

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON OLUŞTURULMUŞ SIÇAN
RETİNASINDA ÇEŞİTLİ ANTIOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİ**

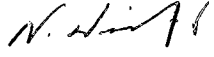
Mehmet Zülfü YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI


**ŞANLIURFA
2004**

Doç.Dr. Nihat DİLSİZ' in danışmanlığında, Mehmet Zülfü YILDIZ' ın hazırladığı “Deneysel İskemi-Reperfüzyon Oluşturulmuş Sıçan Retinasında Çeşitli Antioksidanların Koruyucu Etkisi” konulu bu çalışma 15/06/2004 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç.Dr. Nihat DİLSİZ

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Erhan ÜNLÜ

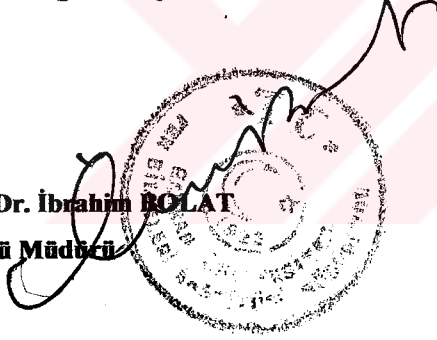
İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. S. Ahmet OYMAK

İmza: 

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim BOLAT
Enstitü Müdürü



Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.

Proje No : 180

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENEYSSEL İSKEMİ REPERFÜZYON OLUŞTURULMUŞ SIÇAN RETİNASINDA ÇEŞİTLİ ANTIOKSİDANLARIN KORUYUCU ETKİSİ

Mehmet Zülfi YILDIZ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nihat DİLSİZ

2004, Sayfa: 56

Bu çalışma, çeşitli antioksidanların (Vitamin- E, *Teucrium multicaule*, *Trigonella foenum-graecum* ve Lutein), sıçan retinasında iskemi-reperfüzyon (İ-R) sırasında oluşan serbest oksijen radikallerine karşı muhtemel rolünü göstermektedir. Hayvanlar rast gele seçilerek altı gruba ayrıldılar. Bunlar 1. grup (kontrol), 2. grup (İ-R), 3. grup (İ-R + vitamin- E), 4. grup ((İ-R+ *T. multicaule*), 5. grup (lutein) ve 6. grup (*T. foenum-graecum*) olarak adlandırıldı. Deneyde sıçanların sağ gözleri iskemi-reperfüzyon için kullanıldı. 3, 4, 5 ve 6. gruplara iskemi başlamadan 3 saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde sırasıyla vitamin-E, *Teucrium multicaule* ekstraktı , lutein ve *Trigonella foenum graecum* L.(Çemen otu) ekstraktı verildi. 24 saatlik reperfüzyondan sonra hayvanlar kesildi. Daha sonra retinalar, malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) ölçümü için izole edildi. Bu deney sonucunda, tüm grupların lipid peroksidasyonunu, iskemi grubuna göre koruduğu saptanırken, lutein (8.83 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) grubunun MDA değeri kontrol (8 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) grubuna en yakın değere sahip olduğu görüldü. Buna göre, luteinin (8.83 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) *T. multicaule*'den (15.13 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*'nin, *T. foenum-graecum*'dan (16.48 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. foenum-graecum*'un da vitamin E'den (17.24 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) daha iyi koruma sağladığı görülmüştür. GSH miktarları değerlendirildiğinde kontrol grubuna (36.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) en yakın değerini lutein grubunda (30.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) olduğu görülmüştür. Buna göre luteinin grubundaki GSH miktarı (30.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*'den (21.25 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*'nin, vitamin-E'den (18.1 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), vitamin-E'nin *T. foenum-graecum*'dan (15.98 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) daha yüksek olarak bulunmuştur. Sonuç olarak kullanılan antioksidanların peroksidasyon ürünü olan MDA oluşumunu engellediği ve bir antioksidan olan GSH miktarını koruduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER : İskemi-reperfüzyon, Retina, MDA, *Teucrium multicaule*, *Trigonella foenum-graecum*

ABSTRACT

Master Thesis

THE POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF VARIOUS ANTIOXIDANTS IN ISCHEMIA-REPERFUSION INDUCED RAT RETINA

Mehmet Zülfi YILDIZ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

2004, Page: 56

This study shows the possible role of various antioxidants (Vitamin- E, *Teucrium multicaule*, *Trigonella foenum-graecum* and Lutein) on free oxygen radicals which formed during ischemia-reperfusion (I-R) in rat retina. The animals, randomly selected, were divided into six groups. These were named as group 1 (control), group 2 (I-R), group 3 (I-R+vit-E), group 4 (I-R+ *T. multicaule*), group 5 (I-R+ Lutein), group 6 (I-R+ *T. foenum-graecum*). In the experiment, right eyes of rats were used for ischemia-reperfusion. Group 3, 4, 5 and 6 received vit-E, extract of *Teucrium multicaule*, lutein, extract of *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) before 3 hours of ischemia and after 6 hours of reperfusion respectively. The animals were sacrificed after 24 hours of reperfusion. Then, retina were isolated and processed for the quantification of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels. At the end of this experiment, all groups determined significant protection against formation of MDA when compared to I-R group while MDA level of lutein (8.83 nmol/100 mg retina wet weight) group was observed as it had the closest level to the control group. According to this, lutein (8.83 nmol/100 mg mg retina wet weight) provides more protection than *T. multicaule* (15.13 nmol/100 mg retina wet weight), *T. foenum-graecum* (16.48 nmol/100 mg retina wet weight), and vit-E (17.24 nmol/100 mg retina wet weight). When quantity of GSH was evaluated, it was observed that lutein group (30.4 nmol/100 mg retina wet weight) had the closest level to the control group. According to this result, the quantity of GSH in lutein group was found higher than *T. multicaule* (21.25 nmol/100 mg retina wet weight), vit-E (18.1 nmol/100 mg retina wet weight), and *T. foenum-graecum* (15.98 nmol/100 mg retina wet weight). As result antioxidants which used to experimental prevent formation of peroxidation substrat MDA and protect quantity of a antioxidant GSH.

KEY WORDS : Ischemia-reperfusion, Retina, MDA, *Teucrium multicaule*, *Trigonella foenum-graecum*

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca bilgi ve deneyimlerimden yararlandıđım danıőman hocam Doç. Dr. Nihat DİLSİZ' e, benden her tűrlű desteđini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. S. Ahmet OYMAK' a, Doç. Dr. Davut MUSA'ya, katkılarından dolayı Prof.Dr. Erhan ŐNLŪ'ye istatistiksel analizleri yapmamda bana yardımcı olan Dr. İsmail YILDIZ' a, kullandıđımız bitkilerin teőhisini yapan Prof. Dr. Vagif HATEMOV, Dr Esat ÇETİN' e ve Yrd. Doç. Hasan AKAN' a, yardımlarından dolayı Nazmiye GŪREL' e, Arő. Gűr. Hatice GŪMŪŐHAN' a, Mahmut AYDOĐDU' ya, Mustafa KORKUT' a, Arő. Gűr. Halef NAS' a, Arő. Gűr. Ayőe ŐAHABOĐLU' na bana her tűrlű desteđi veren eőim Fatma YILDIZ' a projeme destek sađladıđı için HŪBAK' a teőekkűrű borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Göz	3
2.1.1. Dış tabaka (Tunica fibroza bulbi)	4
2.1.2. Orta tabaka (Tunica vasculosa bulbi)	4
2.1.2.1. Koroid	4
2.1.2.2. Silyer cisim	4
2.1.2.3. İris	5
2.1.2.4. Lens	5
2.1.2.5. Vitroz cisim	5
2.1.3. Retina (Tunica İnterna Bulbi)	6
2.2. Retina ve İskemi Reperfüzyon	7
2.3. Serbest Radikaller	9
2.3.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri	10
2.3.1.1. Süperoksit anyonu (O ₂ ⁻)	11
2.3.1.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	12
2.3.1.3. Hidroksil radikali (OH [•])	14
2.3.1.4. Tekli (Singlet) oksijen (¹ O ₂)	14
2.3.2. Serbest radikal kaynakları	15
2.3.2.1. Biyolojik kaynaklar	15
2.3.2.2. Hücre içi kaynaklar.....	15
2.3.3. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar	15
2.3.3.1. Membran lipitlerine etkileri	16
2.3.3.2. Proteinlere etkileri	18
2.3.3.3. Karbonhidratlara etkileri	19
2.3.3.4. Nükleik asitlere etkileri	19
2.4. Antioksidanlar	20
2.4.1. Enzimler	21
2.4.1.1. Sitokrom oksidaz	21
2.4.1.2. Süperoksit dismutaz (SOD)	22
2.4.1.3. Katalaz	22
2.4.1.4. Glutatyon peroksidaz (GSH Px)	22
2.4.2. Enzim olmayan antioksidanlar	23
2.4.2.1. Askorbik asit	23
2.4.2.2. Glutatyon (GSH)	23
2.4.2.3. E Vitamini	24
2.5. Ekstraktları Kullanılan Bitkiler.....	25
2.5.1. <i>Trigonella foenum graecum</i>	25
2.5.2. <i>Teucrium multicaule</i>	25
2.6. Lutein	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	27
3.1. Deney hayvanları	27
3.2. Gruplar	27
3.3. Bitki Ekstraksiyon Yöntemi	28
3.4. Anestezi Tekniği	28
3.5. İskemi-Reperfüzyon Oluşturulması	28

	Sayfa No
3.6. Retina Örneklerinin Hazırlanması	29
3.7. MDA	29
3.7.1. Retina örneklerinde MDA analizi	30
3.7.2. Retina örneklerinde glutasyon analizi	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	33
4.1. Retinada GSH Ölçüm Sonuçları	33
4.2. Retinada MDA Ölçüm Sonuçları	36
4.3. Uygulana İstatistiksel Metot ve Analizler	39
4.3.1. Glutasyonun istatistiksel analizi	39
4.3.2. Malondialdehitin istatistiksel analizi	39
4.4. Tartışma	40
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	52
ÖZET	53
SUMMARY	55



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Gözün genel yapısı	3
Şekil 2.2. Retinanın histolojik yapısı	6
Şekil 2.3. İskemik zedelenmede olayların varsayılan dizisi	8
Şekil 2.4. Lipid peroksidasyon şeması	17
Şekil 2.5. Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin oluşumu.....	20



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Serbest radikallere örnekler.....	10
Çizelge 3.1. MDA standart eğrisinin hazırlanması	31
Çizelge 3.2. GSH standart eğrisinin hazırlanması	32
Çizelge 4.1.1. Kontrol grubunda GSH değerleri	33
Çizelge 4.1.2. İskemi-Reperfüzyon grubunda GSH değerleri	34
Çizelge 4.1.3. İ-R+Vitamin-E (α -tokoferol) grubunda GSH değerleri	34
Çizelge 4.1.4.İ-R+ <i>Teucrium</i> grubunda GSH değerleri	34
Çizelge 4.1.5. İ-R+Lutein grubunda GSH değerleri	34
Çizelge 4.1.6. İ-R+ <i>Trigonella</i> grubunda GSH değerleri	35
Çizelge 4.1.7. Tüm gruplardaki GSH ortalama değerleri	35
Çizelge 4.1.8. GSH standartlarından elde edilen değerler ve kalibrasyon eğrisi	35
Çizelge 4.2.1. Kontrol grubunda MDA değerleri	36
Çizelge 4.2.2. İskemi-Reperfüzyon grubunda MDA değerleri	37
Çizelge 4.2.3. İ-R+Vitamin-E (α -tokoferol) grubunda MDA değerleri	37
Çizelge 4.2.4. İ-R+ <i>Teucrium</i> grubunda MDA değerleri	37
Çizelge 4.2.5. İ-R+Lutein grubunda MDA değerleri	37
Çizelge 4.2.6. İ-R+ <i>Trigonella</i> grubunda MDA değerleri	38
Çizelge 4.2.7. Tüm gruplardaki MDA ortalama değerleri	38
Çizelge 4.2.8. MDA standartlarından elde edilen değerler ve kalibrasyon eğrisi	38

SİMGELER DİZİNİ

AMP	Adeozin Monofosfat
ATP	Adeozin Trifosfat
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTPA	Dietilentriamin Pentaasetik Asit
EDTA	etilendiamin Tetra Asetik Asit
ER	Endoplazmik Retikulum
GAA	Glasiyal Asetik Asit
GSH	Glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş Glutasyon
GPx	Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HO ₂	Perhidroksi Radikali
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LOO.	Peroksil Radikali
LOOH	Hidroperoksit
LPO	Lipid Peroksidasyonu
µM	Mikromolar (10 ⁻⁶)
MDA	Malondialdehit
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Redükte Formu
OSR	Oksijen Serbest Radikalleri
PO ₂	Yüksek parsiyel oksijen
PUFA	Poliinsatüre yağ asitleri
RNA	Ribonükleik Asit
RPE	Retina Pigment Epiteli
SDS	Sodyum Dodesil Fosfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik Asit

1. GİRİŞ

Retina, göz küresinin sklera ve koroidden sonraki en iç tabakasıdır. Yapısında duyu reseptörleri olarak adlandırılan koni ve basil hücreler bulunur. Bu özel hücrelerden dolayı retina gözün ışığa en hassas olan bölgesidir (Guyton ve ark., 2001). Retinaya gelen ışık duyu reseptörlerinde çeşitli sinyaller oluşturur. Bu sinyaller optik sinir aracılığıyla beyinin görme merkezine iletilerek, görme olayı gerçekleştirilir (Solomon, 1997).

İskemi, kan akımının dokuya gitmesinin engellenmesi veya kan basıncındaki düşme sonucu glikoz ve oksijenin dokuya dağıtımındaki ve metabolik artıkların dokudan uzaklaştırılmasındaki zayıflama ile meydana gelen patolojik bir durumdur (Cottron ve ark., 2000). Glikoz ve oksijen miktarındaki azalma ve metabolik artıkların birikmesi dokuda çeşitli hasarlara neden olur. İskemi kritik bir zaman dilimini aşarsa dokularda ardışık bir takım kimyasal olaylar hücre disfonksiyonu, intertisyel ödem hücresel hasar ve en sonunda hücre ölümüne yol açmaktadır (Granger, 1986). Dokuya tekrar kan akımının sağlanmasına da reperfüzyon denir. Bir çok çalışmada reperfüzyon hasarının iskemik hasardan daha şiddetli olduğu gösterilmiştir (Ishihara, 2000). Bu hasardan ise büyük oranda serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır (Granger, 1986; Banin, 2000). Aerobik canlılar da en önemli serbest radikal oksijenden köken alan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleridir (Akkuş, 1995). İnsan retinası, çeşitli nedenlerden dolayı iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalır (Yoon, 1989). Bunlar; diabetik retinopati (Takagi, 2004), orak hücre anemisi (Sinclair, 2003), glokom (Thanos, 2004), premature retinopatisi (Smith, 2004) ve retinal arter ile ven tıkanıklığı gibi durumlarda söz konusudur (Cottron ve ark., 2000).

Retina, oksijen ve doymamış yağ asidi bakımından oldukça zengin olduğu için aşırı miktarda serbest radikal etkisine maruz kalmaktadır (Siu, 1998). Hücre zarında ve hücrenin diğer komponentlerinde bulunan doymamış yağ asitleri serbest

radikallerden kolaylıkla etkilenerek lipid peroksidasyon tepkimesini başlatır (Clemens, 1990). Lipid peroksidasyonu, direkt olarak membran yapısına ve dolaylı olarak da reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece bir çok hastalığa ve doku hasarına sebep olur (Akkuş, 1995). Serbest radikaller sadece lipidleri değil karbonhidrat, protein ve DNA gibi diğer hücre komponentlerini de oksitleyerek hücreye zarar verir (Moller, 1996). Bu zarar tamir edilemeyecek boyuta ulaştığı zaman hücre nekroza veya apoptosize gider (Cotron ve ark., 2000).

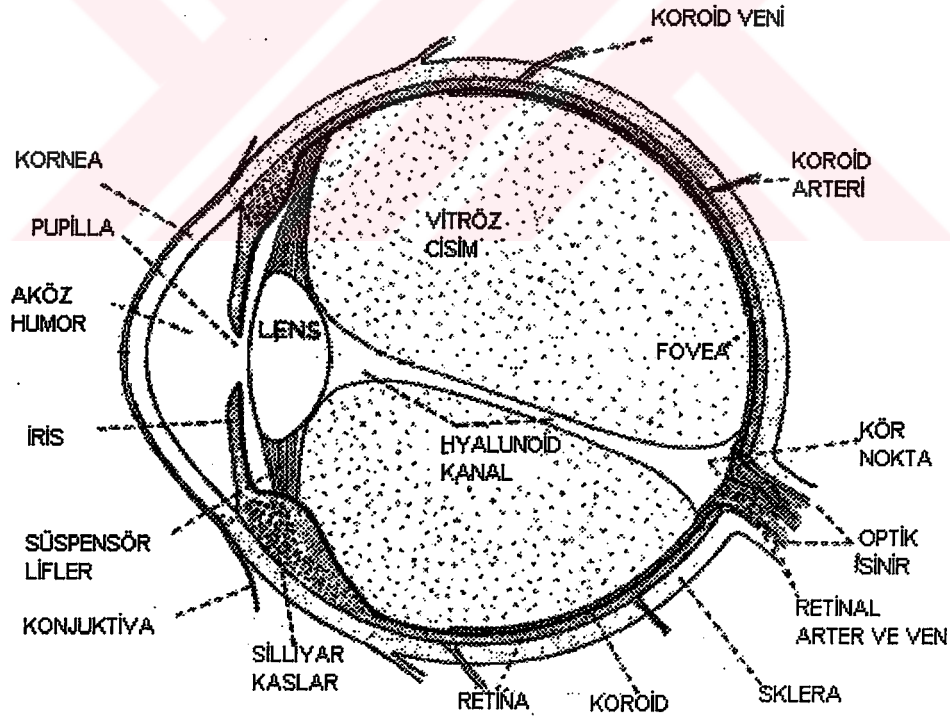
Hücre serbest radikallere karşı oldukça gelişmiş bir savunma sistemine sahiptir. Bu savunma sistemine antioksidan savunma sistemi denir. Normal bir hücrede metabolik işlevler sırasında serbest radikaller üretilir. Serbest radikal oluşum hızı ile antioksidanlar tarafından etkisizleştirme hızı dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir (Delmaestro, 1980). Buna karşılık savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulmakta ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır (Nakazawa, 1996). Retina tabakası çeşitli enzimatik ve non enzimatik savunma sistemlerine sahiptir. Retinanın pigmentli epitel tabakasında bulunan ve doğal olarak sentezlenen melanin (Thuman, 1997), vitamin E (Augustin, 1998), vitamin C (Nielsen, 1987), katalaz ve SOD (Nayak, 1988) bunlardan bazılarıdır.

Antioksidanların serbest radikallere karşı koruyucu etkisi uzun süredir bilinmektedir (Yu, 1994). Serbest radikaller ve antioksidanların hastalıklardaki rolü son yıllarda büyük ilgi uyandırmıştır. Bazı bitkilerin halk tarafından tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. *Teucrium multicaule* ve *Trigonella foenum-graecum* tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerdendir. Bu nedenle bu bitkilerin hangi hastalıklarda ne kadar etkili oldukları çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmaktadır (Abdel-Barry, 1997; Ali, 1995). Bu çalışmada iskemi-reperfüzyona maruz kalmış sıçan retinasındaki MDA ve GSH miktarına vitamin E (Alfa tokoferol), *Teucrium multicaule*, *Trigonella foenum-graecum* ve luteinin etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Böylece göz kusurlarının moleküler düzeyde araştırılması ve bu konuda tıbbi tedavi yöntemlerine katkıda bulunmak amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Göz

Göz, karmaşık ve oldukça gelişmiş, ışığa duyarlı (Fotosensitif), ışık şiddetine ve nesnelere yansıyan renklerin analizini yapan, kafatasının orbita çukurunda yer alan bir duyu organıdır (Solomon, 1997; Junqueira ve ark., 1998). Dıştan içe doğru sklera ve korneadan oluşan bir dış tabaka (Tunica fibroza bulbi), koroid silyer cisim ve iristen oluşan orta tabaka (Tunica vasculosa bulbi), ve retinayı içine alan bir iç sinir dokusu tabakasından (Tunica interna bulbi) oluşur (Vural, 1999; Junqueira ve ark., 1998).



Şekil 2.1. Gözün genel yapısı (Grove ve Novel, 1950)

2.1.1. Dış tabaka (Tunica fibroza bulbi)

Dış tabaka, sklera ve kornea olmak üzere iki bölümden oluşur. Sklera gözün 5/6 ini kaplayan opak ve sağlam bir bağ dokusu tabakasından ibarettir. Skleranın kalınlığı arkada 1 mm olup ön tarafa doğru gidildikçe incelik ve ekvatorunda 0,4 mm'ye düşer. Skleranın dışı yüzü düzdür sadece göz kaslarının birleştiği bölgede hafif engebeldir (Arıncı, 1997). Göz kapaklarını örtüğü gözün ön bölümü konjunktiva ile örtülüdür. Konjunktiva yapısında bulununan goblet hücreleri, gözün devamlı nemli kalmasını sağlar (Junqueira ve ark., 1998). Sklera yerini ön tarafta, şeffaf ve hafif öne çıkık kornea ya bırakır. Korneaya dıştan herhangi bir cisim temas ettiğinde anında refleks oluşarak göz kapakları kapanır.

2.1.2. Orta tabaka (Tunica vasculosa bulbi)

Orta tabaka, koroid, silyer cisim ve iris tabakasından oluşur (Arıncı, 1997).

2.1.2.1. Koroid

Koroid, kan damarları bakımında oldukça zengin bir tabakadır. Bu yüzden damar tabaka da denir. Bu tabakada çok sayıda melanosit bulunur ve yapıya karakteristik siyah rengini verir (Junqueira ve ark., 1998). Ayrıca melanosit hücrelerinin oluşturduğu melanin pigmenti göze gelen ışığı absorblayarak göz içinde ışığın yansımalarını engeller. Bu da net bir görüş için zorunludur (Guyton ve Hall, 2001). Melanin pigmentinin antioksidan özelliğinin olduğu da bilinmektedir (Thuman ve Hinton, 1997).

2.1.2.2. Silyer cisim

Silyer cisim, skleranın anterior bölümünün iç yüzeyinde yer alan kalınlaşmış bir halka olarak görülür ve koroidin lens hizasında öne doğru yaptığı genişlemedir. Silyer cisim yüzeyinde dışa doğru çıkıntılar bulunur. Bunlara silyer uzantılar denir. Silyer uzantıların yüzeyi epitel hücreler ile kaplıdır. Bu epitel hücreler aköz hümörü

salgılar. Dakikada yaklaşık olarak 2-3 µl salgılanan aköz hümör, iyon içeriği plazmaya benzeyen ancak % 1'den daha az protein içeren alkali ve berrak bir sıvıdır. Salgılandıktan sonra önce arka kamerayı daha sonra ön kamerayı doldurur. Ön ve arka kamera boşluğu dolduktan sonra kornea ve irisin bazal bölümü arasında trabeküleri geçerek shlemm kanalına akar. Shlemm kanalı gözün etrafını çember şeklinde dolaşan ince duvarlı bir vendir (Guyton ve Hall, 2001). Ancak içinde tamamen aköz hümör bulundurduğu için bunlara aköz venler de denir. Shlemm kanalı ince venler ile bağlantılıdır. Aköz hümör shlemm kanalı vasıtasıyla dolaşım sistemine dahil olur. (Solomon, 1997; Junqueira ve ark., 1998; Guyton ve Hall, 2001)

2.1.2.3. İris

Kişiler arasında farklı renklerde olması nedeniyle bu yapıya gökkuşağı anlamına gelen iris adı verilmiştir. 12 mm çapında ortası delik bir bölme şeklinde, kornea ile lens arasında bulunur (Arıncı, 1997). İrisin ortasındaki deliğe pupilla (göz bebeği) denir ve göze bakıldığında siyah görünür. İristeki dairesel kaslar daralarak ya da genişleyerek pupillayı büyütür ya da küçültür. Göze çok kuvvetli ışık geldiği zaman ışık şiddetini düşürmek için irisin dairesel kasları kasılır ve pupilla küçülür, az miktarda ışık geldiği zaman iris, gözün ışığı daha iyi alması için dairesel kasları gevşeterek pupillayı büyütür (Solomon, 1997).

2.1.2.4. Lens

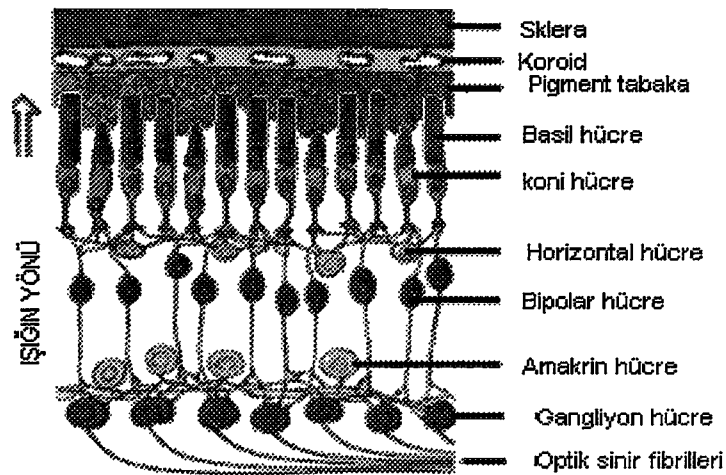
Göze gelen ışığın kırımında görev alan lens, ön kamera boşluğunun arkasında bulunur (Solomon, 1997). Gençlerde lens, visköz, protein içeren saydam liflerle dolu güçlü esnek bir kapsülden oluşmuştur. Lens, kapsülü üzerinde herhangi bir gerilim uygulanmadan gevşek bırakıldığında, mercek kapsülünün esnekliğine bağlı olarak küresel bir şekil alır. Ancak 70 kadar süspansuvar bağ, merceği dış çeperine doğru gelecek şekilde tutturmuştur. Bu bağlar sayesinde lens yassı bir şekilde kalır. Lens yakın ve uzak nesnelere daha net algılayabilmek için bu bağlar sayesinde şeklini değiştirebilmektedir (Guyton ve Hall, 2001).

2.1.2.5. Vitröz cisim

Vitröz cisim (korpus vitreum), lensin arkasında bulunan kollajen lifler ve esas bileşeni hyaluronik asit olan glikozaminoglikanlardan oluşan saydam bir jeldir (Junqueira ve ark., 1998). Gözün şeklini korumasında ve ışığın kırınımında görev alır (Guyton ve Hall, 2001). Yapısında kan damarı bulundurmaz bu nedenle retina ve silyer cisimden beslenir (Arıncı, 1997).

2.1.3. Retina (Tunica interna bulbi)

Retina, renkli görmeden sorumlu olan konileri ve esas olarak karanlıkta görmeden sorumlu olan basilleri içeren, gözün ışığa duyarlı olan bölümüdür (Guyton ve Hall, 2001). Retina, pigmentli retina ve saydam bir zar olan sensoriyal retinadan oluşmuştur. Retina, optik sinirden ora serataya kadar uzanır. İçte vitre ve dışta koroid ile komşudur. Pigmentli retina tek katlı hücre tabakasından meydana gelmiş ve yapısında melanin bulunur (Thuman ve Hinton, 1997). Sensoriyal retina ise mitozlar sonucu fotoreseptörler (Basil ve koni hücreleri), sinyalleri basil ve konilerden bipolar hücre dendritlerine yatay olarak ileten horizontal hücreler, sinyalleri basil, koni ve horizontal hücrelerden gangliyon ve amakrin hücrelere ileten bipolar hücreler, sinyalleri bipolar hücrelerden gangliyon hücrelerine ileten amakrin hücreler ve destek hücreleri olan müller hücreleri meydana gelmiştir (Guyton ve Hall, 2001; Bengisu, 1990).



Şekil 2.2. Retinanın histolojik yapısı. Şekilde retinada bulunan hücreler gösterilmiştir (Crook, 1998)

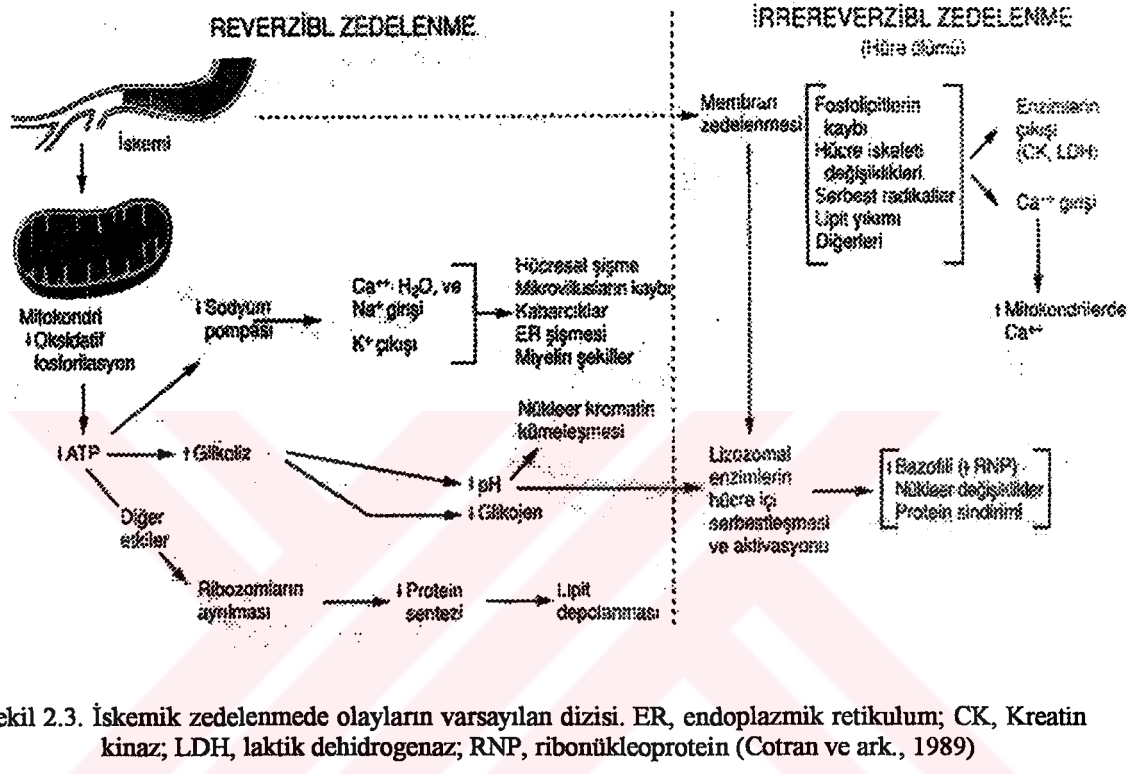
Retinanın iç tabakaları için besleyici kan desteği, göz küresine optik sinir ile birlikte giren ve sonra tüm iç retina yüzeyine dallanan retinal arterden sağlanır. Bununla beraber retinanın dış tabakalarının çoğu, retina ve sklera arasında damarsal bir yapı olan koroidden beslenir (Harris ve ark, 1997). Ayrıca retinanın dış tabakaları, özellikle basil ve konilerin dış segmentlerinin beslenmeleri ve oksijen gereksinimleri esasen koroid tabaksından difüzyonuna bağlıdır.

Retinanın reseptör tabakası pigment epitel tabakasının bitişiğindedir (Thuman ve Hinton, 1997). Işık, gangliyon hücrelerini geçer ve ışığın elektrokimyasal olaya dönüştüğü fotoreseptör tabakasına ulaşır (Blank, 1999).

2.2. Retina ve İskemi Reperfüzyon

İskemi, kan akımının dokuya gitmesinin engellenmesi veya kan basıncındaki düşme sonucu glikoz ve oksijenin dokuya dağıtımındaki ve metabolik artıkların dokudan uzaklaştırılmasındaki zayıflama ile meydana gelen patolojik bir durumdur (Cotran ve ark, 1989). Dokuya tekrar kan akımının sağlanmasına da reperfüzyon denir. İskeminin ilk etkisi mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon üzerinedir. Oksijen basıncının azalması sonucu oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi azalır ve hücre içi ATP miktarı belirgin olarak düşer. ATP miktarındaki azalmanın hücre içindeki bir çok sisteme etkisi vardır. Örneğin sitoplazmik serbest kalsiyum normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile hücre içinde oldukça düşük yoğunlukta tutulur. İskemiden kaynaklanan ATP miktarındaki azalma sonucu, ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları görevini yapamaz ve hücre dışı kalsiyum plazma membranından geçerek hücre içinde kalsiyum yoğunluğunun artmasına neden olur. Bunu hücre içi stoklardan kalsiyumun serbest bırakılması izler. Artan sitoplazmik kalsiyum sıra ile fosfolipazları, proteazları, ATPazları ve endonükleazları aktifleştirir. Bu enzimler de lipid, protein, ATP ve nükleik asitleri parçalayarak hücrenin ölümünü hızlandırır. Ayrıca plazma membranındaki ATP enerjili “sodyum pompası”nın aktivitesi azalır. Bunu, sodyumun hücre içinde birikimi ve potasyumun hücre dışına akışı izler. Sodyumun hücre içindeki artışı suyun osmotik basıncının artmasına ve hücrenin su alıp şişmesine neden olur. ATP miktarındaki azalma ile AMP miktarı hızla artar.

Artan AMP miktarı fosfofruktokinaz enzimini uyararak glikojenden ATP üretimini artırır. Sonuç olarak, glikojen miktarı hızla tükenir. Glikoliz, fosfat esterlerinin hidrolizi, laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak hücre içi pH'nın düşmesine neden olur (Cotran ve ark., 1989).



Şekil 2.3. İskemik zedelenmede olayların varsayılan dizisi. ER, endoplazmik retikulum; CK, Kreatin kinaz; LDH, laktik dehidrojenaz; RNP, ribonükleoprotein (Cotran ve ark., 1989)

Düşük pH daha ileri ki aşamalarda serbest kalan lizozom enzimlerinin aktifleşmesine neden olur.

İskemiyin neden olduğu sonraki olay, ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezindeki azalmadır. Hipoksi düzelmez ise mitokondriyal fonksiyonların daha da kötüleşmesi ve membran permabilitesinin artması daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve hücre şişmiş görülür (Harris ve ark., 1997).

Hücre zedelenmesinde, reverzibl zedelenme ile irreverzibl zedelenmenin ayrım noktasını tayin etmek oldukça zordur. İrreverzibl zedelenmede, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun reperfüzyondan sonra bile geri döndürülmesindeki yetersizlik ve membran permabilitesindeki ileri derecede bozukluk temel olaylar olarak kabul edilmektedir. Ayrıca irreverzibl hücre zedelenmesinin patogenezinde hücre membran hasarını ana faktör olarak destekleyen önemli kanıtlar vardır (Guyton ve Hall, 2001).

İskemik dokuda en büyük hasar reperfüzyondan sonra meydana gelir (Ishihara, 2000). Çünkü reperfüzyon, hücreye aşırı miktarda Ca^{++} girişine neden olur ve kalsiyuma bağlı litik enzimlerin aktivasyonu ile hücre komponentleri zarar görür. Örneğin; fosfolipaz aktifleşerek hücre membran fosfolipitlerinden araşidonik asidi serbestleştirir. Yine iskemi sırasında ATP' nin yıkımı sonucu hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri birikirken ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin oksidaza çevrilir. Reperfüzyon esnasında sisteme ani O_2 girişi, birikmiş pürinlerin çok süratli bir şekilde oksidlemesine ve sonuç olarak ürat ve süperoksit anyonu oluşumuna neden olur. Oluşan süperoksit anyonu, endotelde demir tarafından katalize edilen reaksiyonlar ile toksisitesi yüksek hidroksil radikali üretimine neden olur (Barry ve ark., 1997). İskemi, kompleman sistemi ve kemotaktik faktörlerin oluşumunu aktive eder. Reperfüzyon sonrası bu bölgede toplanan nötrofiller, NADPH oksidaz enzimi sayesinde süperoksit üretirler (Akkuş, 1995).

Görüldüğü gibi iskemik-reperfüzyon hasarından büyük oranda serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır. Retina, oksijen ve doymamış yağ asidi bakımından oldukça zengin olduğu için aşırı miktarda serbest radikal etkisine maruz kalmaktadır. Bu durum retinayı iskemik hasara daha hassas kılar (Siu, 1998).

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış orbitalinde bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron taşıyan, elektrik yüklü ya da yüksüz atom veya moleküllerdir (Delmaestro, 1980). Organik veya inorganik moleküller halinde bulunabilirler (Practido, 1999).

Ortaklanmamış elektronları nedeniyle son derece reaktif olan bu moleküller daha kararlı bir yapıya dönüşmek için diğer moleküller ile reaksiyona girerler (Clark, 1986; Reilly ve ark., 1991).

Çizelge 2.1. Serbest radikallere örnekler (Uysal, 1998)

RADİKAL	ADLANDIRMA
H ₃ C	Metil radikali
R-OO	Alkil peroksi radikali
OH [•]	Hidroksil radikali
O ₂ ^{•-}	Süperoksit anyonu
NO [•]	Nitrik oksit anyonu
Cl [•]	Klor radikali
NO ₂ [•]	Azot dioksit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit

Bu bileşikler organizmada, normal aktiviteler sonucu oluştuğu gibi, hiperoksi, inflamasyon, iskemi, radyasyon, klinik uygulamalarda kullanılan adriamicin ve daunorobin gibi neoplastik ajanlar ile üretim hızları artmaktadır (Freeman ve Crapo, 1982). Cu⁺², Fe⁺³, Mn⁺² ve Mo⁺⁵ gibi geçiş metallerin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Ama, radikal oluşumuna neden olan reaksiyonları katalizledikleri için serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Akkuş, 1995).

İki radikal reaksiyona girerlerse her iki radikal de elimine olur. Bir radikal, radikal olmayan bir molekül ile karşılaşarsa başka bir serbest radikal oluşur. İşte bu özellik serbest radikallerin bir çok zincir reaksiyonuna girmelerine sebep olmaktadır (Bozkurt, 1997; Sies, 1993).

2.3.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri

Yaşam için gerekli olan oksijenin, dış yörüngesinde eşleşmemiş iki elektron taşıması ve bu molekülün aerobik organizmalarda pek çok reaksiyonda önemli rol

oyunması çok sayıda serbest radikal oluşmasına neden olmaktadır (Practido, 1999). Serbest oksijen radikalleri O_2^- , H_2O_2 , OH radikalleridir. Serbest oksijen radikalleri, hücrenin önemli komponentleri olan lipid, karbohidrat, protein ve DNA'yı oksitleyerek biyolojik sistemlerde ağır hücre zedelenmelerine neden olurlar (Uysal, 1998; Erden, 1992; Çelebi, 2002), Normal şartlar altında oluşumları, hücrenin sahip olduğu koruyucu sistemlerden dolayı zarara neden olmaz (Bonne, 1998). Hücrenin sahip olduğu bu koruyucu sisteme antioksidan savunma sistemi denir ve bu antioksidan savunma sistemi hücre içinde oksidanlar ile bir denge içerisinde. Ancak bu oksidan ile antioksidan arasındaki denge oksidan yönüne doğru bozulduğunda serbest radikallere bağlı zararlar ortaya çıkmaktadır (Uysal, 1998).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen metabolizmasındaki anahtar maddeler şunlardır.

1. Oksijenin kendisi (O_2)
2. Süperoksit anyonu (O_2^-)
3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)
4. Geçiş metallerinin iyonları (Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} vb.)
5. Hidroksil radikali (OH)

Oksijende son iki elektronun eşleşmemiş olması oksijenin diradikal olarak değerlendirilmesine neden olur. Bu özelliğinden dolayı oksijen diğer serbest radikallerle kolayca etkileşir (Akkuş, 1995). Oksijen suya indirgenirken yüksek derecede reaktif olan diğer ürünler de oluşabilir (Nakazawa, 1995). Normal şartlar altında oksijenin %98 solunum zincirinin son basamağı olan sitokrom O_3 tarafından kullanılır. Nadiren (%1-2) Sitokrom O_3 tarafından tüketilemez. Bunlar bir elektron alıp süperoksit anyonuna veya iki elektron alarak hidrojen peroksite indirgenir (Köse ve Doğan, 1992; Kılınç, 1995; Reitter ve ark., 1998).

2.3.1.1. Süperoksit anyonu (O_2^-)

Süperoksit anyonu, moleküler oksijenin bir elektron almasıyla meydana gelir (Akkuş, 1995; Floyd, 1995). Normal koşullarda oluşan temel oksijen radikali

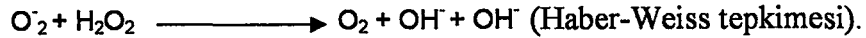
süperoksit anyonudur. Süperoksit anyonu başta hem, flavin, demir ve sülfür merkezleri içeren proteinler olmak üzere pek çok enzimatik tepkimelerde, mitokondrilerde elektron taşınımı sırasında, çeşitli moleküllerin otooksidasyonunda meydana gelir. Süperoksit anyonu hidrojen peroksit ile birlikte fagositik lökositlerin ürettiği ana mikrop öldürücüdür (Robinson, 1995).

Süperoksit anyonu, en az zararlı olan serbest radikaldir. Ama, anında ortamdan uzaklaştırılmazsa kendinden çok reaktif toksik maddelerin oluşumuna neden olur. Hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metal iyonlarının reduktantı olması süperoksit anyonunu önemli kılar. Süperoksitin bir çok enzimi inaktive ettiği bilinmektedir (Baykal 2002). Ortamdan uzaklaştırılmayan süperoksit anyonu;

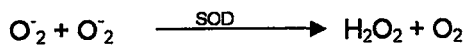
1. Ortamdan bir hidrojen alarak perhidroksil radikali oluşturabilir.
2. Perhidroksil radikali ile tepkimeye girerek oksijen ve hidrojenperoksit oluşturabilir.



3. H_2O_2 ile tepkimeye girerek OH^\cdot radikali ve oksijen oluşturabilir

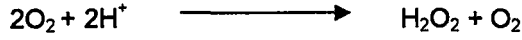


Süperoksit anyonunun ortamdan uzaklaştırıldığı tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir. Bu tepkime süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından iki süperoksit radikalinden hidrojen peroksit ve oksijen molekülü oluşmasıyla sonuçlanır (Kılınç, 2002).

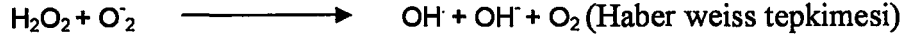


2.3.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

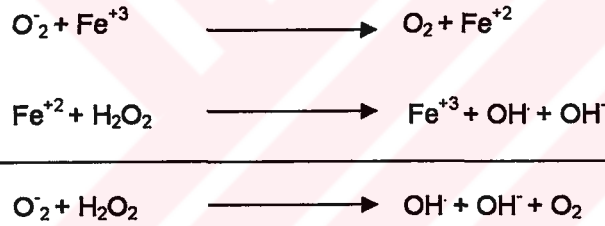
Hidrojen peroksit, süperoksit radikalinin spontan veya SOD ile katalizlenen dismutasyon reaksiyonuyla veya moleküler oksijenin iki elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir (Akkuş, 1995; Floyd, 1995; Aydın, 1997).



Hidrojen peroksit, ortaklanmamış elektron içermez. Bu yüzden gerçekte serbest radikal değildir. Demir, bakır gibi geçiş metallerinin varlığında süperoksit radikali ile reaksiyona girer ve bilinen en toksik oksidan ajan olan hidroksil (OH^\cdot) radikalini oluşturur (Akkuş, 1995; Aydın, 1997; Erenel, 1992).

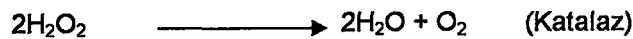


Bu reaksiyon haber-weiss reaksiyonu olarak bilinir. Haber-weiss katalizör varlığında veya yokluğunda cereyan edebilir. Ancak katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demir ile katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyon, önce ferric demiri (Fe^{+3}) süperoksit radikali tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirger sonra bu ferro demir kullanılarak hidrojen peroksitten OH^\cdot ve OH^- üretilir (Cheesman, 1993)



Hidrojen peroksit, hücre ve nükleus zarından kolaylıkla geçebilir (Floyd, 1995). Hidrojen peroksit ve süperoksit radikalinin hasar oluşturma potansiyelleri oldukça azdır ve katalizör metallerin yokluğunda ortamdan derhal uzaklaştırılırlar (Cheesman, 1993). Bazı araştırmalar, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonunun toksik etkisinin, hidroksil radikaline dönüşmelerinden dolayı olduğunu ileri sürerler.

Hidrojen peroksit katalaz ve birkaç peroksidaz (Örneğin glutatyon peroksidaz) tarafından parçalanabilir (Floyd, 1995).



2.3.1.3. Hidroksil radikali (OH⁻)

Hidroksil radikali hem süperoksit anyonundan (Haber weiss) hem de hidrojen peroksitten meydana gelir. Her iki reaksiyon da geçiş metallere ihtiyaç duyar (Floyd, 1995). Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda hidroksil radikali oluşur (Akkuş, 1995). Son derece reaktif olan bir radikaldir. Yarılma ömrü çok kısa olduğu için hemen oluştuğu yerde büyük tahribata yol açar (Erden, 1992). Çeşitli moleküllerden bir proton koparak yeni radikal oluşumuna neden olur. Hidroksil radikali DNA sarmalında kırılmalara, enzim inaktivasyonuna ve lipid peroksidasyonunun başlamasına neden olabilir (Practido, 1999)

2.3.1.4. Tekli (Singlet) oksijen (¹O₂)

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonu sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spinin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle oluşur (Akkuş, 1995). Singlet oksijen, gözde pigmentlerin ışığı absorpsiyonuyla aktive edilmesi sonucu oluşabilir (Cheesman ve Slater, 1993).

Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar. Singlet oksijenin kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle reaktif oksijen türlerinin direkt tayini yapılabilmektedir (Akkuş, 1995). Tekli oksijen ve hidroksil radikallerinin üretimi büyük oranda O₂ ve H₂O₂'in birikmesine bağlıdır. Bu iki bileşiğin anında ortamdaki uzaklaştırılmadığı durumda, iki molekülün birbirine rastlaması ¹O₂ ve OH⁻ üretimi için yeterlidir (Kılınç, 2002).

2.3.2. Serbest radikal kaynakları**2.3.2.1. Biyolojik kaynaklar**

Fagositler, antineoplastik ajanlar (Bleomisin, doxorubicin, adriamicin) radyasyon, alkol, uyuşturucu, hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar ve stres olarak sıralanabilir (Akkuş, 1995).

2.3.2.2. Hücre içi kaynaklar

Tioller, hidrokarbonlar, ketakolamiler, flavinler ve antibiyotiklerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler (Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin), mitokondriyal elektron transportu, lipoksijenaz, prostoglandin, NADPH oksidaz, iskemi, travma, oksidazlar ve flavoproteinler bilinen serbest radikal oluşturan kaynaklardır (Akkuş, 1995).

2.3.3. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar

Serbest radikaller aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan savunma sistemi yetersiz kaldığında biyomoleküllere zarar verirler (Aybey, 1996). Reaktif oksijen radikalleri, membran lipidlerinin peroksidasyonu, membran permabilitesinin artmasına enzimlerin ve proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmalarına, DNA yapısının bozulmasına ve mukopolisakkaritlerin depolimerizasyonuna neden olarak doku hasarı oluşturur. Serbest radikaller hücre ve dokuda bir çok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir (Uysal, 1998).

1. DNA'nın tahrip olması
2. Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı
3. Tiolere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması
4. Protein ve lipidlere kovalent bağlantıların yapılması
5. Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler

6. Mukopolisakkaritlerin yıkımı
7. Lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonun değişmesi
8. Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sisteminin bozulması
9. Seroid ve lipofuksin pigmentinin birikimi
10. Kolajen elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması

2.3.3.1. Membran lipidlerine etkileri

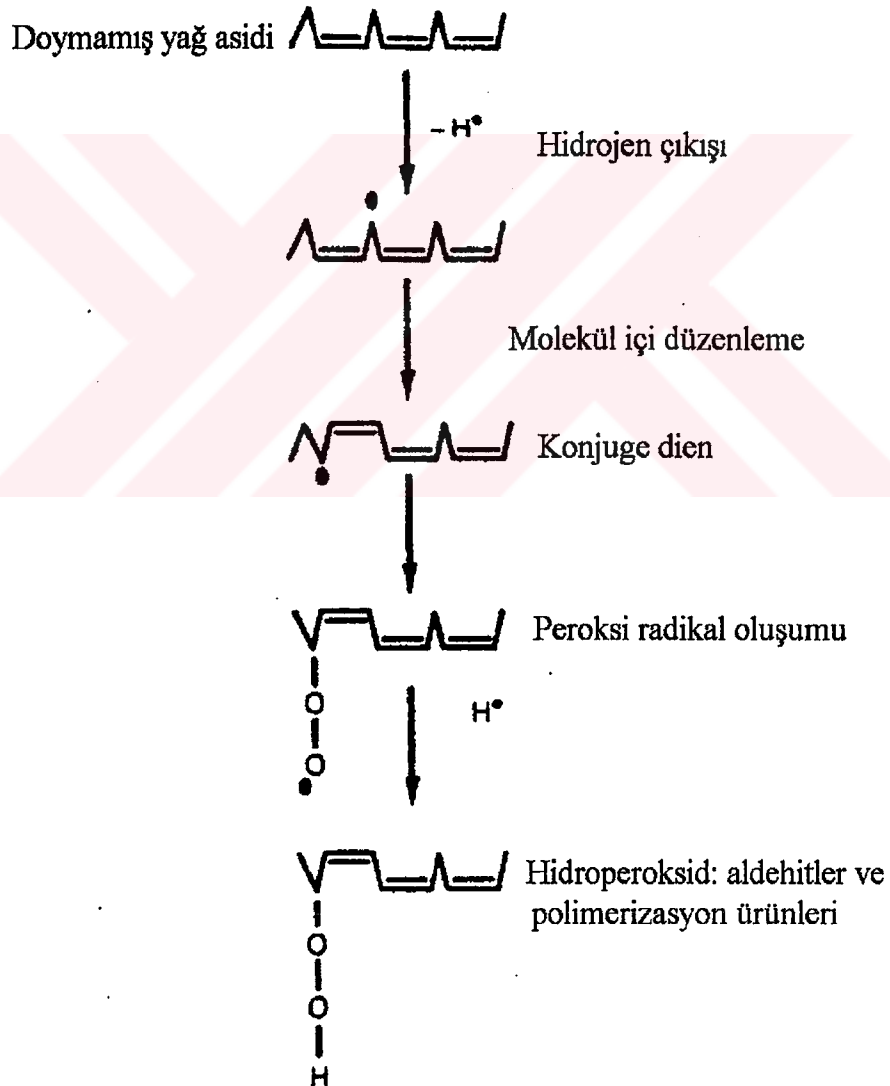
Hücre membranı, bol miktarda doymamış yağ asidi içerdiğinden serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır (Cheesman ve Slater 1993). Ortamda bulunan serbest radikaller yağ asitlerinden bir proton koparak “Lipid peroksidasyon” olarak bilinen reaksiyonun başlamasına neden olurlar. Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi maddeler hücrenin bir çok komponentiyle reaksiyona girerek hücrenel ve metabolik fonksiyonlar üzerine toksik etki gösterirler (Köse ve Doğan, 1992). Biyolojik membranlarda serbest radikaller ile indüklenen lipid peroksidasyonu başlama, yayılma ve sonlanma reaksiyonları şekilde değerlendirilebilir (Mearson, 1982).

Başlama

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin poliansature yağ asitlerinin yan zincirindeki metilenik karbonlardan hidrojen atomu çıkarmasıyla başlar. Peroksidasyonun başlaması için ayrıca demir ve bakır gibi geçiş metal iyonlarının varlığı da gereklidir. Hidrojen atomunun çıkarılması karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron bıraktığından, karbon merkezli bir radikal (L.) oluşumuna neden olur. Bu radikalın bir çok akibeti vardır. Ancak aerobik hücrelerde en sık görülen olay, bu radikalın moleküler düzenlemeler ile konjuge dien oluşturduktan sonra oksijen ile reaksiyona girerek peroksi radikalının oluşturmasıdır.

Yayılma

Oluşan peroksi radikali, diğer bir peroksi radikali ile birleşebilir veya membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksi radikalinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomları çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Böylece, yan zincirlerden hidrojen atomunun çıkarılması ile her defasında lipid hidro-peroksitleri (LOOH) ve yeni bir peroksi radikali oluşmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra, otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zincirleri, lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir (Akkuş, 1995; Köse ve Doğan, 1992).



Şekil 2.4. Lipid peroksidasyon şeması (Özekin ve Değer, 2001)

Sonlanma

Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit kelatları (Fe^{+2} -ADP), hem, hemoglobin, ve miyoglobinde içeren bazı demir proteinleri lipid hidro-peroksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırırlar. Lipid peroksidasyonu sonucu, alkanlar, alkenler, aldehitler, hidroksialkenler, malondialdehit (MDA) ve uçucu hidrokarbonlar gibi bir takım ürünler oluşur.

Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (Köse ve Doğan, 1992). Lipid peroksidasyonu, kalsiyum homeostasisinde bozulmaya neden olarak kalsiyuma bağlı bozuklukların ortaya çıkmasına neden olur (Cotran ve ark., 1989). Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşur. MDA, membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey determinantlarının bazı özelliklerini değiştirmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MDA, mutajenik genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (Hockstain, 1981; Karaduman, 1998).

2.3.3.2. Proteinlere etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Protein fonksiyonu için kritik pozisyonda olan amino asitler (Örn: enzimin aktif bölgesindeki amino asitler), özellikle radikal hasarına duyarlıdır (Akkuş, 1995). Metionin, sistein gibi terminal sülfidril (-SH) grubu bulunduran amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler, oksidasyona en fazla maruz kalmaktadırlar. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır. Bunun yanı sıra iskemi-reperfüzyon sürecinde hücre içi enzimlerden olan antioksidan

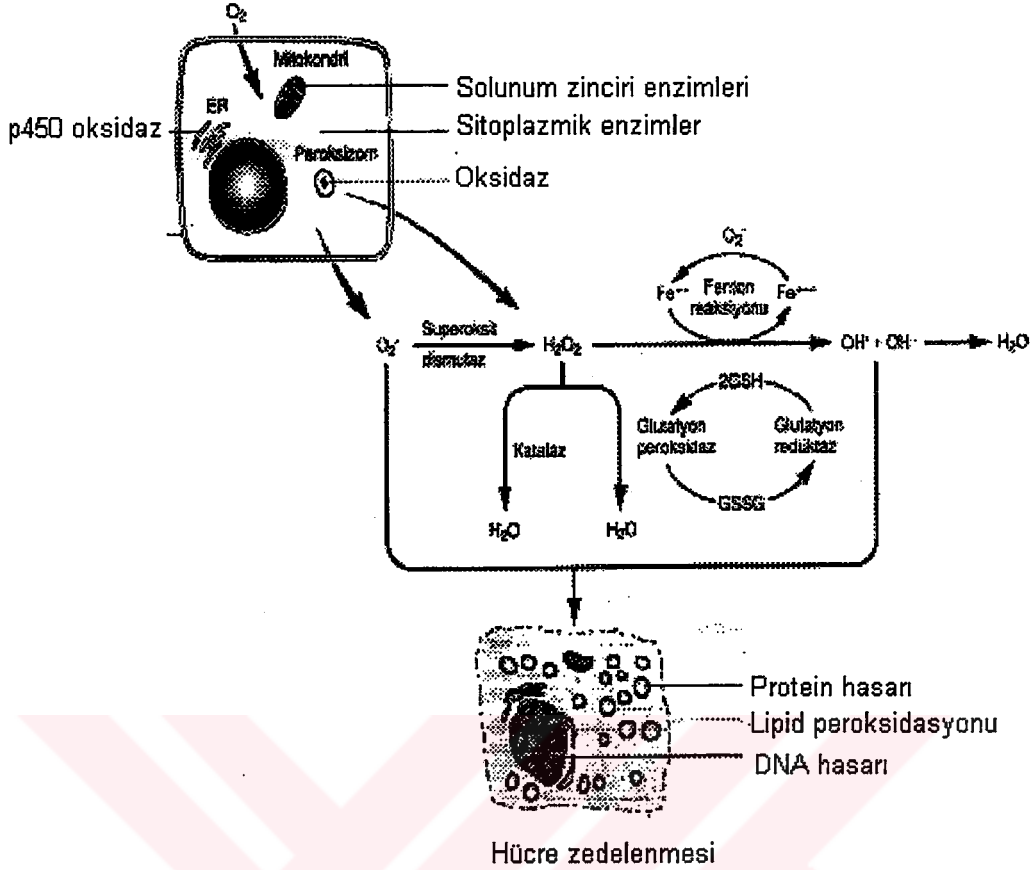
enzimlerin oksidasyonları da bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın nedenlerinden birini oluşturabilmektedir (İşlekel, ve ark., 2000).

2.3.3.3. Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzaloaldehitler meydana gelir. Okzaloaldehitler, DNA, RNA, ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterirler (Akkuş, 1995). Karbonhidratların proteinlere bağlanması, proteinleri serbest radikal hasarına daha duyarlı kılmaktadır. Böylece hormonal ve nörotransmitter yanıtlarda rol oynayan hücre reseptör işlevleri değişmektedir (Aybey, 1996; Winrow, 1993). Bir mukopolisakkarit olan hyalüronoik asit gözün vitreusunda bol miktarda bulunur. Hyalüronoik asidin oksidasyonu katarakt oluşumuna katkıda bulunur (Akkuş, 1995).

2.3.3.4. Nükleik asitlere etkileri

Reaktif oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makro molekül nükleik asitlerdir. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asidin (DNA) temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlar ile reaksiyona girerek değişikliklere yol açar (Akkuş, 1995). Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Özekin ve Değer, 2001).



Şekil 2.5. Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin oluşumu görülmektedir. Oksijen; ER, mitokondri, plazma membranı, peroksisomlar ve sitoplazmada bulunan enzimlerle süperoksit'e dönüşür. O_2 SOD ile hidrojen peroksit'e ve daha sonra Cu^{++}/Fe^{++} katalizör olduğu fenton reaksiyonuyla OH^{\cdot} 'a dönüşür. Serbest radikallerin lipidleri proteinleri ve DNA'yı oksitlemesiyle çeşitli hücre zedelenme biçimleri görülmektedir. Başlıca antioksidan enzimler SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdır. (Cotran ve ark, 1989)

2.4. Antioksidanlar

Aerobik canlılarda serbest oksijen radikalleri, normal metabolik olaylar esnasında oluşmaktadır. Serbest radikaller, aşırı miktarlarda üretildikleri zaman serbest radikallere bağlı hasarlar ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar, dört farklı mekanizma ile serbest radikal hasarını engellerler.

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi

2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri

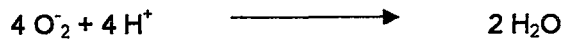
Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilirler

1. Yapılarına göre
 - a) Enzimler
 - b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller
2. Kaynaklarına göre
 - a) Organizmaya ait olanlar (Endojen)
 - b) Dışarıdan alınanlar (Eksojen)
3. Çözünürlüklerine göre
 - a) Suda çözünenler
 - b) Yağda çözünenler
4. Buldukları yere göre
 - a) Hücre içinde bulunanlar
 - b) Plazma ve diğer ekstra sıvılarda bulunanlar

2.4.1. Enzimler

2.4.1.1. Sitokrom oksidaz

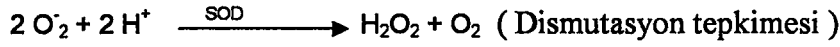
Mitokondrielerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan ve bakır içeren bir enzimdir. Süperoksit radikalının suya dönüşümünü sağlayarak oksidatif hasar oluşumunu engeller (Gassen, 1999)



Ancak süperoksit radikalının oluşumu çoğu kez enzimin kapasitesini aşar ve diğer enzimlerin devreye girmesiyle süperoksit radikalının zararlı etkileri engellenir (Akkuş, 1995).

2.4.1.2. Süperoksit dismutaz (SOD)

Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma süperoksit dismutaz enzimiyle gerçekleşir. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirir. Bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir (Floyd, 1995)



Daha sonra hidrojen peroksit katalaz ve peroksidaz enzimlerinin etkisiyle suya dönüştürülür (Akkuş, 1995; Aybey, 1996).

2.4.1.3. Katalaz

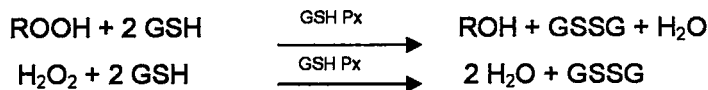
Katalaz, peroksizomlarda bulunan oldukça yüksek reaktivite gösteren bir enzimdir. Hidrojen peroksiti oksijen ve suya dönüştürür (Akkuş, 1995, Floyd, 1995; Yalçın, 1998).



Katalaz yapısında dört adet hem gurubu bulunan bir hemoproteindir. Katalazın peroksidaz aktivitesi de vardır. Hidrojen peroksit, metil hidroperoksit gibi küçük moleküllere etki eder. Lipid hidroperoksitlerine etki etmez (Akkuş, 1995; Yalçın, 1998).

2.4.1.4. Glutatyon peroksidaz (GSH Px)

Glutatyon peroksidaz, sitoplazmada bulunan, tetramer yapısında, aktivasyonu için selenyum atomu içeren bir enzimdir. Normal koşullarda H_2O_2 'in indirgenmesinden sorumlu olan enzim glutatyon peroksidazdır. H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini katalizler (Akkuş, 1995).



Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutatyon, glutatyon reduktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar redükte glutatyon oluşur.

2.4.2. Enzim olmayan antioksidanlar

2.4.2.1. Askorbik asit (C vitamini)

Askorbik asit, vücutta sentezlenemeyen esansiyel bir bileşiktir. Suda çözünebilen ve genellikle turuncgil meyvelerinden elde edilen bir vitamindir. Askorbik asit bir çok hidroksilasyon reaksiyonda indirgeyici ajan olarak görev yapar (Floyd, 1995). Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Askorbik asit aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipid peroksitleri başlatıcı radikalleri temizleyerek lipidleri ve zırları oksidatif hasara karşı korur (Akkuş, 1995; Yalçın, 1998). Askorbik asit, A vitamini ve E vitamini gibi daha nadir bulunan antioksidanları da korur (Floyd, 1995).

Askorbik asit, antioksidan özelliği yanında çok düşük konsantrasyonlarda (0,2 mM) bulunduğu zaman, oksidan özelliği de gösterir. Süperoksit radikali dışında ferri demiri (Fe^{+3}); ferro demire (Fe^{+2}) indirgeyen tek radikaldir. Ferro demirin indirgenmesi, fenton reaksiyonunda ferro demir kullanılarak OH^- radikali oluşumundan dolayı çok önemlidir.

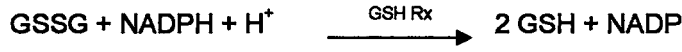
2.4.2.2. Glutatyon (GSH)

Glutatyon; glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan ve hücre içi konsantrasyonu fazla olan bir tripeptittir (Akkuş, 1995; Greenmayre, 1986). Karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duymadan sentezlenir (Akkuş, 1995).

Glutatyonun pek çok metabolik görevi vardır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Ayrıca protein yapısındaki sülfüdril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok protein ve enzimin inaktivasyonunu engeller, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino

asitlerin membrandan transportunu sağlar, hemoglobinin, methemoglobine dönüşümünü engeller (Yu, 1994).

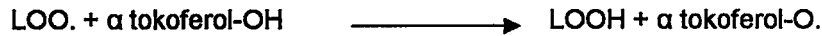
Glutatyonun peroksitler ve disülfidler ile reaksiyonu sonucu okside glutatyon (GSSG) oluşur. GSSG konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin göstergesidir (Seven ve candan, 1996). Canlıların yaşayabilmesi için yüksek miktarda glutatyona ve düşük miktarda okside glutatyona ihtiyaç vardır. Reaksiyonlar sonucu oluşan GSSG, NADP'inde kullandığı bir reaksiyonla tekrar GSH'a çevrilir. Böylece GSH/GSSG oranı yüksek tutulur (Yu, 1994).



2.4.2.3. E vitamini

E vitamini tokoferol ve tokotrienol türevlerini kapsayan bir vitamindir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta ve efa gibi çeşitli şekilleri bulunmaktadır. Antioksidan özelliği en yüksek olan tokoferol, alfa tokoferoldür. Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip olan aromatik halka, aktif kısmı oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (Akkuş, 1995; Yalçın, 1998).

E vitamini, zincir kırıcı bir antioksidan olarak görev yapar (Floyd, 1995). Lipid peroksi radikalini (LOO.) parçalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırır.



Sonuç olarak oluşan tokoferol radikali, yeni lipid peroksidasyonunu başlatacak kadar reaktif değildir. Tokoferol radikali, glukoronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır. Tokoferolün antioksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında da etkilidir.

Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, membran yapısındaki doymamış yağ asitlerini (PUFA) serbest radikallerin etkisinden koruyarak ilk savunma hattını

oluşturur. Bir alfa tokoferol molekülü 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilir (Akkuş, 1995; Floyd, 1995).

E vitamini, deneysel olarak retinada oluşturulan iskemi-reperfüzyonunda, lipid peroksidasyon oluşumunu azalttığı ve GSH miktarının azalmasını engellediği deneyler ile gösterilmiştir (Aydemir, 2002; Çelebi, 2000; Ekin,2002). Deneysel olarak oluşturulan beyin iskemisinde E vitaminin konsantrasyonunun azaldığı, reperfüzyon da ise peroksidatif hasarı önlemede yardımcı olduğu gösterilmiştir (Akkuş, 1995).

2.5. Ekstraktları Kullanılan Bitkiler

2.5.1. *Trigonella foenum graecum*

Fabaceae familyasında bulunan *Trigonella foenum-graecum* L. yurdumuzda ve Akdeniz havzasında yetişen tek yıllık ve otsu bir bitkidir. Yurdumuzda, Hindistan'da güney Afrika'da ve Akdeniz ülkelerinde kültürleri yapılmaktadır (Alhabori and Raman, 1998). Yaprakları trifoliat, çiçekler tek başına, yaprakların koltuğunda ve sarı renklidir. Meyvesi yay gibi kıvrık, uzun ve uç tarafta sivrilmiştir. Tohumları prizmaya benzer musilaj ve yağ taşır. Baharat karışımında kullanıldığı gibi pastırmanın üzerini örten çemen de bu tohumların tozu ile hazırlanır, iştah açıcıdır. Bitkinin kuvvetli ve kalıcı bir kokusu vardır. Koku trigonellin alkaloidinden ileri gelir (Tanker, Koyuncu ve ark, 1998). *Trigonella* bitkisinin diabette kan şekerini ve kolesterol düşürücü etkisinin olduğu (Bordia, Verma ve Srivastava, 1997) ve kanda lipid peroksidasyonunu engellediği (Ravikumar ve Anuradha, 1999) deneylerle gösterilmiştir.

1.5.2. *Teucrium multicaule*

Lamiacea familyasında bulunan *Teucrium multicaule* Montbret & Aucher ex Benth boyu 10-40 cm çiçekler beyazımsı ve bir dal üzerine dizilmiş, kök odunsu

oldukça sağlam bir yapıda bulunur. Türkiye’de yayılış gösteren bu bitki halk arasında tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

2.6. Lutein

Lutein çok yaygın bir karotenoittir. Sebze ve meyvelerde bulunur ve insanlara bu besinler yoluyla ulaşır. Temel bir ksantofil olan lutein insan plazmasında β -karoten kadar bol bulunur (Thurnham, 1994). Yapısal olarak β -karotene çok benzer fakat ek olarak molekülün tüm β -iyon halkalarında hidroksil grubu bulunur. Bu hidroksil grubu molekülün hidrofilik özeliğini daha da artırır. β -karoten ile karşılaştırıldığı invitro çalışmalarda, β -karotenden daha fazla antioksidan özelliği olduğu gösterilmiştir (Chopra, 1993). Lutein, zeaxanthin ile birlikte makula bölgesi pigmentini oluşturur. Ayrıca retinada da bulunur. Biyolojik aktivitesi özellikle yaşa bağlı makula dejenerasyonunda ortaya çıkar (Olmedilla, 2003). Lutein alımı ile makula dejenerasyonunu azalır. Normal insan serumunda lutein seviyesi 0.6-1.1 mmol/L arasında değişir ve görme fonksiyonlarına yararlı etkileri vardır. Luteinin dokular arasındaki dağılımı diğer karotenoidler gibidir (Burri ve ark, 2004). Lutein Gözde serbest radikal hasarına neden olabilen görünür mavi ışığı absorplayarak gözde serbest radikal hasarını önleyen, oksitlenmiş bir karotenoittir (Bone ve ark, 1997).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Denekler, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Transgen ve Deney Hayvanları ünitesinden temin edilen 150 gram ağırlığında pigmentli dişi cins, *Long evans* türü 51 adet sağlıklı sıçandan oluşmuştur. Denekler için etik kurul onayı alınmıştır. Denekler 6 gruba ayrılarak her gruba standart hazırlık, anestezi ve cerrahi teknik uygulanmıştır. Her grup 8-9 denekten oluşmuştur.

3.2. Gruplar

1. Grup (Kontrol gurubu) : Bu grup 9 denekten oluşmuştur. Bu gruba herhangi bir işlem yapılmamış olup, sadece normal değerlerin saptanması amaçlanmıştır.

2. Grup (İ-R) : Bu grup 9 denekten oluşmuştur. Bu gruba iskemi-reperfüzyon yapıldı ve plasebo olarak serum fizyolojik verilmiştir. 90 dakikalık iskemiden sonra yirmi dört saatlik reperfüzyon gerçekleştirilmiştir.

3. Grup (İ-R + Vitamin E) : Bu grup 9 denekten oluşmuştur. Bu gruba, 90 dakikalık iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Vitamin E (alfa-tokoferol), iskemi başlamadan üç saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 800 IU/kg dozunda subkutan olarak uygulanmıştır.

4. Grup (İ-R+*T. multicaule*) : Bu grup 8 denekten oluşmuştur. Bu grupta iskemi-reperfüzyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Alkol (Etanol) çözünürlüğünde hazırlanan *Teucrium multicaule* ekstraktı (5 mg/ml), iskemi başlamadan üç saat önce

ve reperfüzyonun altıncı saatinde 50 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

5. Grup (İ-R + Lutein) : Bu grup 8 denekten oluşmuştur. Bu grupta, 90 dakikalık iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Lutein (5 mg/ml), iskemi başlamadan üç saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 72 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

6. Grup (İ-R + *T. foenum-graecum*) : Bu grup 8 denekten oluşmuştur. Bu grupta, 90 dakikalık iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. Alkol çözünürlüğünde hazırlanan *Trigonella foenum-graecum* ekstraktı (5 mg/ml), iskemi başlamadan üç saat önce ve reperfüzyonun altıncı saatinde 50 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

3.3. Bitki Ekstraksiyon Yöntemi

Bitkiler Şanlıurfa'da bulunana aktarlar dan satın alınmıştır. Bitkiler teşhis edilip temizlendikten sonra 500 gr tartılmıştır. *Teucrium multicaule* bitkisinin tamamı kullanılırken *Trigonella foenum-graecum* bitkisinin tohumları kullanılmıştır. Tartılan bitkiler porselen havanda iyice dövülerek toz hale getirildikten sonra 100 ml etanol de 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sıvı kısım rotary evaporeyter cihazı yardımıyla etanol uzaklaştırılarak bitki ekstraktları elde edilmiştir.

3.4. Anestezi Tekniği

İntramuskular olarak, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompon, Bayer, Türkiye) kombinasyonu ile anestezi ve analjezi sağlanmıştır. İşlem öncesi deneklerin kornealarına % 0,5' lik proparakain hidroklorid damlatılmış olup, hiçbir denekte solunum ve kan basıncı desteği sağlanmamıştır.

3.5. İskemi-Reperfüzyon Oluşturulması

Bütün deneklerin gözü biyokimyasal incelemeler için kullanılmıştır. Denekler yüzüstü pozisyonda laboratuvar masasına yatırılarak anestezi ve analjezi uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmamıştır. Plasebo, alfa tokoferol, lutein, *T. foenum-graecum* ve *T. multicaule* grubundaki deneklerde retinal iskemi oluşturmak amacıyla, serum fizyolojik şişesine, ucunda insülin iğnesi bulunan serum seti takılmıştır ve bu insülin iğnesi ile temporal limbustan ön kameraya girilmiştir. Göz içi basıncı 150 mm Hg olacak şekilde serum şişesi 150 cm yüksekliğe çıkartılarak tespit edilmiş ve bu yükseklikte 90 dakika süreyle tutulmuştur. İskeminin başlamasıyla birlikte plasebo grubuna 1 ml serum fizyolojik subkutan olarak verilmiştir. 90 dakikalık iskemiden sonra serum şişesi göz seviyesine indirilerek, göz içi basınç normal seviyeye düşürülmüş ve takiben iğne ön kameradan çekilmiştir. Denekler 24 saat süreyle reperfüzyon ortamında bekletilmiştir. Reperfüzyonun başlamasından 6 saat sonra 3. gruba alfa tokoferol, 4. gruba *Teucrium multicaule* ekstraktı, 5. gruba lutein, 6. gruba *Trigonella foenum-graecum* uygulanmıştır.

3.6. Retina Örneklerinin Hazırlanması

90 dakikalık iskemi ve takiben 24 saatlik reperfüzyon ortamında bekletilen denekler daha sonra intrakardiyak olarak 50 mg/kg thiopental sodyum (Pentothal Sodium, Abbot) ile öldürülüp gözleri enükle edilmiştir. Her gruptaki enükle edilen gözler incelenmeye alınmıştır.

Biyokimyasal incelemeler için alınan gözler enüklasyon sonrası süratle buz kabı üzerine konup, bisturi yardımıyla pars plana bölgesinden ikiye ayrıldı. Vitreus dokusu uzaklaştırıldıktan sonra binoküler mikroskop yardımıyla retina dokusu koroidden ayrılmış. Örnekler hassas terazi ile tartıldıktan sonra ependorf tüplere aktarılmış ve analiz edilinceye kadar - 80⁰ C' de bekletilmiştir.

Biyokimyasal incelemeler

1. Doku örnekleri 1/9 oranında Tris-EDTA- BHT (butil hidroksi tolüen) (20 mM Tris pH: 7.4, 1 mM EDTA 5 mM BHT) içerisinde ultrasonikatör yardımıyla buz ortamında homojenize edilmiştir.

2. Elde edilen homojenata eşit oranda %18'lik TCA (Trikloroasetik asit) ilave edildi. Vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 20 dakika süreyle +4⁰C'de bekletilmiştir. Daha sonra mikrosantrifüj yardımıyla 4000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.

3. Süpernatantlar yeni bir tüpe aktarılarak GSH ve MDA analizleri yapılmaya kadar -80⁰ C'de bekletilmiştir.

3.7. MDA

Thiobarbitirik asit reaktif maddeleri (TBARS) genellikle doymamış yağ asit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ile tespit edilmektedir. Buna ilave olarak DNA, protein ve karbonhidratların oksidatif hasarları sırasında da MDA oluşmaktadır (Jo, 1998).

3.7.1. Retina örneklerinde MDA analizi

1. Stok standardın hazırlanması

Birinci çalışma solüsyonu: 4.05 M konsantrasyonlu orijinal stok tetraetoksipropan (TET, Sigma) solüsyonundan 24.7 µl alınarak 10 ml suda seyreltili. Böylece 10 mM birinci çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu.

İkinci çalışma solüsyonu : Birinci çalışma solüsyonundan 10 µl alınıp üzerine 990 µl saf su ilave edilerek 100 µM konsantrasyonlu TET hazırlanmış oldu.

Üçüncü çalışma solüsyonu : İkinci çalışma solüsyonundan 100 µl alınıp üzerine 900 µl saf su ilave edilerek 10 µM konsantrasyonlu TET hazırlandı.

Çizelge 3.1. MDA standart eğrisinin hazırlanması

3. Çalışma Solüsyonu	Saf su	Konsantrasyon (nmol)
0	100 µl	0
10 µl	90 µl	1 nmol
20 µl	80 µl	2 nmol
40 µl	60 µl	4 nmol
80 µl	20 µl	8 nmol
100 µl	0	10 nmol

2. Örnek ve standartların her birinden 100 µl alınarak üzerlerine sırasıyla aşağıdaki solüsyonlar ilave edilmiştir.

- % 8.1 SDS.....20 µl
- 0.5 M HCl.....150 µl
- %15'lik TCA içinde taze hazırlanmış 20 mM TBA.....150 µl
- %95'lik etanol içinde çözülmüş olan %7.22 BHT (Bütil hidroksi toluen)..... 5 µl

3. Karışımlar iyice vortekslendi. Örnekleri içeren ependorf tüpleri 90°C ayarlanmış sıcak su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra musluk suyu altında soğutulmuştur.

4. Örneklerle 575 µl bütanol/piridin (9 ml/0.6 ml) ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Üst faz alınıp spektrofloreometre (Jasco FP-6300) yardımıyla eksitasyon 520 nm ve emisyon 550 nm'de absorbans değerleri okundu.

6. Konsantrasyonları bilinen standartlardan okunan absorbans değerlerinden bir standart eğri oluşturuldu. Excel programı yardımıyla yapılan standart eğri sonucunda bir formül elde edildi. Okunan örnek absorbansları, standart eğri formülünde örnek olarak ifade edilen X yerine konularak gerçek değerleri nmol cinsinden tespit edilmiştir.

3.7.2. Retina örneklerinde glutatyon analizi (Obrosova, 1998)

1. **Stok solüsyonu:** 3.073 mg indirgenmiş GSH (Sigma) 10 µl saf suda çözüldü. Böylelikle 1 mM'lık stok solüsyon hazırlanmış oldu.

2. **Çalışma solüsyonu:** Stok solüsyonundan 100 µl alındı. Buna 900 µl saf su ilave edilerek 100 mM konsantrasyonlu çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu.

Çizelge 3.2. GSH standart eğrinin hazırlanması

Çalışma solüsyonu 100 µM	Saf su	Diğer solüsyonlar	Konsantrasyon
1 µl	99 µl	900 µl	0.1 nmol
2 µl	98 µl	900 µl	0.2 nmol
4 µl	96 µl	900 µl	0.4 nmol
8 µl	92 µl	900 µl	0.8 nmol
16 µl	84 µl	900 µl	1.6 nmol
32 µl	68 µl	900 µl	3.2 nmol

3. Örnek ve standartların her birinden 100 µl alındı. Bunlara 890 µl GSH solüsyonu (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH: 8.1) ve 10 µl oftaldialdehit (10 mg Ophthaldialdehit/1 ml metanol) ilave edilmiştir.

4. Örnekler oda sıcaklığında ışıktan korunabilecek bir yerde reaksiyon oluşması için 6–7 dakika bekletildi. Daha sonra absorbans değerleri spektrofloreometre yardımıyla eksitasyon 345 nm emisyon 425 nm'de okunarak standartlardan elde edilen eğrideki formüle uygulanarak nmol cinsinden hesaplandı ve elde edilen sonuçlar 100 mg doku yaş ağırlığına göre değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Örneklerde bulunan MDA ve GSH konsantrasyonları spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. Ölçümler yapılmadan önce konsantrasyonları bilinen standartlar spektrofotometre ile ölçülerek standart eğri ve formül elde edildi. GSH miktarını saptamak için GSH ve ophthaldialdehitin oluşturduğu renkli kompleksin kompleksin spektrofotometre ile absorbansının ölçülmesi prensibi kullanıldı. Örneklerde okunan absorbans değerleri formüldeki yerine konarak GSH miktarları belirlendi ve daha sonra ortalama değerler hesaplandı. Gruplardan elde edilen ortalama değerler aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

GSH miktarları değerlendirildiğinde kontrol grubuna (36.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) en yakın değer lutein grubunda (30.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) olduğu görülmüştür. Buna göre luteinin grubundaki GSH miktarı (30.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule* 'den (21.25 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule* 'nin, alfa tokoferol'dan (18.1 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), alfa tokoferol'un *T. foenum-greacum*'dan (15.98 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) daha yüksek olarak bulunmuştur.

4.1. Retinada GSH Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.1.1. Kontrol grubunda GSH değerleri

Grup Kontrol	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	30.8	36.04±9,64
2	36.2	
3	32.4	
4	45.5	
5	35.3	
6	31.2	
7	38.4	
8	38.52	
9	36.04	

Çizelge 4.1.2. İskemi-Reperfüzyon grubunda GSH değerleri

Grup İ-R	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	13.6	12.84±3,12
2	12.7	
3	15.4	
4	10.8	
5	11.7	
6	11.8	
7	14.3	
8	12.4	
9	12.8	

Çizelge 4.1.3. İ-R+Vitamin-E (α-tokoferol) grubunda GSH değerleri

Grup İ-R + Alfa tokoferol	Konsantrasyon(nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	16.3	18.1±6,17
2	21.6	
3	13.6	
4	17.4	
5	21.6	
6	18.2	
7	20.4	
8	15.7	
9	18.2	

Çizelge 4.1.4. İ-R+T. multicaule grubunda GSH değerleri

Grup İ-R + T. multicaule	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer
1	19.2	21.25±5,7
2	18.3	
3	21.6	
4	25.9	
5	20.3	
6	23.2	
7	22.4	
8	19.1	

Çizelge 4.1.5. İ-R+Lutein grubunda GSH değerleri

Grup İ-R + Lutein	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	30.8	30.4±11,3
2	39.1	
3	27.7	
4	24.0	
5	35.3	
6	29.2	
7	32.4	
8	24.7	

Çizelge 4.1.6. İ-R+*T. foenum-greacum* grubunda GSH değerleri

Grup İ-R + <i>T. foenum-greacum</i>	Konsantrasyon (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	10.8	15.98±7,5
2	21.6	
3	15.4	
4	13.6	
5	18.5	
6	16.3	
7	18.1	
8	13.5	

Çizelge 4.1.7. Tüm gruplardaki GSH ortalama değerleri

GRUPLAR	Ortalama Konsantrasyon değeri (nmol GSH/100 mg retina yaş ağırlığı)±SD
Kontrol	36.04±9,62
İskemi-Reperfüzyon	12.84±3,12
İ-R+alfa tokoferol	18.10±6,17
İ-R+ <i>T. multicaule</i>	21.25±5,7
İ-R+ Lutein	30.40±11,3
İ-R+ <i>T. foenum-greacum</i>	15.98±7,5

Çizelge 4.1.8. GSH standartlarından elde edilen değerler ve kalibrasyon eğrisi

4.2. Retinada MDA Ölçüm Sonuçları

Örneklerde bulunan MDA ve GSH konsantrasyonları spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. MDA miktarını saptanması için, MDA ile Thiobarbitirik asit reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleksin spektrofotometre ile absorbansının ölçülmesi prensibi kullanıldı. Ölçümler yapılmadan önce konsantrasyonları bilinen standartlar spektrofotometre ile ölçülerek standart eğri ve formül elde edildi. Örneklerde okunan absorbans değerleri formüldeki yerine konarak MDA miktarları belirlendi ve daha sonra ortalama değerler hesaplandı. Gruplardan elde edilen ortalama değerler aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Çalışmamızda retina dokusunun MDA düzeyleri değerlendirildiğinde; iskemi oluşturulan grupta MDA değerinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Tüm grupların lipid peroksidasyonunda iskemi grubuna göre koruma saptanırken, lutein (8.83 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) grubunun MDA değeri kontrol (8 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) grubuna en yakın değere sahip olduğu görülür. Sonuç olarak luteinin (8.83 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) *T. multicaule* 'den (15.13 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*'nin, *T. foenum-greacum*'dan (16.48 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. foenum-greacum*'unda alfa tokoferol'dan (17.24 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) daha iyi koruma sağladığı görülmüştür.

Çizelge 4.2.1. Kontrol grubunda MDA değerleri

Grup Kontrol	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	7.92	8±5,72
2	7.8	
3	7.5	
4	8.86	
5	7.92	
6	6.9	
7	7.1	
8	9.1	
9	8.9	

Çizelge 4.2.2. İskemi-Reperfüzyon grubunda MDA değerleri

Grup İ-R	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	24.86	23.29±9,7
2	17.8	
3	28.68	
4	20.54	
5	24.57	
6	20.6	
7	24.2	
8	19.6	
9	28.76	

Çizelge 4.2.3. İ-R+Vitamin-E (α-tokoferol) grubunda MDA değerleri

Grup İ-R + Alfa tokoferol	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	10.3	17.24±8,7
2	16.43	
3	21.91	
4	18.38	
5	19.17	
6	17.5	
7	19.4	
8	20.1	
9	11.96	

Çizelge 4.2.4. İ-R+T. multicaule grubunda MDA değerleri

Grup İ-R + T. multicaule	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	16.43	15.13±4,35
2	15.06	
3	12.61	
4	16.43	
5	14.3	
6	16.2	
7	12.4	
8	17.62	

Çizelge 4.2.5. İ-R+Lutein grubunda MDA değerleri

Grup İ-R + Lutein	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	9	8.83±3,06
2	11.03	
3	7.5	
4	7.78	
5	8.2	
6	7.5	
7	10.6	
8	9.02	

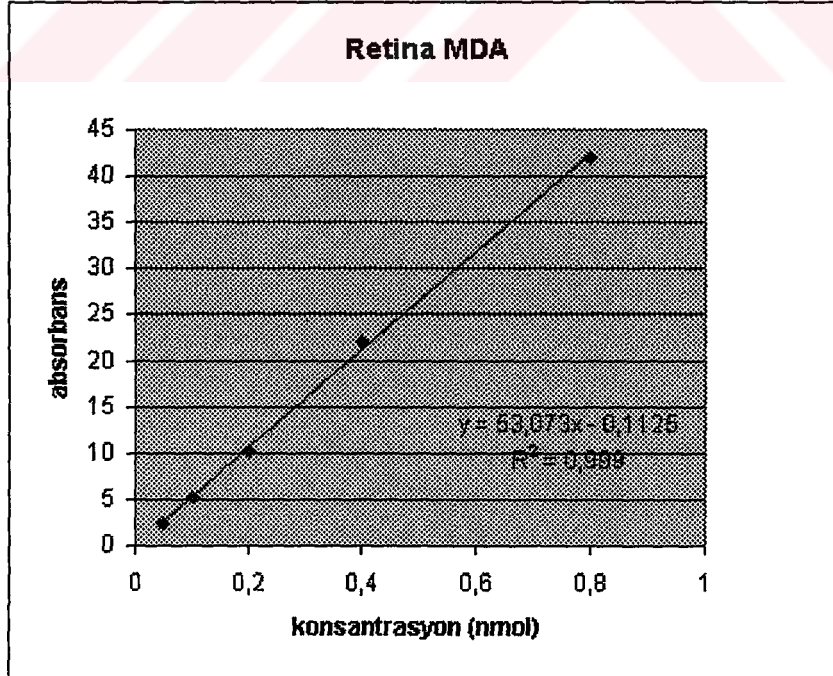
Çizelge 4.2.6. İ-R+T. foenum-greacum grubunda MDA değerleri

Grup İ-R + T. foenum- greacum	Konsantrasyon (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)	Ortalama değer±SD
1	21.91	16.48±7,92
2	14.27	
3	11.53	
4	19.17	
5	15.5	
6	13.4	
7	17.3	
8	18.74	

Çizelge 4.2.7. Tüm gruplardaki MDA ortalama değerleri

GRUPLAR	Ortalama Konsantrasyon değeri (nmol MDA/100 mg retina yaş ağırlığı)±SD
Kontrol	8±5,72
İskemi-Reperfüzyon	23.29±9,7
İ-R+alfa tokoferol	17.24±8,7
İ-R+ T. multicaule	15.13±4,35
İ-R+ Lutein	8.83±3,06
İ-R+ T. foenum-greacum	16.48±7,92

Çizelge 4.2.7. MDA standartlarından elde edilen değerler ve kalibrasyon eğrisi



4.3. Uygulanan İstatistiksel Metot ve Analizler

Deneysel çalışma için oluşturulan kontrol, iskemi-reperfüzyon, vitamin-E, *Teucrium*, lutein ve *Trigonella* gruplarında bulunan örneklerden elde edilen GSH ve MDA değerleri SPSS programında Mann – Whitney U testi, gruplar arasındaki farklılıklar ise Kruskal – Wallis testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen “p” değerleri “0,05, 0,01 ve 0,001” sabitlerine göre değerlendirilerek anlamlılık düzeyleri saptanmıştır. $p < 0,05$ ise “karşılaştırılan gruplar arasında anlamlı bir fark vardır”, $p > 0,05$ ise “karşılaştırılan gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur”, $p < 0,01$ ise “karşılaştırılan gruplar arasında çok önemli farklılıklar vardır”, $p < 0,001$ ise “karşılaştırılan gruplar arasında ileri düzeyde önemli farklılıklar vardır” şeklinde ifade edilmektedir.

4.3.1. Glutatyonun istatistiksel analizi

- Gruplar arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p < 0,05$).
- Kontrol ile İ-R grupları arasında çok önemli farklılıklar görülmüştür ($p < 0,01$).
- Kontrol ile vitamin-E grupları arasında çok önemli farklılık görülmüştür ($p < 0,01$).
- Kontrol ile *Teucrium* grupları arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0,05$).
- Kontrol ile lutein grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p > 0,05$).
- Kontrol ile *Trigonella* grupları arasında çok önemli farklılık görülmüştür ($p < 0,01$).
-

4.3.2. Malondialdehitin istatistiksel analizi

- Gruplar arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p < 0,05$).
- Kontrol ile İ-R grupları arasında çok önemli farklılıklar görülmüştür ($p < 0,01$).

- Kontrol ile vitamin-E grupları arasında çok önemli farklılık görülmüştür ($p<0,01$)
- Kontrol ile *Teucrium* grupları arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0,05$).
- Kontrol ile lutein grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).
- Kontrol ile *Trigonella* grupları arasında çok önemli farklılık görülmüştür ($p<0,01$)

4.4. Tartışma

İskemi ve reperfüzyon sonucu dokuda meydana gelen hasar, bu hasarda serbest oksijen radikallerinin rolü ve antioksidanların bu hasarı gidermede etkileri konusunda son yıllarda bir çok araştırmalar yapılmıştır. İnsan retinası; diabetik retinopati, orak hücre anemisi, glökom, prematüre retinopati ve retinal arter ve ven tıkanıklığı gibi durumlarda iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalmaktadır (Yoon, 1989). İskemi süresi arttıkça doku hasarının büyüklüğü de artar. Dokulara göre farklılık göstermekle beraber iskeminin belirli bir süresine kadar doku, geri dönüşebilen doku hasarı fazına, iskemi süresi arttıkça doku geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girer. Bu doku reperfüzyon edilse dahi doku hasarı geri dönmez (Cotran, ve ark 1989). Retina için bu süre 30-90 dk olarak kabul edilir (Aydemir, 2002; Yoneda, 2001). Dokuya tekrar oksijen desteğinin sağlanmasıyla sisteme aniden aşırı miktarda giren oksijen, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Böylece doku hasarı daha da artar (Bozkurt, 1997; Matsubara, 2000). Reperfüzyonla birlikte dokuya gelen lökositlerin serbest radikal oluşumuna neden olarak oksidatif hasarı arttırdığı bilinmektedir. Lökosit toplanmasının inhibe edildiği bir çalışmada hasarın azaltıldığı gösterilmiştir (Matsubara ve ark. 2000).

İskemi-reperfüzyon hasarından sorumlu olan mekanizmalar; aspartat ve glutamat gibi uyarıcı amino asitlerin açığa çıkması, enerjiye bağlı taşıma sistemlerindeki bozulmalar, özellikle hücre içi kalsiyum miktarının artması, bunun sonucu olarak kalsiyum tarafından yürütülen bazı süreçlerin başlaması ve serbest radikallerin oluşmasıdır (Cotran, ve ark.1989; Aydemir, 2002).

Aydemir (2002)'in bildirdiğine göre, serbest radikaller; membran lipitlerini peroksidasyona uğratarak, hücrede proteinlerin, karbohidratların, nükleik asitlerin yapısını değiştirerek, kalsiyum dengesini bozarak, aspartat ve glutamat gibi uyarıcı amino asitleri uyararak doku hasarına yol açmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarın azaltmak ve önlemek için bir çok farmakolojik ajanla değişik çalışmalar yapılmıştır (Ishihara, 2000; Ekin 2002; Bozkurt 1997; Aydemir 2002; Yoneda, 2001). Muller ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, toksik etki yaparak nöronların ölümüne neden olan glutamatın, H₂O₂ tarafından geri emiliminin azaltıldığı deneyler ile gösterilmiştir (Muller, 1998). Yoneda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada interlökin 1 β 'nin, sıçan retinasında oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarında önemli rol oynadığı, İnterlökin 1 β antagonistleri ile iskemi hasarının engellendiği saptanmıştır (Yoneda, 2001). İskemi-reperfüzyon çalışmalarında, iskemi oluşturmak amacıyla genellikle göz içi basıncın (GİB) artırılması veya retinal arterin bağlanarak kan akımının durdurulması metotları kullanılmıştır. Kullanılan en güncel metot GİB artırılarak sistolik basıncın üzerine çıkarılması metodudur. Bu metot kolay uygulanabilir ve reperfüzyon evresinin kolaylıkla başlatılabilir olması tercih sebebidir. Bizde çalışmamızda retinal iskemiye GİB arttırarak gerçekleştirdik. GİB sistolik basıncın üzerine çıkarılması ile hem koroidal hem de arteriyal kan akımının durduğu söylenmektedir.

Retinanın iskemiye olan toleransı bazı dokulara göre çok fazladır. Bu farkın nedeni retina ve vitreusun büyük glikoz rezervine sahip olmasının yanın da, uzun süreli anaerobik glikoliz yapabilme yeteneğine sahip olmasıdır. Retina serbest radikallerin oluşturabileceği hasara karşı oldukça gelişmiş bir savunma sistemine sahiptir. Retinada bol miktarda bulunana vitamin E, SOD, glutatyon perksidaz, vitamin C ve glutatyon (GSH) retinayı oksidatif strese karşı korur. Bozkurt ve arkadaşlarının tavşan retinasında 60 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon sonucunda belirli patolojik değişiklikler gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada katalaz ve SOD'ın birlikte intravenöz olarak uygulandığı grupta fotreseptör dış segmentinin oldukça iyi bir şekilde korunduğu tespit edilmiştir (Bozkurt, 1997). İskemik kobay retinalarında vitamin E türevlerinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, vitamin E

türevlerinden α -tokoferolün daha belirgin olarak lipid peroksidasyonunu engellediği, GSH miktarı değerlendirildiğinde α -tokoferolün ve TPGS gruplarının anlamlı koruma sağladığı saptanmıştır (Çelebi, 2001). Aydemir, vitamin E türevlerinin MDA ve GSH değerleri yanında histolojik incelemelerde bulunmuş ve vitamin E türevlerinin retina dokusunun iç tabakalarında ödem formasyonu dejenerasyonunu azalttığını göstermiştir (Aydemir, 2002). Çelebi ve arkadaşlarını yaptığı bir çalışmada melatonin, vitamin E ve ostreotidin, iskemi reperfüzyon oluşturulmuş kobay retinasında koruyucu etkisi araştırılmış ve melatonini vitamin E'den, vitamin E'nin de ostreotidden daha etkili olduğu bulunmuştur (Çelebi, 2001). Yoneda ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada antiepileptik bir ilaç olarak kullanılan topiramatin retinal iskemi modelinde ve retinal hücre kültüründe koruyucu etkisi araştırılmıştır. Ratlarda yapılan çalışmada GİB 130 mm Hg'ya çıkarılmış ve 45 dk iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon uygulanmıştır. İskemi öncesi ve sonrası topiramat uygulanmıştır. Histolojik incelemelerde iç pleksiform tabakasının kalınlığı ve elektoretinogram a ve b dalgaları kullanılmıştır. Yapılan incelemelerde topiramatin iskeminin neden olduğu ganglion hücre tabakası ve iç pleksiform tabakasındaki incelmeyi engelleyerek kalınlığını koruduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada yeni doğmuş rat embriyolarından hazırlanan retinal nöron kültürü ve saflaştırılan ganglion hücre kültüründe de topiramatin, toksisiteyi engelleyerek hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Yoneda, 2001). İskemi hasarının belirlenmesinde retinal ganglion hücrelerinin belirleyicisi olan Thy-1 proteini ve Thy-1 mRNA' sını belirleyerekten hasar tespiti yapılabilmektedir (Chidlow ve Osborne, 2002).

Szabo ve arkadaşları (2001), sıçan retinasında deneysel olarak 90 dakikalık iskemi, 3 dakika ve 24 saatlik reperfüzyonlar oluşturularak oksijen serbest radikallerinin neden olduğu kapiller geçirgenlikteki artışa karşı koruyucu etkisi olan kalsiyum debosilatın retinal ödemi giderici etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada retina Na^+ konsantrasyonunun iskemi grubunda %51.8 oranında, tedavi grubunda ise %27.5 oranında arttığı, Ca^{+2} konsantrasyonunun iskemi grubunda %107.1 oranında, tedavi grubunda ise %59.6 oranında arttığı saptanmıştır. Ayrıca kalsiyum debosilatın, iskemi reperfüzyonun Na^+ - K^+ -ATPaz ve Ca^{+2} - Mg^+ -ATPaz üzerine olan inhibe edici etkiyi azalttığını saptamışlardır. İskemi-reperfüzyonda Na^+ - K^+ -ATPaz

ve Ca^{+2} - Mg^{+} -ATPaz'ın inhibe olması ve membran geçirgenliğinin artması sonucunda retinal Na^{+} ve Ca^{+2} konsantrasyonunda artış olmakta bunun sonucunda retinal ödem oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda iç pleksiform tabakasındaki kalınlık artışı, iskemi reperfüzyon sonrası dokudaki iyon hemostazı ve membran bütünlüğünün lipid peroksidasyonu ile bozulmasına bağlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada sıçan böbreklerinden elde edilen fibroblast kültürünün UV ışınlarını neden olduğu oksidatif stres üzerine β -karoten, lutein ve astaxanthin'in koruyucu etkileri araştırılmış, oksidatif stres göstergesi olarak antioksidan enzimler olan SOD ve katalaz aktiviteleri ve tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri ölçülmüştür. Kültürler 4 saat UV ışınına maruz kaldıktan sonra SOD ve katalaz aktivitesi anlamlı bir şekilde düşmüş ve tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri anlamlı bir şekilde artmıştır. Deney sonunda astaxanthin en iyi sonucu vermekle beraber tüm grupların oksidatif strese karşı koruma sağladığı görülmüştür (O'Connor ve ark., 1998). Burri ve Arkadaşlarının (2004) bildirdiğine göre, makula bölgesinde yoğunlaşan lutein molekülü, makula fonksiyonlarını işlevinde ve görme işlevlerinde zorunlu olduğu ortaya çıkmıştır.

Karotenoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında pro-oksidan olarak ta rol oynadıkları gözlemlenmiştir. Örneğin β -karoten ışıқта (Faria ve Mukai, 1983) ve karanlıkta (Suzuki ve ark, 1989) lipid peroksidasyonu süresince pro-oksidan rol oynadığı gösterilmiştir. Luteinin de ışıқта ve karanlıkta yağ asitleri üzerine pro-oksidan aktivitesinin de olduğu gösterilmiştir (Haila, 1994). Mısır yağ asitlerinde ve kurutulmuş yiyeceklerde, karotenoidlerin sıcaktan ve ışıktan dolayı kararlılıklarını yitirdiklerinden dolayı pro-oksidan olarak görev yaparlar (Subagio ve Morita, 2001). Makular pigment olarak adlandırılan lutein ve zeaxanthin günlük olarak tüketilmelerindeki azalma, yaşa bağlı makula dejenerasyonu ile ilgili olabileceği söylenmiştir (Bone, 2000). Lutein ile birlikte diğer karotenoid ve vitamin e karışımı lipid peroksidasyonunu engellemede daha etkili olduğu gösterilmiştir (Stahl ve ark, 1998). Olmedilla ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir çalışmada yaşa bağlı kataraktlı hastalarda lutein ve α -tokoferol denenmiş ve lutein verilen grupta hastalarda iyileşme gözlenirken α -tokoferol verilen hastalarda gelişme kaydedilmemiştir.

Bazı bitkilerin halk tarafından tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. *Teucrium multicaule* ve *Trigonella foenum-graecum* tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerdendir. Bu nedenle bu bitkilerin hangi hastalıklarda ne kadar etkili oldukları çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmaktadır. *Trigonella foenum-graecum*' un tip I ve tip II diyabette kan glikoz seviyesini düşürdüğü (Bordia, , Verma ve Srivastava, 1997; Sharma ve ark, 1990; Madar, ve ark, 1988; Abdel-Barry ve ark, 1997; Al-Habori, Raman, 1998), kandaki lipid seviyesini (LDL, VLDL, trigliseritler vb.) düşürdüğü (Bordia ve ark., 1997; Alarcon-Aguilaria ve ark., 1998), yapısında bulunan 4-hidroxyisoleucine etkisile insülin salgılanmasını arttırdığı (Sauvaire ve ark, 1998), kanda lipid peroksidasyon oluşumunu engellediği ve antioksidanların miktarını arttırdığı (Ravikumar ve Anuradha, 1999) yapılan deneyler sonucu gösterilmiştir. Bunun haricinde astım hastalarında alerjiye neden olduğu (Patil, Niphadkar ve Bapat, 1997) ve zirai amaçlı nematod mücadelesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Zia, Siddigui ve Hasnian, 2000).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, lipid peroksidasyon ürünü olan ve lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesi olarak kabul edilen MDA analizi yapılarak lipid peroksidasyonu indirekt olarak gösterilmiştir. Çalışmamızda retina dokusunun MDA düzeyleri değerlendirildiğinde; iskemi oluşturulan grupta MDA değerinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Tüm grupların lipid peroksidasyonunda iskemi grubuna göre koruma saptanırken, lutein (8.83 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) grubunun MDA değeri kontrol (8 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) grubuna en yakın değere sahip olduğu görülür. Sonuç olarak luteinin (8.83 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) *T. multicaule* 'den (15.13 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*'nin, *T. foenum-greacum*'dan (16.48 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. foenum-greacum*'unda alfa tokoferol'dan (17.24 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) daha iyi koruma sağladığı görülmüştür.

GSH miktarları değerlendirildiğinde kontrol grubuna (36.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) en yakın değer lutein grubunda (30.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) olduğu görülmüştür. Buna göre luteinin grubundaki GSH miktarı (30.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule* 'den (21.25 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*'nin, alfa tokoferol'dan (18.1 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), alfa tokoferol'un *T. foenum-greacum*'dan (15.98 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) daha yüksek olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak kullanılan antioksidanların peroksidasyon ürünü olan MDA oluşumunu engellediği ve bir antioksidan olan GSH miktarını koruduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle Vitamin E (alfa tokoferol) ve lutein maddelerinin iskemi reperfüzyon hasarını önlemede kullanılabileceğini *Teucrium multicaule* ve *Trigonella foenum-greacum* bitkilerinde ise etken maddeler tespit edilerek ve saflaştırıldıktan sonra etkilerinin araştırılmasının gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- ABDEL-BARRY, J.A., ABDEL-HASSAN, I.A., and AL-HAKIEM, M.H., 1997. Hypoglycaemic and Antihyperglycaemic Affects of *Trigonella foenum-graecum* Leaf in Normal and Alloxan Induced Diabetic Rats. *J Ethnophar*, 58; 129-129.
- ABRAHAM, S., 1995. Oxidative Stress-Induced Cataract: Mechanism of Action. *The FASEB J*, 9; 1173-1182.
- AĞIRBAŞ, K., 1998. Diabetik Sıçanlarda Serbest Oksijen Radikali Ölçülmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 50s.
- AKKUŞ, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Patolojik Etkileri. Konya Mimoza Yayınlar, 157s, Konya.
- ALARCON-AGUILARIA, F.J., ROMAN-RAMOS, R., PEREZ-GUITEREZ, S., AGUILAR-CONTRERAS, A., CONTRERAS-WEBER, CC., and FLORES-SAENZ, JL., 1998. Study of The Anti-Hyperglycemic Effect of Plants Used As Antidiabetics. *J Ethnophar*, 61; 101-110.
- AL-HABORI, M., and RAMAN, A., 1998. Antidiabetic and Hypocholesterolaemic Affects of Fenugreek. *Phytother. Res*, 12; 233-242.
- ALI, L., AZAD KHAN, A.K., HASSAN, Z., MOSIHUZZAM, M., and et al., 1995. Charecterization of Hypoglycemic Effects of *Trigonella foenum-graecum* Seed. *Planta Med*, 61; 358-360.
- ANONYMOUS, 1995. Oxidative Metabolizm. Free Radical Biology and Aging Reaserch Program, Oklohama Med. Res Found, Oklohama City OK.
- ARINCI, K. ELHAN, A. 1997. Anatomi. Güneş Kitap Evi, 256s, Ankara.
- AUGUSTINE, A.J., SPITZNAS, M., KOCH, F., GRUS, F., LUTZ, J., 1998. Effects of perfluorooctylbromide and Vitamin E on Ischemia Induced retinal oxidatif Tissue Damage. *Exe Eye Res*, 66; 19-24.
- AYBEY, B., TUFAN, H., ve ERGENEKON, G., 1996. Serbest Radikaller. *Türkderm*, 30; 116-122.
- AYDEMİR, O., 2002. Deneysel Retinal İskemi ve Reperfüzyon Oluşturulan Kobaylarda Vitamin E Türevlerinin Etkisi, Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, 56s.
- AYDIN, A., SAYAL, A., ve İŞİMER, A., 1997. Oksijen Radikalleri ve Biyolojik Sistemlerdeki Rolü. *Gata Bülteni*, 39; 270-274.
- BANIN, E., BERENSHTEIN, E., KITROSSKY, N., PEER, J., and CHEVION, M., 2000. Gallium-desferrioxamine Protects the Cat Retina Against Injury After Ischemia and Repefusuion. *Free Radic Biol Med*, 28; 315-323.
- BARRY, M.C., and GRACE, P.A., 1997. Ischemia-Reperfusion Injury. *Surgery*, 68-72.
- BAYKAL, Y., GÖK, F., ve EREKÇİ, S., 2002. Demir, Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar. *Sendrom*, 94-100.
- BLANKS, J. 1997. Morphology and topography of the retina. *Basic Science, inherited retinal disease, and tumors*, 32-50.

- BORDIA, A., VERMA, S.K., and SRIVASTAVA, K.C., 1997. Effect of Ginger (*Zingiber Officinale* Rosc.) and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) on Blood Lipids and Platelet Aggregation in Patients With Coronary Artery Disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 56; 379-384.
- BOZKURT, N., 1997. Tavşan Retinasının İskemi Reperfüzyon Hasarından Süperoksit Dismutaz ve Katalaz ile Korunması. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 54s.
- ÇELEBİ, S., DİLSİZ, N., YILMAZ, T., and KÜKNER, AS., 2002. Effects of Melatonin, Vitamin-E and Octreotid on Lipid Peroxidation During Ischemia Reperfusion Guinea Pig Retina. *Eur J Ophth*, 12; 77-83.
- CHEESMAN, K.H., and SLATER, T.F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49; 481-493.
- CHIDLOW, G., and OSBORNE, N.N., 2002. Rat Retinal Ganglion Cell Loss Caused By Kainate, NMDA and Ischemia Correlates With Areduction in mRNA and Protein of Thy-1 and Neurofilament Light. *Brain Res*, 963; 298-306.
- CHUN, M.H., KIM, I.B., JU, W.K., and et al., 1999. Horizontal Cells of The Rat Retina are Resistant to Degenerative Processes induced By Ischemia-Reperfusion. *Neuro sci*, 260; 125-128.
- CLARK, I.A., 1986. Tissue Damage Caused by Free Oxygen Radicals. *Pathology*, 18; 181-186.
- CLEMENS, M.R., and WALLER, H.D., 1987. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids*, 45; 251-268.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., and ROBINS S.L., 1989. Cellular Injury and Adaptation In: *Robins Pathologic basis of disease*. WB Saunders Company, 1-38.
- CROOK, J., 1998. <http://www.catalase.com/retina.htm>.
- DELMAESTRO, R.F., 1980. An approach to Free Radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiol Scand*, 492; 153-168.
- EKİN, İ., 2002. Çeşitli Antioksidanların Kobaylarda Oluşturulan Retinal İskemi-Reperfüzyon Üzerine Etkisi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ, 42s.
- EMRE, İ., 2002. Senil Kataraklı İnsan Lens ve Ön Kamera Sıvısında Meydana Gelen Değişimlerin Moleküler Biyolojisi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ, 42s.
- ERDEN, M., 1992. Serbest Radikaller. *Temel Klin Tıp Bilimleri*, 12; 201-206.
- ERENEL, G., ERBAŞ, D., ve ARICIOĞLU, A., 1992. Serbest Radikler ve Antioksidan Sistemler. *Gazi Medical J*, 3; 243-250.
- FREEMAN, B.A., CRAPO, J.D., 1982. Biology of Disease, free Radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47; 412-426.
- GASSEN, M., and YOIDIM, M.B., 1999. Free radical scavengers: Chemical concept and clinical relevance. *J Neural Trans* ; 193-210.
- GARNGER, D.N., HALLWART, ME., PARKS, D.A., 1986. Ischemia-Reperfusion Injury Rol of Oxygen Derived free radicals. *Acta Physiol Scand*, 548; 47-53.

- GROVE, and NOVEL, 1950. Animal Biology,
www.micrographia.com/tutorial/micbasic/micbpt02/micb0200/hu446gan.gif
- HARRIS, A., BINGMAN, D.P., CIULLA, T.A., and MARTIN, B.J., 1997. Retinal and Choroidal blood Flow in Health and Disease. Basic Science, inherited retinal disease, and tumors.68-89.
- HOCHSTEIN, P., and JAIN, S.K., 1981. Association of Lipid Peroxidation and Polymerization in The Eye of Young and Aged Rats. Jpn J Physiol, 50; 125-132.
- İKDE ÖNER, Ö., 2004. Deneysel Diabetik Retinopati Oluşturulmuş Sıçanlarda Çeşitli Antioksidanların Koruyucu Etkisi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ, 36s.
- ISHIHARA, M., and NAKANO, T., 2000. Postischemic Reperfusion in The Eye of Young and Aged Rats. Jpn J Physiol, 50; 125-132.
- İŞLEKEL, H., İŞLEKEL, S., ve GÜNER, G., 2000. Biochemical Mechanism And Tissue Injury of Cerebral Ischemia And Reperfusion. J Neuro Sci , 17; 45-49.
- JO, C., AHN, D.U., 1998. Fluoremetric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances 109. in Turkey. Poult Sci, 77; 475-480.
- JUNGUEIRA, L.C., 1998. Temel Histoloji. Barış kitapçılık, 503s, İstanbul.
- KAVAS, G., 1989. Free radicals and Ageing. T Klin Cozmetol, 1; 21-26.
- KHOSLA, P., GUPTA, D.D., and NAGPAL, R.K., 1995. Effect of Trigonella foenum-graecum (Fenugreek) on Blood Glucose in Normal and Diabetic Rats. Indian J Physiol Pharm, 39; 173-174.
- KILINÇ, K., ve KILINÇ, A., 2002. Oksijenin Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 33; 100-118.
- KÖKSEL, O., 1998. İskemi Reperfüzyona Bağlı Akciğer Hasarı Üzerine Alfa-Lipoik Asidin Etkisi. Uzmanlık tezi, Elazığ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı .
- KÖSE, K., ve DOĞAN, P., 1992. Lipid Peroksidasyonu. Erciyes Tıp dergisi, 1; 340-350.
- MADAR, Z., 1987. New Sources of dietary fibre. Int J Obes, 11; 57-65.
- MADAR, Z., ABEL, R., SAMISH, S., and ARAD, J., 1988. Glucose-Lowering Effect of Fenugreek in Non-insulin Dependent Diabetics. Eur J Clin Nutr, 42; 51-54.
- MATSUBARA, A., TOMIDA, K., MATSUDA, Y., and et al., 2000, Protective Effect of Selectin Ligands/Inhibitor (SKK_60060) Against Retinal ischemia-Reperfüzyon Injury. Academic press, Exp Eye Res, 71; 283-293.
- MEARSON, F., KAGON, V.E., KOZLOV, Y.P., BELKINA, L.M., and ARKHİPENKO, YV., 1982. The role of Lipid Peroxidation in Phatogenesis of ischemic damage and The antioksidant Protection of The Heart. Basic Res Cardiol, 77; 465-85.
- MOLLER, P., WALLIN, H., and KNUDSEN, L.E., 1996. Oksidative Stress with Associated exercise Phisiplgical Strees and Life Style factor. Chem Biol Int, 102; 17-36.
- MULLER, A., MAURIN, L., and BONNE, C., 1998. Free radicals and Glutamate uptake in The Retina. Gen Pharmac, 30; 315-18.

- NAKAZAWA, H., GENKA, C., and FUJISHIMA, M., 1995. Pathological Aspects of Active Oxygen/ Free Radicals. *Japanese J Physiol*, 46; 15-32.
- NAKAZAWA, H., GENKA, C., FUJISHIMA, M., 1996. Pathological Aspects of Active Oxygens/Free Radicals. *Japan J Physiol*, 46; 15-32.
- NAYAK, M.S., KITA, M., MARMOR, MF., 1993. Protection of rabbit retina From Ischemic Injury by Superoxide Dismutase and Catalase . *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34: 2018-2022.
- NIELSIN, JC., NAASH M.I., ANDERSON, RE., 1987. The regional Distribution of Vitamin E and C in Mature and Premature Human Retinas. *Invest ophthalmol Vis Sci*. 29; 22-26.
- OBROSOVA, I.G., AND STEVENS, M., 1998. Effevt of dietary taurine supplementation on GSH and NAD(P)- redoks status lipid peroxidation, and energy metabolism in diabetic precataractous lens. *Invest Opht Vis Sci*, 40; 680-688.
- ÖZEKİN, A., DEĞER, K., 2001. LDL Oksidasyonu ve Etkileri. *İbni Sina Tıp Dergisi*, 6;125-132.
- PATIL, S.P., NIPHADKAR, P.V., and BAPAT, M.M., 1997. Alergy to Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Ann Alergy Asthma Immunol*, 78; 297-300.
- PETIT, P.R., SAUVAIRE, Y.D., HILLAIRE-BUYS, D.M., LECONTE, O.M., BAISSAC, Y.G., PANSION, G.R., and RIBES, G.R., 1995. Steroid Saponins From Fenugreek Seeds: Extraction, Purification, and Pharmacological investigation on Feeding Behavior and Plasma Cholesterol. *Steroids*, 60; 674-680.
- PRACTİDO, D., PASİN, M., BARRY, O.P., and et al., 1999. Iron dependet human platelet activation and hydroxil radikal formation: involvement of protein. *Circulation*, 99; 3118-24.
- RAVIKUMAR, P., and ANURADHA, C.V., 1999. Effect of Fenugreek Seeds on Blood Lipid Peroxidation and Antioxidants in Diabetic Rats. *Phytother Res*, 13; 197-201.
- REILLEY, P.M., SCHILLER, H.J., and BULKEY, G.B., 1991. Pharmacoligal Approach To Tissue injury Mediated By Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites. *The American J Surgery*, 16; 488-502.
- REITTER, R.J., and TAN, D.X., 1998. Supression of Oxygen Toxisity by Melatonin. *Acta Pharmacol Sinica*, 19; 575-581.
- SAUVAIRE, Y., PETIT, B., BARCO, C., MANTEGHETTI, M., and et al., 1998. 4-Hydroxyisoleucine: A Novel Amino Asid Potentiator of insulin Secretion. *Diabetes*, 47; 206-210.
- SEVEN, A., ve CANDAN, G., 1996. Antioksidan Savunma Sistemleri. *Cerrah Paşa J Medical*, 27; 41-51.
- SHARMA, R.D., RAGHURAM, T.C., and RAO, N.S., 1990. Effect of Fenugreek Seeds on Blood Glucose and Serum Lipids in Type I Diabetes. *Eur J Clin Nutr*, 44; 301-306.
- SIES, H., 1993. Strategies of Antioxidabt Defense. *Eur J Biochem*, 215 (2); 213.

- SINCLAIR, S.H., DELVECHIO, C., LEVIN, A., 2003. Treatment of Anemia in Diabetic Patient with Retinopathy and Kidney Disease. *American J Opht*, 135; 740-743.
- SIU, A.W., REITER, R.J., TO CH., 1998. The Efficacy of vitamin E and Melatonin As Antioxidants Against lipid peroxidation in retinal homogenates. *J Pineal Res*, 24; 239-244.
- SMITH, L.E.H., 2004. Pathogenesis of Retinopathy of Prematurity. *Growth Hormone& IGF Res*, 14; 140-144.
- SOLOMON, E.P. 1997. İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş. Birol yayınları, 274s, İstanbul.
- SZABO, M.E. HAINES, D., GARAY, E., and et al., 2001. Antioksidant Properties of Calcium Debesilate in İschemic/Reperused Diabetic Rat Retina. *Eur J Pharmacol*, 428; 277-286.
- TAGAKI, H., HIDEYASU, O., and et al., 2004. Molecular Mechanism of retinal neovascularization in Diabetic Retinopathy. *International Congress Series*, 1262; 160-163.
- THANOS, S., and NASKAR, R., 2004. Correlation Between Retinal Ganglion Cell Death and Chronically Developing İnherited Glaucoma in a New Rat Mutant. *Ex Eye Res*, 79; 119-129.
- THUMAN, G., and HINTON, D.R. 1997. Cell Biology of the retinal pigment Epithelium. *Basic Science, inherited retinal disease, and tumors*. 104-122.
- TUZCU, M., 1998. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar. Yüksek Lisans Semineri, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 52.
- UYSAL, M., 1998. Serbest Radikaller, Lipid Peroksitleri ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar. *Klinik gelişim II*, 2; 336-341.
- VURAL, F., 1999. Anatomi Atlası. Birol Yayınları, 312, İstanbul.
- WINROW, V.R., WINYARD, P.G., MORRIS, J.C., and BLAKE, D.R., 1993. Free Radicals In Inflammation: Second Messengers and Mediators of Tissue Destruction. *British Med Bulletin*, 49; 506-522.
- YALÇIN, AS., 1998. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*, 11; 342-346.
- YONEDA, S., TANIHARA, H., KIDO, N., HONDA, Y., GOTO, W., HARA, H., and MIYAWAKI, N., 2001. Interleukin-1 β Mediates İschemic Injury in The Rat Retina, *Academic Press, Exp Eye res*, 73s; 661-667.
- YOON, Y.H., and MARFOR, M.F., 1989. Dextrometorphan Protects Retina Against ischemic injury. *Arch Opht*, 107; 409-411.
- YU, B.P., 1994. Cellular Defences Against Damage from Reactive Oxygen species. *Physiol Rev*, 74; 139-162.
- ZIA, T., SIDDIGUI, I.A., and HASNAIN, N., 2000. Nematicidal Activity of *Trigonella foenum-graecum* L. *Phytother Res*, 15; 538-540.
- YONEDA, S., TANAKA, E., GOTO, W., and et al., 2003. Topiramate reduces exitotoxic and ischemic injury in the rat retina. *Brain Res*, 967; 257-266.
- OLMEDILA, B., GRANADO, F., BLANCO, I., and VAGUERO, M., 2003. Lutein, but Not α -Tokoferol, Supplementation Improves Visual

- Function in patients With Age- Related Cataracts: A 2-y Double-Blind, Placebo- Controlled Pilot Study. *Nutrition*, 19; 21-24.
- STAHL, W., JUNGHANS, A., BOER, B.D., DRIOMINA, E.S., and et al., 1998. Carotenid Mixtures Protect Multilamellar Liposomes Against Oxidative Damage: Synergistic Effects of Lycopene And Lutein. *FEBS letters*, 427; 305-308.
- BONE, R., LANDRUM, J.T., DIXON, Z., CHEN, Y., and LLERENA, C.M., 2000. Lutein and Zeaxanthin in The Eyes, Serum And Diet of Human Subjects. *Exe Eye Res*, 71; 239-245.
- SUBAGIO, A., MORITA, N., 2001. No Effect of Esterification With Fatty Acid on Antioxidant Activity of Lutein. *Food Res Int*, 34; 315-320.
- SUBAGIO, A., and MORITA, N., 2003. Proooksidant Activity of Lutein and Its Dimyristate Esters In Corn Triacylglyceride. *Food Chem*, 81; 97-102.
- DUNCAN, J., ALEMAN, T.S., GARDNER, L.M., CASTRO, E.D., and et al., 2002. Macular Pigment and Lutein Suplemention in Choroiderma. *Exp Eye Res*, 74; 371-381.
- BURRI, B.J., and CLIFFORD, A.J., 2004. Carotenoid and Retinoid Metebolism: Insight From Isotopes Studies. *Arch Biochem Biophys*, xxx; xxx-xxx.
- O'CONNOR, I., and O'BRIEN, N.,1998. Modulation of UVA light- induced Oxidative Stress by β - Caroten, Lutein and Astaxantin in Culterde Fibroblast. *J Derm Sci*, 16; 226-230.
- THURNHAM, D.I., 1994. Carotenids: Fonctions and Fallacies. *Poc Nutr soc*, 53; 77-87.
- CHOPRA, M., WILSON, R., THURNMAN, D.I., 1993. Free Radical Scavenging Ability of Lutein in Vitro. *Ann Acad Sci*, 61s, New York.
- BONNE, R.A., LANDUM, J.T., FRIEDES, L.M., and et al., 1997. Distribution of Lutein an Zeaxanthin Stereoisomers in The Human Retina. *Exp Eye Res*, 64; 211-218.
- FARIA, J.A.F., and MUKAI, M.K., 1983. Use of Gas Chromotographic Reactor to Study lipid photooxidation. *J. America Oil Chem Sos*, 60;77-81.
- SUZUKI, T., USUKI, R., and KANEDA, T., 1989. The Role of Carotenoids in the Oxidative Deterioration of Edible Oil. *J japanese Oil Chem Soc*, 38; 486-497.
- HAILA, K.M., LIEVONEN, S.M., and HEINONEN, M., 1994. Action of β -Carotene on Purified Rapeseed oil During Light Storage. *Food Sci Tech*, 27; 573-577.

ÖZGEÇMİŞ

12.05.1979'da Diyarbakır'da doğdu. İlk ve orta öğretimini aynı şehirde tamamladı. 1997 yılında Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2001 yılında mezun olduğu yıl Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. Ocak 2002'de Enstitüye bağlı olarak araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Eylül 2003'te Fen Edebiyat Fakültesinin açtığı sınavı kazanarak Araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Halen görevine devam etmektedir.



ÖZET

Hayvanları (*Long evans*) TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Transgen ve Deneysel Hayvanları ünitesinden temin edildi. Denekler altı gruba ayrıldı. 1. grup (Kontrol), 2. grup (İ-R), 3. grup (İ-R + alfa tokoferol), 4. grup (İ-R+ *Teucrium multicaule*), 5. grup (İ-R + Lutein) ve 6. grup (İ-R + *Trigonella foenum-greacum*) olarak adlandırıldı. Deneysel hayvanların sağ gözleri kullanıldı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı. Her hayvanın sağ göz ön kamerasına, izotonik çözelti içeren serum şişesine bağlı insülin iğnesi ile girildi. Göz içi basıncı 150 mm Hg olacak şekilde serum şişesi 150 cm yüksekliğe çıkartılarak tespit edildi ve bu yükseklikte 90 dakika süreyle tutuldu. 90 dakikalık iskemiden sonra serum şişesi göz seviyesine indirilerek, göz içi basınç normal seviyeye düşürüldü ve takiben iğne ön kameradan çekildi. Denekler 24 saat süreyle reperfüzyon ortamında bekletildi. Reperfüzyonun altıncı saatinde 3. gruba alfa tokoferol, 4. gruba *Teucrium multicaule* bitkisinin ekstraktı, 5. gruba lutein, 6. gruba *Trigonella foenum-greacum* tohumlarının ekstraktı uygulandı. 24 saatlik reperfüzyon sonunda hayvanlar öldürülerek gözleri enükle edildi. Daha sonra retina izole edilerek biyokimyasal analizler için kullanıldı. Biyokimyasal incelemelerde, MDA ve GSH miktarları ölçüldü.

Bu deney sonucunda, tüm grupların lipid peroksidasyonunu, iskemi grubuna göre koruduğu saptanırken, lutein (8.83 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) grubunun MDA değeri kontrol (8 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) grubuna en yakın değere sahip olduğu görülür. Buna göre, luteinin (8.83 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) *T. multicaule*' den (15.13 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*' nin *T. foenum-greacum*' dan (16.48 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. foenum-greacum*' un da alfa tokoferol'dan (17.24 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) daha iyi koruma sağladığı görülmüştür. GSH miktarları değerlendirildiğinde kontrol grubuna (36.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) en yakın değer lutein grubunda (30.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) olduğu görülmüştür. Buna göre luteinin grubundaki GSH miktarı (30.4 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*' den (21.25 nmol/100 mg retina yaş ağırlık), *T. multicaule*' nin alfa tokoferol' dan (18.1 nmol/100 mg retina yaş

ağırlık), alfa tokoferol' un *T. foenum-greacum*' dan (15.98 nmol/100 mg retina yaş ağırlık) daha yüksek olarak bulunmuştur. Sonuç olarak kullanılan antioksidanların peroksidasyon ürünü olan MDA oluşumunu engellediği ve bir antioksidan olan GSH miktarını koruduğu tespit edilmiştir.



SUMMARY

The animals (Long evans), purchased from TÜBİTAK Gen Engineering and Biyotecnology Research Enstitue Transgen and experiment animals center. Subject were divided into six groups. These were named as group 1 (control), group 2 (I-R), group 3 (I-R+ alfa tokoferol), group 4 (I-R+ *Teucrium multicaule*), group 5 (I-R+ Lutein), group 6 (I-R+ *Trigonella foenum greacum*). In the experiment, right eyes of rats were used for ischemia-reperfusion. Control group was not put under any process. The anterior camber of the right eye of each animals was cannulated with insulin needle connected to a bottle containing normal saline. Retinal ischemia was induced by raising the saline reservior to a height of 150 cm, thereby increasing the intraocular pressure to 150 mmHg and this hight was waited for 90 munites at this height. After retinal ischemia, reperfusion was performed for 24 hours. After 90 munites ischemia, bottle containing normal saline was set down to eye level thereby intraocular pressure reduced to normal level, and subsequently needle removed from the anterior camber. Reperfusion was performed for 24 hours. On the sixth hour of reperfusion, group 3, 4, 5, and 6 adminestered alfa tokoferol, ekstrakt of *Teucrium multicaule* plant, lutein, and ekstrakt of *Trigonella foenum-graecum* seeds respectively. At the end of reperfusion, animals were killed and eyes were enucleated. Then retina isolated from eye and used to for biochemical analysis. MDA and GSH level was assessed for biochemical analysis.

At the end of this experiment, all groups determined significant protection against formation of MDA when compared to I-R group while MDA level of lutein (8.83 nmol/100 mg retina wet weight) group was observed as it had the closest level to the control group. According to this, lutein (8.83 nmol/100 mg retina wet weight) provides more protection than *Teucrium multicaule* (15.13 nmol/100 mg retina wet weight), *Trigonella foenum-greacum* (16.48 nmol/100 mg retina wet weight), and alfa tokoferol (17.24 nmol/100 mg retina wet weight). When quantity of GSH was evaluated, it was observed that lutein group (30.4 nmol/100 mg retina wet weight) had the closest level to the control group. According to this result, the quantity of GSH in lutein group was found higher than *Teucrium multicaule* (21.25 nmol/100

mg retina wet weight), alfa tokoferol (18.1 nmol/100 mg retina wet weight), and *Trigonella foenum-greacum* (15.98 nmol/100 mg retina wet weight). As result antioxidants which used to experimental prevent formation of peroxidation substrat MDA and protect quantity of a antioxidant GSH.

