistically significant difference was not observed in the TAS, TOS, OSI, PON and ARE levels of cornea in sham, BSS and carbachol groups ( $p>0.05$ ).

In terms of caspase-3 staining of the cornea, all of the carbachol group of rats were negative painted and statistically significant differences were found between the Carbachol, Sham and BSS groups ( $P=0.002$ ).

In terms of caspase-8 staining of the cornea, statistically significant differences were not observed between the Carbachol, Sham and BSS groups ( $p=0.094$ ).

**Conclusion:** Carbachol reduces oxidative stress in rat serum in comparison to the BSS and sham groups, and plays a protective role against oxidative stress. In cornea, carbachol does not increase oxidative stress in comparison to the sham and BSS groups. Immunohistochemical examination showed that carbachol had no effect to increase apoptosis. On the contrary, carbachol might have protective effect.

The results of this study also showed that intracameral carbachol have not promoting effect on oxidative stress and apoptosis in cornea. The results show that intracameral carbachol is a safe intracameral drug.

**Keywords:** Apoptosis, Carbachol, Caspase-3, Caspase-8, Cornea, Oxidative stress

## 1. GİRİŞ

Katarakt cerrahisinden sonra erken dönemde göz içi basıncında (GİB) artış sık gözlenen bir bulgudur. Postoperatif göz içi basınç artışını azaltmada intraoperatif olarak viskoelastiklerin temizlenmesi ve intraoperatif karbakol kullanımı önemlidir (1). Buna rağmen artmış olan intraoküler basınç optik sinirde kalıcı hasara yol açabilir. Göz içi basıncını düşürmede kullanılan topikal ajanlar arasında, beta-blokerler, prostaglandin analogları, alfa-blokerler, karbonik anhidraz inhibitörleri bulunmaktadır. Ancak bunlardan prostaglandin analoglarının göz içi enflamasyonunu arttırıcı, beta-blokerler ve alfa-blokerlerin de kardiyak ve sistemik tansiyon üzerine yan etkileri bulunmaktadır (2).

Karbakol ve asetilkolin direkt etkili muskarinik reseptör agonistleridir. Asetil kolin asetilkolin transferaz enzimi ile hızlı bir şekilde yıkılır. Dolayısıyla etkisi kısa sürelidir. Karbakolde ise asetil grubu olmadığı için asetilkolin esteraza ve nonspesifik esterazlara daha dirençlidir. Bundan dolayı asetilkoline göre etki süresi daha uzundur. Etkilerini; skleral mahmuzu çekerek trabeküler ağda genişlemeye yol açarak aköz humörün gözden atılımını arttırlar ve dolayısıyla göz içi basıncını azaltırlar. Katarakt ameliyatı yapılan intrakameral karbakol verilen hastalarda ilk gün düşük intraoküler basınç görülmektedir. İntrakameral karbakol ilaç etkisinin uzun sürmesi istendiği durumlarda asetilkoline tercih edilebilmektedir (3).

Organizma, iç (sindirim, solunum, yaralanma vb.) ve dış (çevresel faktörler) etkenlerin uyarılarıyla sürekli oksidanlara maruz kalmaktadır. Oluşan oksidan moleküller hücrelere ve dokularda zarara neden olur (4). Oksidatif stres, ilaçlar, büyüme faktörü eksikliği, iyonize radyasyon, toksik ajanlar, besin eksikliği, kimyasalların etkisi, psikolojik faktörler ve büyüme faktörlerinin yetersizliği, virüsler, serbest radikaller, sitokin ve hormonlar gibi çeşitli uyarılar kaspazlar üzerinden apoptozisi aktive etmektedirler (5). Kaspazlar apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kaspazlar çeşitli proapoptotik ve proenflamatuar sinyallere cevap olarak aktif hale gelirler. Kaspaz aktivasyonu apoptoziste kritik önemde rol oynamaktadır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılara sekonder olarak gerçekleşen genetik kontrol altında olan programlanmış hücre ölümüdür (6).

Yaptığımız literatür araştırmasında, intrakameral karbakolün korneaya olan etkilerini araştıran kısıtlı sayıda çalışma mevcuttu. Bu çalışmalar korneanın daha çok mikroskopik ve

makroskopik olarak incelenmesini içermektedir. Fakat intrakameral karbakolun korneada oksidatif stres ve endotelyal apoptozis üzerine etkileri ile ilgili çalışmaya rastlamadık.

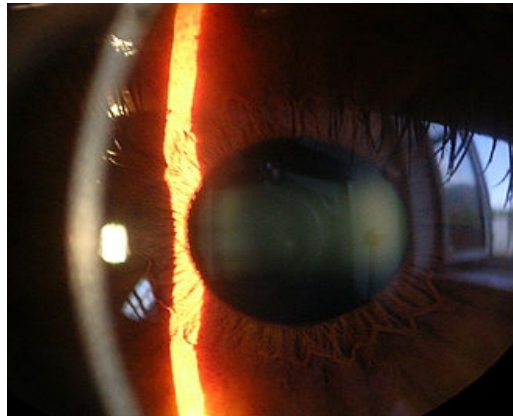
Bu çalışmada, ratlarda intrakameral karbakol'un korneada oksidatif stres ve apoptozise etkisini araştırmayı planladık.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kornea Anatomi

Kornea göz küresinin ön kısmında yer alan ve göz küresinin 1/6'sını oluşturan saydam, avasküler ve saat camı şeklinde bir dokudur (Fotoğraf 1). Korneanın %70'i su'dur. Devamlı olarak yenilenen epitelyal bir yüzeye sahiptir. Dış çevreye karşı bir bariyer oluşturur ve koruyucu rolü mevcuttur. Kornea insan gözünün toplam 58.60 diyoptri (D) olan kırma gücünün yaklaşık %74'ünü yani 43.25 D'sini oluşturur. Kornea ön kurvatürü yenidoğanda daha diktir. İlk 6 ayda 47.59 D olan kırma gücü, üç yaş civarında kırma gücü 42.69 D'ye iner ve stabil olur. Kornea ön yüzünün kırma gücü 48 D, arka yüzünün kırma gücü - 5,8 D'dir. Yenidoğan döneminde korneanın kırıcılık gücü +51 D ve dikey çapı 10 milimetre (mm)'dir. (7).



**Resim-1:** Yarıklı lamba biyomikroskopisinde kornea

### Boyutlar

Kornea ortalama 12.6 mm horizontal ve 11.7 mm vertikal boyutlarda avasküler bir dokudur. Ön yüz kurvatür yarıçapı 7,8 mm arka yüz ise 6,8 mm'dir (7). Kornea kalınlığı merkezde 540 mikronmetre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığındadır ve perifere doğru kalınlığı giderek artar (8).

### **2.1.1.1. Korneanın Beslenmesi**

Normal kornea kan damarlarından yoksundur. Beslenmesi ve metabolik ürünlerin uzaklaştırılması arka yüzeyde aköz hümör ve ön yüzeyde gözyaşı film tabakası tarafından sağlanır. Glukoz ihtiyacı ön kamara sıvısından ve difüzyonla limbal damarlardan sağlanırken, oksijen ihtiyacı ise kapaklar kapalı iken konjonktival damarlardan, kapaklar açıkken gözyaşı yoluyla atmosferden sağlanır. (8).

### **Korneanın İnnervasyonu**

Kornea her ikisi de trigeminal sinirin ilk dalından köken alan subepitelyal ve ve daha derinde yer alan stromal pleksus ile vucuttaki en yoğun innervasyona sahip olan dokudur (8).

### **Tabakalar**

Kornea anatomik olarak beş tabakadan oluşur (Şekil 1).

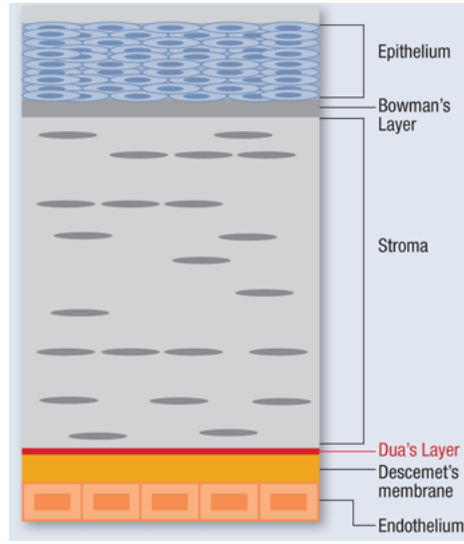
1-Epitel

2- Bowman tabakası

3- Stroma

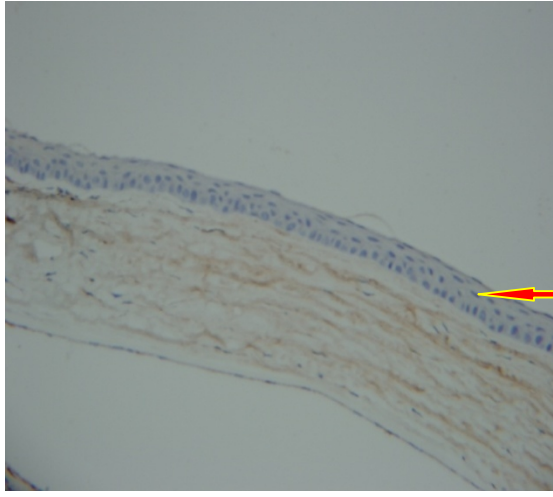
4-Descement membranı

5-Endotel



**Şekil-1:** Kornea tabakaları ve dua tabakası

**1-Epitel:** Kornea epiteli devamlı yenilenen 5-7 tabaka hücreden meydana gelir (Fotoğraf 2). Epitel gözyaşı film tabakası ile örtülüdür. Gözyaşı film tabakası dışta lipid, ortada aköz, en içte müsün tabakadan oluşmaktadır. Kornea epiteli dış çevreye karşı koruyucu bir bariyer oluşturur. Hücreler arası bağlantılar vasıtasıyla çevresel patojenlerin göze invazyonunu engeller. Korneanın ön yüzeyi yüzey ektoderminden köken almış keratinize olmayan stratifiye squamoz epitel içerir. Kornea kalınlığının %5'ini (50 µm) oluşturur. Santral korneal epitel 5-6 katlı hücre tabakasından oluşur. İnsan vücudundaki en düzenli stratifiye epitel tabakasıdır. Hücreler arasında intersellüler boşluk olmayacak şekilde sıkı bir şekilde düzenlenmiştir. Komşu yüzeyel epitelyal hücreler su geçirgenliğine bariyer oluşturan zonula okludenslerle birbirine bağlıdır. Kornea epitelinin en yüzeyde bulunan iki tabaka hücresi yassılaştırmıştır. Yüzey epitelyum hücreleri mikroplika olarak adlandırılan ön yüze sahiptirler. Yüzeydeki epitel hücrelerinin sitoplazmaları relatif olarak organelden yoksundur ama hücre çekirdeği korunmuştur (7) .



Yüzeyel Epitel hücreleri

**Resim-1:** Sham grubundaki rat korneası (yüzeyel epitel hücreleri )

Sadece bazal hücreler mitoz yeteneğine sahiptir. Limbustaki bazal epitele yerleşmiş olan kök hücreleri bazal hücrelerin sürekli çoğalmasını, merkeze ve yüzeye doğru hücrelerin ilerlemesini ve yüzeyel tabaka oluşumunu sağlarlar (7). Yüzeyel hücreler olgunlaştıkça mikrovilluslar ile kaplanır ve daha sonra dökülürler. Bu süreç 7-14 gün kadardır. Kornea epitel tabakası içerisinde nonepitelyal hücrelerde vardır. Gezgini histositler, makrofajlar, lenfositler ve pigmente melanositler periferal korneanın en sık rastlanan elemanlarıdır. Langerhans hücreleri de tanımlanmıştır. Fonksiyonları bilinmemektedir (7).

Kornea epiteli aşağıdaki tabakalardan oluşur.

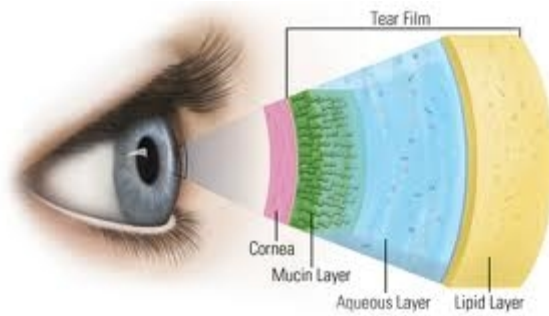
- **Bazal kolumnar hücreler:** Kornea epitelinin en derininde bazal membran yer alır. Tek katlı silindirik yapıdadır. Epitelde bazal kolumnar hücre tabakası hemidesmosomlarla bazal membrana (bazal lamina), desmozomlarla ise çevredeki hücrelere tutunur. Bazal hücreler elektron mikroskopi altında yüzeyde lamina lucida derinde lamina densadan oluştuğu görülen bazal laminayı salgılar. Kornea epiteli bazal membranının pek çok görevi vardır. Epitelin yapısal bir desteğidir. Hücre bölünmesini sağlar. Hücre tutunmasında, proliferasyonunda ve differansiasyonunda fonksiyon görür. Bazal membran proteoglikan ve glikoproteininden zengindir. Bu dokunun iki büyük içeriği tip 4 kollajen ve laminindir.

Fibronektin birikintileri de bulunur. Bazal membran hayat boyu değişime uğrar ve yaşlanmayla kalınlaşır (7).

- **Kanatsız hücreler:** Yüzeyel tabakanın altında İki ya da üç sıra kanatsız hücrelerden oluşurlar. Buradaki hücreler bazal silindirik hücreler ile yüzeydeki yassılaştırmış hücreler arasında geçiş hücreleridir (7) .

- **Yüzeyel hücreler:** 2-3 sıra uzun ve ince poligonal hücrelerden oluşur. Epitelin en yüzeyel iki tabakası yassılaştırmıştır ve yüzeyde de mikropilika olarak adlandırılan katlantılar yapan hücreler içerir (7). Bu da müsinin yapışmasını artırır. Yüzeyel hücreler desmozomlarla birbirlerine sıkı bir şekilde bağlanmıştır. Bu şekilde mikroorganizmaların, suyun ve elektrolitlerin korneaya girmesi engellenir. Yüzeyel hücreler mikrovilluslar ile kaplanarak olgunlaşır ve daha sonra gözyaşına dökülürler. Yenilenme kapasitesi çok iyi olduğu için epitel hasarında korneada skar oluşmaz.

Yüzeyel kornea epitel hücrelerinin apikal yüzeyleri mikropilika ve mikrovillus nedeniyle oldukça düzensizdir. Bu korneal yüzey gözyaşı film tabakası tarafından optik olarak düzgün bir yüzey haline gelir (Şekil 2) (7) .

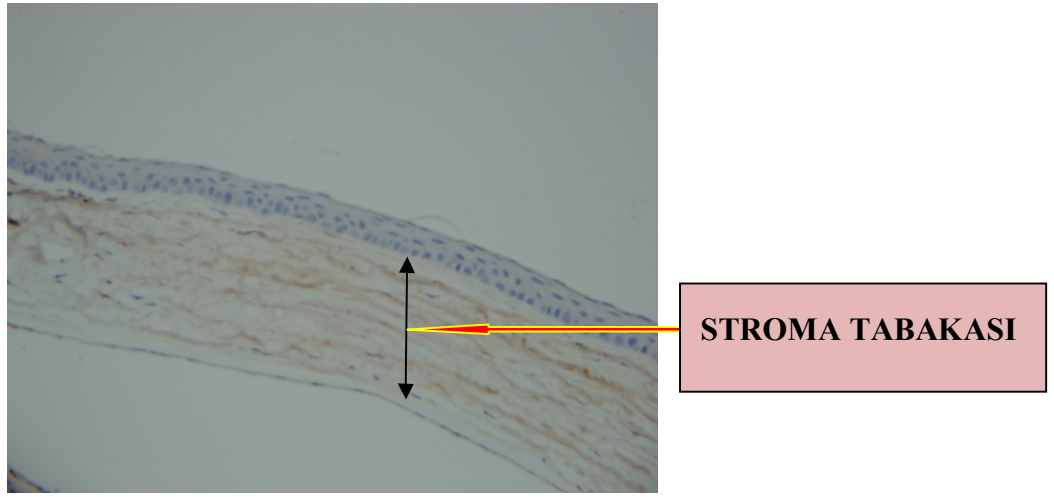


Şekil-2: Gözyaşı film tabakası

• **Epitelyal kök hücreler:** Kornea epitel hücreleri yaşlanınca değişime uğrar ve apoptozis veya dökülme ile uzaklaştırılır. Sadece bazal hücreler mitoz yeteneğine sahiptir. Limbusta epitelin bazal tabakasına yerleşmiş olan kök hücreleri, bazal hücrelerin sürekli çoğalmasını, merkeze ve yüzeye doğru hücrelerin ilerlemesini ve yüzeyel tabaka oluşumunu sağlar. Esas olarak üst ve alt limbusta muhtemelen Vogt palisadlarının içinde bulunurlar. Bunlar aynı zamanda konjoktival dokunun kornea üzerine ilerlemesine engel olarak birleşim yerinde bariyer görevi görürler. Limbal kök hücre yetmezliği; kronik epitel defektleri, konjoktiva epitelinin kornea üzerine ilerlemesi (konjoktivalizasyon) ve vaskülarizasyona neden olur (8).

**Bowman tabakası:** Stromanın kollajen liflerinden oluşan hücreden yoksun tabakasıdır. Sinir akson sonlanmaları dışında asellüler bir yapıdır. Ön yüzey birçok por ihtiva etmektedir. Bu porlar sinirlerin geçişini sağlamaktadır (9). Descement tabakasından farklı olarak hasarlanmadan sonra yenilenemediğinden skar dokusu ile opak hale gelir (7).

**Stroma:** Kornea kalınlığının % 90'ını ve yaklaşık olarak 450 ( $\mu\text{m}$ ) oluşturur. Korneanın optik ve mekanik özellikleri doğrudan stromal makromoleküler komponentlerle ilişkilidir (Fotoğraf 3). Stromadaki kollajen lifleri arasındaki boşluk, proteoglikan zemin maddesi (kondroitin sülfat ve keratan sülfat) ile aralara dağılmış keratositler tarafından oluşturulur. Keratositler uzun ve yassı olup korneada yaygın olarak bulunurlar. Kollajen ve mukoprotein sentezinden sorumludurlar. Yaralanmalarda fibrositlere dönüşürler. Stoplazmalarında bulunan glikojen granülleri korneanın enerji deposunu oluşturur (7). Kollajenin muntazam ve aralıklı diziliminin idamesi optik saydamlık açısından kritik önem taşır. Stromanında rejenerasyon kapasitesi yoktur (8).



**Resim-2:** Sham grubundaki rat korneası (stroma tabakası)

**Dua Tabakası:** İngiltere'nin Nottingham Üniversitesi'nde 31 insan donör korneası ile yapılan çalışmada korneada yeni bir tabaka keşfedildi.

Profesör Harminder Dua tarafından keşfedildiğinden dolayı Dua tabakası olarak adlandırıldı. Yeni bulunan Dua tabakası, kornea stroması ile desme membranı arasında bulunuyor. Kalınlığı 15 mikron olan son derece dayanıklı olan Dua tabakası 1,5-2 bar basınca direnç gösterebiliyor (10).

**Descement membranı:** Arka stroma ve endotel arasında endotelden köken alan özelleşmiş bir bazal membrandır. Desme membranı kornea endotelinin bazal membrandır. Stromal kollajenden ayrık yapıda ince kafes işi (lattice work) yerleşimli kollajen liflerinden oluşan bir tabakadır. Bantlı ve bantsız olmak üzere 2 tabakadan meydana gelir. Bantlı bölge intrauterin dönemde gelişir ve önde yer alır. Kollajen lifler ve glikoproteinlerden oluşur. Bantsız bölge ise endotel tarafından salgılanır. Endotel için modifiye bazal membran görevi yapar. Rejenerasyon kapasitesi mevcuttur (8). Periferal korneadaki descement membranı çıkıntıları Hassal-Henle cisimcikleri olarak bilinir ve sıklıkla yaşlılarda izlenir. Desme zarı limbusta sonlanır ve iridokorneal açıda Schwalbe çizgisini oluşturur (7).

**Endotel:** Kornea endoteli tek sıralı çoğunlukla hegzagonal hücrelerden oluşur. Kornea endotelinin nöral kresten köken aldığı gösterilmiştir. Bariyer fonksiyonunun temeli endotelyal hücreler arasındaki sıkı (tight junction) ve aralıklı (gap junction) bağlantılarıdır. Bu hücrelerin apikal yüzeyi ön kamarada, bazal yüzeyleri descement membranındadır. Kornea endotelyumu normal korneal hidrasyon, kalınlık ve geçirgenliğin korunması için esastır. Endotel hücreleri fazla sıvıyı stroma dışına pompalayarak korneanın saydamlığını sağlar. Speküler mikroskopide erişkin hücre yoğunluğu 2800 hücre mm<sup>2</sup> civarındadır. Ortalama 400.000-500.000 hücreden oluşur (7). Endotel hücrelerinin rejenerasyon kapasitesi yoktur. Hücre sayısı ortalama yılda %0.06 düşer. Komşu hücreler boşluğu kapatmak amacıyla genişler. Ortalama hücre sayısı 500 hücre/mm<sup>2</sup> ye düştüğünde korneal ödem gelişir ve saydamlık bozulur (8). Endotel hücrelerinin dış tabakalarında sodyum potasyum adenin trifosfataz (Na-K ATPaz) pompaları yer alır. Cerrahiden, yüksek göz içi basıncından, hastalık veya diğer nedenlerden dolayı endotel hücreleri harab olabilir. Bu durum hücre dansitesinde azalma, endotelyal dekompanasyon, ödem ve kornea bulanıklığı ile sonuçlanacaktır (7).

## 2.2. Karbakol

Miyotik olarak adlandırılan parasempatomimetik ajanlar 100 yıldan daha fazla süredir glokom tedavisinde kullanılmaktadır.

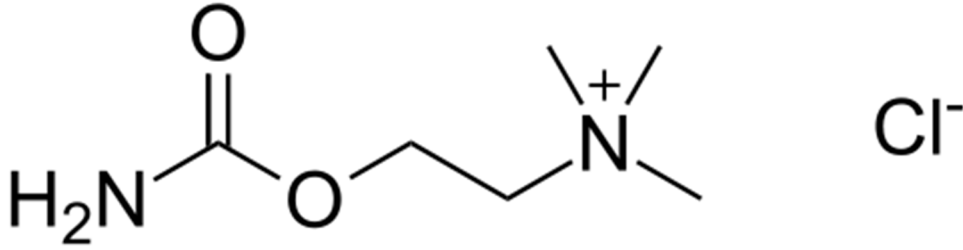
Parasempatomimetikler iki gruba ayrılırlar.

1. Direkt etkili kolinerjik ajanlar
2. İndirekt etkili antikolinesterazlar

Asetil kolin gibi direkt etkili ajanlar somatik, otonomik ve santral sinir sisteminde postgangliyonik, parasempatik kavşakta ise motor son plak üzerinden etki ederler. İndirekt etkili ajanlar ise asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek doğal salgılanan asetil kolinin etkisini artırır ve uzatır. Pilocarpin en sık kullanılan direkt etkili ajandır. Karbakol primer direkt etkili ajan olmasına rağmen, direkt ve indirekt etkisi bulunmaktadır. Direkt ve indirekt etkili ajanlar longitudinal silier kası kasılması ve skleral mahmuzun çekilmesi sonucu trabeküler ağdan aköz humorün çıkışını artırması ile GİB'ını azaltırlar. Bu ajanlar GİB'ı %15-25 oranında azaltırlar (11).



Miyotik ilaçlar, günümüzde birçok cerrah tarafından intraoküler cerrahilerde kullanılmaktadır. Miyotiklerden 1% asetilkolin ve 0.01% karbakol oküler cerrahilerde intrakameral olarak kullanılmaktadır. Asetilkolin, asetilkolin transferaz enzimi ile hızlı bir şekilde yıkılır. Dolayısıyla etkisi kısa sürelidir. Karbakolde ise asetil grubu olmadığı için asetilkolin esteraza ve nonspesifik esterazlara daha dirençlidir (Şekil 3). Bundan dolayı asetilkoline göre etki süresi daha uzundur. İlaç etkisinin uzun sürmesi istendiği durumlarda asetilkoline tercih edilmektedir (3).



Şekil-3: Karbakolün kimyasal yapısı:

2-[(Aminocarbonyl)oxy]-N,N,N-trimethylethanaminium chloride

Karbakol, muskarinik ve nikotinik reseptörleri uyaran kolinerjik bir ajandır. Oftalmolojide özellikle glokom olmak üzere birçok kullanım alanı mevcuttur. Genellikle damla olarak kullanılmakla birlikte oftalmik cerrahi sırasında intraoküler olarakta kullanılmaktadır. Karbakol kan beyin bariyerini geçmez. Karbakol kolinesterazlar tarafından kolay metabolize edilemez. Topikal uygulama sonrası 4-8 saat intraoküler uygulama sonrası 24 saatte metabolize olmaktadır. Topikal ve intraoküler karbakolün primer etkisi miyozis ve aköz hümör akışının artmasıdır (12).

Miyotiklerin ön segment cerrahisi sırasında kullanımı ile elde edilen avantajlar arasında; intrakapsüler katarakt ekstraksiyonu sonrası vitreus yüz koruması, iris inkarserasyonunun önlenmesi, ön kamaraya lens takılmasının kolaylaştırması, postoperatif periferik anterior sineşi sıklığında azalma sayılabilir (13). Katarakt cerrahisi sonrası erken dönemde geçici ancak ciddi göz içi basınç yükselmeleri meydana gelmektedir. GİB özellikle ameliyat sonrası ilk 3-8 saatte yükselerek 24-48 saat içinde ameliyat öncesi değerlere ulaşmaktadır (1). Özellikle glokomlu ve psödoeksfolyasyonlu hastalarda GİB artışının daha fazla ve daha zarar verici olduğu gösterilmiştir (14). Katarakt cerrahisi sonrası GİB artışında

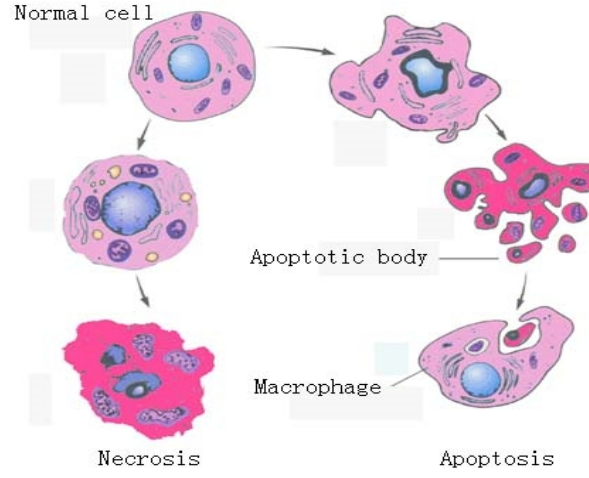
viskoelastik maddeler, intraoküler lens, kan veya pigment tarafından trabeküler ağın tıkanması, sütürasyon sırasında açı deformasyonu ve enflamasyon gibi birçok etken sorumlu olabilir (15). Cerrahi sırasında GİB artışı cerrahi sonrasında ağrı, kornea ödemi, anterior iskemik optik nöropati, optik atrofi, glokomlu hastalarda daha fazla olmak üzere görme alanı kayıpları, atonik pupilla, kistoid maküler ödem, retinal arter ve ven tıkanıklıkları, geçikmiş yara iyileşmesine yol açabilmektedir (1). İntraoküler cerrahilerden özellikle de katarakt cerrahisinden sonra GİB artışını önlemek için topikal ve sistemik tedavilere alternatif olarak intrakameral karbakol kullanılmaktadır.

Miyotiklerin birçok yan etkisi bulunmaktadır. Tüm kolinerjikler ortak yan etki olarak silier kas kasılması sonucu miyopi yaparlar. Kaş ağrısı, silier spazma eşlik edebilir. Miyozis lens kesafeti olan kişilerde loş ışıkta görmeyi engeller. Miyotikler retina dekolmanı yapabilirler. Dolayısıyla tedavi başlangıcında periferik retinanın değerlendirilmesi gereklidir. Özellikle indirekt etkili miyotikler katarakt yapabilirler. Çocuklarda iriste pigment epitelyum kist oluşumunu indükleyebilirler. Bu ajanlar direkt lakrimal uyarı ve punktum stenozu sonucu epiforaya neden olabilir. Bu ilaçlar ilaca bağlı psödopemfigoidle sonuçlanan oküler yüzey değişiklikleri yapabilirler. Diğer potensiyel yan etkileri cerrahi sırasında kanamanın artması ve cerrahi sonrasında inflamasyon artışı ve ciddi fibrinöz iridosiklit yapabilmeleridir. Çünkü miyotikler kan- aköz bariyerini bozarlar. Üveitik glokomda kullanımlar sınırlıdır. Sistemik yan etkileri esas olarak indirekt etkili ajanlara bağlıdır. Diare, abdominal kramp, salgı artışı, bronkospazm ve enürezis sistemik yan etkileri arasındadır. Miyotikler paradoksal açı kapanması sonucu pupiller blok yapabilirler (11).

### **2.3. Apoptozis**

Hücre ölümü, 2 temel mekanizma olan nekroz ve apoptozis ile gerçekleşmektedir (Şekil 4). Nekroz, iskemi, hipertermi, fiziksel veya kimyasal bir travma gibi şiddetli bir hasarın yol açtığı hücre ölümüdür. Esas hasar gören organel hücre zarıdır bunun sonucunda osmotik basıncı dengelenemez hale gelir. Sonuçta hücre şişer ve parçalanır. Bu şekilde hücre ölümü her zaman patolojiktir (16).

Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılara sekonder olarak gerçekleşen genetik kontrol altında olan programlanmış hücre ölümüdür (6). Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar Tablo-1’de özetlenmiştir.



Şekil-4: Apoptozis ve nekroz

<b>APOPTOZİS VE NEKROZ FARKLARI</b>	
<b>MORFOLOJİK KRİTERLER</b>	
<b>APOPTOZİS</b>	<b>NEKROZ</b>
Tek hücre ölümü	Bir grub hücre ölümü
Membran intakt, zeiosis	Membran hasarı
Hücre büzüşmesi, apoptotik cisimcikler	Hücre şişmesi
Enflamasyon yok	Enflamasyon var
Komşu hücre tarafından fagositoz	Makrofajlar tarafından fagositoz
Lizozomlar intakt	Lizozomal sızıntı
Kresentik kromatin kondansasyonu	Düzensiz kromatin kondansasyonu
<b>BİYOKİMYASAL KRİTERLER</b>	
Enerji bağımlı	Enerji bağımlı değil
Makromolekül sentezi var	Makromolekül sentezi yok
De novo gen transkripsiyonu	Yeni gen transkripsiyonu
internkleozomal DNA fragmentasyonu	DNA'nın düzensiz yıkımı
Fizyolojik/ patolojik	Her zaman patolojik

Tablo-1: Apoptozis ve nekroz farkları

Apoptozis terimi literatürde 1972 yılında Kerr JF ve ark. tarafından programlı hücre ölümü için kullanılmıştır (17). Apoptoz aslında çok hücreli organizmaların dokularda gelişme, homeostaz ve yara iyileşmesi sırasında meydana gelen bir temel süreçtir (18).

Apoptozis canlı organizmada görevini tamamlamış veya hasara uğramış hücrelerin çevredeki diğer hücre ve yapılara zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozis’de hücre içi veya çevresel kaynaklı ölüm sinyalleri sonucunda apoptotik mekanizma aktive olur. Sonuçta DNA kırılması oluşur. Apoptozis’de hücreler apoptotik cisimlere ayrılması sonucunda çevre hücreler tarafından fagosite edilirler. Canlılarda apoptozis, embriyogenez, büyüme ve gelişme, hemostaz, rejenerasyon ve tamirde, organların hacimlerinin korunması ve organların patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır (19). Apoptozis, embriyogenez ve doku hemostazı gibi fizyolojik durumlara ilaveten iskemi, toksisite ve neoplazik değişiklikler ile de ortaya çıkarabilir. Apoptozis p53, Bcl-2 gibi onkogenler tarafından regüle edilir. Apoptozis oftalmolojide retinoblastom, glokom, katarakt, retina dekolmanı, keratokonus ve bazı göz hastalıklarının patogenezinde rol oynadığı için apoptozise neden olan ve apoptozisi kontrol eden mekanizmaların anlaşılması tedavi çabalarına katkıda bulunacaktır (20).

Apoptozis korneal dokunun proliferasyonunda, gelişmesinde, hemostazisinde ve yara iyileşmesinde kritik rol oynamaktadır. Korneal epitel yaralanmasından sonra kornea stroma ve epitel arasındaki keratositlerde apoptozis tespit edilmiştir. Korneal yaralanmadan sonra anterior stromada keratositlerin yok olması apoptozis ile açıklanır (18).

Apoptozisin üç temel adımı vardır

- 1) Hücre ölümünü indükleyen bir uyarın (fizyolojik veya patolojik)
- 2) Hücre içinde mevcut olan endojen ölüm mekanizmasının aktivasyonu
- 3) Hücrenin fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılması (21).

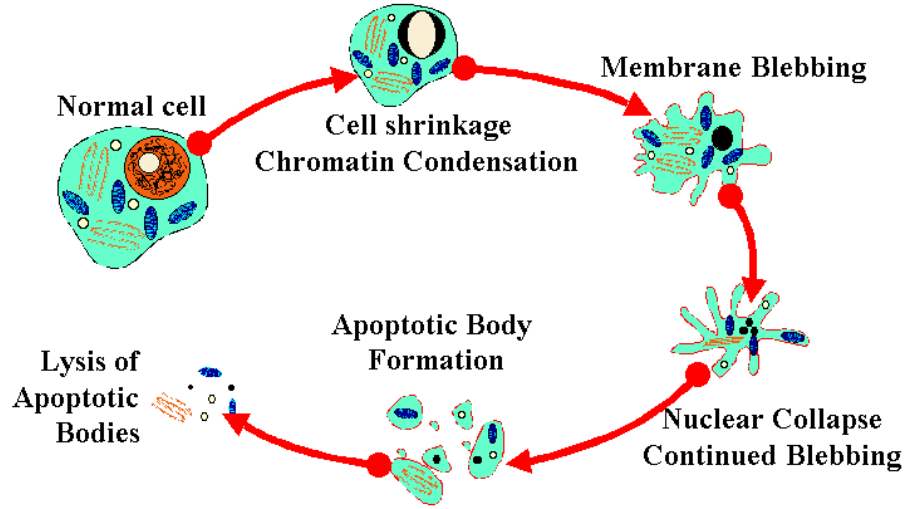
## **Apoptozis Morfolojisi**

Apoptozis süreci morfolojik olarak belirli adımları izlemektedir.

Genellikle tek hücre ya da hücre grublarını kapsayan apoptozis hematoksilen/eozin ile boyanmış kesitlerde koyu euzonofilik sitoplazmalı yuvarlak veya oval kitleler şeklinde görülür. Nükleer kromatin yoğunlaşmış ve periferde nükleer membran altında iyi sınırlı kitleler halinde kümeleşmiştir (22).

İlk olarak dezmozom gibi hücrelerarası bağlantıların kopması sonucu apoptotik hücre diğer komşu hücrelerden ayrılır. Bundan sonra hücre büzüşmeye başlar. Hücre içi suyun hücre dışı ortama transportu sonucunda sitoplazma küçülür ve hücre dansitesi artar. Bu sırada hücre içi organellerin çoğu intaktır. Aynı zamanda nükleer kromatin de kondanse olur ve nükleer zar altında tipik kresentik tarzda yoğunlaşır. Bundan sonra hücre zarında ameboid uzantılar gelişir (zeiosis). En sonunda ise hücrenin fragmantasyonu gerçekleşir ve apoptotik cisimcikler oluşur. Çevredeki hücreler ve makrofajlar ortaya çıkan apoptotik cisimcikleri reseptör bağımlı mekanizma ile fagosite ederler (Şekil 5) (23). Apoptotik süreç hızlıdır ve yaklaşık 3-4 saat içinde hücre ortamdan kaybolur. Apoptoziste hücrelerden dış ortama hücre içi elemanlar sızmadığından dolayı enflamasyon oluşmaz. Dolayısıyla apoptotik hücre ölümü çevre hücrelere zarar vermez ve skar oluşumuna yol açmaz (16). Ayrıca apoptozis iltihabi reaksiyon oluşturmadığından dolayı tanınması güçleşir (22).

## Apoptosis (Programmed Cell Death)



Şekil-5: Apoptozis morfolojisi

### Apoptozisin biyokimyasal kriterleri

Apoptoziste gerçekleşen önemli biyokimyasal olaylar vardır (24). Apoptozis enerji bağımlı aktif bir olaydır. Nekroz ise enerji bağımlı değildir. Apoptotik hücrelerde RNA ve protein sentezi de olmaktadır. Apoptoziste hücre içi kalsiyum (Ca) artışı sonucunda önemli enzim sistemleri aktive olmaktadır. Bu aktivasyon sonucu hücre içi su ve iyonlar dış ortama transport olmakta ve bunun sonucunda hücre kondanse olmaktadır. Biyokimyasal değişiklikler içinde apoptozis için en karakteristik olanı kromatinin internükleozomal fragmentasyonudur. Bundan sorumlu enzim ise Ca - Mg bağımlı endonükleazdır (25). Diğer önemli olan enzim ise kalsiyum bağımlı transglutaminaz enzimidir. Bu enzim proteinlerde çapraz bağlar oluşturularak apoptotik cisimciklerin dış ortama sızıntı olmasını engeller (23). Apoptotik hücrelerde immatür glikanlar gibi moleküller reseptör bağımlı fagositoz için apoptotik hücrelerin yüzeyinde reseptör görevi görürler (16).

## **Kaspazlar**

Kaspazlar apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kaspazın açılımı; "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs (KASPAZ) şeklindedir (26). Yani Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden kesen sistein proteazlardır. Aktive olduğu zaman nükleer DNA'nın parçalanmasından sorumludur. Tüm kaspazlar proteolitik enzim olarak sentezlenir (27).

Deneysel çalışmalarda kaspazların herhangi birinin varlığının hücrel apoptozise neden olması normal şartlarda kaspazların sıkıca kontrol edilmesi gerektiğini gösterir. Bir veya daha fazla kaspaz enzim aktivasyonu kaçınılmaz olarak apoptozisle sonuçlanacak diğer proteazların aktivasyonuna yol açtığı düşünülür (22).

Apoptozisin genetik kontrolü ile ilgili bilgilerin çoğu *Caenorhabditis elegans* nematodundan elde edilmiştir (28). *Caenorhabditis elegans*'da apoptozisle ilgili üç tür gen bulunmuştur. Bunlar ced-3 geni, ced-4 geni ve ced-9 genidir. Ced-3 ve ced-4 geni apoptotik genler iken ced-9 geni ise apoptozisi inhibe eden bir genidir (29). Kaspazların *Caenorhabditis elegans* nematodunun ced-3 geninin, aktif merkezinde sistein taşıyan ve proteinlerin aspartik asit rezidülerinin karboksil terminal ucundan kesen bir proteazı kodladığı anlaşılmıştır (27). Daha sonra kaspaz ailesinden diğer proteazlar da tespit edilmiştir. Bu enzimler normalde hücrede mevcuttur ancak hücre içindeki aktivasyonları aktif olarak inhibe edilmektedir. Bu aktif inhibisyonun bcl-2 sorumludur. Diğer taraftan bax geni kaspaz aktivasyonunu arttırarak apoptozisi aktive etmektedir. Kaspazların aktivasyonu apoptozis sürecindeki terminal olaydır. Kaspazlar pekçok hücre içi proteini (aktin, lamin, retinoblastom proteini gibi) yıkıma uğratırlar (16).

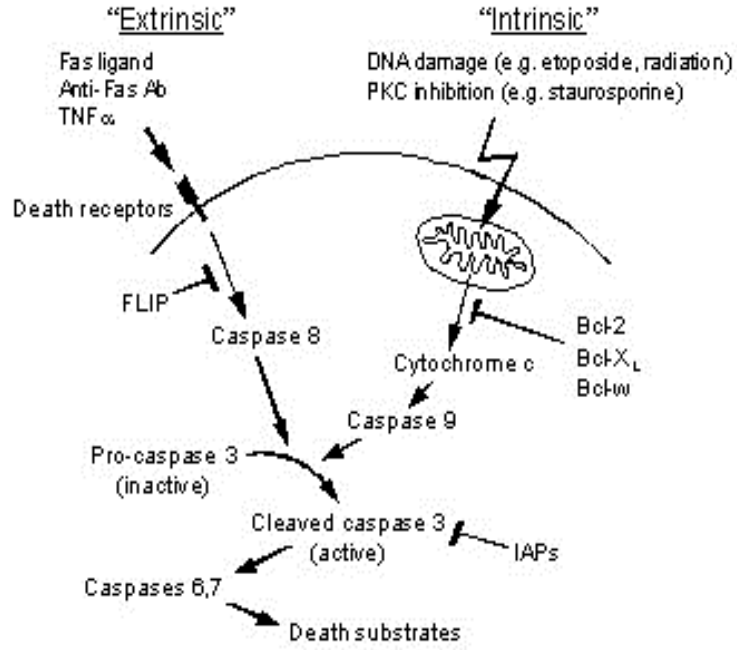
Kaspazlar immunolojik fonksiyonlar, çoğalma, hücre göçü ve organizasyonunda rol alırlar. Kaspazlar ayrıca çeşitli düzenleyici faktörlerin salgılanmasında rol alırlar. Kaspazlar hücrenin olgunlaşması ve rekonstrüksiyonunun yanında yaşlı hücrelerde apoptozisi başlatan hücrelerin kalitesi ve sayısından sorumludur. Kaspazlar çeşitli proapoptotik ve proenflamatuar sinyallere cevap olarak aktif hale gelirler. Kaspaz aktivasyonu apoptoziste kritik önemde rol oynar.

## **Apoptoziste iki ana yol vardır**

**1- İntrensek yol:** İntrensek yolda apoptozisin uyarılması mitokondri dış membran geçirgenliğini arttırır. Hücre ölümüne neden olan apoptotik moleküller salınır veya hücre için gerekli olan mitokondrial enerji üretimi azalır. Mitokondriden sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınması sonucu kaspaz kaskadı aktive olur. Sitolitik sitokrom-c apoptosom olarak bilinen Apoptozis Proteaz Aktive edici Faktör 1 (APAF-1) ve prokaspaz-9'dan oluşan ölüm aktive edici kompleksini aktive eder. Apoptosomla birlikte kaspaz-9 aktive olur. İntrensek yol hücrel hemostazis, oksidatif stress, büyüme faktörü eksikliği, iyonize radyasyon ve toksik ajanlar gibi çeşitli uyanlarla aktive olur. Mitokondrial bütünlüğün kaybı intrensek yolda anahtar rol oynamaktadır. Mitokondrial iç ve dış membran arasında geçiş porları meydana gelir. Porların oluşumu sonucu Kalsiyum, magnezyum, hidrojen iyonları seviyesi, lokalize ADP/ATP konsantrasyonu, mitokondriyal membran potansiyeli ve Bcl-2 kompleksi fonksiyonu etkilenir. Porların açılması sonucu proapoptotik Bcl proteinleri, reaktif oksijen molekülleri, iç mitokondrial membran geçirgenliğinin artmasıyla 1.5 kDa kadar olan iyon ve moleküllerin geçişi, ATP üretimi için gerekli transmembran potansiyel kaybı gerçekleşir. Porların açılması mitokondri matriksinin şişmesine neden olan su girişine neden olur. Dış membranın yırtılması mitokondri intermembranöz boşluğa serbest proteinlerin salınmasına neden olur. Sitoplazmaya salınan tüm moleküller apoptoziste hücre için hayati olan kaspazların aktivasyonuna neden olur.

Sitokrom-c nin intermembranöz boşluğa salınması kaspaz aktivasyonu için ana olaydır. Öncelikle sitoplazmada sitokrom-c adaptör moleküllere ve Apaf-1'e bağlanır ve aktive olur. ATP ve sitokrom-c varlığında prokaspaz-9'u içeren apoptosom olarak adlandırılan mitokondrial ölüm uyarıcı sinyal kompleksi aktive olur. Apoptosome kaspaz-3,6,7'yi aktive eden kaspaz-9'u aktive eder (Şekil 6) (30).



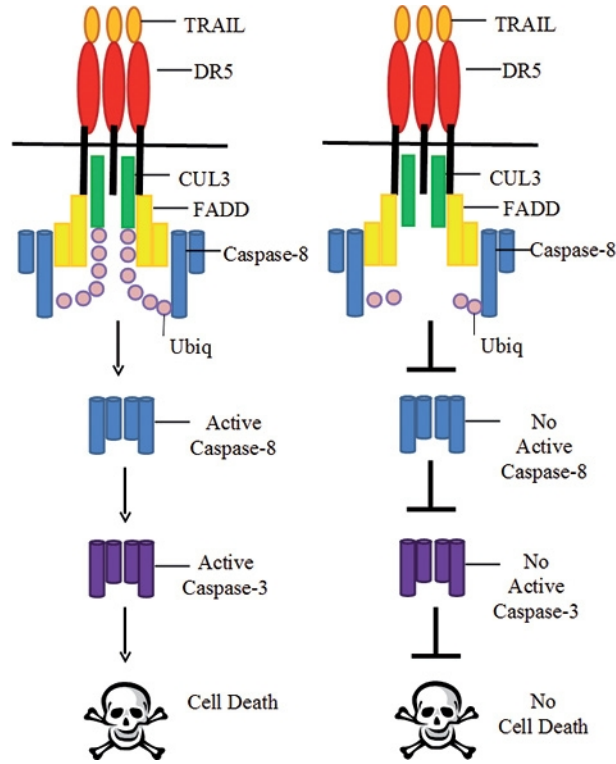


Şekil-6: Apoptoziste intrensek ve ekstrensek yol

**Ekstrensek yol:** Apoptozisteki ekstrensek yola hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılık eder. 8 tane ölüm reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar tümör nekroz faktör reseptör 1 (TNFR1), Fas, death reseptör 3 (DR3) ,TNF-related apoptosis-inducing ligand reseptör 1 (TRAILR1), TRAILR2, DR6, ectodysplasin A receptor (EDAR) ve sinir büyüme faktörü reseptörüdür. Ölüm reseptörlerinin uyarılması adaptör proteinler; Fas-associated death domain (FADD), TNFR-associated death domain (TRADD) proteinleri ve Kaspaz-8 den oluşan ölüm reseptör sinyal kompleksi oluşumunu sağlar (Şekil 7). Ölüm kompleksi oluştuğu zaman kaspaz 8 aktive olur. Kaspaz 8'in aktive olması diğer kaspaz-3, 6, 7'yi içeren kaspazların aktive olmasını sağlar. Ölüm ligandları hücre yüzeyindeki reseptörlere etkileşir. Fas ve TRAIL reseptörlerinin uyarılması benzer yolla ölüm reseptör sinyal kompleksini uyarır. Ölüm reseptör sinyal kompleksinin oluştuğu yolda apoptoziste merkezi rol oynayan kaspaz 8 aktive olur. Bir dizi reaksiyon sonucu ekstrensek yolda apoptozis gerçekleşir. (30)

Hücre içi sinyaller instrensek yolla apoptozisi indüklerken, hücre dışı sinyaller ekstrensek yol ile apoptozu indükler. Ekstrensek yol besin eksikliği, kimyasalların etkisi, psikolojik faktörler ve büyüme faktörlerinin yetersizliği, virüsler serbest radikaller, sitokin ve hormonlara cevap gibi birçok çeşitli yolla aktive olur. İntrensek yol ise hipoksi, anormal proteinlerin birikmesi büyüme faktörlerinin azalması sonucu onkojenler vasıtasıyla aktive olur. İntrensek yolda kaspaz aktivasyonu mitokondriye vasıtasıyla gerçekleştirilir. Kimyasal

uyarı, UV, radyasyon, gamma radyasyonu, büyüme faktörleri eksikliği dış mitokondri membranında permeabilite artışına yol açar ve özel yollarla intramembranöz alana sitokrom c salınımına yol açar. Sitokrom- c salınımı apoptosomun ilk evresidir. Pro-kaspaz-9 muhtemelen kaspaz-8 ile etkileşim sonucu aktive olur. Proinflamatuvar kaspazların düzenleyici mekanizması açık değildir. Kaspazlar hücre göçü, çoğalması, organizasyonu ve çeşitli düzenleyici faktörlerin sekresyonu gibi immunolojik rol oynarlar. (31)



Şekil-7: Apoptoziste Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 in rolü

## Apoptozis ve hastalıklar

Apoptozis birçok otoimmün, neoplastik ve dejeneratif oftalmik hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Apoptozis immün ve enflamatuvar olaylarda önemli rol oynar. Apoptozis muhtemelen immün cevapta ve gelişmede lenfositlerin seleksiyonu ve eliminasyonu için gereklidir. Apoptozis otoimmün hastalıklarda antikorların meydana gelmesinde de rol oynar. Sjogren sendromu, neoplazi, foliküler b hücreli lenfoma, Li-Fraumeni sendromu, meme kanseri, rabdomyosarkom gibi yumuşak doku kanserleri, skuamöz hücreli karsinom ve lenfoma gibi hastalıkların patogeneğinde apoptozis rol oynamaktadır.

Ayrıca apoptozis santral sinir sistemi, retina ve korneanın ( fuchs distrofi ve keratokonus) dejeneratif hastalıklarında rol oynamaktadır. Retinada nöronal hücrelerin ölümü ve retina dekolmanında apoptozis rol oynar. Enfalmasyon ve yara iyileşmesinde apoptozis rol oynar. Apoptozis ayrıca oküler hastalıklardan keratitis sika, otoimmün konjoktival skar, korneal allograft rezeksiyonu, Senil Maküler Dejenerasyon(SMD) ve proliferatif vitreoretinopati gibi hastalıklarda rol oynar (30).

## **2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem**

Oksijen canlılarda hayatın devam etmesi için önemli bir moleküldür. Ancak oksijenin vücutta kullanımını sırasında serbest radikaller olarak bilinen ve hücrenin lipid, protein ve DNA gibi bileşenlerine hasar veren reaktif ara metabolitler oluşmaktadır. Canlılarda oksijen metabolizması sonucu oluşan bu reaktif oksidan metabolitlerini ortadan kaldırmak ve hasar oluşumunu engellemek için çeşitli savunma mekanizmaları vardır. Bu savunma mekanizmalarına genel olarak antioksidan sistem olarak denir. (5).

### **2.4.1. Antioksidan Maddeler**

Oksidasyon, oksitleyici bir maddeden hidrojen veya elektronları transfer eden kimyasal bir reaksiyondur. Oksidasyon reaksiyonu serbest radikaller üretir. Bu serbest radikaller zincirleme reaksiyonları başlatır. Eğer zincirleme reaksiyon hücrede meydana gelirse hücre hasarı veya ölüme neden olabilir. Oksidanlara karşı vücudun ürettiği veya dışardan besin olarak alıp kullandığı oksidatif stresi azaltan maddeler antioksidan maddelerdir (Tablo 3).

ANTIOKSİDAN MADDELER	ÇÖZÜNÜRLÜK	İNSAN SERUMUNDAKİ KONSANTRASYONU( $\mu$ M)
ASKORBİK ASİT (VİT C)	SU	50 – 60
GLUTATYON	SU	4
LİİPOİK ASİT	SU	0.1 – 0.7
ÜRİK ASİT	SU	200 – 400
KAROTENLER	YAĞ	B-KAROTEN. 0.5-1 RETİNOL(VİT A):1-3
VİT E	YAĞ	10-40
KOENZİM Q	YAĞ	5

**Tablo-2:** Başlıca antioksidan maddeler

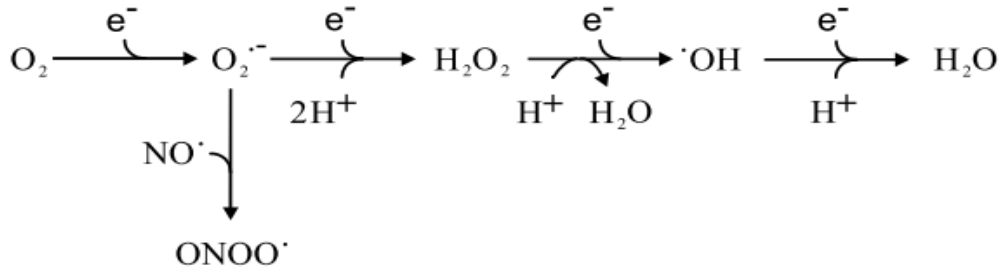
Antioksidanlar ortamdaki serbest radikalleri ortadan kaldırarak zincirleme reaksiyonları sonlandırır. Her ne kadar oksidasyon reaksiyonları yaşam için zaruri olsada bazen zararlı olabilmektedir. Glutatyon, vitamin A,C,E, katalaz, süperoksit dismutaz, çeşitli peroksidazlar gibi birçok antioksidan ajan bulunmaktadır. Antioksidanların yetersiz seviyesi veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu hücre hasarı veya hücre ölümüne neden olan oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres kanseride içeren birçok hastalığa neden olur (32).

Oksidatif stres reaktif oksijen metabolitlerinin etkileri ve biyolojik sistemdeki detoksifiye reaktif ara ürünlerin hasarı tamir etme kabiliyeti arasındaki dengesizliği yansıtır. Hücrelerdeki oksidasyon redüksiyon bozuklukları protein, lipid, DNA dahil olmak üzere hücrenin bütün bileşenlerine peroksidaz ve serbest radikal üretimi ile toksik etki eder. Ayrıca bazı reaktif oksijen metabolitleri oksidasyon redüksiyon olaylarında hücre içi haberci gibi hareket eder. Böylece oksidatif stres normal hücre içi sinyal iletiminde bozulmalara neden olabilir. İnsanda oksidatif stres kanser, Parkinson, Alzheimer, ateroskleroz, kalp hastalığı, miyokardial infarktüs, fragil x sendromu, orak hücreli anemi, liken planus, kronik yorgunluk sendromu gibi birçok sistemik duruma neden olabilir. Reaktif oksijen metabolitleri, immun sistemde patojenlerin öldürülmesinde faydaları da vardır (5). Fakat oksidatif stresin fazla olması, antioksidanların yetersiz seviyesi veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu hücre hasarı veya hücre ölümüne neden olur (32).

Kimyasal olarak oksidatif stres okside edici metabolitlerin üretiminin artması ve glutatyon gibi antioksidan koruyucu maddelerin etkinliğinin azalması ile ilişkilidir. Oksidatif stres apoptozisi tetikleyebilirken, daha şiddetli oksidatif stres hücre ölümüne neden olabilir. (5)

#### 2.4.2. Reaktif Oksijen Metabolitleri

Reaktif oksijen metabolitleri organizmada metabolik ve fizyolojik süreç sonucunda üretilir. Canlıda zararlı oksidatif reaksiyonlar enzimatik ve nonenzimatik antioksidatif mekanizmaların ortadan kalkması sonucu ortaya çıkar (Şekil 8). Sonuç olarak oksidatif stres 100 den fazla hastalığın gelişmesinden sorumludur. Antioksidan moleküller, reaktif oksijen metabolitlerinin neden olduğu zararlı reaksiyonları önlerler (33).



**Şekil-8:** Reaktif oksijen moleküllerinin oluşumu

Vücutta oksijenin kullanımı sırasında ortaya çıkan ve hücrenin yapıtaşlarına zarar veren, aynı zamanda da vücut savunmasında rol oynayan bileşikler özetle Tablo 3'de özetlenmiştir (5).

Maddenin Adı	Formülü	Açıklama
<b>Süperoksit Anyonu</b>	$O_2^-$	Elektron transport sisteminde veya otoksidasyonla oluşur. $O_2$ 'nin bir elektron kaybetmiş formudur. Kendiliğinden veya enzimatik olarak $H_2O_2$ 'ye dönüşür. Hidroksil radikalının öncülüdür. Genellikle reaktif değildir.
<b>Hidrojen Peroksit</b>	$H_2O_2$	İki elektron kaybetmiş formdur. Süperoksit anyonundan veya direkt olarak oksijenden oluşur. Yağda çözünür ve membranları geçebilir.
<b>Hidroksil Radikali</b>	-OH	Üç elektron kaybetmiş formdur. Fenton reaksiyonu sonrası oluşur. Son derece reaktiftir. Çoğu hücre bileşeni ile etkileşime girebilir.
<b>Organik Hidroperoksit</b>	ROOH	Reaktif oksijen moleküllerinin lipid ve nükleik asitler gibi hücre elemanlarıyla oluşturduğu bileşik
<b>Alkoksil ve Peroksil Radikali</b>	RO-ve ROO-	Oksijen merkezli organik radikal
<b>Hipokloröz Asit</b>	HOCl	Miyeloperoksidaz tarafından hidrojen peroksitten oluşturulur. Yağda çözünür ve membranları geçebilir. Tiyol, amino gibi protein gruplarını ve metiyonin okside edebilir.
<b>Peroksinitrit</b>	ONOO-	Oksijen – nitrojen serbest radikalidir. HOCl gibi özellikleri vardır. Proton alarak peroksinitröz asidi o da nitrojen dioksit ve hidroksil radikalini oluşturur.

**Tablo-3:** Reaktif oksijen ürünleri

### 2.4.3. Total Oksidatif Stres (TOS)

Total oksidatif stresin göstergesidir. Oksidatif stres ve serbest oksijen radikalleri organizmada hücre ve dokularda hasara neden olur. Serum veya plazmadaki farklı oksidan maddelerin ölçümü laboratuvarında ayrı ayrı yapılabilir. Bu şekilde ayrı ayrı ölçüm yapmak uzun zaman gerektiren, pahalı ve komplike metodlar gerektirir. Farklı oksidan maddelerin ayrı ayrı ölçümü pratik değildir. TOS düzeyi için birkaç farklı kolorimetrik metod geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin hiçbiri pratik değildir ve büyük analitik ve teknik problemler

içermektedir. Erel tarafından geliştirilen yeni yöntem TOS ölçümünde kolay, uygulanabilir, hasas ve pahalı olmayan pratik bir yöntemdir. Bu yeni metotla biyolojik sıvılar, serum, plazma, semen plazma, lipoprotein içeren örnekler, serebrospinal, plevral sıvılar, idrar, oksidanların heterojenöz çözeltilerinde, içecekler ve meyve suları gibi birçok örnekte ölçüm yapılabilir (34).

Örnekte bulunan oksidanlar ferrous ion-o-dianidisine kompleksinden ferrik iyona okside olur. Oksidasyon reaksiyonu ortamda bol miktarda bulunan gliserol molekülü tarafından arttırılır. Renk yoğunluğu örnekte bulunan oksidan moleküllerin miktarıyla orantılı olarak spektrofotometrik yöntemle ölçülür. Örnek hidrojen peroksitle kalibre edilir.

#### **2.4.4. Total Antioksidatif Stres (TAS)**

Total antioksidan seviyesini göstermektedir. Bilindiği gibi antioksidan moleküller organizmada zararlı reaksiyonları önlerler. Antioksidanların serum veya plazma konsantrasyonları laboratuvarında ayrı ayrı ölçülebilir. Fakat ayrı ayrı ölçüm pahalı, komplike ve zaman alıcıdır. Çünkü antioksidanların ayrı ayrı ölçümü pratik değildir ve tüm antioksidanların additif etkisi vardır. TAS ölçümü için çeşitli yöntemler mevcuttur. Erel tarafından geliştirilen yeni yöntemde örnekte antioksidan aktiviteye karşı radikaller oluşturulur. Oluşturulan radikaller kolorimetrik olarak ölçülür. Yaygın kullanılan kolorimetrik metodlardan renksiz 2,2'-azibonis (3 etylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) temel metoddur. Deneyde renksiz ABTS molekülü mavi yeşil ABTS molekülüne okside olur. Renkli ABTS<sup>+</sup> molükülü okside edici herhangi bir maddeyle karıştırıldığında tekrardan orjinal renksiz ABTS molekülüne indirgenir. Erel tarafından geliştirilen bu yeni yöntemin temel prensibinin özelliği ABTS molekülünün kullanılmasıdır. Bu methodda indirgenen ABTS molekülü çeşitli ajanlar tarafından okside edilir. Bazı çalışmalarda hidrojen peroksit ve peroksidaz enzim veya metmyoglobin gibi nonenzimatik peroksidaz ajanlar ABTS molekülünü okside etmek için kullanılırlar (33).

#### 2.4.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total oksidanların seviyelerinin, total antioksidanların seviyelerine bölünmesiyle elde edilir. Değerin yüksek olması oksidatif stresin arttığını gösterir (4).

#### 2.4.6. Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE)

PON, hücre membranları ve lipoproteinler üzerinde serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki gösterdiği gözlenmiştir (70). PON gen ailesi insanlarda 7 kromozomda PON 1, PON 2 ve PON 3 olmak üzere 3 türü bulunmaktadır. Bu üç tür oksidatif stres ve inflamasyonu önler. Bunlar insanda ateroskleroz, diyabet, ruhsal rahatsızlıklar ve iltihaplı bağırsak hastalığına da içeren birçok hastalıkla ilişkili gibi görünmektedir (35). PON ve ARE, aynı gen tarafından kodlanan ve aktif merkezleri benzer olan esteraz grubunda enzimlerdir. PON1'in polimorfik değişim olmasına rağmen ARE enzimi genetik polimorfik değişim göstermez. Yine iki enzimin doğal substratları farklı olmasına karşın PON1 enzimi ARE'nin doğal substratı olan fenil asetatı hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. PON-1 yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ile ilişkili PON, ARE ve dyazoxonase aktiviteleri olan bir enzimdir (36). İnsan serum PON, paraokson gibi çevresel potent kimyasalları ve ilaçları inaktive eden bir enzim sistemidir. Bu enzim sistemi öncelikle zehirli çevresel kimyasallardan konak organizmaları korumak için bulunur. PON 1 organofosforlu esterleri, karbamatlar ve aromatik karboksilik asit esterlerini hidrolize eder (37). PON kolinesterazların güçlü inhibitörü olan paraoksonu hidroliz edebilen arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimidir. Enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır. PON ve ARE, aynı gen tarafından kodlanan ve aktif merkezleri benzer olan esteraz grubu enzimlerdir. PON1 enzimi LDL'yi oksidasyondan koruyucu özelliği ve hidrojen peroksit gibi diğer radikalleri nötralize etme kapasitesi nedeniyle antioksidan işlevde bulunmaktadır. Düşük PON1aktivitesinin dislipidemi, diabetes mellitus, ileri yaş, sigara, hipertansiyon ve artmış oksidatif stresle ilişkili olduğu gösterilmiştir (38). PON 1 muhtemelen HDL'nin antioksidan etkisinden sorumludur. PON 1 ana görevi dolaşıma giren organofosfatların nörotoksik etkisinden sinir sistemini korumaktır. PON 1 'in organofosfat ve diğer organik esterleri hidrolize etme kapasitesi bireyler arasında geniş farklılıklar göstermektedir (39).



#### **2.4.7. Oksidatif Durumun Saptanması: Erel Yöntemi**

Erel tarafından tanımlanmış oksidatif stresi saptamak için kurgulanmış bir laboratuvar yöntemidir. 2004 yılında total antioksidan kapasiteyi kolorimetrik olarak ölçen “Total Antioksidan Seviye (TAS)” olarak adlandırılan sistemi, 2005 yılında da reaktif oksijen ürünlerinin total değerini veren “Total Oksidan Seviye (TOS)” sistemini yayınlamıştır(34). Her iki sistem de alternatiflerine göre kolay, ucuz, duyarlı, güvenilir ve tam otomatik ölçüm yapan sistemlerdir ve birçok çalışmada beraber kullanılmıştır

#### **2.5. Materyal Metod**

Bu deneysel çalışma, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri uygulama ve araştırma merkezi (DÜSAM)’da gerçekleştirildi. Etik kurul onayı Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK)’dan 11.03.2014 tarihli ve 2014/09 protokol numaralı ve karar no:2 alınarak başlatıldı. Apoptozisle ilgili Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 çalışmaları Harran üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında; TAS, TOS, OSİ, PON ve ARE çalışmaları ise Harran üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapılmıştır.

##### **2.5.1. Hayvanlar Ve Deney Grupları**

Çalışmamızda 4-8 haftalık, 180-200 gram ağırlığında toplam 30 adet Wistar albino rat kullanılmıştır. 7 gün süren deney süresince ratlar ( $21 \pm 2C$ ) sıcaklıkta, ( $60 \pm 5 \%$ ) nem oranı ve 12 saat ışık 12 saat karanlık olan odada uygun kafeslerde sürekli gözlem altında tutuldular. Her kafese beş Wistar albino rat konuldu. Hayvanlar yeteri kadar ticari standart diyet ve su ile

beslendi. Sham, Balanced Salt Solution=Dengeli tuz solüsyonu (BSS) ve Karbakol gruplarında denek sayısı rastgele n:10 olarak belirlendi (Tablo 4).

Gruplar	Rat sayısı	Tedavi protokolü
Grup 1 (Sham)	10	Ön kamaraya işlem yapılmadı
Grup 2 (BSS)	9	Ön kamaraya 0.01 cc BSS uygulandı
Grup 3 (Karbakol)	9	Ön kamaraya 0.01 cc Karbakol uygulandı

**Tablo-4:** Deney grubları

### 2.5.2. Cerrahi İşlemler Ve Doku Hazırlama

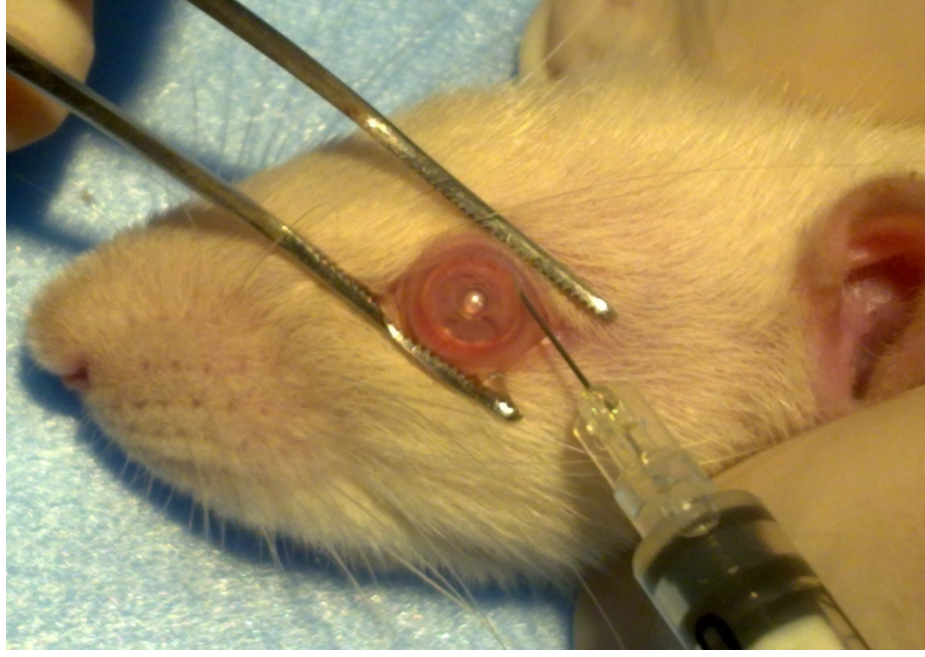
**İntrakameral Enjeksiyon Tekniği:** Tüm cerrahi işlemler için steril cerrahi aletler kullanıldı. İntrakameral enjeksiyon öncesinde ratlara laboratuvar koşulları altında Ketamin 87 mg/Kg (Ketalar; Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul Türkiye) 0.87 cc olarak ve Xylazine 13 mg/kg (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) 0.13 cc dozlarındaki karışım hazırlandı. Kilograma uygun olarak (yaklaşık 0.33 cc) intraperitoneal enjeksiyon ile anestezi sağlandı.

Ön kamaraya BSS ve karbakol verilmesi esnasında rat gözünün bütünlüğü korundu. Göz küresi horizontal açılı konjoktival forceps yardımı ile limbustan sabitlendi. Ön kamera enjeksiyonu limbustan insulin enjektörü (İğne: 0.30×8mm, 30 G×5/16’’; Ayset Tıbbi Ürünler Sanayi A.Ş. Adana, Türkiye) yardımıyla gerçekleştirildi (Fotoğraf 4). Enjeksiyonlar ameliyat mikroskobu (YZ20T9; Nanjing. Redsun Optical Co., Ltd., Jiangsu, China) altında gerçekleştirildi. Sham grubuna ilaç uygulanmadı; BSS grubuna 0.01 cc Dengeli tuz solüsyonu (BSS) (Alcon Laboratories, Inc, Texas USA) verildi. İlaç grubuna ise %0.01 karbakol (Miostat, Alcon Laboratories Inc. Texas / ABD) verildi.

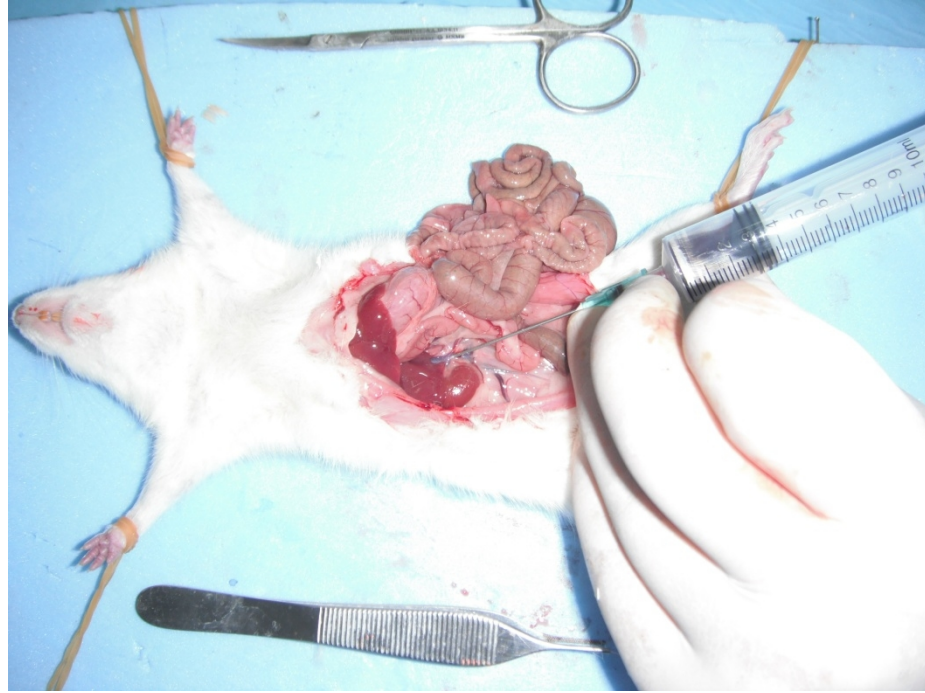
2. Gün BSS grubuna ait bir rat, 4. gün karbakol grubundaki bir rat kafeste ölü olarak bulundu. 7. günün sonunda aynı anestezi dozlarında intraperitoneal enjeksiyon ile ratların

korneaları 15 derece korneal bıçak kullanılarak limbal kesi ile histopatolojik inceleme için ve biyokimyasal inceleme için alındı. İnguinal bölgeden yapılan vertikal 3 cm'lik cilt ve ciltaltı insizyonu ile batına ulaşıldı. Vena cava inferiordan yaklaşık olarak 1,5-2 cc kan örneği alındı (Fotoğraf 9). Daha sonra tüm ratlara dekapitasyon uygulandı. Patolojik numuneler % 10 formaldehit içeren taşıma kabına, biyokimyasal numuneler ise kuru taşıma kabına konuldu ve -70 ° C' de muhafaza edildi.

Kornea endotelinde Kaspaz 3 ve 8 ile immunohistokimyasal yöntem ile apoptOSİs araştırıldı. Kornea ve kan örneğinde oksidatif stres faktörlerinden total oksidan seviye (TOS), total antioksidan seviye (TAS), oksidatif stres indeksi (OSİ), Paraoksanaz (PON) ve arilesteraz (ARE) seviyelerine bakıldı.



**Resim-3:** İnrakameral enjeksiyon uyguladığımız rat görüntüsü



**Resim-4:** Ratın vena kava inferiorundan kan alma görüntüsü

### 2.5.3. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 Boyama

Korneal dokular 10% formaldehit tespit edildi ve 4 mm'lik parafin bloklar Kaspaz- 3 antibodies (cleaved; catalog no. PP 229 AA, Biocare Medical, Concord, CA) ve Kaspaz-8 antibodies (clone: C502S, catalog no. GTX59555, Gene Tex, Irvine, CA) kullanılarak standart bir streptavidin-biotin immünoperoksidaz yöntemi ile boyanmıştır. Tüm örnekler ışık mikroskobu (Olympus Corp., Tokyo, Japonya Olympus BX51TF) altında değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyanmış materyaller yarı-kantitatif olarak değerlendirildi (Tablo 5).

<b>Kaspaz boyama değerlendirme</b>	
<b>Negatif boyama</b>	-
<b>Zayıf boyama</b>	+
<b>Orta boyama</b>	++
<b>Şiddetli boyama</b>	+++

**Tablo-5:** Kaspaz boyama değerlendirme

### 2.5.4. Total Antioksidan Durum (TAS) Ölçümü

TAS Erel tarafından geliştirilen yeni bir otomatik ölçüm yöntemi ile ölçülmüştür. Bu yöntemde hidroksil radikaller ve en potent biyolojik radikaller üretilir. Yöntemde Reaktif 1 içinde mevcut demir iyon solüsyonu, Reaktif 2 içinde mevcut olan hidrojen peroksit ile karıştırılır. Bu yöntemin esası  $Fe^{2+}$ -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyona girerek OH radikalini oluşturur. Oluşan OH radikali düşük pH'da o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Oluşan dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ortamdaki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu renk değişimi otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmekte olup birimi "nmol Trolox equiv./mg protein olarak ifade edilmiştir. Bu yöntemde materyalin hidroksil radikal üretimi ile başlayan potent serbest radikal

reaksiyonlara karşı antioksidatif etkisi ölçülür. Yöntemde %3 ten az hata hassasiyeti vardır.  
(34)

### 2.5.5. Total Oksidan Durum (TOS) Ölçümü

Örneklerin TOS düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyona kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalent/ L olarak ifade edildi (4).

### 2.5.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), Toplam Oksidan Status/Seviye (TOS) düzeylerinin Toplam Antioksidan Status/Seviye (TAS) düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Örneklerin Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplanırken TAS düzeyinin birimi ile TOS düzeyinin birimleri eşitlenir

Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

OSİ değeri elde edilen TAS ve TOS değerine göre aşağıdaki formüle göre hesaplandı

$$\text{OSİ (Arbitrary Unit – AU)} = \frac{\text{TOS} \left( \text{mol H}_2\text{O}_2 \frac{\text{equiv}}{\text{L}} \right)}{\text{TAS} \left( \text{mmol Trolox}^{\text{®}} \frac{\text{equiv}}{\text{L}} \right)} \times 10^{-1}$$

### 2.5.7. Parakosonaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

HDL-Kolesterole bağlı lipofilik, hidrofobik yapıli antioksidan bir enzim olan PON aktivitesi ticari Rel Assay marka kit kullanılarak ölçüldü. Yöntemde PON enzimi paraoxon

(*O,O*-diethyl-*O*-*p*-nitrophenylphosphate), substratını hidroliz ederek renkli *p*-nitrophenol ürününün oluşmasına yol açar. Oluşan ürünün absorbansı 412 nm de kinetik modda izlenerek enzim aktivitesi U/L olarak ifade edilir (37).

### **2.5.8. Arilesteraz Aktivitesi Ölçümü**

Antioksidan bir enzim olan PON enziminin ARE aktivitesi de ticari Rel Assay marka kit kullanılarak ölçüldü. Bu test, örneğin içerdiği enzim tarafından fenilasetat substratından enzimatik aktiviteyle açığa çıkarılan fenolün, kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Sonuçlar enzim aktivitesi çok yüksek düzeylerde olduğu için kU/L olarak ifade edilir (34)

### 3. YAPILAN İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler SPSS 18 sürümü (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oksidatif stres ile ilgili sayısal veriler median (maksimum-minimum değer) olarak verildi. Oksidatif stres grupları One Way Anova testi ile karşılaştırıldı. Anlamli çıkan parametrelerde alt grup analizleri için Bonferoni analizi yapıldı. Kaspaz 3 ve 8 düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında  $\chi^2$  testi ile yapıldı.  $P<0.05$  değeri İstatistiksel anlamli olarak kabul edildi.  $P<0.01$  yüksek düzeyde istatistiksel anlamli ve  $P<0.001$  ise çok yüksek istatistiksel anlamli olarak kabul edildi.



## 4. BULGULAR

Çalışmamızda 4-8 haftalık, 180-200 gram ağırlığında toplam 30 adet Wistar albino rat kullanılmıştır. Sham, BSS ve Karbakol gruplarında denek sayısı rastgele n:10 olarak belirlendi. Fakat 2. Gün BSS grubuna ait ratlardan biri, 4. gün Karbakol grubundaki ratlardan biri kafeste ölü olarak bulundu. Çalışmamız 28 rat ile tamamlandı.

### 4.1. Rat serumlarında oksidatif stres ile ilgili bulgular

Parametreler	Sham (n =10)	BSS (n = 9)	Karbakol (n= 9)	P
TAS(mmolTrolox®equiv/L)	0,96(0,83-1,08)	1,02(0,86-1,17)	0,91(0,82-1,06)	0,095
TOS(mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equiv/L)	22,24(12,53-26,56)	25.19 (18,43-37,27)X **	15,59(12,67-20,39)	0,001
OSİ(Arbitrary Unit)	2,31 (1,46-3,16)Y *	2,53(1,78-3,18)X **	1,71(1,35-2,03)	0,004
PON(ünite/litre U/L)	112,23(70,6-144,5)	99,79(76,04-108,2)	91,36(80,35-127,6)	0,132
Ariesteraz (U/L)	136.5(83,5-175,06)	120,41(96,6-132,7)	111,87(95,11-136,8)	0,132

**Tablo-6:** Ratların serumunda oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması.

TAS; Total Antioksidan Seviye, TOS; Total Oksidan Seviye, OSİ; Oksidatif Stres İndeksi, PON; Paraoksonaz ve ARE:Ariesteraz

Median (minimum-maksimum) \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

X: Karbakol ile BSS arasında anlamlı fark vardır.

Y: Karbakol ile Sham grubu arasında anlamlı fark vardır.

Rat serumlarında Karbakol grubunda, Sham grubuna göre bulunan OSİ değerleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p=0.05$ ). Karbakol grubunda BSS grubuna göre OSİ değerleri düşüktür ve gruplar arası anlamlılık düzeyi daha fazladır ( $p=0,004$ ). Rat serumlarında Karbakol grubunun TOS değerleri, BSS grubuna göre düşük bulunmuş olup yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık göstermiştir ( $p=0,001$ ). Karbakol grubu ile sham grubu arasındaki TAS, TOS, PON ve ARE değerleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Rat serumlarında Karbakol grubunun TAS, PON ve ARE değerleri açısından BSS grubuna göre anlamlı fark bulunmamıştır. BSS ve Sham gruplarının TAS, TOS, OSİ, PON ve ARE değerleri arasında istatistiksel farklılık yoktur (Tablo-7).

#### 4.2. Rat kornealarında oksidatif stres ile ilgili bulgular

Parametreler	Sham (n=10)	BSS (n=9)	Karbakol (n=9)	<i>p</i>
TAS(mmolTrolox®equiv/L)	0,06 (0,05-0,1)	0,04 (0,02-0,16)	0,06 (0,05-0,1)	0,954
TOS(mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equiv/L)	8,19 (7,05-10,25)	7,34(5,32-10,19)	8,05 (5,78-10,97)	0,256
OSİ(Arbitrary Unit)	12,20(7,19-15,73)	14,88 (4,10-32,8)	12,32(7,55-17,59)	0,273
PON(ünite/litre U/L)	3,86 (2,01-5,6)	3,541(0,57-6,26)	4,27 (1,9-6,2)	0,691
ARE (U/L)	5,24 (1,9-6,02)	2,81 (2,1-4,8)	4,12 (3,08-5,85)	0,051

**Tablo-7:** Ratların korneasında oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması

TAS; Total Antioksidan Seviye, TOS; Total Oksidan Seviye, OSİ; Oksidatif Stres İndeksi, PON; Paraoksonaz ve ARE: Arilesteraz, Median (minimum-maksimum)

Sham, BSS ve karbakol gruplarındaki ratların kornealarında TAS, TOS, OSİ, PON ve ARE düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 7).

### 4.3. Rat korneasında apoptozis ile ilgili sonuçlar

KASPAZ- 3	SHAM	BSS	KARBAKOL <sup>A*</sup>	P DEĞERİ
-	5	6	9	P: 0,002
+	5	0	0	
++	0	3	0	
+++	0	0	0	
<b>TOPLAM</b>	10	9	9	

**Tablo-8:** Kaspaz 3 boyanma sonuçları

(-): Negatif boyanma; (+): Zayıf boyanma; (++) : Orta boyanma; (+++) : Yoğun boyanma.

**A:** Karbakol ve Sham grupları arasında kaspaz-3 boyanması açısından  $\chi^2$  testi anlamlı fark bulunmuştur (p:0,033). \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$

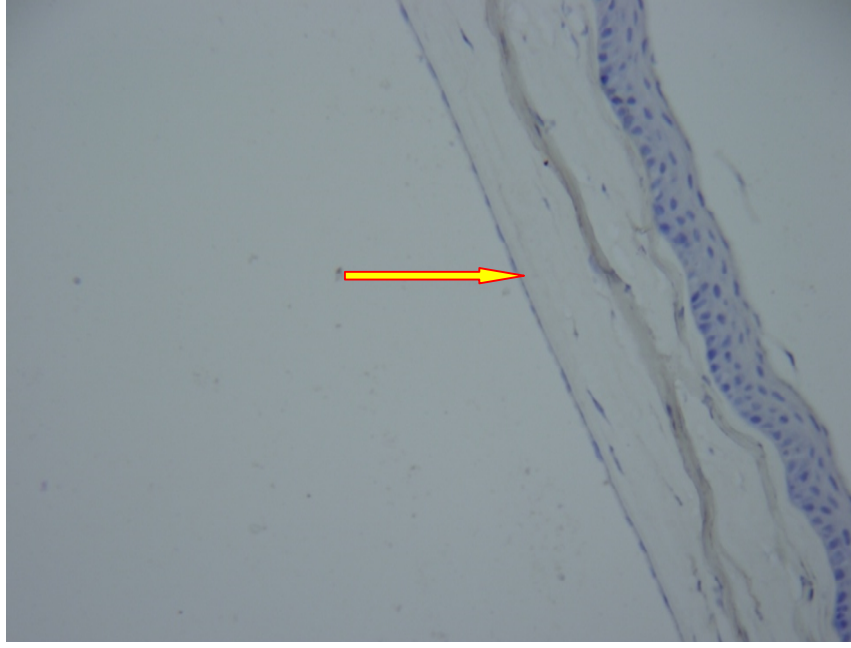
Karbakol, Sham ve BSS grupları arasında kaspaz-3 boyanması açısından yapılan karşılaştırmada, karbakol grubunda tüm rat korneaları negatif boyanmış olup, gruplar arasında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı farklılık bulunmuştur (P=0.002) (Tablo:8).

KASPAZ 8	SHAM	BSS	KARBAKOL	P DEĞERİ
-	4	2	7	P: 0.094
+	4	3	0	
++	1	3	0	
+++	1	1	2	
<b>TOPLAM</b>	10	9	9	

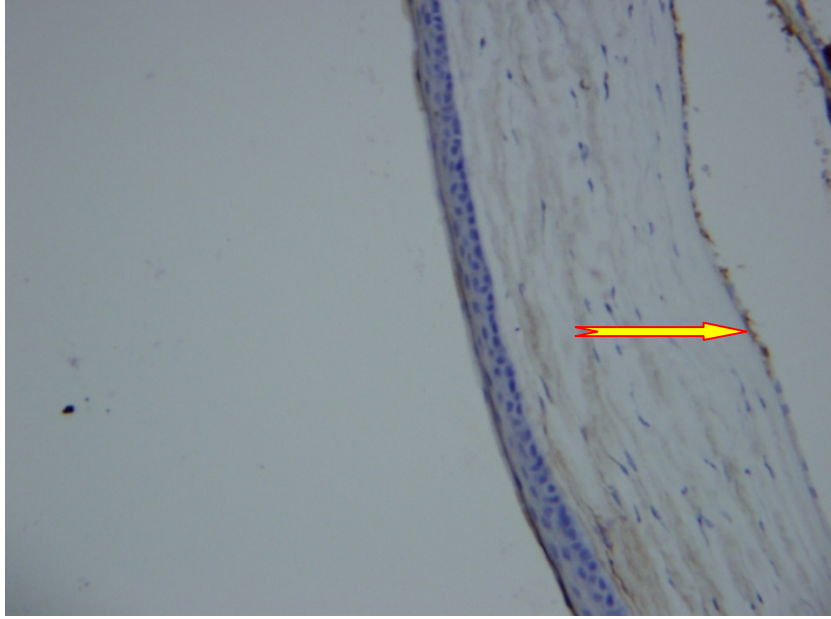
**Tablo-9:** kaspaz- 8 boyanma sonuçları

(-) : Negatif boyanma; (+) : Zayıf boyanma ; (++) : Orta boyanma; (+++) : Yoğun boyanma.

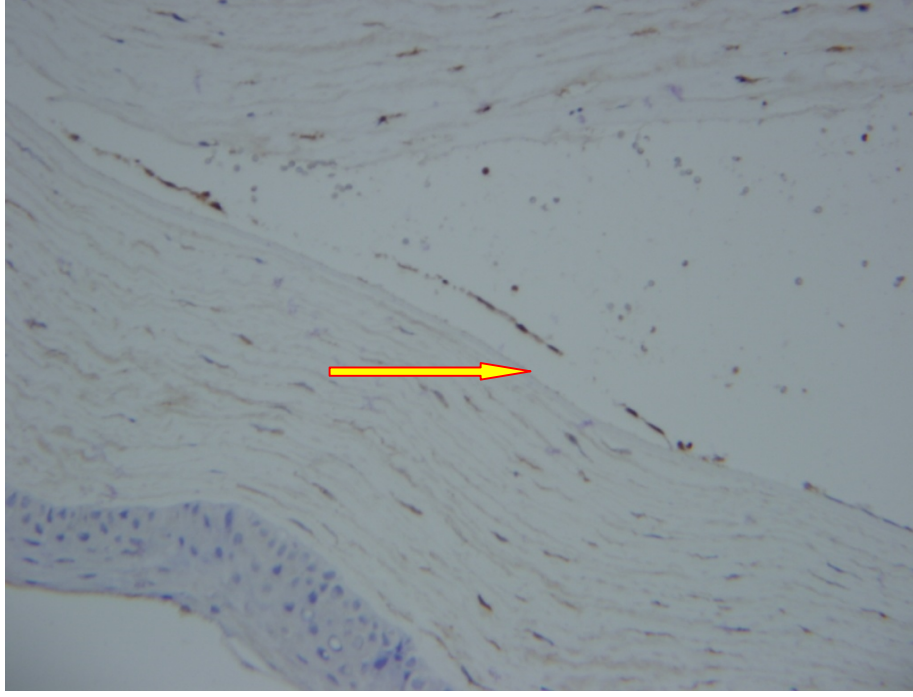
Karbakol, Sham ve BSS gruplar arasında kaspaz-8 boyanması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=0.094) (Tablo:9 ).



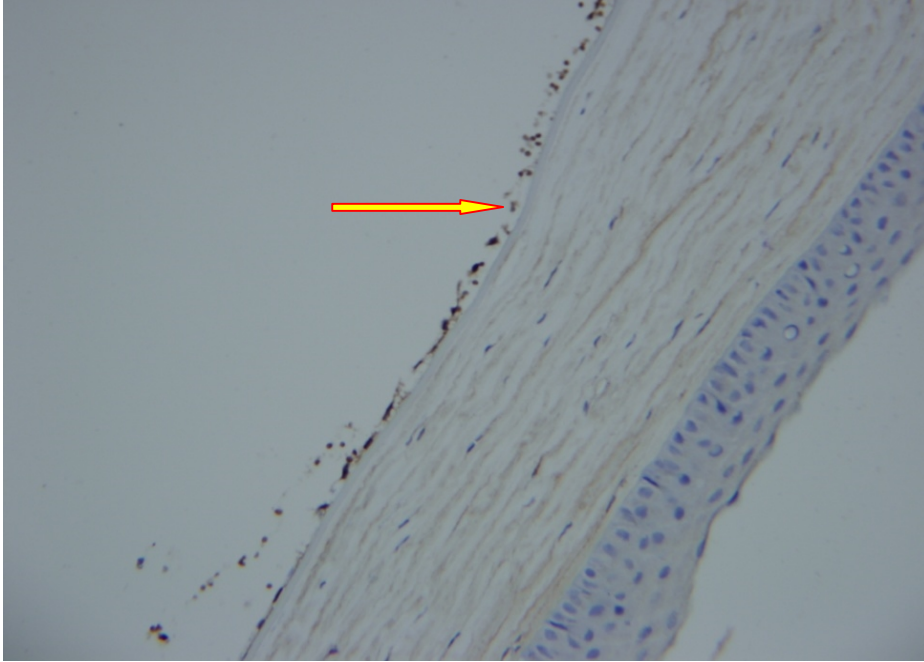
**Resim-5:** Kaspaz 8 -: İtrakameral karbakol uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 8 ile negatif boyanma görüntüsü



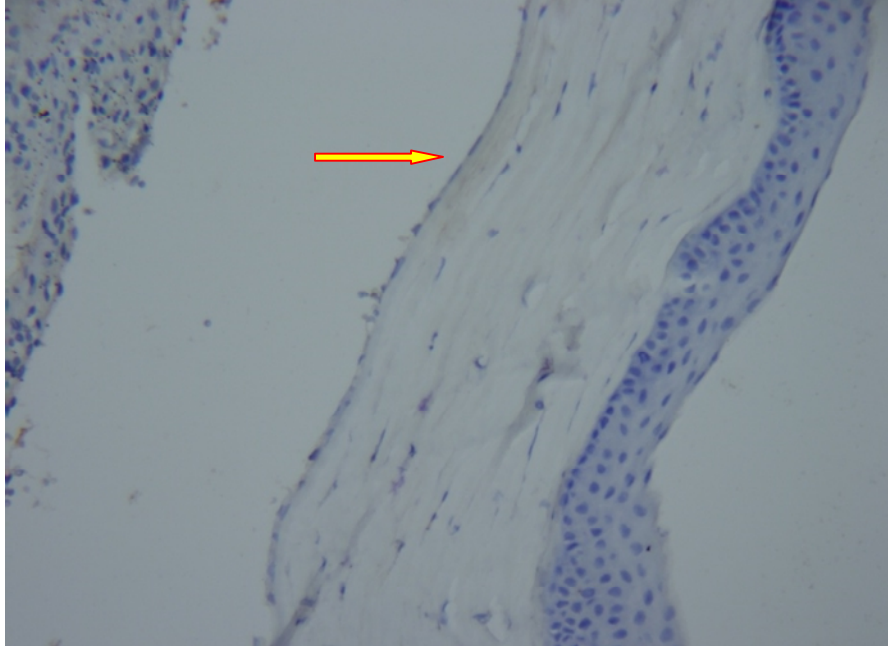
**Resim-6:** Kaspaz 8 +: İtrakameral BSS uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 8 ile + boyanma görüntüsü



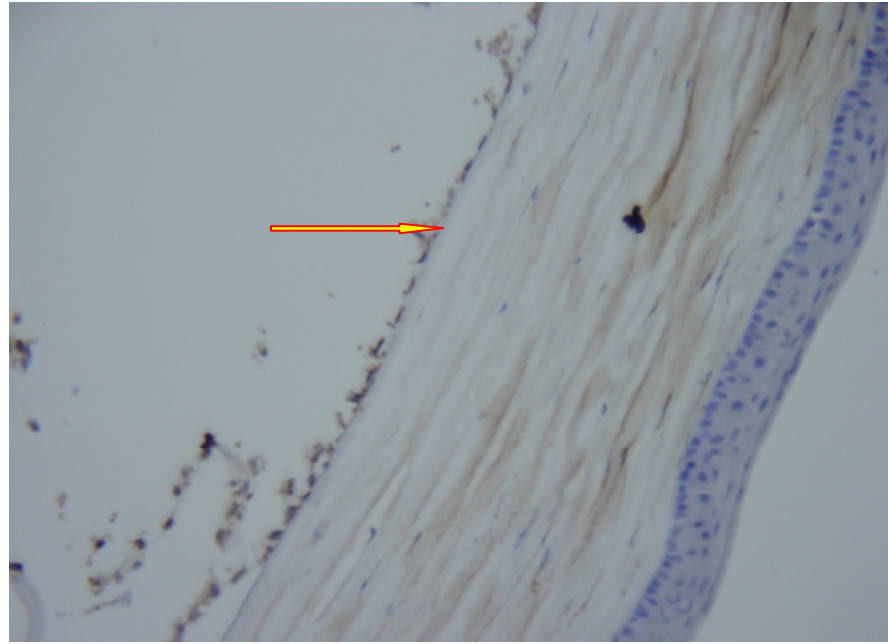
**Resim-7:** Kaspaz 8 ++ : İntrakameral BSS uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 8 ++ görüntüsü



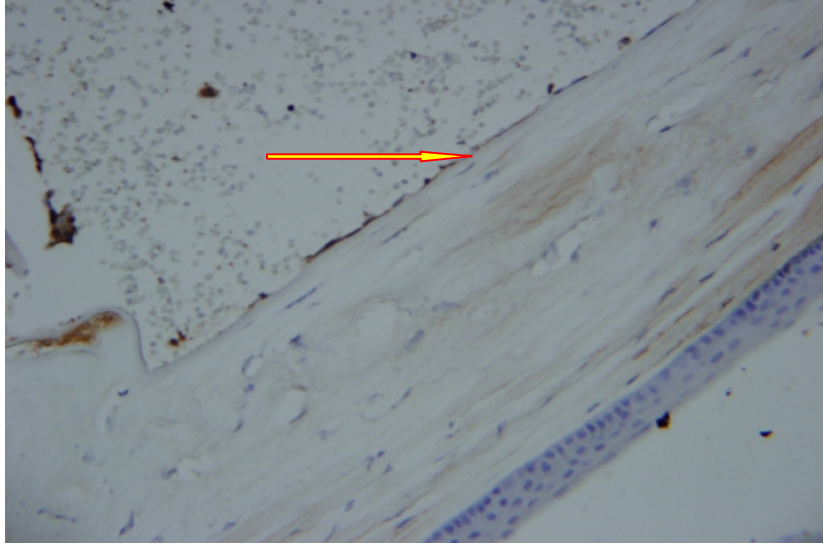
**Resim-8:** Kaspaz 8 +++: İntrakameral karbakol uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 8 ile +++ pozitif boyanma görüntüsü



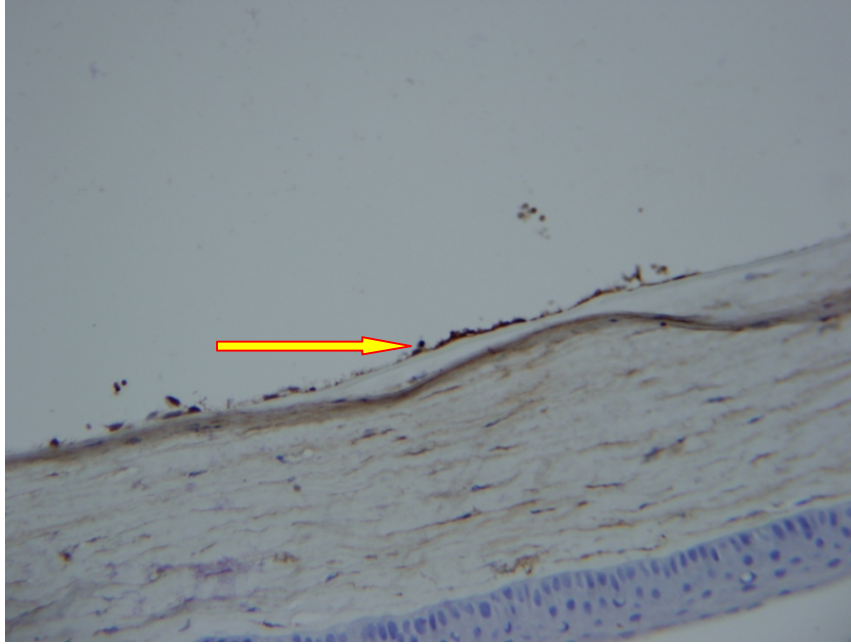
**Resim-9:** Caspaz 3 -: intrakameral karbakol uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 3 ile - negatif boyanma görüntüsü



**Resim-10:** Caspaz 3 + : Sham grubunda bir rat kornea endotelinin kaspaz 3 ile + pozitif boyanma görüntüsü



**Resim-11:** Caspaz 3 ++ : İntrakameral BSS uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 3 ile ++ pozitif boyanma görüntüsü



**Resim-12:** Caspaz 3 +++ : İntrakameral BSS uyguladığımız bir rat kornea endotelinin kaspaz 3 ile +++ pozitif boyanma görüntüsü

## 5. TARTIŞMA

Ratlar üzerinde yaptığımız çalışmada, intrakameral karbakolun serumda biyokimyasal olarak oksidatif strese etkisinin incelenmesinde; I) Rat serumlarında Karbakol grubunda OSİ değerleri, Sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Karbakol grubunda BSS grubuna göre OSİ değerleri düşüktür ve gruplar arası anlamlılık düzeyi daha fazladır. II) Rat serumlarında Karbakol grubunun TOS değerleri, BSS grubuna göre düşük bulunmuş olup yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık göstermiştir.

Biyokimyasal olarak korneanın oksidatif strese etkisinin incelenmesinde; III) Sham, BSS ve karbakol gruplarındaki ratların kornealarında TAS, TOS, OSİ, PON ve ARE düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

İmmunohistokimyasal olarak korneanın apoptozise etkisinin incelenmesinde IV) Karbakol, Sham ve BSS grupları arasında kaspaz-3 boyanması açısından yapılan karşılaştırmada, karbakol grubunda tüm rat korneaları negatif boyanmış olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. V) Karbakol Sham ve BSS gruplarında kaspaz-8 boyanması açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

İntrakameral karbakol günümüzde birçok cerrah tarafından özellikle de katarakt cerrahisinde sık olarak kullanılmaktadır. Karbakolun ön segment cerrahisi sırasında intrakameral olarak kullanılması birçok avantaj sağlamaktadır. İntrakameral karbakolun göz içi cerrahilerde kullanılmasının avantajları arasında intrakapsüler katarakt ekstraksiyonu sonrası vitreus yüzeyinin korunması, iris inkarserasyonunun önlenmesi, ön kamaraya lens takılmasını kolaylaştırması, postoperatif periferik anterior sineşi sıklığında azalma ve kornea skleral sütür atılmasının kolaylaştırılması sayılabilir (13). Katarakt cerrahisi sonrası erken dönemde geçici ancak ciddi GİB yükselmeleri meydana gelmektedir. GİB artışı özellikle ameliyat sonrası ilk 3-8 saatte maksimum seviyeye ulaşmakta ve 24-48 saat içinde ameliyat öncesi değerlere gelmektedir (9). Özellikle glokomlu ve psödoeksfolyasyonlu hastalarda GİB artışının daha fazla ve daha zarar verici olduğu gösterilmiştir (14). Cerrahi sırasında GİB artışı, cerrahi sonrasında ağrı, kornea ödemi, anterior iskemik optik nöropati, optik atrofi, glokomlu hastalarda daha fazla olmak üzere görme alanı kayıpları, atonik pupilla, kistoid



maküler ödem, geçikmiş yara iyileşmesine, retinal arter ve ven tıkanıklıklarına yol açabilmektedir (1). Fakoemülsifikasyon cerrahisi sırasında, intraoküler lens takıldıktan sonra miyozis sağlamak için ve postoperatif GİB artışını önlemek için intrakameral karbakol günümüzde sık olarak kullanılabilir.

Oksidatif stres, serbest oksijen radikallerinin organizmada oluşturduğu hücre ve doku hasarıdır. Oksidatif stres pek çok hastalık sürecinde hayati role sahip olabilir. Bazı durumlarda oksidanların artması ve antioksidanların azalması önlenemez ve oksidatif/antioksidatif denge 100 den fazla hastalığın gelişmesinden sorumlu olan oksidatif yöne doğru kayar. Oksidatif stres, apoptozisi tetikleyebilirken, yoğun oksidasyon nekroza, daha şiddetli oksidatif stres ise hücrelerin ölümüne neden olabilmektedir (5).

Apoptozis canlı organizmada görevini tamamlamış veya hasara uğramış hücrelerin çevredeki diğer hücre ve yapılara zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozis korneal dokunun proliferasyonunda, gelişmesinde, hemostazisinde ve yara iyileşmesinde kritik rol oynamaktadır. Kornea epitelinin yaralanmasından sonra korneal stroma ve epitel arasında keratositlerde apoptozis tespit edilmiştir. Korneal yaralanmadan sonra anterior stromada keratositlerin yok olması apoptozis ile açıklanır (18). Apoptozis oftalmolojide retinoblastom, glokom, katarakt, retina dekolmanı, keratokonus ve bazı göz hastalıklarının patogenezinde rol oynadığı için apoptozise neden olan ve apoptozisi kontrol eden mekanizmaların anlaşılması tedavi çabalarına katkıda bulunacaktır (20).

İntrakameral olarak kullanılan ilaçlar kornea endoteli ile direkt temas halindedir. Kornea endoteli, korneanın hidrasyonu, kalınlığı ve geçirgenliğinin korunması için esastır. Endotel hücreleri fazla sıvıyı stroma dışına pompalayarak korneanın saydamlığını sağlarlar (7). Kornea endoteli intrakameral kullanılan ilaçlardan etkilenmektedir. Endotel hücrelerinin rejenerasyon kapasitesi yoktur. Hücre sayısı ortalama yılda %0.06 düşer. Komşu hücreler boşluğu kapatmak amacıyla genişler. Ortalama hücre 500 hücre /mm<sup>2</sup> ye düştüğünde korneal ödem gelişir ve saydamlık bozulur (8). Cerrahi travmadan, yüksek göz içi basıncından, göz içinde kullanılan solüsyon ve ilaçlardan dolayı endotel hücreleri harab olabilir. Bu durum

hücre dansitesinde azalma, endotelial dekompanzasyon, ödem, kornea bulanıklığı ve görme azalması ile sonuçlanacaktır (7).

Literatürde GİB artışı ile ilgili olarak intrakameral karbakolün postoperatif birinci gün GİB artışını engellediğini gösteren retrospektif ve deneysel araştırmalar mevcuttur. Çekiç ve ark. 51 katarakt hastasında intrakameral karbakolün erken postoperatif intraoküler basıncı azalttığını tespit etmişlerdir (40). Stuhr ve arkadaşları 32 köpek üzerinde yaptıkları fakoemülsifikasyon cerrahisi sonrası, intraoküler basınç artışını önlemede, intrakameral %0.01 karbakol'un etkili olduğunu yayınlamışlardır (41). Linn ve ark. 32 katarakt hastasında intrakameral % 0.01'lik karbakolün, 0.1, 0.25 ve 0.5 ml dozlarında kullanımının postoperatif ilk 24 saatte intraoküler basınç artışını önlediğini göstermişlerdir (42). Güreli ve ark. 83 hastanın 93 gözünde sistemik asetozolamid ve intrakameral karbakolün postoperatif 1. Gün GİB artışını önlemede etkili bulmuşlar (1).

Intrakameral karbakol genellikle GİB artışını önlemede etkili olmasına rağmen, literatürde aksini ifade eden yayınlar da mevcuttur. Crasta ve ark. 21 köpeğin 39 gözünde fakoemülsifikasyon cerrahisi sonrası kullandıkları intrakameral karbakol ve topikal 0.005% latanoprostun postoperatif GİB yükselmesini önlemede etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir (43). Uçar ve ark. 2005 yılında intrakameral karbakol uygulanan bir katarakt hastasında operasyon sırasında karbakol alerjisi geliştiğini yayınlamışlardır (44).

Intrakameral karbakolün retina üzerine etkilerini araştıran iki adet deneysel çalışmada, intrakameral karbakolün retina üzerine toksik etkilerinin olmadığı gösterilmiştir. Bunlardan Pekel ve ark. intrakameral karbakolün kullanılan 82 Fakoemülsifikasyon hastasının, retinasını optik coherens tomografi (OCT) ile incelemişler ve karbakolün postoperatif birinci gün makula kalınlığı toplam makula hacmini azalttığını ancak retina damar çapına bir etkisinin olmadığını saptamışlardır (45). Diğer retina çalışmasında ise, Demir ve ark. 47 katarakt hastasında intrakameral karbakolün makular kalınlık üzerine etkisini OCT ile incelemişler ve makular kalınlık üzerine etkisinin olmadığını göstermişler (46).

Kornea üzerine intrakameral karbakolün etkilerini araştıran Richard ve ark., pigmente tavşanlarda intrakameral kullanılan asetilkolin ve karbakolün kornea kalınlığı ve endoteline

olan etkilerini mikroskopik karşılaştırmışlardır. %0.01 Karbakol uygulanan tavşanlarda elektron mikroskopik olarak kornea endotelinde bir değişiklik saptamamalarına karşılık % 1 asetilkolin uygulanan grupta normal endotelial mozaik paternin kaybolduğu, endotel hücrelerinde belirgin nükleus ve vakuol artışı saptamışlar (13). Liou ve ark. İntrakameral lidokain ve karbakolün tavşan kornea endotelinde oluşturabileceği hücre kaybını ve kornea kalınlığını speküler mikroskopik olarak değerlendirmişler. Her iki grupta da normal kornea kalınlığı ve normal kornea endotel hücresi saptamışlardır (47). Erdoğan ve ark. ratlarda intrakameral ve intravitreal karbakol ve asetilkolinin gözdeki etkilerini mikroskopik ve makroskopik olarak araştırmışlar her iki ilacında göz içi dokulara toksik etkisi olmadığını bulmuşlar (3). Literatürde karbakolün korneada oksidatif stres ve apoptozis üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya rastlamadık. Akal ve ark. moksifloksasilinin korneada oksidatif stres ve apoptozis üzerine etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, ratlara uygulanan intrakameral moksifloksasilinin, kornea endotelinde ve serumda oksidatif stresi artırdığı ve apoptozisi aktive ettiği bildirilmiştir (48).

Bizim çalışmamız, intrakameral karbakolün kornea ve serumda, oksidatif stres üzerine artırıcı etkisinin olmadığını serumda ise oksidatif stres üzerine koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir. Ayrıca korneada apoptozisi arttırmadığı, aksine apoptozis için koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız, yukarıdaki çalışmalardaki gibi intrakameral karbakolün kornea üzerine güvenli olduğunu desteklemektedir. Bu çalışmamız ayrıca karbakol kadar olmasa da, BSS'in göz içi kullanımının apoptozise karşı koruyucu rolününün olabileceğini desteklemektedir.

Çalışmamız, intrakameral olarak uygulanan karbakolün, korneada oksidatif stres ve apoptozis üzerine indükleyici etkisinin olmadığı ve güvenli bir ilaç olduğunu desteklemektedir.

## 6. SONUÇ

Karbakol, rat serumlarında BSS ve sham grublarına göre oksidatif stresi azaltmakta ve oksidatif strese karşı koruyucu rol oynamaktadır.

Karbakol korneada ise, sham ve BSS grublarına göre oksidatif stresi artırmamaktadır.

İmmunohistokimyasal inceleme karbakolün apoptozisi artırıcı etkisi olmadığını, aksine koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Güveli AK, Değer A, Arsan AK, Akçay L, Doğan ÖK. Oral asetozolamid ve intrakameral karbakolun fakoemülsifikasyon sonrası erken dönem göz içi basıncı üzerine etkileri. T Oft Gazetesi. 2005 : 35-40.
2. Yiğit U, Arslan B. Fakoemülsifikasyon cerrahisi sonrası erken dönem göz içi basıncı kontrolünde oral ve topikal karbonik anhidraz inhibitörlerinin etkinliği. Bakırköy Tıp Derg 2011; 7(3):99-103.
3. Erdoğan H, Arıcı MK, Arıcı S, Toker Mİ, Topalkara A. İntravitreal ve intrakameral asetilkolin ve karbakol'ün göz içi dokulara etkisi. Ret-Vit. 2006;14: 23-26.
4. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clin Biochem. 2004 Feb;37(2):112-9.
5. Oxidative stress. Wikipedia, the free encyclopedia. 2014 [cited 2014 Dec 6]. Available from: <https://en.wikipedia.org>
6. Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today. 1993 Mar;14(3):126-30.
7. Akyol F. Kornea anatomisi. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları No :11 Kornea kitabı 2009;11(1): 13-20.
8. Kanski JJ, Bowling B, Nischal K, Pearson A, editör. Klinik oftalmoloji sistematik yaklaşım. 7. baskı. ostim/Ankara: ayrintı basımevi; 2013 p.168.
9. Komai Y, Ushiki T. The three dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991; 32(8):2244-58
10. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). Ophthalmology. 2013 Sep;120(9):1778-85.
11. American Academy Of Ophthalmology The Eye M.D. Association Glaucoma Section 10 2012: 178-80.

12. Carbachol . Wikipedia, the free encyclopedia. 2014 [cited 2014 Dec 25]. Available from: <https://en.wikipedia.org>
13. Yee RW, Edelhauser HF. Comparison of intraocular acetylcholine and carbachol. *J Cataract Refract Surg.* 1986 Ocak;12(1):18–22.
14. Pohjalainen T, Vesti E, Uusitalo RJ, Laatikainen L. Intraocular pressure after phacoemulsification and intraocular lens implantation in nonglaucomatous eyes with and without exfoliation. *J Cataract Refract Surg.* 2001 Mar;27(3):426–31.
15. Kim JY, Sohn JH, Youn DH. Effects of intracameral carbachol and acetylcholine on early postoperative intraocular pressure after cataract extraction. *Korean J Ophthalmol KJO.* 1994 Dec;8(2):61–5.
16. Tatlıpınar S , Kiratlı H. Apoptozis ve Göz. *T Oft Gaz.* 2000; 30 :587-91
17. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239–57.
18. Wilson SE, Li Q, Weng J, Barry-Lane PA, Jester JV, Liang Q, et al. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996 Jul 1;37(8):1582–92.
19. Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM, Hajimohamadreza I. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci.* 1999 Jan;20(1):35–42.
20. Turgut B, Demir T, Celiker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. *Firat Tıp Derg.* 2006; 11(1): 6-11.
21. Milligan CE, Schwartz LM. Programmed cell death during animal development. *Br Med Bull.* 1997;53(3):570–90.
22. Kumar V, Kotran RS, Stanley L. Robbins, çeviri: Prof.Dr.Uğur Çevikbaş. Robbins Temel Patoloji, 7. baskı. 2003 p. 25-30.
23. Fesus L, Davies PJA, Piacentini M: Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Bioi.* 1991; 56: 170-77.

24. Bursch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. 1990 Sep;68(9):1071–4.
25. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*. 1990 Mar;136(3):593–608.
26. Apoptozis. *Wikipedi*. 2014 [cited 2014 Dec 28]. Available from: <http://tr.wikipedia.org>
27. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull*. 1997;53(3):478–90.
28. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*. 1992 Apr 9;356(6369):494–9.
29. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*. 1997;53(3):451–65.
30. Gordon KK, Garner A. *Pathobiology of ocular disease*. 3rd ed. Informa Healthcare USA, Inc. 52 Vanderbilt Avenue New York, NY 10017.2008 p. 33-4.
31. Frejlich E, Rudno-Rudzińska J, Janiszewski K, Salomon L, Kotulski K, Pelzer O, et al. Caspases and their role in gastric cancer. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ*. 2013 Aug;22(4):593–602.
32. Antioxidant *Wikipedia, the free encyclopedia*. 2014 [cited 2014 Dec 7]. Available from: <https://en.wikipedia.org>
33. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004 Apr;37(4):277–85.
34. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005 Dec;38(12):1103–11.
35. Précourt L-P, Amre D, Denis M-C, Lavoie J-C, Delvin E, Seidman E, et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*. 2011 Jan;214(1):20–36.

36. Aslan M, Kösecik M, Horoz M, Selek S, Celik H, Erel O. Assessment of paraoxonase and arylesterase activities in patients with iron deficiency anemia. *Atherosclerosis*. 2007 Apr;191(2):397–402.
37. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*. 1983 Nov;35(6):1126–38.
38. Türkoğlu S, Bulmuş FG, Parmaksız A, Özkan Y, Gürsu F. Metabolik sendromlu hastalarda paraoksonaz 1 ve arilesteraz aktivite düzeyleri. *Fırat Tıp Dergisi*. 2008;13(2): 110-5
39. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Apr;21(4):473–80.
40. Cekiç O, Batman C. Effect of intracameral carbachol on intraocular pressure following clear corneal phacoemulsification. *Eye Lond Engl*. 1999 Apr;13 ( Pt 2):209–11.
41. Stuhr CM, Miller PE, Murphy CJ, Schoster JV, Thomas CB. Effect of intracameral administration of carbachol on the postoperative increase in intraocular pressure in dogs undergoing cataract extraction. *J Am Vet Med Assoc*. 1998 Jun 15;212(12):1885–8.
42. Linn DK, Zimmerman TJ, Nardin GF, Yung R, Berberich S, DuBiner H, et al. Effect of intracameral carbachol on intraocular pressure after cataract extraction. *Am J Ophthalmol*. 1989 Feb 15;107(2):133–6.
43. Crasta M, Clode AB, McMullen RJ, Pate DO, Gilger BC. Effect of three treatment protocols on acute ocular hypertension after phacoemulsification and aspiration of cataracts in dogs. *Vet Ophthalmol*. 2010 Jan;13(1):14–9.
44. Uçar F, Doğan AŞ, Dursun D, Akova YA. Bir katarakt olgusunda karbakol allerjisi. *MN Oftalmoloji*. 2005, 6 ;12 (2): 160-2.
45. Pekel G, Yagci R, Acer S, Cetin EN, Cevik A, Kasikci A. Effect of intracameral carbachol in phacoemulsification surgery on macular morphology and retinal vessel caliber. *Cutan Ocul Toxicol*. 2014 Apr 22; 413-6



46. Demir M, Oba E, Dirim B, Can E, Odabasi M, Ozdal E. Effect of intracameral carbachol given during cataract surgery on macular thickness. *Int Ophthalmol*. 2012 Oct;32(5):413–6.
47. Liou S-W, Chiu C-J, Wang I-J. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. *J Cataract Refract Surg*. 2004 Jun 1;30(6):1351–5.
48. Akal A, Ulas T, Goncu T, Guldur ME, Kocarslan S, Taskin A, et al. Does moxifloxacin alter oxidant status in the cornea? An experimental study. *Cutan Ocul Toxicol*. 2014 Jun 25;1–5.

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
PROF. DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ  
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ  
DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK KURULU  
(DÜHADEK)

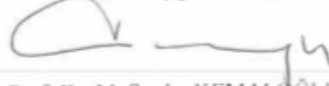
**EFQM**  
Committed to excellence

ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR NO	ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ
11.03.2014	2	Yrd. Doç. Dr. Ali AKAL

KARAR

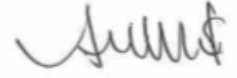
“Ratlarda intrakameral Karbokol’un korneada oksidatif stres ve apoptozise etkisinin araştırılması.” konulu 2014/09 protokol numaralı araştırma projesi Etik Kurulumuzca görüşülmüş olup araştırmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.



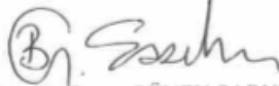
Prof. Dr. M. Serdar KEMALOĞLU  
Tıp Fak. Beyin Cer. AD  
(BAŞKAN)



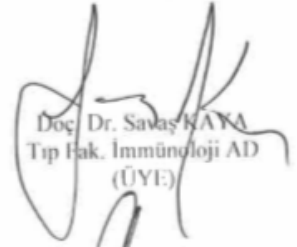
Prof. Dr. Yüksel KOÇYİĞİT  
Tıp Fak. Fizyoloji AD  
(Raportör)



Prof. Dr. Ahmet ONAY  
Fen Fak. Biyoloji AD  
(ÜYE)



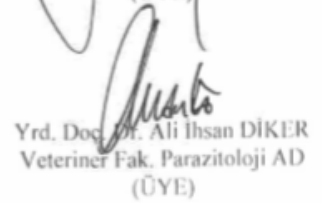
Doç. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN  
Veteriner Fak. Hist. ve Embr. AD  
(ÜYE)



Doç. Dr. Savaş KAYA  
Tıp Fak. İmmünoloji AD  
(ÜYE)



Doç. Dr. Abdurrahman ABAKAY  
Tıp Fak. Göğüs Hast. AD  
(ÜYE)



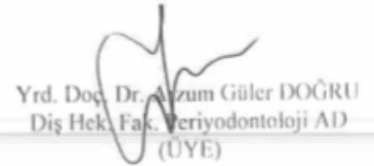
Yrd. Doç. Dr. Ali İhsan DİKER  
Veteriner Fak. Parazitoloji AD  
(ÜYE)



Yrd. Doç. Dr. İbrahim BAYRIL  
Veteriner Fak. Zootekni AD  
(ÜYE)



Ferhat DEMİR  
Veteriner Hekim  
(ÜYE)



Yrd. Doç. Dr. Azam Güler DOĞRU  
Diş Hek. Fak. Periyodontoloji AD  
(ÜYE)