

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



**OKSİDATİF HASAR MODELİ OLUŞTURULAN ARPE-19 HÜCRELERİNE
FARKLI DOZLARDA UYGULANAN KURKUMİN, KROSETİN VE LUTEİNİN
ANTIÖKSİDAN VE APOPTOZ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

DR. KÜBRA DEMİRCİ KÜÇÜK

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

2021

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**OKSİDATİF HASAR MODELİ OLUŞTURULAN ARPE-19 HÜCRELERİNE
FARKLI DOZLARDA UYGULANAN KURKUMİN, KROSETİN VE LUTEİNİN
ANTIOKSİDAN VE APOPTOZ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

DR. KÜBRA DEMİRCİ KÜÇÜK

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. V. LEVENT KARABAŞ

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI BAŞKANI

PROF. DR. NURŞEN YÜKSEL

**ETİK KURUL ONAYI: KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GOKAEK 2020/131**

2021



ÖNSÖZ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1.AMAÇ VE KAPSAM	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 RETİNA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ.....	3
2.1.1 <i>Duyusal retina</i>	4
2.1.2 <i>Retina Pigment Epiteli</i>	5
2.1.2.1 <i>Retina Pigment Epitel Fonksiyonu</i>	7
2.1.2.2 <i>RPE Hücrelerinin Yaşlanması</i>	9
2.1.3 <i>Bruch Membranı</i>	10
2.1.4 <i>Koroid</i>	10
2.1.5 <i>Vitreus Anatomisi</i>	11
2.2 RETİNA KAN DOLAŞIMI.....	12
2.3 YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU.....	13
2.3.1 <i>YBMD Epidemiyolojisi</i>	13
2.3.2 <i>YBMD Etiyopatolojisi</i>	13
2.3.3 <i>YBMD Histopatolojisi</i>	17
2.3.4 <i>Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Sınıflandırması</i>	18
2.3.4.1 <i>Non-Neovasküler Anormallikler (Kuru Tip YBMD)</i>	18
2.3.4.2 <i>Neovasküler (yaş) YBMD</i>	21
2.3.5 <i>Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Tedavi</i>	22
2.3.5.1 <i>Non-Neovasküler (Kuru Tip) YBMD Tedavisi</i>	22
2.3.5.2 <i>Neovasküler (Yaş Tip) YBMD Tedavisi</i>	27
2.4 SERBEST RADİKAL OLUŞUM MEKANİZMALARI VE VÜCUTTAKİ ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	27
2.4.1 <i>Oksidatif Süreçler</i>	28
2.4.2 <i>Reaktif Oksijen Ara Maddeleri</i>	28
2.4.3 <i>Reaktif Oksijen Ara Maddeleri ve Hücre Hasarı</i>	30
2.4.4 <i>Oksidatif Strese Karşı Savunma Mekanizmaları</i>	31
2.4.5 <i>Retinada Reaktif Oksijen Ara Ürünlerinin Üretimi</i>	31
2.4.6 <i>Serbest Radikal Çeşitleri</i>	36
2.4.6.1 <i>Süperoksit</i>	36
2.4.6.2 <i>Hidrojen Peroksit</i>	37
2.4.6.3 <i>Hidroksil</i>	37
2.4.7 <i>Antioksidanlar</i>	38
2.4.7.1 <i>Süperoksit dismutaz (SOD)</i>	39
2.4.7.2 <i>Katalaz</i>	40
2.4.7.3 <i>Glutasyon, Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Redüktaz</i>	41
2.4.8 <i>Lizozomal membran geçirgenliği ve apoptozis</i>	41
2.5 LUTEİN.....	42
2.6 KURKUMİN	46
2.7 KROSETİN	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1 ARPE-19 HÜCRELERİNİN KÜLTÜR KOŞULLARI	50
3.2 ARPE-19 HÜCRELERİNİN PASAJLANMASI	50
3.3 OKSİDATİF HASAR MODELİ OLUŞTURULMASI VE OPTİMUM DOZUN BELİRLENMESİ	51

3.4 ARPE-19 HÜCRELERİNİN LUTEİN, KURKUMİN VE KROSETİNLE MUAMELESİ	51
3.5 OKSİDATİF BİYOBELİRTEÇLERİN TESPİTİ	51
3.5.1 SOD inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi	52
3.5.2 MDA aktivitesinin belirlenmesi	52
3.5.3 GSH aktivitesinin belirlenmesi	53
3.6 APOPTOTİK GEN DÜZEYLERİNİN RT-PCR İLE BELİRLENMESİ	53
3.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	54
4.BULGULAR	55
4.1 HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN MİKROSKOBİK GÖRÜNÜMLERİ	56
4.1.1 H ₂ O ₂ Uygulamasının Hücre Kültürü Üzerine Etkisi.....	56
4.1.2 Lutein, Kurkumin ve Krosetinin Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi	56
4.2 HÜCRELERİN CANLILIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	59
4.2.1 H ₂ O ₂ in hücre canlılığı üzerine etkisi ve oksidatif model için uygun dozunun belirlenmesi	59
4.2.2 Luteinin hücre canlılığı üzerine etkisi ve etkin dozunun belirlenmesi	60
4.2.3 Kurkuminin hücre canlılığı üzerine etkisi ve etkin dozunun belirlenmesi	61
4.2.4 Krosetinin hücre canlılığı üzerine etkisi ve etkin dozunun belirlenmesi	62
4.3 BİYOKİMYASAL İNCELEMELER	63
4.3.1 Süperoksit dismutaz (SOD)	63
4.3.2 Glutasyon (GSH).....	67
4.3.3 Malondialdehit (MDA).....	71
4.4 GEN EKSPRESYON ANALİZİ	75
4.4.1 Anti-apoptotik BCL-2 geninin gen ekspresyon analizi	75
4.4.2 Pro-apoptotik BAX1 geninin gen ekspresyon analizi	76
5.TARTIŞMA	80
6. SONUÇLAR	90
7. ÖZET	92
8. ABSTRACT	94
KAYNAKLAR.....	96

ÖNSÖZ

Kliniğimiz ve üniversitemiz kurucularından, uzmanlık eğitimim sürecinde tanımaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR'a teşekkür ederim.

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL'e uzmanlık eğitimime sağladığı katkıdan, gösterdiği sevgi ve ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Tez konumun seçiminde, proje aşamasında ve yürütülmesinde desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen; hasta yaklaşımı, cerrahi deneyimi, disiplini, yaptığı işe duyduğu tutkuyla beni kendine hayran bırakan, her zaman birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum, uzmanlık eğitim sürecimde benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Levent KARABAŞ'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimi sürecimde cerrahi ve klinik deneyimiyle bana her zaman destek olan kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Dilara PİRHAN'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecimde desteğini hep hissettiren, ihtiyaç duyduğumda yardımını esirgemeyen sevgili hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Sevgi SUBAŞI'na ve Dr. Öğr. Üyesi Büşra Yılmaz TUĞAN'a teşekkür ederim.

Tez sürecinde benden yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım, Prof. Dr. Yusufhan Yazır KASAP ve Doç. Dr. Gökhan DURUKSU 'ya teşekkür ederim. Birlikte çalışma fırsatı bulduğum Ayşegül AÇIKSARI 'ya teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecimde beraber çalışma fırsatı bulduğum asistan arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim. Eğitimim süresince uyum içinde çalıştığım klinik hemşirelerine, sekreterlerine ve personeline de teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde şüphesiz en büyük emeğe sahip olan başta sevgili annem ve babam olmak üzere her zaman bana inanan, anlayışlı, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Asistanlık sürecimin en yakın şahidi, her zaman yanımda olan, en büyük destekçim, eşim Burhan KÜÇÜK' e teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

RPE: Retina Pigment Epiteli

YBMD: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

Ca²⁺: Kalsiyum İyonu

CAT: Katalaz

Cu: Bakır

DHA: Dokosaheksaenoik asit

GSH: Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

HO₂: Hidroperoksil radikali

H₂O₂: Hidrojen peroksit

MDA: Malondialdehid

MAPK: Mitojenle aktifleştirilen Protein Kinaz

NADPH: Nikotin Amid Dinukleotid Fosfat

NGF: Sinir Büyüme Faktörü

O₂⁻: Süperoksit Radikali

OH⁻: Hidroksil Radikali

1O₂: Tekli Oksijen

3O₂: Üçlü Oksijen

RO⁻: Alkoksi

ROO⁻: Peroksi

ROS: Reaktif oksijen türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

Zn: Çinko

PED: Pigment Epitel Dekolmanı

KNV: Koroidal Neovaskülerizasyon

KNVM: Koroid Neovasküler Membran

L: Lutein

Z: Zeaksantin

MPOY: Makula Pigment Epitel Yoğunluğu

LF: Lipofuskin

PUFA: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

AREDS: Yaşa Bağlı Makulopati Çalışma Grubu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Retinanın histolojik kesiti

Şekil 2. Mitokondriyal solunumda oksijenin kademeli olarak redüksiyonu

Şekil 3. B-karoten

Şekil 4. Likopen

Şekil 5. Lutein

Şekil 6. Zeaksantin

Şekil 7: Kurkumin ve türevlerinin kimyasal yapısı

Şekil 8. ARPE-19 hücrelerinin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi

Şekil 9. Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerler ve Dizi Bilgisi

Şekil 10. H₂O₂'nin hücre üzerine olan etkilerinin mikroskobik görünümü.

Şekil 11. Kurkuminin hücre üzerine olan etkilerinin mikroskobik görünümü

Şekil 12. Luteinin hücre üzerine olan etkilerinin mikroskobik görünümü

Şekil 13. Krosetinin hücre üzerine olan etkilerinin mikroskobik görünümü

Şekil 14. H₂O₂'nin artan dozlarda canlılık üzerine etkisi

Şekil 15. Luteinin farklı dozlarının canlılık üzerine etkisi

Şekil 16. Kurkuminin farklı dozlarının canlılık üzerine etkisi

Şekil 17. Krosetinin farklı dozlarının canlılık üzerine etkisi

Şekil 18. Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması (1)

Şekil 19. Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması (2)

Şekil 20. Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması (3)

Şekil 21. Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması (4)

Şekil 22. Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması (1)

Şekil 23. Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması (2)

Şekil 24. Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması (3)

Şekil 25. Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması (4)

Şekil 26. Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması (1)

Şekil 27. Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması (2)

Şekil 28. Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması (3)

Şekil 29. Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması (4)

Şekil 30. BCL-2 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Şekil 31. BAX 1 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (1)

Şekil 32. BAX 1 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (2)

Şekil 33. BAX 1 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (3)

Şekil 34. BAX 1 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (4)

1.AMAÇ VE KAPSAM

Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu (YBMD), makülayı tutan, genetik eğilim ve çevresel faktörlerle ortaya çıkan, prevalansı yaşla artan, ilerleyici, kalıcı santral görme kaybına neden olan ve henüz etkin tedavisi olmayan bir hastalıktır. Hastalığın etyopatogenezi ve risk faktörleri tam olarak bilinmemektedir. Kısıtlı tedavi seçenekleri, hastalıktan korunmanın önemini arttırmış ve ciddi halk sağlığı problemi olmasına neden olmuştur.¹

YBMD gelişmiş ülkelerde 65 yaş ve üzeri santral görme kaybının en önemli nedenidir.¹ YBMD'nin neovasküler (yaş) ve non-neovasküler (kuru) olmak üzere iki ana tipi vardır. Hastaların % 90' ını kuru tip oluşturmaktadır. Kuru tip YBMD; retina pigment epitelinde (RPE) değişiklikler, atrofi, drusen ile karakterizedir. Yaş tip YBMD ise koroidal neovaskülarizasyon ile karakterizedir.²

RPE hücreleri retinanın dış tabakasında bulunup, fotoreseptör hücrelerinin yenilenmesi ve onarımı gibi birçok özelliğe sahiptir.^{3,4} RPE hücrelerinde normal fizyolojik işlevin bozulması YBMD'nin patogenezi en erken bulgulardan biridir.⁵ Artan kanıtlar YBMD'de oksidatif strese bağlı RPE dejenerasyonun kritik bir rol oynadığını göstermektedir.⁶ RPE hücreleri, süperoksit radikalleri(O₂-), hidroksil radikalleri(OH-), hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif strese karşı özellikle savunmasızdır.⁷⁻⁹ ROS'un birçok doku ve hücrede, hücre hasarını ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Araştırmalar, çeşitli antioksidanların ve çinko içeren takviyelerin YBMD ilerlemesini engelleyebileceğini ve görmeyi koruyabileceğini göstermiştir.⁸⁻¹⁰ Bu nedenle, oksidatif stresi sınırlandırarak RPE hücrelerini korumak, YBMD hastalarında görme kaybını yavaşlatmak veya muhtemelen tersine çevirmek için etkili bir yaklaşım olabilir. ROS ile indüklenen RPE hücresi hasarının önlenmesi, YBMD ilerlemesini engelleyebilir.^{11,12} Katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px), RPE hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan başlıca enzimlerdir.^{13,14} Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun bir ürünüdür ve ekspresyonu genellikle lipid peroksidasyonunun ve oksidatif hasarın bir belirteci olarak kullanılır.¹⁵ Apoptoz, programlanmış hücre ölümünün bir şeklidir ve patolojik apoptoz da YBMD ile ilişkilidir.^{16,17}

Kurkumin, Zingiberaceae ve Araceae bitkilerinin rizomlarından ekstrakte edilen bir bileşiktir.¹⁸ Jat ve ark.¹⁹ yaptığı bir araştırma, kurkuminin güçlü antioksidatif etkilere sahip olduğunu ve lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu ve mitokondriyal geçirgenlik artışına karşı koruduğunu göstermektedir. Antioksidan aktiviteye sahip zerdeçalın (*Curcuma longa* L.) büyük bir biyoaktif bileşiği olan kurkuminin kanser, artrit ve Alzheimer gibi hastalıklar için yararları olduğu gösterilmiştir.²⁰⁻²³ Özellikle, *in vitro* çalışmalar kurkumin'in apoptoz ile ilişkili proteinlerin ve antioksidan enzimlerin değiştirilmesiyle hücre canlılığını iyileştirdiğini ve RPE hücrelerindeki apoptozu ve oksidatif stresi azalttığını göstermiştir.²⁴⁻²⁶

Lutein, retinada insan maküler pigmentleri oluşturan, retinaya zararlı mavi ışığı önleyen ve RPE hücrelerinin antioksidan savunmasının güçlendirilmesine katkıda bulunan bir tür karotenoiddir.^{27,28} İnsan vücudu luteini sentezleyemez. Lutein kaynakları esas olarak diyet kaynaklıdır. YBMD'nin başlaması ve ilerlemesi riskinin makuladaki lutein konsantrasyonu ile negatif korelasyonu olduğu bildirilmektedir.^{10,29} Luteinin retina pigment epiteli (RPE) hücrelerindeki oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir.³⁰

Bir diğer antioksidan ajan, safranda bol miktarda bulunan bir antioksidan karotenoid olan krosetindir. Birçok hücre tipinde birden fazla farmakolojik etkisi gösterilmiştir. Etkileri arasında skleroderma fibroblastlarında antifibrotik etkisi bulunur. Krosetin, antioksidan, antienflamatuar, apoptozu indükleme ve nöroprotektif etki gibi çeşitli özelliklere sahiptir.³¹⁻³⁶ Yapılan bir başka çalışmada krosetin ile ön muamele edilen ARPE19 hücrelerinin, ERK1/2 yolaklarının aktivasyonu yoluyla LDH salımı, ATP tüketimi, hücre iskeleti kaybı ve oksidatif stresden koruduğu gösterilmiştir.³⁷

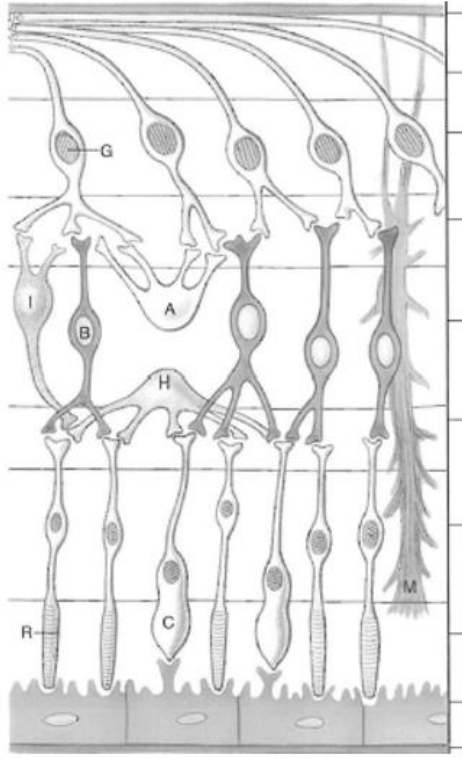
Kurkumin ve luteinin oksidatif hasara maruz bırakılan RPE hücrelerinde, antioksidan enzim seviyelerini arttırdığı ve apoptotik yolu etkilediği gösteren çalışmalar olmakla birlikte, krosetinin benzer etkileri henüz net olarak değerlendirilmemiş olup, yine bu üç molekülün etkileri karşılaştırılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, kurkumin, lutein ve krosetinin oksidatif hasara maruz bırakılmış RPE hücreleri üzerindeki antioksidan etkilerini ve apoptozis üzerine olan etkilerini araştırmak ve bu etkilerini karşılaştırmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Retina Anatomisi ve Histolojisi

Retina nöroektoderm kökenli, ışık sinyallerinin sinirsel iletiye dönüştürüldüğü, ince, şeffaf yapıda bir dokudur. Kalınlığı 100 ile 300 mikron arasında değişen retina içten (vitreus tarafından), dışa doğru (koroid tarafına) şu tabakalardan oluşur (Şekil 1):

- 1) İç limitan membran (Müller Hücreleri terminal uzantıları ve bazal membran)
- 2) Sinir lifi tabakası (ganglion hücre aksonları)
- 3) Ganglion hücre tabakası (ganglion hücre çekirdekleri)
- 4) İç pleksiform tabaka (bipolar, amakrin, ganglion hücreleri sinaptik bağlantıları)
- 5) İç nükleer tabaka (bipolar, horizontal, amakrin ve Müller hücre çekirdekleri)
- 6) Dış pleksiform tabaka (Fotoreseptör, bipolar, horizontal hücrelerin sinaptik bağlantıları, Henle lif tabakası)
- 7) Dış nükleer tabaka (fotoreseptör çekirdekleri, kon nükleusları dış grupta, rod nükleusları daha çok iç grupta)
- 8) Dış limitan membran
- 9) Fotoreseptör tabakası



İç limitan membran
Sinir lifi tabakası
Ganglion hücre tabakası
İç pleksiform tabaka
İç nükleer tabaka
Dış pleksiform tabaka
Dış nükleer tabaka
Dış limitan membran
Retina pigment epiteli
Bruch membranı

Şekil 1. Retinanın histolojik kesiti: R: Rod fotoreseptör, C: Kon fotoreseptör, B: Bipolar hücresi, H: Horizontal hücresi, A: Amakrin hücresi, G: Ganglion hücresi, M: Müller hücresi

2.1.1 Duyusal retina

Fotoreseptörler: Retina pigment epiteli (RPE) ile dış limitan membran arasında yer alan koni ve basil (rod) olarak adlandırılan, iki tip fotoreseptör bulunmaktadır. Her bir fotoreseptörün iç ve dış olmak üzere iki segmenti bulunmaktadır.³⁸ Basiller alaca karanlıkta ve gece görmeden (skotopik görme) sorumludur, foveada hiç bulunmaz ve periferde doğru sayıları hızla artar, uç periferde hafifçe azalır.³⁹ Koniler ise parlak ışıktaki görme (fotopik görme), renkli görme ve keskin görmeden sorumludurlar. En çok foveada bulunmaktadır.

Bipolar Hücreler: Dendritleri dış pleksiform tabakada koni ve basiller ile, aksonları ise iç pleksiform tabakada gangliyon ve amakrin hücrelerle sinaps yapan bu hücreler radyal

yerleşimlidir.³⁹ Görevleri fotoreseptörlerden gelen sinyali gangliyon hücrelerine aktarmaktır.

Gangliyon hücreler: Retinanın iç kısmında bulunan gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir. Dendritleri bipolar hücre aksonları ve amakrin hücreler ile sinaps yapar.³⁹ Gangliyon hücre aksonlarının birleşmesiyle optik sinir oluşur.⁴⁰

Horizontal hücreler: Horizontal hücreler basil ve konilerin terminal genişlemelerinin yakınlarında yer alan multipolar hücrelerdir. Fotoreseptörleri inhibe eden antagonistik internöronlardır.⁴⁰

Amakrin Hücreler: Bol sitoplazmalı, parçalı nükleuslu ve çok sayıda dendritleri olan aksonsuz hücrelerdir ve çoğunlukla inhibitör internöronlardır.

Müller Hücreleri: Retinanın glial hücre yapısını oluşturan en önemli hücrelerdir. Retinada mikrogliya ve makrogliya (Müller hücreleri, astrosit, oligodendrosit ve Schwann hücreleri) olmak üzere iki tip nöronal olmayan hücre grubu bulunur. Mikroglial hücreler yardımcı immün hücreler, makroglialar ise retinal nöronların fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerdir.⁴⁰ Retinanın destek yapısını oluşturan Müller hücreleri, dış limitan membrandan iç limitan membrana kadar uzanmaktadır.

2.1.2 Retina Pigment Epiteli

Retina pigment epiteli (RPE), Bruch membranı ve retina arasında bulunan nöroektodermal kökenli, tek katlı, altıgen şekilli küboidal hücre tabakasıdır. Optik disk kenarından ora serrataya kadar uzanır. Rod ve kon hücrelerinin dış kısmının fagositozu ve ışık absorpsiyonunda rol oynarken aynı zamanda dış kan-retina bariyerini de oluşturur.⁴¹ RPE'nin görevleri; fotoreseptör dış segment fagositozu, oksidatif stresten korunma, avasküler dış retinanın sağlanması, immünitenin sağlanması, A vitamini metabolizmasını düzenlemek, rodopsin sentezini düzenlemek, vizuel pigment yenilenmesi, sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanması, dış kan retina bariyerinin (KRB) oluşturulması ve devamlılığının sağlanması, subretinal alandaki sıvı ve besin kontrolünü ve retinal yapışıklığın sağlanmasıdır.³⁹

İnfant gözünde 4.2-6.1 milyon arasında RPE hücresi bulunmaktadır. Yaş arttıkça gözün yüzey alanı genişlemesine rağmen hücre sayısında önemli artış olmaz. Erişkin gözünde

normalde RPE de mitotik aktivite bulunmamaktadır. Hücre şekli fundusun değişik bölgelerinde birbirinden farklılık gösterebilir. Hücre büyüklüğü 10 µm ile 60 µm arasında değişir. Makulada RPE hücreleri daha uzun ve ince iken perifer retinada daha kısa ve geniştir ve aynı zamanda iki çekirdekli dirler. Makula bölgesinde 12-18 µm genişliğinde ve yaklaşık 10-14 µm yüksekliğindedirler. Ora serrata yakınında pigment epitel hücrelerinin genişliği 60 mikrona yaklaşır ve daha kısa hale gelirler. Makula bölgesindeki pigment hücreleri yaşlandıkça boyları uzar ancak genişlikleri azalır. Makula daha fazla ve daha geniş melanozomlar içerir. Tek sıra halindeki RPE hücreleri optik sinir kenarında başlar ve ora serrataya kadar uzanır, siliyer cismin pigment epiteli olarak devam eder. RPE hücrelerinin yoğunluğu fovea merkezinden perifer retinaya doğru giderek azalır.⁴²

RPE hücrelerinin apeksi fotoreseptörlerin dış segmentleri ile yüz yüzedir ve RPE tabanı alttaki Bruch membranına sıkı yapışıklık gösterir. RPE bazal membranı, Bruch membranının en iç tabakasına karşılık gelir. RPE hücreleri, içindeki melanin granülleri nedeni ile kahverengi görülür. Göz dibinin gözlediğimiz tipik pigmentasyon, RPE içindeki pigmentasyon miktarının değişikliklerine bağlıdır. Pigmentasyon paterni de yaşlanma ile birlikte değişir. Makula bölgesindeki hücreler daha az pigmente hale gelirken periferdeki hücrelerin pigmentasyonu artar. En yüksek pigment konsantrasyonu perifer retinada bulunurken, makula bölgesinde RPE en düşük melanin pigmenti konsantrasyonuna sahiptir.^{43,44}

Makula bölgesindeki pigment hücrelerinde lizozomal enzimler daha aktiftir ve dolayısı ile melaninin daha fazla degradasyonuna bağlı olarak perifere kıyasla bu bölgede melanin konsantrasyonu daha düşüktür. Retina ve RPE subretinal boşluk dediğimiz potansiyel bir aralık ile ayrılmışlardır. RPE hücreleri farklı yüzey alanlarına sahiptir ve her bir yüzeyin farklı ultrastrüktürel özellikleri ve fonksiyonları vardır. Apikal hücre membranı 3-7 µm uzunluğunda çok sayıda mikrovillus ile karakterizedir. Yaklaşık 5-7 mikron uzunluğunda olan uzantılar fotoreseptörlerin dış segmentleri arasına girerken yaklaşık 3 mikron uzunluğunda olan mikrovillusler, fotoreseptörlerin dış segmentlerinin üçte bir dış kısımları etrafında bir kılıf oluşturur. Dış segmentlerin fagositozu ile yenilenmesinde daha çok 3 mikronluk villüsler görev yapmaktadır. İki elin parmaklarının birbirine kenetlenmesi gibi bu villüsler fotoreseptörlerin dış segmentleri ile parmaksı bağlantılar oluşturur. Bahsettiğimiz bu parmaksı iç içe geçme şeklindeki yapılanma, retina ve RPE arasındaki

anatomik olmayan yapışıklığın sürdürülmesinde önemli etkidir. Zira fotoreseptör dış segmentleri ile pigment hücrelerinin apikal mikrovillusleri arasında sıkı bağlantılar (gap junctions) bulunmamaktadır. Retina-RPE temasının devamını sağlayan diğer iki etken ise ekstrasellüler matriks ve RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden salınan nöral hücre adezyon molekülüdür (N-CAM). Ekstrasellüler matriks, içinde laminin ve fibronektin gibi adezyon moleküllerinin bulunmaması ve anatomik bağlantının olmaması nedeni ile patolojik durumlarda sensoriyel retina, pigment epitelinden kolayca ayrılabilir.⁴²⁻⁴⁶

2.1.2.1 Retina Pigment Epitel Fonksiyonu

Her bir RPE hücresi 30-45 arası sayıda fotoreseptör hücresi ile temas halindedir. RPE hücreleri o kadar yüksek bir hızla dökmüş olan rod dış segmentlerini fagosite eder ve sindirirler ki 70 yıllık bir yaşam süreci içinde tek bir RPE hücresi yaklaşık 3 milyar disk sindirir ve degrade eder. RPE hücrelerinin apikal yüzeyinde özellikle de mikrovillusler üzerinde yerleşmiş membran proteinleri olan $\alpha\beta5$ integrin, mannoz reseptörleri ve CD36 rod dış segment fagositozunda çok önemli rol oynarlar. RPE hücreleri apikal membranında yerleşik olan Na^+/K^+ ATPaz pompa sistemi RPE tarafından koroide olan aktif sodyum akımında kritik rol alır. RPE hücresinin bazal membran yüzünde ise yaklaşık 1 μm uzunlukta içe katlantılar vardır. Bazal membran $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ ve $\alpha\beta3$ adı verilen integrinleri salar ve Bruch membranına yapışıklıktan sorumludur.⁴⁷⁻⁵²

RPE hücrelerinin yan duvar membranları apikal yüzeyin aksine, özelleşmiş anatomik sıkı bağlantılara sahiptir. Bu bağlantılar RPE hücrelerinin birbirleri ile yapışıklığı ve haberleşmesinden sorumludur. Bitişik RPE hücrelerinin lateral yüzleri zonula okludens ve zonula adherens bağlantıları ile birbirine sıkı yapışiktır. Bu bağlantılar makromoleküllerin koryokapillaris ile yer değiştirdiği bölge olan subretinal aralığı geçişlere kapatır ve Verhoeff membranı adını alır. Verhoeff membranı çok yüksek çözünürlüklü optik koherens tomografisinde RPE bandı ile iç segment/dış segment bandı arasında hiperreflektif ayrı bir bant şeklinde seçilebilir. Ancak bu bandın fotoreseptör dış segmentleri çevreleyen apikal yüzdeki mikrovillus çıkıntılarına karşılık geldiği de iddia edilmiştir. RPE hücreleri arasındaki zonula okludens yapıları hücreler arası sıkı bağlantılar oluşturur. Bu sıkı bağlantı bitişikteki okludin moleküllerinin hücre dışı alanlarının arasındaki etkileşimlere bağlıdır. Bu bağlantı sayesinde yüksek transepitelial direnç ve kan retina bariyeri oluşur. Sıkı bağlantılar aynı zamanda moleküllerin apikal ya da bazal

plazma membran alanlarına hapsolmasına neden olur. Bu moleküllerin bazıları koroidden dış retina katlarına besin taşınması ve aksi yönde su, iyon ve atıkların atılmasından sorumludur. Zonula adherensler ise 200Å ara ile bir bağlantı oluşturur ve çevresel mikrofilaman demetleri ile ilişkilidir. Adherens bağlantılarda bulunan katedrin molekülleri bağlanma ve sinyal için kalsiyuma ihtiyaç duyar. Bu bağlantı kompleksinin sitoplazmik yüzleri katenin proteinleri ile etkileşir. Katenin proteinleri α -aktinin ve vinkülün ile kompleks oluşturur. Adherens bağlantıları aktin iskeletinin organizasyonu ve RPE hücrelerinin poligonal şeklinin korunmasında önemli rol oynarlar. Bazolateral hücre membranlarında da bulunan sıkı bağlantılar(gap junctions), hücreler arası iyon ve metabolit değişiminde görev yapar.⁵³⁻⁵⁶

Retinanın RPE ile olan yapışıklığı aktif ve pasif olan güçler tarafından sağlanır ve devam ettirilir. Pasif güçlerin nispeten küçük bir rolü vardır. Pasif güçleri vitreus jelinin endotamponat sağlaması, transretinal sıvı gradienti, fotoreseptörler arası madde ve koroidin osmotik basıncı oluşturur. Apeksinde yerleşik Na^+/K^+ pompası ve sekonder olarak HCO_3^- transport sistemi ile RPE hücreleri, subretinal boşluktan su ve elektrolitleri aktif olarak dışarı pompalayarak retinanın yapışıklığını devam ettirir. Yukarıda bahsedildiği gibi RPE hücrelerinin mikrovillusleri ile fotoreseptör dış segmentleri arasındaki parmaklı içiçe geçmeler retinal yapışıklığın sağlanmasına çok daha az katkı sağlarken duyuşal nöronlar için fiziksel bir koruma oluşturur. Yine yukarıda bahsedildiği gibi RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden salınan N-CAM retinal yapışıklığın sağlanmasına katkıda bulunur.

Retinanın gözlemlediğimiz kırmızımsı rengi fotoreseptörler içinde yer alan rodopsin proteininden kaynaklanmaktadır. Bu rengin devamı için sensörinöral retinanın RPE ile kontaktının ve dolayısı ile görme siklusunun devamı gerekir. Retina dekolmanında veya ölüm sonrası retina bu kırmızımsı görünümünü kaybeder. Retina pigment epitelinin yaş ağırlığının yaklaşık %3'ünü lipidler ve fosfolipidler oluşturur. Fosfolipid içeriğinin de %80'inden fazlasını fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin oluşturur. Pigment epiteli içindeki doymuş yağ asitleri bitişikteki fotoreseptör dış segmentlerinden daha fazladır. Proteinler RPE'nin %8'ini oluşturur ve hücre iskelet proteinleri, plazma membran reseptörleri ve hidrolitik enzimlerini içerir. Protein devir hızı RPE içinde oldukça aktiftir. Fotoreseptörlerde yüksek konsantrasyonda bulunan taurin giriş-çıkışı RPE aracılığı ile

olur. RPE içinde yaklaşık 850 proteinin bulunduğu tanımlanmıştır. Yaklaşık 200 asidik protein mevcuttur. Hücre iskelet proteini olan aktin bunlardan birisidir. Plazma membranlarında bulunan reseptör proteinleri hücre fonksiyonlarında anahtar rol oynarlar. Glutasyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi detoksifiye edici enzimler, protein yapısındaki hidrolitik enzimler arasında yer alır.⁵⁷

2.1.2.2 RPE Hücrelerinin Yaşlanması

Yaşlanma ile RPE hücrelerinde özel değişimler görülür. Yaş artarken apoptotik RPE hücrelerinin oranı artar ve bu apoptotik hücreler başlıca makula bölgesi içindedir. Periferdeki RPE hücreleri makuladaki RPE hücrelerinin ölümünü telafi edebilirler. Ayrıca yaşlanma ile RPE hücreleri şekil ve büyüklük olarak daha düzensiz hale gelirler. Hücre içinde metabolizma artışı veya sindirilemeyen materyaller artar ve bu maddeler Bruch membranında toplanır. Hücre sitoplazmasında ise lipofuskin miktarı artar.^{42-48,58,59} Lipofuskin, pigment epitelinin ikinci en belirgin pigmenti olup doğumdan sonra yaklaşık 16. ayda görülmeye başlar, fagositoz artıkları ve hücre metabolizmasından geriye kalan artıklardan oluşur. Lipofuskin granüllerinin sayısı yaşlanma ile artar. Lipofuskin granülleri yaklaşık 1.5 µm büyüklüğünde olup hücrenin bazal kısmında yerleşiktirler, ancak bazı olgularda tüm sitoplazmayı doldurabilirler. Lipofuskin granülleri sarı rengindedir ve otofloresansa neden olurlar. Lipofuskin miktarının aşırı artışının YBMD ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. RPE hücresinde lipofuskin birikimi en nihayetinde hücre metabolizmasının bozulmasına yol açar. Bu durum sağlıklı RPE hücrelerine muhtaç olan fotoreseptörler için ciddi sonuçlar doğurur. Lipofuskin içeriği tam olarak tanımlanmamış olmakla birlikte; fototoksik bir florofor olan A2E içerdiği bilinmektedir. A2E, RPE hücresinde dejenerasyona yol açma potansiyeline sahiptir.^{42-46,58} Yaşlanma ile RPE içerisindeki bazı enzimler artar iken bazıları azalmaktadır; ancak bu konudaki bilgiler şu an için sınırlıdır. RPE hücrelerinin yapışma, hareket ve farklılaşma gibi fonksiyonlarında görev alan glikozaminoglikanların dağılımı yaşlanma ile değişmektedir. Yaşlanan RPE hücresinin Bruch membranına afinitesi muhtemelen azalmakta, Bruch membranında ortaya çıkan kalınlaşma, koroid ile RPE arasındaki moleküler transportun bozulmasına yol açmaktadır. Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinde kayıplar ortaya çıkmakta ve geriye kalan hücrelerin boyutu artmaktadır. Apoptotik hücre ölümü çevredeki hücrelerin yayılması ile tamir edilmektedir. Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinin proliferasyon

kabiliyeti de azalmaktadır. Tüm bu değişiklikler YBMD patogeneğinde yer almaktadır.^{42-46,48,58,59}

RPE hücreleri sahip oldukları fizyolojik fonksiyonları yerine getirmek ve yeterli miktarda ATP üretmek için, yüksek sayıda mitokondriye ve yüksek metabolik aktiviteye sahiptir.⁶⁰ Genel olarak mitokondri, ROS üretimi ve klirensinin ana hücre içi kaynağıdır. Tüm bu fizyolojik fonksiyonlar nedeniyle üretilen ROS, RPE hücreleri için savunmasız bir ortam meydana getirmekte ve RPE hücrelerinin oksidatif hasara karşı duyarlılıklarını arttırmaktadır.^{8,61-63} RPE hücreleri aynı zamanda birçok fizyolojik antioksidan savunma mekanizmasına sahiptir, ancak yaşlanmayla birlikte kronik ve uzun süreli oksidatif strese maruz kalma zamanla antioksidan kapasitenin azalmasına, ROS birikmesine ve mitokondriyal hasara neden olur.⁶⁴⁻⁶⁷ Bu süreçler sonunda meydana gelen RPE hücrelerinin dejenerasyonu, YBMD' nin erken klinik özelliklerinden biridir.^{68,69}

2.1.3 Bruch Membranı

RPE'nin taban kısmıdır ve RPE bazal membranı, iç kollajen alan, esnek lifler, dış kollajen alan, koryokapillaris endoteli olmak üzere beş tabakadan oluşur. Yaşam boyunca, yağlar ve oksidatif olarak harap edilen maddeler bruch membranı içinde birikirler.⁴¹

2.1.4 Koroid

Kan arka siliyer arterler ile koroide girer. Koroidal damarların dış tabakası, Haller tabakası olarak bilinir ve göreceli olarak büyüktür. Bu damarlar Sattler tabakası olarak bilinen tabakadaki küçük çaplı damarlarla birleşir. Böylelikle arteryel basıncın koroid seviyesine gelmesi düzenlenmiş olur. Arka kutupta, koryokapilaristeki kapillerler lobüler yapıda olmasa da, işlevsel olarak lobül oluşturan bir ağı yapıdadır. Bu ağı yapı fovea altında 4-5 kat iken ora serrataya doğru gidildikçe 1-2 kata kadar düşer. Kan koryokapillaris varınca, ampullalara dönüşen venüller içerisinde toplanır ve vorteks venler yardımı ile üst oftalmik vene ulaşır. Retina, ağırlığına göre metabolizma oranı en yüksek dokulardandır ve yoğun kan akımına sahip koroid tarafından beslenir. Koroidi terk eden venöz kanda dahi çok yüksek oranda oksijen mevcuttur. Böylece koryokapillaris üzerinde yer alan RPE hücreleri herhangi bir hücreden daha çok oksijene maruz kalırlar ve oksidatif hasar olasılığı da artar.⁴¹

2.1.5 Vitreus Anatomisi

Vitreus; lens, arka kamara, silier cisim ve retina arasında yerleşen, göz küresi hacminin yaklaşık %80'ini oluşturan, gözün en büyük iç yapısal elemanıdır. Vitreus, vitreus tabanı, kortikal vitreus ve kor vitreus gibi farklı bölümlerden meydana gelir. Erişkinde ortalama 4 mm³ olup, ağırlığı ise yaklaşık 4 gr'dır.³⁹ Vitreus yapısal olarak sıvı içeriği fazla hyaluronik asit matrikste asılı kollejen fibril ağından ibarettir ve %99'u su olmasına rağmen viskozitesi suyunkinin yaklaşık iki katı kadardır. Geriye kalan %1' lik kısım ise düşük molekül ağırlıklı yağlar ve inorganik tuzlardan, çözülebilen ve çözilemeyen proteinlerden ve hyaluronik asitten oluşur.⁴⁰ Vitreusta bulunan serbest amino asitler serumdaki miktarının beşte biri kadardır. Vitreusta hücrenel eleman olarak en sık hyalosit olarak bilinen mononükleer fagositler olmakla beraber daha az sayıda fibroblast ve glial hücreler sayılabilir. Vitreusun en önemli protein içeriğini kollajen oluşturur.

Vitreustaki kollajen, fibroblastlar tarafından üretilen tip-II kollajendir. Polisakkarit bileşiminde bir glikozaminoglikan olan, hyalositlerce sentezlenen hyaluronik asit en yoğun kortikal vitreusta en az kor vitreusun ön kısmında bulunur. Tüm yaşam süresince ön kortikal vitreustan arka kamaraya geçer. Hyaluronik asit vitreusun stabilizasyonunun, saydamlığını ve viskoelastik yapısını güçlendirir. Genç vitreus %80 jel iken, yaş ile beraber likefiye olmaya başlar ve 70-80 yaşlarında vitreusun yarısı likefiye olur.^{39,40} Vitreus ile retinanın komşuluklarını kalıcı kılan bağlantılar vitre tabanı ve optik sinir başında güçlüdür. Bu bağlantılar daha zayıf olmak üzere, lensin gerisindeki hyaloid fossa periferinde, pars plana silier epiteli yüzeyinde, retina damarları ve makula düzleminde de gözlenmektedir. Vitreus tabanı ora serratanın 1,5-2,0 mm önünde, nazalde 3 mm, temporalde ise 1,8 mm arkasına ve birkaç mm vitreus içine doğru yükselen üç boyutlu bir yapıdır.⁷⁰

Kortikal vitreus, vitreusun periferde retinaya komşu 100-300 mikron kalınlıktaki dış kısmıdır. Vitreus tabanı önündeki fibrillerin öne ve içe doğru yönelmesi ile ön kortikal vitreus, arkasından içe ve arkaya doğru yönelmesi ile arka kortikal vitreus oluşmaktadır. Müller hücrelerinin bazal membranı olan iç limitan membran ile kortikal vitreustaki fibriller sayesinde retina-vitreus bağlantıları sağlanmaktadır. Kor

vitreus kortikal vitreusun çevrelediği, merkezdeki bölümdür. Daha az yoğun bir yapı olup daha az kollejen fibril içerir.⁷⁰

2.2 Retina Kan Dolaşımı

Retina birim ağırlık başına oksijen tüketiminin yüksek olduğu bir dokudur. Optik diskin yakınındaki büyük dallar dışında gerçek arter ve ven içermemektedir. Retina arterleri anatomik olarak uç-arter olup arteriovenöz anastomoz göstermemektedirler.³⁹

Arterler: Santral retinal arter (SRA); internal karotid arterden ayrılan oftalmik arterin dalıdır. Retinal kan dolaşımı retinal ve üveal (koroidal) olmak üzere iki ayrı kaynaktan gelir. Dış pleksiform ve dış nükleer tabakalar, fotoreseptörler ve pigment epitelinden oluşan retinanın 1/3 dış kısmı koroid dolaşımından, 2/3 iç kısmı ise santral retinal arterden beslenir.

Oftalmik arterin, SRA dan sonraki dalları olan kısa ve uzun arka siliyer arterler globa optik sinir etrafından girerler. Posterior koryokapillaris kısa arka siliyer arterlerden, anterior koryokapillaris ise uzun arka siliyer arterlerden ve ön siliyer arterlerden beslenmektedir.³⁹

Venler: Ora serratada venler, arterlerin sonlandığı yerin daha periferinden başlarlar. Ekvatordan itibaren ise arterlerle birlikte seyrederek ve papillada toplanarak santral retinal veni oluştururlar. Santral retinal ven ya superior oftalmik ven yolu ile veya direkt olarak kavernoöz sinüse drene olur.^{39,40}

Kapillerler: Retina arteriyolları ile venülleri arasında kapillerler bulunur. Retina kapillerleri çoklu arteriyoler bağlantılar içermektedir. Böylelikle bir besleyici damarın kapanması ile kapiller yatakta dolaşım durmaz. Koryokapillerlerin duvarlarında geniş porlar bulunmasına ve geçirgen olmalarına karşılık, retina kapillerlerinin duvarları geçirgen değildir. Retina kapillerleri yüzeysel ve derin olmak üzere iki ağ şeklinde mevcuttur. Retinada kapillerlerin olmadığı üç bölge mevcuttur: Ora serratadan 1,5 mm gerisine kadar olan bölge, fovea santralinde ortalama 0,5 mm'lik bölge (foveal avasküler zon) ve büyük arterlere ya da daha az oranda venlere komşu bölgeler.^{39,40}

Kan-Retina Bariyeri (KRB)

Dış KRB, komşu RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri olan zonula oklüdens ve zonula adherensler aracılığı ile oluşturulmaktadır. İç KRB ise non-fenestre retinal vasküler endotel hücreleri ve bunların arasındaki sıkı bağlantılar tarafından oluşturulmaktadır.

2.3 Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

2.3.1 YBMD Epidemiyolojisi

YBMD, batı toplumlarında, 50 yaş ve üzeri popülasyonda en sık yasal körlük nedenidir. YBMD, yaşlı bireyler arasında geri dönüşümsüz görme kaybının önde gelen nedenidir ve dünya çapında körlüğün %8.7'sini oluşturmaktadır. Hastalık en fazla Avrupa kökenli popülasyonda yaygındır ve toplam popülasyonun yaklaşık %1-3'ü ileri bir YBMD formundan muzdariptir.⁷¹⁻⁷³ Global olarak, 2040 yılında herhangi bir YBMD tipine sahip toplam etkilenen hasta sayısının 288 milyon bireye yükselmesi beklenmektedir.⁷³ Framingham göz çalışmasında 2631 görme kaybı olan kişide etyolojide %15.5 senil katarakt, %3.1 diyabetik retinopati, %8.8 YBMD saptanmıştır ve YBMD'nin 5 yıllık insidansı 65 yaş için %2.5, 70 yaş için %6.7, 75 yaş üstü için %10.8 olarak bildirilmiştir.⁷⁴ Tüm çalışmalarda YBMD prevalansı yaşla birlikte artış göstermektedir. Beyaz ırkın çoğunlukta olduğu geniş toplum tabanlı Beaver Dam Göz Çalışması(BDES)' nda 75 yaş üstünde 15 yıllık insidans erken YBMD'de %24, geç YBMD'de %8'dir.⁷⁵ Coğrafik atrofinin veya neovasküler YBMD'nin 55 yaş öncesinde nadir olduğu, 75 yaş ve üzeri hastalarda daha sık olduğu görülmektedir. Latin ve Latin kökenli bireylerden oluşan Los Angeles Latino Göz Çalışması (LALES)'nda, 70-79 yaş arası YBMD prevalansı %1.5 iken, 80 yaş üstü %8.5 olarak saptanmıştır. BDES'te 70-79 yaş arası prevalansı %3.7, 80 yaş üstü ise %9.5 olarak saptanmıştır.^{75,76} Baltimore göz çalışmasında görme kaybı beyazlarda %2.7, siyahlarda %3.3 olarak saptanmış ve bunların %14.4'ü YBMD' ye, %7.3'ü diğer retinal hastalıklara bağlanmış ve bu çalışmada retinal hastalıkların görme kaybındaki sıklığı vurgulanmıştır.⁷⁷

2.3.2 YBMD Etyopatolojisi

YBMD' nin kesin patofizyolojisi halen anlaşılammış olmasına rağmen yapılan çalışmalarda çok sayıda biyolojik yol tanımlanmıştır. Bunlar yaşlanma, RPE hücrelerinde lipofuskin birikimi, koroidal iskemi ve oksidatif stres gibi çeşitli patolojik süreçleri içermektedir.

Yaşlanma: RPE, fotoreseptörler için çok önemli olan metabolik ve destekleyici fonksiyonlara sahiptir. Fotoreseptör hücrelerin dış kısımlarında disk şeklindeki membran yapıları bulunmaktadır. Bu diskler düzenli olarak yenilenmekte ve eski diskler hücrelerin dış kısmına itilmektedir. İşte RPE bu dökülen fotoreseptör dış segmentlerini fagosite eder. Metabolik artıklar ise daha sonra koryokapillaris yolu ile gözden uzaklaştırılmaktadır.⁷⁸

Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinin sayısında zamanla azalma olmaktadır. Hücre sayısında azalma kalan hücrelerin metabolik yükünün artmasına ve metabolik artıkların tam olarak uzaklaştırılmamasına sebep olur. Bu durumda artık materyaller hücre sitoplazmasında birikmeye başlar. Bu birikim kalan RPE hücrelerinin de ölümüne yol açabilir.⁷⁹ RPE sitoplazmasında biriken fagozomal birikimler lipofuskin olarak adlandırılır. Yaşla birlikte lipofuskin birikimi giderek artmaktadır.⁸⁰

RPE sitoplazmasında lipofuskin biriktikçe fonksiyonel sitoplazma gittikçe azalır ve RPE fonksiyonunda bozukluklar ortaya çıkmaya başlar. Lipofuskin, RPE hücrelerinde oksidatif hasara ve lizozomal enzimatik faaliyetin azalmasına neden olabilir.^{59,81} RPE hücrelerinin ölümü ise fotoreseptör kaybı ve koryokapillarisde atrofiye neden olabilir.⁸²

Bruch membranı YBMD patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. Gençlerde ve sağlıklı gözlerde Bruch membranı oksijen ve glukoz gibi sıvı ve küçük molekülleri geçiren, yapısal bir destek olarak fonksiyon gösterir. Ayrıca antianjiojenik moleküller içererek elastin tabaka da neovaskularizasyona karşı bir bariyer olarak işlev görür.

RPE, VEGF üretir. VEGF, Bruch membranından koryokapillarisine geçebilir. Buna rağmen Bruch membranındaki antianjiojenik moleküller koroidden gelen neovasküler kılcal damarların büyümesini engelleyerek yaş tip YBMD' nin gelişmesine engel olur.

Bruch membranı 5 tabakadan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla; RPE bazal membranı, iç kollajen tabaka, elastik tabaka, dış kollajen tabaka ve koriokapillarisin bazal membranıdır. Yaşlanmayla birlikte Bruch membranında da bazı değişiklikler görülmeye başlar. Bruch membranında görülen ilk dejenerasyon belirtileri bazal laminar depozitlerdir.

Yaşlandığımızda Bruch membranı elastin laminada debris birikimi ve ayrıca kollajen tabaka ve RPE bazal laminası arasında drusen birikimi oluşmaya başlar. Bu debris birikimi Bruch membranının geçirgenliğinde azalmaya sebep olur. Bu RPE tarafından gözün

içinden dışına atık maddelerin pompalanmasına engel olarak RPE dekolmanına sebep olabilir. Ayrıca kuru tip YBMD' de görülen atrofinin de yine Bruch membranındaki artık madde birikimi nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir.⁸³

Yaşlanma ayrıca Bruch membranındaki elastin tabakada incelmeye ve kırılmalara yol açar bu tabakada incelme antianjiojenik proteinlerin azalmasına bağlı olarak neovaskülarizasyon riskini artırır. Ayrıca elastin yıkım ürünlerinin kendileri de anjiojeniktir. Bu nedenle Bruch membran elastinlerinin yıkımı sadece neovaskülarizasyona karşı olan bariyerin azalmasına sebep olmaz aynı zamanda damar büyümesini de sitimüle eder.⁸⁴

Koroidal kan akımı: Yaşlanma ile sklera, Bruch membranı ve damar yapılarının duvarlarına lipid maddelerin infiltrasyonu sonucu koroidde kan akımına karşı artmış bir direnç izlenmektedir. Bunun sonucu olarak da göz ve beyin arterindeki göreceli dirence bağlı olarak koroid perfüzyon basıncında azalma veya koryokapiller damar içi basınçta artma izlenir.

Ramrattan ve ark.⁸⁵ çalışmasında doğumdan (200µm) 90 yaşına kadar (80µm) koroid kalınlığında progresif bir azalma izlenmiştir. Yaşla beraber koryokapillaris yoğunluğu ve lümen çapı azalmaktadır.⁸⁶ Bu bilgilerin ışığında subfoveolar koroidal kan akımının yaşla birlikte azalması sürpriz değildir.⁸⁵ Örneğin 50 yaşın üzerindeki bireylerde indosiyanın yeşili ile koryokapiller dolma gecikmiş, YBMD hastalarında makülada hipofloresan alanlar görülmeye başlanmıştır. Submaküler koryokapillarisin Laser Doppler Flowmetrisi 46 yaşından büyük bireylerde düşük koroidal kan akımını ve volümünü göstermiştir.

Guymer ve ark.⁸⁷ Bruch membranındaki endotelial hücre çıkıntılarının Bruch membranından atık temizlemede önemli bir rolü olduğunu söylemektedir. Bu nedenle yaşa bağlı koryokapiller kaybı Bruch membranı kalınlığının artmasının sebebi olabilir. Aynı zamanda RPE normal koryokapiller yoğunluğu ve anatomisini koruyucu maddeler üretmektedir. Bruch membran kalınlaşması koryokapillaris bu maddelerin yayılmasını bozarak yaşa bağlı koryokapiller değişikliklere yol açar.⁸⁸ Koroid perfüzyonunun azalması RPE metabolizmasını etkileyerek RPE dejenerasyonuna ve atrofisine neden olmaktadır.^{47,89}

Aynı zamanda artmış koroid basıncı ise RPE den gelen atık maddelerin atılımını zorlaştırmakta ve Bruch membranında lipoit infiltrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bu drusen ve bazal laminar birikintilerin oluşumuna yol açmaktadır. Artmış koroid basıncı retina pigment epitel dekolmanının (PED) da nedeni olabilir. Ek olarak sistemik hipertansiyon da koroidde vasküler değişikliklere yol açarak damar intimasında kalınlaşma ve tıkanıklığa sebep olabilmektedir.^{90,91}

Oksidatif stres: Hücrelerin oksidatif hasarı yaşanma sürecinde önemli bir rol oynar. Yaşla birlikte DNA onarım sisteminde bozukluk, yoğun oksidatif stres ve azalmış antioksidan savunma nedeniyle DNA hasarı artar.⁹² Fotoresptör ve RPE gibi non-proliferatif postmitotik hücreler, hücre döngüsü kontrol noktalarında herhangi bir DNA hasarı tespit sistemlerine sahip olmadıkları için oksidatif hasara duyarlıdır.⁹³ Makülada predominant fotoresptörler koni hücreleridir. Rodlardan daha fazla enerji üretmeye ihtiyacı olduğu için aynı zamanda daha fazla oksijene de ihtiyaç duyarlar.^{94,95}

Retina görünür ışığa maruz kalmasından dolayı yüksek oksijen tüketen bir organdır. Bu nedenle retina oksidatif strese karşı duyarlıdır.^{8,96} Işığa ve oksidatif strese maruz kalma durumu protein, lipid ve DNA'da lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır.⁹⁷

Ayrıca bazı çalışmalar antioksidan vitaminler olan vitamin A,C ve E vitaminlerinden zengin gıdalar tüketenlerde YBMD riskinde azalma göstermiştir.^{10,98} Ek olarak Eye Disease Case Control Study düşük plazma C vitamini düzeylerinin artmış YBMD riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir.⁹⁹

YBMD'de plazma glutatyon redüktaz seviyeleri anlamlı derecede düşük izlenmiştir.¹⁰⁰ Yine bir çalışmanın sonucu sigara kullanmanın da oksidatif hasara yol açarak YBMD için risk faktörü olduğunu göstermektedir.⁹⁷

İnflamasyon: Epidemiyoloji ve laboratuvar çalışmaları, enflamasyonun drusen ile YBMD patogenezinde rol aldığını göstermektedir.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ YBMD'ye neden olan ana patolojik değişiklikler enflamasyon, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresidir.¹⁰⁵ Hipoksi ile indüklenebilir faktör (Hif)-1 α , VEGF-A gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan hipoksik yanıtın anahtar bir aracıdır.¹⁰⁶

Doku kesitlerinin histolojik incelemelerinde RPE'ye ait hücre atıklarının, RPE bazal lamina ve bruch membranı arasında birikip kronik enflamasyon yoluyla drusen oluşturabildiği görülmüştür. Drusen, akut ve kronik enflamatuvar cevap oluşturan proteinler amiloid P ve kompleman proteinlerini de içerir. Enflamasyon anjiyogenez ile alakalıdır ve ileri YBMD'de neovaskularizasyonda rolü olduğu düşünülmektedir.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

Kuru tip YBMD'nin anlamlı belirtisi olan drusen; apolipoprotein E, koagülasyon proteinleri, akut faz proteinleri, IgG, kompleman faktörleri gibi çok sayıda pro-inflamatuvar faktörler içermektedir ve lokal inflamasyon YBMD'nin erken patogenezi oluşturur.¹⁰⁷

2.3.3 YBMD Histopatolojisi

Normal yaşlanmaya bağlı olarak makülada çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar; fotoreseptör yoğunluk ve dağılımında azalma, pigment epitelinde ultrastrüktürel değişiklikler, melanin granüllerinde azalma, lipofuskin granül ve artık cisimlerin oluşumudur.

Bazal lamina depozitlerinin birikimi yağdan zengin granüler materyal ve geniş aralıklarla yerleşmiş kollajen fibrillerinin, RPE'nin hücre plazma membranı ve onun bazal membranı arasında birikmesidir.

İlerleyici involüsyonel koryokapiller değişiklikler normal yaşlanma süreci ile ilgili olup YBMD'nin bir parçası olmayabilir. YBMD'ye bağlı değişiklikler ise yaşlanmanın parçası değildir ve neovasküler olmayan ve neovasküler olarak sınıflandırılabilir.⁴¹

Yaşlanmayla beraber, drusen formasyonu ve lipofuskin oluşumunu hızlandıran çok sayıda metabolit retina belirmeye başlar. Lipofuskin hücre yaşlanma faktörü olarak isimlendirilir. Bunlar fotoreseptörlerin eksternal segmentlerinin inkomplet metabolizma ürünleridir. Protein lipid membran sıklığının kaybı sonucu lipofuskin önce sitoplazmaya sonrasında ekstrasellüler alana çıkar ve sonunda drusenleri oluşturur.¹⁰⁸

Lipofuskin molekülü hibrid florofor A2-E (toksik vitamin A dimeri) içerir ve fotoreseptör apoptozunda aktif bir rol oynamaktadır.¹⁰⁸ Aşırı düzeylerde, lipofuskin ve A2-E fotoreseptörleri ve koryokapillarisini hasarlar ve jeografik atrofiye sebep olur. RPE'ye

toksik olmanın yanında A2-E'nin kompleman kaskadını aktive ettiği de gösterilmiştir.^{109,110}

2.3.4 Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Sınıflandırması

2000 yılında yayınlanan çok merkezli “Yaşa Bağlı Makulopati Çalışma Grubu” (Age Related Eye Disease Study- AREDS) YBMD sınıflamasını aşağıdaki gibi düzenlemiştir;¹¹¹

AREDS kategori 1: Drusen olmaması veya bilateral yaygın olmayan küçük drusen (<63 µm) ile karakterizedir.

AREDS kategori 2 (Erken Evre YBMD): En az bir gözde yaygın küçük drusen (<63 µm), 20'den az sayıda orta drusen (63-124 µm) veya pigment anomalileri ile karakterizedir.

AREDS kategori 3 (Orta Evre YBMD): Birçok orta boy drusen (63-124 µm) veya en az bir büyük drusen (>124 µm) veya merkezi makula içine uzanmayan jeografik atrofiyi içermektedir.

AREDS kategori 4 (İleri Evre YBMD): En az bir gözde foveayı tutan jeografik atrofi veya koroid neovaskularizasyonu veya nörosensoryal retina veya RPE'nin seröz ve/veya hemorajik dekolmanı, retinal sert eksüdatlar, subretinal ve sub-RPE fibrovasküler proliferasyon, diskiform skar durumlarını içeren neovasküler makulopati durumlarının tek bir gözde biri veya birkaçı ile karakterizedir.

2.3.4.1 Non-Neovasküler Anormallikler (Kuru Tip YBMD)

Atrofik tip YBMD'de görülen temel lezyonlar; drusen, RPE değişikliği, RPE'nin coğrafik atrofisi ve fokal hiperpigmentasyonudur. Atrofik tip, YBMD'nin %90'ından sorumlu iken ancak hastaların %10'unda aşikâr görme azalması meydana gelir. Atrofik tip YBMD'de görme azalması yıllar içinde yavaş yavaş gelişmesine karşın, atrofik tip zamanla eksüdatif tipe dönüşebilir ve ani görme azalması oluşabilir.¹¹²

Drusen

Almanca nodül anlamına gelen, ilk defa 1854 yılında Donders tarafından tariflenen drusen, makula içinde RPE seviyesinde yer alan, genellikle 50 yaşından büyüklerde görülen sarı-beyaz, hafifçe kabarık birikintilerdir. Drusen tipik olarak kollajen, RPE

organelleri ve hücre proseslerini kapsayan ekstraselüler eozinofilik materyallerin fokal birikimidir ve RPE bazal membranı ile Bruch membranının kollajenez katı arasında yer alır.^{113,114} Bugüne kadar drusenin oluşumu hakkında çok çeşitli hipotezler öne sürülmüştür fakat genellikle bu birikintilerin RPE kaynaklı olduğu düşünülmektedir.¹¹⁵ Histopatolojik incelemeler drusenin dağılımının koryokapilleris patternine uygunluk gösterdiğini göstermiştir.¹¹⁶ Drusen'de plazma proteinlerinin gözlemlenmesi, enflamatuar bir yanıt sırasında, immün aracılı, kompleman aktivasyonunun sebep olduğu mekanik önerilere yol açmıştır. RPE'den gelen sinyaller tarafından tetiklenen olaylar, nedensel olarak drusen oluşumunda yer almaktadır. Oksidatif protein modifikasyonları protein çapraz bağları, AGE'ler ve lipidler kaynaklı değişiklikler drusen formasyonunda birincil katalizörler olabilir. Gerçekten de AGE'ler vasküler endotelial büyüme faktör salgılanmasını ve in vivo anjiyogenezisi uyarır bunun sonucunda da YBMD'de koroidal neovaskülarizasyonda rol oynayabilir.¹¹⁷ Drusen her zaman makula dejeneresansına ilerlemez ve yalnızca normal yaşlanma bulgusu olarak kalabilir. İlerleyici formda aynı hastada zaman içerisinde farklı drusen formları oluşabilir. Hastalığın prognozunda oynadıkları rol açısından sayı, şekil ve büyüklüklerine göre sınıflandırılabilirler.

Boyuta göre:

- 1- Küçük drusen: < 63 mikron
- 2- Orta drusen: 63-124 mikron
- 3- Büyük drusen: >124 mikron

Klinik görünümüne göre:

Sert drusen: Bruch membranının iç yüzeyinde hyalin materyalin birikiminden oluşur. Çapı 63 mikrondan küçük sınırları belirgin sarı-gri renkte görülür.

Sert drusen kümeleri: Sert drusen birikimlerinin sıkı bir şekilde bir araya gelmesi ile oluşan ve yumuşak drusen andıran lezyonlardan ibarettir. FFA ve indosiyanin yeşili anjiyografisinde (İCGA) erken ve geç evrede hiperfloresan olarak izlenirler.¹¹²

Yumuşak drusen: Yumuşak drusen, 63 mikrondan büyük, sınırları belirsiz ve farklı büyüklük ve şekildedir. Genellikle birleşme ve kümeler oluşturma eğilimindedir.

Histopatolojik olarak diffüz bazal laminer veya bazal lineer depozitlerle birlikte, RPE-Bruch membranı kompleksinde yaygın fonksiyon bozukluğunu temsil eder. FFA'da gecikmiş ve hafif bir hiperfloresans gösterirler, drusenin büyüklüğü arttıkça floresansı azalır. İCGA'da tüm fazlarda hipofloresandır. Yumuşak drusenin batı toplumlarında erişkinlerde görülme sıklığı %13-20 arasında verilmektedir. Hem insidansı hem de prevalansı yaşla ilişkilidir ve KNV gelişmesi açısından büyük risk taşırlar.¹¹⁸⁻¹²¹

Drusenin gerilemesiyle ilgili bulgular, beyazlığının artması, sınırlarının keskinleşmesi, pigment birikintilerinin oluşması ve kalsifikasyonudur. Drusenin gerilemesiyle incelmış RPE veya fokal jeografik atrofi alanları ortaya çıkar. FFA'da atrofik alanlar hiperfloresan, pigment ve kalsifikasyon hipofloresan olarak izlenir. İCGA'nin erken fazında hiperfloresan olarak başlayan atrofi alanlarının bazıları anjiyografi ilerledikçe tamamen hipofloresan olarak izlenirken, bazıları ise zemin koroid floresansına göre daha hiperfloresan hale geçer.

Retiküler Drusen: Retiküler drusenler FFA'da bulgu vermezler. Histolojik yapısı aydınlatılamamıştır. KNV oluşması için yüksek risklidir.¹²²

Gerileyen drusen: Drusenin gerilemesi ile ortaya çıkan keskin sınırlı, beyaz, kalsifiye, pigment birikimleri ile seyreden ve bunu zamanla RPE incilmesi veya atrofisinin takip ettiği lezyonlardır. FFA'da RPE atrofisi, pigment kümelerine bağlı pencere defektlerinin olduğu hiperfloresan görünüm verirken kalsifik drusen ise hipofloresan özellik gösterir. Bunlar, İCGA'da hiperfloresans görünüm verirler.¹²³

Retina Pigment Epiteli Değişiklikleri

Bruch membranının iç katının diffüz kalınlaşmasıyla birlikte klinik olarak tespit edilen yumuşak drusen birlikte RPE değişiklikleriyle birlikte seyredebilir. Bu değişiklikler RPE'nin jeografik atrofisi, RPE'nin non-jeografik atrofisi, fokal hiperpigmentasyon ve bruch membranının distrofik kalsifikasyonudur. Non-jeografik atrofi; başlangıçta fovea dışında beliren, zamanla foveayı da etkileyebilen keskin sınırlı ve alttaki koroidal damarların seçilebildiği RPE'nin fokal atrofisidir. RPE'de geniş atrofi alanları dışında sensoriyal retina ve koriokapillarisin atrofisinin de izlendiği, büyük damar arkadlarını aşmayacak şekilde foveayı da içine alan atrofiler jeografik atrofi olarak tanımlanır. Non-jeografik atrofi FFA'da erken dönemde pencere defektine uyacak şekilde lekeli hiperfloresans özellik gösterirken, geç dönemde hiperfloresans giderek azalır. Jeografik

atrofide ise FFA'da erken fazda koriokapillaris atrofisine bağlı hiperfloresans izlenmezken, geç dönemde koroid ve skleranın boyanması nedeniyle hiperfloresans izlenir.¹²⁴

2.3.4.2 Neovasküler (yaş) YBMD

Yaş tip YBMD'nin kuru tipten ayırılması, Bruch membran/RPE kompleks bütünlüğünün ayrılması neticesinde meydana gelen pigment epitel dekolmanı (PED) ile olur. Sub-RPE ve subretinal potansiyel boşluklara koryokapiller damarların ilerlemesiyle PED ve eksudatif tip YBMD meydana gelir. PED'in en sık komplikasyonu koroidal neovasküler membrandır. İnsan retinası vücuttaki en yüksek oksijen tüketimi ve metabolik aktiviteye sahiptir. Retina damarları dış pleksiform tabakaya kadar beslenmeyi sağlarken daha derin tabakaların beslenmesi koroid damarlarından sağlanır. Depozitlerin varlığı büyüme faktörlerini tetikleyebilir. Anjiogenez (Vasküler Endotelial Growth Factor, VEGF) ve anti- anjiogenez (Pigment Epithelium Derived Factor, PEDF) faktörleri arasındaki dengenin bozulması koroidal neovaskülarizasyonu (KNV) tetikler.¹¹⁹

KNV: Yaş tip YBMD nin en önemli bulgusu KNV'dir. KNV, koroidden yeni damar oluşumudur. Oluşan yeni damarlardan sızan sıvılar, retina tabakalarında ayrılmalara ve rüptürlere, subretinal ve intraretinal kanamalara sebep olmaktadır. Koryokapiller damarlar, Bruch membranındaki çatlaklardan geçerek RPE ve Bruch membranı arasındaki boşluğa (sub-RPE KNV, tip 1 büyüme paterni), retina ve RPE arasına (subretinal KNV, tip 2 büyüme paterni) veya her iki boşluğa (kombine büyüme paterni) ilerleyebilirler. Tip 1 KNV nin anjiyografik bulgusu okült, tip 2 KNV'nin anjiyografik bulgusu klasik tipe karşılık gelir. Tip 1 KNV, yaş tip YBMD için karakteristiktir.

Klasik KNV: KNV'nun histolojik olarak gösterildiği ilk anjiyografik tiptir. Aşikâr KNV Bruch membranındaki bir çatlaktan koroid kapillerinin proliferasyonu sonucu, anjiogramın erken fazında, sınırları son derece iyi belirlenen, komşu dokulardan ayırt edilebilen parlak hiperflöresans veren ve giderek flöreseinin sızması sonucu geç göllenme tarzında çevresindeki subsensoriyal retinal alanı sızıntı ile dolduran durumdur. YBMD'lerin %12'si yaş tiptedir ve bunların %13'ü klasik KNV özellikleri gösterir.¹²⁵

Okült KNV: Klasik dışı tüm görünümleri kapsayan subretinal pigment epitelyum lezyonudur. Beraberinde eksudatif veya hemorajik belirtiler olması üzerindeki pigment epitelinin veya damarsal etkisiyle değişik görüntüler sergiler.¹²⁶ FFA'da flöreseinin

göllenmesinin kesin odağı net olarak izlenmeyebilir. Koroidal flöresansın görülmesini engellemeye yetecek kalınlıkta kanama olması, hiperplastik RPE'nin seröz dekolmanları, KNV'nin yavaş kan akımı veya fibröz doku nedeniyle organize olmuş kabarıklıkta floresansın blokajına bağlı olarak, KNV sınırlarını maskeleyen özellikler ortaya çıkar.^{127,128} Makuler Fotokoagülasyon Çalışma Grubu tarafında flöresansın anjiyografide 2 farklı gizli KNV floresans paterni belirtilmiştir. Bu paternler fibrovasküler pigment epitel dekolmanı (PED) ve kaynağı belirsiz geç faz hiperflöresanstır.

2.3.5 Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Tedavi

2.3.5.1 Non-Neovasküler (Kuru Tip) YBMD Tedavisi

Atrofik tip YBMD tedavisini ve hastalığın ilerlemesi ile eksüdatif tipe dönüşümünün engellenmesini sağlayabilecek kabul edilmiş etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Oksidatif stresin azaltılması ya da önlenmesi için antioksidan vitamin ve bazı minerallerden zengin diyet ve takviye ilaçların kullanımı son yıllarda YBMD profilaksisinde gündeme gelmiştir.¹²⁹⁻¹³²

Besinlerdeki bazı vitamin ve mineraller, retina antioksidan savunma sisteminin parçasıdır. Antioksidan vitaminlerin YBMD patogeneziindeki önemi gün geçtikçe artmaktadır. Vitamin C, E, karotenoidler gibi antioksidanların, retinanın yapısında ve retinanın fizyolojisinde yer alması YBMD ile ilişkisini düşündürmektedir. Antioksidanlar, retinanın oksidatif hasarını önleyerek YBMD gelişimini engellerler. Retinada fotoreseptör hasarı, foto-oksidasyon veya lipid peroksidasyonu ile açığa çıkan serbest radikallerle oluşabilir. Bunun sonucunda okside maddelerin sağlıklı dokularda birikmesi hücre ölümüne, RPE fonksiyon bozukluğuna ve sonuçta makulayı tutan dejenerasyona yol açar. Antioksidanlar, bu zararlı maddelerin oluşumunu engeller, azaltır veya kompanse ederler. Retinanın oksidatif strese karşı oluşan savunma sistemleri, endojen antioksidan enzimler ve diyet kaynaklı olan non-enzimatik ekzojen antioksidanlardan (karotenoidler, vitaminler ve eser mineraller) oluşur.^{112,133} Endojen antioksidan enzimler glutatyon peroksidaz (GPx), superoksid dismutaz (SOD) ve katalazdır. Diyetle alınması gereken ekzojen kaynaklı antioksidanlar ise vitamin C (askorbik asit), vitamin D ve vitamin E (alfa tokoferol) vitaminleri; selenyum (Se), çinko (Zn), bakır (Cu) ve magnezyum (Mg) eser mineralleri ile alfa (α) karoten, beta (β) karoten, kriptoksantin, lutein ve zeaksantin karotenoidleridir.

Lutein ve zeaksantin (L-Z), makula pigment epiteli yapısında yüksek miktarda bulunur, makulaya sarı rengini verir, UV ve kısa dalga boylu mavi ışığı (430-490 nm) absorbe ederek foto-oksidatif hasarı engeller, antioksidan özelliği ile oksijen radikallerini baskılar ve lipofuskin oluşumunu azaltır. Günde 10 mg luteinin diğer antioksidan ve minerallerle birlikte kullanımı, YBMD’de makula pigment yoğunluğunu, kontrast duyarlılığı ve görme keskinliğini (GK) artırdığı bildirilmiştir.¹³⁴ Memelilerde bu karotenoidler sentez edilemezler, beslenme ile alınmalıdır. Yaş ilerledikçe serumdaki L-Z miktarı da azaldığından, diyetle antioksidanların yer alması daha da önem kazanmaktadır. Kuru Tip YBMD’de değiştirilebilir-önlenebilir risk faktörleri dikkate alınarak koruyucu önlemlerin alınması ve özellikle erken hastalık evrelerinde serbest radikalleri nötralize eden antioksidan tedaviler konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Plasebo kontrollü, çift kör, randomize olarak düzenlenen “Lutein Antioxidant Supplementation Trial- LAST” çalışmasında atrofik YBMD’si olan 90 hastada bir gruba 10mg/gün lutein, diğer gruba 10 mg/gün lutein ve antioksidan vitamin/mineral desteği verilmiş; 12 ay takip sonunda lutein grubunda %36, lutein+antioksidan verilen grupta %43 oranında makula pigmenti optik yoğunluğu (MPOY) artarken, plasebo grubunda MPOY azalmıştır. Ayrıca lutein verilen grupta 5.4 harf, lutein+antioksidan verilen grupta 3.5 harf görme artışı saptanırken, plasebo grubunda görme azalmıştır. İlaç verilen her iki grupta da kontrast duyarlık 12 ay sonunda artış göstermiş, plasebo grubunda ise azalma tespit edilmiştir.¹³⁴

Benzer şekilde Waterford çalışmasında da MPOY ölçülmüştür. Araştırmada MPOY’un yaş, sigara, kadın cinsiyeti ve ailede YBMD varlığı ile azaldığı; tüm YBMD hastalarında azalmış olarak tespit edilen MPOY’un, besinlerle lutein alımı sonucunda arttığı saptanmıştır.¹³⁵ YBMD’de Lutein/Zeaksantin (L-Z) alımı ile ilgili çok merkezli, plasebo kontrollü, çift kör AREDS (Age Related Eye Disease Study)- Yaşa Bağlı Göz Hastalığı çalışması yapılmış ve sonuçları 22 numaralı rapor olarak yayınlanmıştır.¹³⁰ Raporla beslenmeye daha fazla L-Z alanlarda ileri evre YBMD, büyük ve yaygın drusen riskinin azaldığı bildirilmiştir. Günde 4 mg yüksek doz L-Z beslenmeye ilave edilirse, kontrol grubuna göre, jeografik atrofi riskinde %55, yaş tip YBMD riskinde %35 ve drusen riskinde %27 azalma olduğu tespit edilmiştir. AREDS 22 numaralı raporunda YBMD riskini azaltmak için sağlıklı kişilerin günde 6 mg L-Z almasını, YBMD hastalarında ise bu dozun 12 mg’a kadar yükseltilebileceğini önermiştir.¹³⁰ Benzer şekilde BMES(Blue

Mountains Eye Study) çalışmasında diyetle alınan L-Z'nin, yaş tip YBMD riskini, yumuşak ve retiküler drusen sıklığını azalttığını göstermiştir.¹³⁶

Lutein ve zeaksantin (L-Z) desteğini takiben MPOY ve serum karotenoid konsantrasyonlarındaki değişikliklerin incelendiği LUNA (Lutein Nutrition Effects Measured by Autofluorescence) çalışmasında 6 ay boyunca 2 mg L ve 1 mg Z, 120 mg vitamin C, 17.6 mg vitamin E, 10 mg çinko, 40 µ g selenyum verilmiş ve serum L-Z düzeyleri ve MPOY ölçümü yapılmıştır. Çalışma sonunda serum L-Z düzeylerinin anlamlı arttığı, L-Z kullananların %96'sında 6 ay kullanımdan sonra MPOY'nun arttığı ve 6 ay kullanımdan sonra ilaç kesildiğinde, 3. ayın sonunda MPOY'nin tekrar azaldığı tespit edilmiştir.¹³⁷

YBMD riski ile karotenoid alımı ilişkisini inceleyen EDCC (The Eye Disease Case-Control Study) de 391 yaş tip YBMD olgusuna günde 6 mg Lutein/Zeaksantin verilmiş, 577 kontrol grubu ile birlikte tüm hastalarda serum karotenoid ve vitamin düzeyleri incelenmiştir. Karotenoid serum düzeyleri yüksek olanlarda, düşük olanlara göre YBMD riskinde %43 azalma ve benzer şekilde lutein serum düzeyleri yüksek olanlarda, düşük olanlara göre YBMD riskinde anlamlı azalma saptanmıştır.¹⁰ Beta karoten diğer vitaminlerle birlikte kullanıldığında YBMD riskini azaltmakta, yüksek miktarda β karoten alınması ise YBMD riskini artırmaktadır. Ancak β karoten ve vitamin A alınması, özellikle sigara içenlerde akciğer kanseri riskini ciddi olarak artırmaktadır; bu nedenle kullanımı sigara içenlerde önerilmemektedir.^{136,138}

C vitamini hidrofilik ortamda antioksidan serbest radikalleri nötralize eder, hücre membranını stabilize eder ve enzimlerin ko-faktörüdür, okside E vitamininin yenilenmesini sağlar. E vitamini de serbest radikalleri bağlar, hücre membranını stabilize eder, yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı koruma sağlar, dolaşımı güçlendirir. Ancak VECAT çalışmasında vitamin E kullanımının YBMD gelişimi üzerine etkisi olmadığı rapor edilmiştir.¹³⁹ Benzer şekilde E vitaminin günlük 400 IU üzerinde alımının kardiyovasküler hastalığı olan bireylerde mortaliteyi arttırdığı gösterilmiştir.¹⁴⁰ D vitamini antianjiojenik ve antiinflamatuvar etkilidir. Parekh ve ark.¹³¹ yaptığı çalışmada serum D vitamini yüksek olan kişilerde erken YBMD riskinin azaldığı tespit edilmiştir.

Omega 3 (alfa linoleik asit, EPA ve DHA) doymuş yağ asitlerinden fakir esansiyel yağ asitidir; damar koruyucu ve nöronların temel yapı taşı olup, yağda eriyen vitaminler için gereklidir. Glutasyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz doğrudan serbest radikallere etkilidirler. Selenyum glutasyon peroksidaz'ın ko-faktörüdür. Diğer nonenzimatik antioksidanlar çinko, selenyum, bakır, magnezyum gibi eser elementler de retinanın antioksidasyon fonksiyonlarında yer alırlar. Çinko, bakır ile birlikte enzimatik antioksidanların temel taşı olup, RPE'de süperoksit dismutaz (SOD), katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivasyonu için ko-faktördür.¹³⁵ 200 kadar enzimi aktive eder; rodopsinin rejenerasyonu ve stabilizasyonunda, retinolün retinaya taşınmasının ve fotoreseptörlerden sinaptik iletinin kolaylaştırılmasında, serbest radikallerin bağlanmasında çinko gereklidir, aynı zamanda antiinflamatuvar etkilidir. BMES çalışmasında 15.8 mg/gün ve üzeri çinko alımının erken ve geç YBMD sıklığını azalttığı, AREDS çalışmasında antioksidan vitamin ile birlikte 80 mg/gün çinko oksit alımının ileri evre YBMD riskini azalttığı gösterilmiştir.^{130,134-136} AREDS'in 8 no'lu raporunda belirtilen günlük dozlardaki destek maddelerinin, ileri YBMD riskini %25, üç ve daha fazla sıra görme kaybı riskini %19 oranında azalttığı bildirilmiştir. Araştırmada günlük 500 mg Vit-C, 400 IU Vit-E, 80 mg çinko oksit, 2 mg bakır oksit ve 15 mg β-karoten kullanılmıştır. Raporda bir gözde erken ve orta evre YBMD olan hastalarda, belirtilen antioksidanların kullanımı ile, diğer gözde ileri evre YBMD gelişme riskinin anlamlı derecede azaldığı, erken evredeki olgularda ise anlamlı sonuçların elde edilmediği belirtilmiştir.¹²⁹ Ancak iki geniş kapsamlı çalışma olan Nurses' Health Survey ve The Health Professionals Follow-up Study, çinko alımının YBMD riskini azaltmadığını göstermişlerdir.¹¹²

Yüksek doz mikro-besinlerin yaşa bağlı göz hastalıkları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla planlanan AREDS-1 araştırmasında oksidatif stresin azaltılması veya önlenmesi için antioksidan vitamin ve mineralleri içeren ilaçların kullanımının sonuçları randomize, plasebo kontrollü klinik çalışma ile incelenmiştir.¹²⁹ Takip süresi ortalama 6.3 yıl olan 1992 yılında başlatılıp, 2001 yılında sonlandırılan 11 merkezli AREDS-1 çalışmasında 55-80 yaşlarında 3640 orta evre YBMD hastası ve 1117 kontrol grubu en az 5 yıl süreyle takip edilmişlerdir. Tedavi grubu hastalarına her gün 500 mg vitamin C, 400 IU vitamin E, 15 mg β karoten, 80 mg çinko ve 2 mg bakır verilmiş ve plasebo grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta ileri evre YBMD'ye geçiş riskinin, plasebo ile karşılaştırıldığında sadece çinko kullananlarda %21, sadece antioksidan (vitamin C ve E) vitamin kullananlarda %17 ve

antioksidan+çinko kullananlarda %25 oranında azaldığı rapor edilmiştir.^{129,134} Araştırmacılar orta ve ileri evre YBMD hastalarında 5 yılda 15 harf görme keskinliği kaybı riskinin sadece çinko kullananlarda %11, sadece antioksidan kullananlarda %10, antioksidan ve çinko birlikte kullananlarda %19 oranında azaldığını tespit etmişlerdir. Beta karotenin sigara kullananlarda akciğer kanseri gelişme riskini artırması, çinkonun gastrointestinal sistemde yan etkilere yol açması AREDS-1'de belirtilen formülasyonda değişiklik yapılmasını gündeme getirmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda L-Z, DHA gibi başka besinlerin de koruyucu rollerinin bildirilmesi yeni formülasyon düzenleme gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Bunun sonucunda 2006 yılında başlayan National Eye Institute (NEI) tarafından desteklenen ve yüksek doz lutein, zeaksantin, omega-3 uzun zincirli doymamış yağ asitleri takviyesinin yaş tip YBMD oluşumuna etkisini incelemeyi amaçlayan AREDS-2 çalışması başlatılmıştır. Bu plasebo kontrollü, randomize, çift kör çalışmada günlük antioksidan dozları çinko 40 mg şeklinde azaltılmış, beta karoten tamamen çıkarılmış ve omega-3 uzun zincirli yağ asitleri (DHA ve EPA) 1000 mg, lutein 10 mg ve zeaksantin 2 mg dozda ilave edilmiştir.^{134,136,141} AREDS-2 çalışması, AREDS-1 çalışmasındaki orijinal formüle lutein, zeaksantin ve omega 3 eklenmesinin herhangi bir yararının olmadığını göstermiştir. Bu çalışma aynı zamanda düşük ya da yüksek doz çinko takviyesinin etkinliğini de araştırmıştır ve her iki doz arasında bir fark bulunamamıştır. Lutein ve zeaksantin içeren AREDS formülünü kullanan hastalarla beta-karoten içeren AREDS formülünü kullanan hastalar karşılaştırılmış ve lutein ve zeaksantin içeren formülü kullanan hastalarda ileri YBMD geliştirme riskinde %18 azalma görülmüştür. Bu çalışma ayrıca göstermiştir ki beta karoten içeren AREDS formülünü kullanan ve sigara içen hastalarda artmış akciğer kanseri riski vardır.^{129,142} Lutein (L) ve Zeaksantin (Z) makulaya rengini veren pigmentlerdir. L bitki pigmenti, Z lutein izomeri karotenoidlerdir. Bunlar da Omega 3 gibi vücutta sentezlenmezler, besinlerle alınırlar. Yaşlı bireylerde yapılan bir çalışmada 5 hafta boyunca günde bir yumurta tüketimi ile, serumda L ve Z düzeyi %26-38 yükselmiş; buna karşılık serum lipid ve kolesterol düzeyleri değişmemiştir.¹⁴³

Sonuç olarak kuru tip YBMD için halen etkinliği kanıtlanmış bir tedavi bulunmamaktadır. YBMD'nin önlenmesi ve ilerlemesinin yavaşlatılması için risk faktörleri de göz önüne bulundurularak sağlıklı bir yaşam biçimi sürdürmek, özellikle 55 yaşın üzerindeki sağlıklı bireylere sigarasız yaşam, düzenli egzersiz, kilo, tansiyon ve kolesterol kontrolü, yağı ve şekeri azaltıp, koyu yeşil yapraklı sebzeler, ceviz ve meyve

yanı sıra haftada 1-2 kez balık tüketmeleri önerilmelidir. Ancak erken evre YBMD saptandığında 10 mg/gün lutein ve 500-1000 mg/gün omega 3 alımı uygun görülürken, bir gözde ileri evre YBMD varlığında AREDS çalışmalarında belirlenen yoğun antioksidan desteği gündeme gelebilir.¹⁴⁴ Antioksidan, vitamin ve mineral desteği en azından diğer gözü korumak için yararlı olmasına rağmen destek tedavisinin de yan etkileri olduğu unutulmamalıdır. Beta karoten alan ve sigara içenlerde akciğer Ca riski olduğu, yüksek dozda E vitamininin kardiyovasküler hastalıklar ve ölüme yol açabileceği, çinko ile alzheimer ve prostat hiperplazisi riskinin, omega 3 ile kanama riskinin olduğu, 100 µgr üzerinde selenyumun toksik etki yapacağı hatırlanmalıdır.

2.3.5.2 Neovasküler (Yaş Tip) YBMD Tedavisi

Lazer Fotokoagülasyon

Fotodinamik Tedavi

Transpupiller Termoterapi (TTT)

Radyasyon Tedavisi

Cerrahi Tedaviler

Antianjiyojenik Tedavi

2.4 Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, dünyada körlüğün önde gelen nedenlerindedir ve yine de patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. ROS oluşumunun neden olduğu hücre hasarı ifade eden oksidatif stres, özellikle yaşla ilgili bozukluklar olmak üzere birçok hastalık sürecinde rol oynamaktadır. ROS'lar arasında serbest radikaller, hidrojen peroksit ve tekli oksijen bulunur ve bunlar genellikle oksijen metabolizmasının yan ürünleridir. Retina, yüksek oksijen tüketimi, yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri ve ışığa maruz kalması nedeniyle oksidatif strese özellikle duyarlıdır.

"Oksidatif stres" terimi, hücrenin antioksidan savunma sistemi ile hücre içinde her zaman bir dereceye kadar mevcut olan ROS arasındaki dengesizliği ifade eder. Oksidatif stres birçok uyarıcı ve koşul tarafından indüklenebilir. Hücre tipine, ortama ve yaşa bağlı

olarak, endojen olarak üretilen ROS'dan kaynaklanabilir veya sigara dumanı, çevre kirliliği veya radyasyon gibi dış kaynaklı olabilir.^{145,146} Çoğu durumda, oksidatif olarak hasar görmüş hücrel bileşenler onarılır veya otofajiye uğrar ve yeni sentezlenen bileşenlerle değiştirilir. Bununla birlikte, yaş ilerledikçe, bu denge skalasının pro-oksidatif tarafına doğru kayar. Postmitotik hücrelerde, bu büyük ölçüde otofajik klerensin azalmasına ve lipofuskin dahil hücrel atıkların birikmesine bağlıdır, bu da daha sonra ROS üretimini daha da artırır.¹⁴⁷ Sınırlı miktarda oksidatif stres sıklıkla hücre replikasyonunu uyarırken, biraz daha fazlası DNA hasarı, büyüme durması ve onarıcı otofajiye neden olacaktır. Son olarak, aşağıda daha ayrıntılı olarak tartışılacağı gibi, orta veya ileri oksidatif stres, lizozomların içeriklerinin sitozole salınması sonucu apoptoz veya nekroz ile sonuçlanmaktadır.¹⁴⁸

2.4.1 Oksidatif Süreçler

Kimyasal olarak, oksidasyon elektronların uzaklaştırılmasını ve indirgeme elektronların kazanımını ifade eder. Diyetteki karbonhidratlardan, proteinlerden ve lipidlerden CO₂ ve H₂O'ya oksitleyerek enerji sağlanır. Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü olarak bilinen bir dizi reaksiyon, yakıtların oksidasyonunun çoğundan sorumludur ve elde edilen enerji, indirgenmiş elektron kabul eden koenzimler, NADH ve FAD (H₂) şeklinde korunur. Bu koenzimlerin elektronları, oksijeni (O₂) elektron taşıma zincirinde H₂O'ya dönüştürmek için kullanılabilir ve bu reaksiyon, oksidatif fosforilasyon olarak bilinen bir işlemde adenosin difosfat ve Pi'nin adenosin trifosfata (ATP) dönüştürülmesi ile enerji açığa çıkarır.¹⁴⁹ Oksidatif fosforilasyon mitokondride meydana gelir ve ATP sentaz ile katalize edilir. Elektron taşıma zinciri toplam O₂ tüketimimizin yaklaşık% 90'ını oluşturur, geri kalanı oksidaz veya oksijenaz içeren reaksiyonlar tarafından kullanılır.¹⁵⁰

2.4.2 Reaktif Oksijen Ara Maddeleri

Reaktif oksijen türleri (ROS), iki ortak özelliğe sahip, nispeten kararsız moleküllerden oluşan farklı bir grup oluşturur. Oksijenden (O₂) türetilirler ve güçlü oksitleyici özellikleri nedeniyle diğer moleküllerle etkileşime çok eğilimlidirler. ROS, serbest radikalleri, hidrojen peroksit veya tekli oksijeni tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren moleküllerdir ve örnekler arasında süperoksit anyonu (O₂⁻ •), hidroksil serbest radikali (OH •), hidroperoksit radikalleri (HO₂ •) ve lipid peroksit radikalleri bulunur.^{151,152}

ROS genellikle iki grupta sınıflandırılır; radikal olmayan ve radikal türler (“serbest radikaller” olarak da bilinir). Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektronun varlığı ile karakterizedir. Bu eşleşmemiş elektronlar nedeniyle radikal olmayan ROS’dan çok daha reaktiftirler ve genellikle çok kısa yarı ömürleri vardır.¹⁵³ Bir elektronu bağışlayabilir ya da diğer moleküllerden bir elektron kabul edebilir, bu nedenle oksidanlar veya indirgeyiciler gibi davranırlar. Bu moleküller çekirdekte DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler gibi biyolojik olarak ilgili moleküllere zarar veren, hücre zarında bulunan oldukça reaktif türlerdir. Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır.¹⁵⁴ Serbest radikallerin hedefleri vücuttaki her türlü molekülü içerir. Bunlar arasında lipidler, nükleik asitler ve proteinler ana hedeflerdir.

Serbest radikaller, insan vücudundaki normal temel metabolik işlemlerden kaynaklanabilir. ROS üretimini arttırdığı bilinen uyarılar arasında radyasyon, yaşlanma, iltihaplanma, yükseltilmiş kısmi O₂ basıncı, hava kirlenmeleri (O₃,NO₂), sigara dumanı ve reperfüzyon hasarı vardır.^{155,156}

Serbest radikal oluşumu, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların bir sonucu olarak hücrelerde sürekli olarak meydana gelir. Serbest radikallerin kaynağı olarak görev yapan enzimatik reaksiyonlar, solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde yer alır. Serbest radikaller ayrıca oksijenin organik bileşiklerle reaksiyonu veya iyonlaştırıcı reaksiyonlarla da oluşabilir.¹⁵⁷

Serbest Radikal Kaynakları

- İç Kaynaklar
- Dış kaynaklar
- Fizyolojik faktörler

İç Kaynaklar

Bunlar serbest radikallerin kaynağı olarak görev yapan enzimatik reaksiyonlardır. Solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P450 sisteminde yer alan reaksiyonları içerir. Serbest radikallerin bazı iç üretim kaynakları, mitokondri,

ksantin oksidaz, fagositler, demir ve diğer geçiş metalleri içeren reaksiyonlar, peroksizomlar, araşidonik asit yolları, egzersiz, iskei/reperfüzyon ve inflamasyondur.

Dış kaynaklar

Bunlar oksijenin organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonlarını içerir. Serbest radikaller, iyonlaştırıcı radyasyonlarla başlatılan reaksiyonlarda da ortaya çıkar. Bazı serbest radikal kaynakları sigara dumanı, çevresel kirletici maddeler, radyasyonlar, ultraviyole ışık, ozon, bazı ilaçlar, böcek ilaçları, anestezipler ve endüstriyel çözücülerdir.

Fizyolojik Faktörler

Stres, ruhsal durum ve hastalık koşulları da serbest radikallerin oluşumundan sorumludur.

2.4.3 Reaktif Oksijen Ara Maddeleri ve Hücre Hasarı

Karbonhidratlar, membran lipidleri, proteinler ve nükleik asitlerin hepsi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasara karşı savunmasızdır ve bu hasarın birçok hastalığın patogenezine katkıda bulunduğuna inanılmaktadır.^{152,158}

Yağlar

Serbest radikal oto-oksidasyonu olarak bilinen lipid serbest radikallerinin ve lipid peroksitlerin oluşumu, normal olarak organik moleküllerin oksidasyonunu geciktiren, spin kısıtlamasının kinetik bariyerlerine tabi değildir. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) serbest radikal hasarına özellikle duyarlıdır, çünkü konjuge çift bağları bir elektron içeren uygun hidrojen atomu kaynaklarıdır. Lipid radikali daha sonra oksijenle birleşerek lipid peroksit radikallerini ve lipid peroksitleri oluşturmak için sadece diğer çoklu doymamış yağ asitlerinden elektronlar çalarak ve böylece değerli PUFA'ları tüketen ve hasarlı moleküller üreten bir sitotoksik reaksiyon dizisi oluşturarak kararlı bir duruma ulaşabilir. Sonunda lipidin bozulması, kan ve idrarda bulunan ve serbest radikal hasarının bir belirteci olarak kullanılabilen malondialdehit gibi ürünler oluşturarak meydana gelir.

Protein

Proteinlerin parçalanması, çapraz bağlanması ve proteolize karşı varolan güvenlik açığı, amino asitlerinin oksidasyonuna neden olur.

Nükleik Asitler

ROS ile etkileşimlerden kaynaklanan DNA'nın oksitlenmiş bazıları yaşlanma ve yaşa bağlı bozukluklara önemli ölçüde neden olur.¹⁵⁹

2.4.4 Oksidatif Strese Karşı Savunma Mekanizmaları

Oksijen toksisitesinin etkilerine karşı korunmak için kullanılan mekanizmalar arasında hücrel bölümlendirme, onarım, ROS 'un enzimatik olarak uzaklaştırılması ve serbest radikallerin vitaminler ve diğer bileşikler tarafından atılması yer almaktadır.¹⁶⁰

-Bölümlendirme, ROS'un oksidatif hasara duyarlı hücrel bileşenlerden ayrılmasını ifade eder. Örneğin, H₂O₂ oluşumunda rol oynayan enzimler, yüksek miktarda antioksidan enzim içeriğine sahip olan ve aynı organel içindeki diğer oksidatif reaksiyonlar için H₂O₂ kullanan peroksizomlarda bulunur.

-DNA onarımı, sarmalın bozuk bölgesinin bir DNA polimerazın etkisiyle değiştirilmesini ve ardından bir ligazın etkisiyle kopmanın kapatılmasını içerir. Tek bir bazın zarar görmesi DNA glikozilazlar kullanılarak onarılır. Proteinlerin oksitlenmiş amino asitleri, proteinin parçalanması veya yeniden sentezi ile onarılır ve oksitlenmiş yağ asitlerini membran lipidlerinden çıkarmak için de mekanizmalar mevcuttur.

-Antioksidan aktiviteye sahip birkaç enzim vardır ve bunlar arasında süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz bulunur.

-C, E vitaminleri ve bazı karotenoidler, ROS ile doğrudan ve enzimatik olmayan bir şekilde reaksiyona girerek zararsız ürünler sentezlenir ve böylece serbest radikal zincir reaksiyonunu sonlandırır.

-Retinal antioksidan savunma sistemine dahil olan diğer maddeler arasında metallotionein, melanin ve glutatyon bulunur.

2.4.5 Retinada Reaktif Oksijen Ara Ürünlerinin Üretimi

İn vivo olarak ROS'lar, hücrel metabolizmanın yan ürünleri olarak veya fotokimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak ortaya çıkabilir.¹⁶¹ Retinada, çeşitli nedenlerden dolayı reaktif oksijen türlerinin üretimi olmaktadır. İlk olarak, retina tarafından oksijen tüketimi diğer dokulardan çok daha fazladır.¹⁶² İkincisi, retina yüksek düzeyde kümülatif ışınlamaya

tabidir. Üçüncüsü, fotoreseptör dış segment membranları, kolaylıkla oksitlenebilen ve sitotoksik bir zincir reaksiyonu başlatabilen çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir.¹⁶³ Dördüncüsü, nörosensöriyal retina ve retina pigment epiteli (RPE) bol miktarda ışığa duyarlılaştırıcı içerir.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Son olarak, RPE tarafından fagositoz sürecinin kendisi oksidatif bir streştir ve ROS oluşumuyla sonuçlanır.¹⁶⁷

RETİNAL FOTOKİMYASAL HASAR

Fotokimyasal retina hasarı ilk kez 1000 saniye boyunca mavi ışığa (441 nm) maruz kalan 20 Rhesus maymunun retinasının histopatolojik bulguları ile Ham ve ark.¹⁶⁸ tarafından bildirilmiştir. Kısa dalga boylu ışığın fotoreseptör dış segmentlerine, hücresel çoğalmaya ve RPE ile koroiddeki mitotik aktiviteye hasar verdiği ve RPE'nin hipopigmentasyonuna neden olduğu kaydedilmiştir.¹⁶⁸ Retinanın ışık hasarına duyarlılığı, daha sonra sekiz farklı monokromatik dalga boyu kullanarak Rhesus maymunlarında retina hasarına neden olan aynı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Fotik hasara oluşturmak için gereken gücün, maruz kalma süresine (1 ila 1000 saniye) bağlı olarak, kızılötesi dalga boylarına (1064 nm) göre mavi ışık (441.6 nm) için 70 ila 1000 kat daha düşük olduğu bulunmuştur.¹⁶⁹

Kısacası, ışığa maruz kalmanın ana etkisi, fotoreseptörlerin seçici dejenerasyonu, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asidinin azalması ve lipid konjuge dienlerin seviyesindeki artışı.¹⁷⁰ Wu ve ark.¹⁷¹ mavi ışığa bağlı hücre ölümü mekanizmasının apoptoz olduğunu doğruladılar. Organisciak ve ark.⁹⁶ ise retinal ışık hasarının antioksidatif stres proteini hem oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyonunu indüklediğini göstermişlerdir.

POLİANSATÜRE (ÇOKLU DOYMAMIŞ) YAĞ ASİTLERİ

Hem rodların hem de konilerin fotoreseptör membranları, stabil bir matriks sağlayan lipid çift tabakası içerir. İyonlara pasif olarak geçirgen ve rodopsin gibi integral membran proteinlerinin stabilizasyonunu sağlayan bir membrandır. Çoklu doymamış yağ asitleri, rod dış segment membranlarının yaklaşık %50'sini oluşturur ve proteinler ise kalan %50'yi oluşturur. Doğada en çok bulunan çoklu doymamış yağ asidi olan dokosaheksaenoik asit (DHA)(22: 6v-3), kon fotoreseptör fosfolipidlerinin yaklaşık %50'sini oluşturur.¹⁷² Dokosaheksaenoik asit ve öncüsü, esansiyel yağ asidi olan alfa-linoleik asit, tamamen diyet menşelidir. DHA altı çift bağ içerdiğinden ve doymamış yağ asitlerinin oksidasyona

yatkınlığı doğrudan çift bağ sayısı ile ilişkili olduğundan, retina doğal olarak lipid peroksidasyonuna duyarlıdır.¹⁷³ Membran PUFA'larının lipid peroksidasyonu, membran fonksiyonunda kayıp ve yapısal bütünlük ile sonuçlanır. Peroksidasyon işleminin ilk adımı, HO veya tekli oksijen gibi güçlü bir serbest radikallerin, hücre zar veya fagosite edilmiş fotoreseptörler gibi PUFA içeren bir yapıya yakın olarak üretildiğinde meydana gelir. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle, radikal PUFA'dan hemen bir hidrojen atomunu çıkarır, bu da su ve bir peroksit radikalinin oluşumuna yol açar. Bir radikal ile radikal olmayan bir madde arasındaki reaksiyon her zaman başka bir radikalın oluşumuna yol açtığından, bu işlemi önlemenin tek yolu radikalın bir anti-oksidan temizleyici (örneğin E vitamini) tarafından tuzağa düşürülmesi veya radikal olmayan bir tür üretmektir.¹⁷⁴ Bu reaksiyon hızlı bir şekilde sonlandırılmazsa, tehdit altındaki membranlar, iyonlar, proteinler ve diğer kapalı bileşenlerin hücre dışına sızmasıyla onarılamaz şekilde hasar görür. Lipid peroksidasyonunun membrana zarar veren doğrudan etkilerinin yanı sıra, son ürünleri (malonaldehit gibi) de lipofuskin üretimi için bazı yapı taşlarını oluşturur.¹⁷⁵

İnsan retinasının lipid peroksidasyonuna yatkınlığı bölgeye ve yaşa bağlıdır. De La Paz ve Anderson, 15 insan kadavra gözünde maküler ve periferik retinanın in vitro lipid peroksidasyonunu karşılaştırdı. Posterior kutup retinasının lipid peroksidasyonuna duyarlılığının yaş ile pozitif ilişkili olduğu, ancak periferik retina için böyle bir ilişki olmadığı kaydedildi.¹⁷⁶ Ayrıca, insan makula bölgesinde periferik retina ile karşılaştırıldığında daha düşük DHA seviyeleri bildirilmiştir, bu da makülanın periferik dokudan daha büyük bir oksidatif stresle karşılaştığını gösterir.¹⁷⁷ Bu nedenle, makulada yani en çok ihtiyaç duyulduğu yerde bir antioksidan savunma sunma yeteneğinin artan yaşla birlikte azaldığı görülmektedir. Fotoreseptör dış segment membranlarının lipid peroksidasyonuna duyarlılığı, diyet modifikasyonu ile değiştirilebilir. Bush ve ark.¹⁷⁸ siklik (12 saat/12 saat) aydınlık/karanlık bir ortamda yetiştirilen ve DHA ve a-linoleik asitten eksik bir diyetle beslenen erkek sıçanlarda yaptıkları çalışmada, retina DHA düzeyleri kısıtlı diyetleri olan hayvanlarda kontrol grubuna göre %65-75 daha düşük olarak rapor edilmiştir ve DHA eksikliği olan sıçanlar, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha az fotoreseptör dış segment membran bozulması, ışığa bağlı disk dökülmesi ve rodopsin kaybı sergilemiştir. Başka bir çalışmada, Organisciak ve ark.¹⁷⁹ linoleik asitten yoksun diyetle beslenen sıçanlarda retinal ışık hasarına karşı koruduğunu doğrulamıştır.

RETİNAL KROMOFORLAR

Kromoforlar veya ışığa duyarlılaştırıcılar, kimyasal bir reaksiyon oluşturmak için ışığı emen moleküllerdir. Fotokimyasal hasar, UV'nin ve görünür ışığın bir kromofor tarafından emilmesinden kaynaklanan ve substratın uyarılmış duruma elektrolit geçişine yol açan yaralanma olarak tanımlanabilir.¹⁸⁰ Retina kromoforları arasında rodopsin, melanin, lipofuskin ve sitokrom c oksidaz gibi mitokondriyal solunum enzimleri bulunur.

Rodopsin

Sıçanlardaki ışığa bağlı fotoreseptör hücre dejenerasyonunun rodopsin aracılı olduğu ve yaralanma şiddetinin maruziyet öncesi rodopsin içeriği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.¹⁸¹⁻¹⁸³ Rodopsin aracılı ışık hasarının oksidatif doğası, artmış retinal antioksidan savunmanın görünür ışığa maruz kaldıktan sonra rodopsin miktarını artırabildiğini gösteren Organisciak ve ark.nın bulguları ile desteklenmektedir.^{184,185} Ayrıca, rodopsin kaybı ile ilişkili retinal fotik yaralanma, antioksidatif stres proteini hem oksijenazın ekspresyonunu indükler ve dimetiltiyöüre uygulanmasıyla iyileştirilebilir.⁹⁶

Lipofuskin

Lipofuskin, kısa dalga boyu ışığı ile uyarıldığında otofloresan, yağ asitlerinin oksidasyonu ile elde edilen aldehit köprüleri ile birbirine bağlanan protein kalıntılarında oluşan bir polimerdir. Nöronal ve nöronal olmayan, metabolik olarak aktif çeşitli post-mitotik hücrelerin lizozomları içinde oluşur. Yaşla biriktiği için, lipofuskin “yaş pigmenti” olarak adlandırılır ve hücre yaşlanmanın bir belirteci olarak kabul edilir. Ayrıca, varlığı yaşa bağlı çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Lipofuskin belirli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir, ancak kesin bileşimi kaynağına bağlı olarak değişir. Proteinlere, lipidlere ve karbonhidratlara ek olarak, bu sarımsı kahverengi, otofloresan bileşik ayrıca önemli miktarda metal, özellikle demir içerir.¹⁸⁶ RPE’de lipofuskin granülleri tipik olarak hücrenin bazal yarısında çekirdeğin etrafında konsantre edilir.

RPE hücre lipofuskinini nispeten eşit büyüklükteki granüllerin içinde bulunur¹⁸⁷ ve Wing ve ark. bu granüllerin artan yaşla birlikte aşamalı olarak biriktiğini ve konsantrasyonlarının arka kutupta zirve yaptığını kaydetmiştir.¹⁸⁸ Bununla birlikte, foveadaki RPE lipofuskin konsantrasyonunda fokal bir azalma sürekli olarak gösterilmiştir.^{46,188} Harcanan hücre içi

organellerin eksik otofajik degradasyonundan elde edilen çoğu dokudaki lipofuskinden farklı olarak, RPE lipofuskini ayrıca fagositoz edilmiş fotoreseptör dış segmentlerinden de türetilir.⁵⁹ Bu nedenle, RPE lipofuskininin hem benzersiz hem de heterojen olması muhtemeldir.

Bileşimi büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, bazı lipidler ve Schiff bazı reaksiyon ürünü N-retiniliden-N-retiniletanolamin (A2-E) tanımlanmıştır.¹⁸⁹ Histopatolojik çalışmalar yüksek seviyelerde lipofuskin ile RPE hücrelerinin ve fotoreseptörlerin dejenerasyonu arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir.¹⁹⁰ Bilindiği kadarıyla, lipofuskinin RPE hücrel aktivitesini bozabileceği üç olası mekanizma vardır.

Birincisi, fonksiyonel sitoplazmik boşluktaki azalma ve hücre içi lipofuskinin varlığından kaynaklanan hücrel mimarinin bozulmasıdır.^{191,192} İkincisi, lipofuskin gerçekte çevre dokuların oksidatif hasarını indükleyebilir, çünkü reaktif oksijen ara ürünlerinin üretimi için bir ışığa duyarlılaştırıcı görevi görür. Üçüncüsü, RPE lizozomal bozunma fonksiyonları N-retinilidin-N-retiniletanolamin tarafından inhibe edilir, böylece hücrenin hücre içi ve hücre dışı materyali sindirme kapasitesini sınırlar.

Bu oksidatif olarak modifiye edilmiş lipofuskin bileşikleri lizozomal enzimlerin ayrışma etkilerine karşı dirençlidir ve bu nedenle zamanla, özellikle bölünmeyen hücrelerde birikecektir.¹⁹³ RPE hücrelerinde lipofuskin birikimi YBMD gelişimi ile açıkça ilişkili olsa da, bu korelasyonun arkasındaki kesin mekanizmalar ayrıntılı olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, lipofuskin birikiminin RPE hücrelerinin hem hetero hem de otofagositik aktivitesini engellediği, dolayısıyla fagosite fotoreseptör dış segmentinin, hücre içi makromoleküllerin ve organellerin degradasyon kapasitelerini azalttığı gösterilmiştir. Bu, protein yanlış katlanması ve mitokondriyal solunumun inhibisyonu gibi diğer lipofuskin aracılı etkilerle birlikte RPE hücre hasarının artmasına neden olacaktır.^{81,175,194-196} Ayrıca, lipofuskin hücreleri foto-oksidasyona duyarlı hale getirir ve lizozomları, lizozomal parçalayıcı enzimlerin sitozole salınması nedeniyle oluşan hücre ölümüyle birlikte oksidatif hasara daha duyarlı hale getirir.^{197,198} Lipofuskin, HO oluşumunu katalizleyen demir açısından zengin olduğu için lipofuskin yüklü lizozomlar oksidatif strese karşı özellikle savunmasız olabilir. RPE hücreleri, günlük olarak herhangi bir başka postmitotik hücre türünde benzeri olmayan bir fagositik görevi yerine getirirken, yoğun ışığa maruziyet, çok yüksek oksijen gerilimi, yüksek metabolik aktivite ve artan hücre içi demir

miktarlarına ömür boyu maruz kalmaktadır. Bunu göz önünde bulundurarak, bu tek hücre tabakasının bir şekilde genellikle yaşamın sonlarına kadar önemli lipofuskin birikiminden kaçınmayı başarması dikkat çekicidir.

Melanin

Çelişki oluşturacak şekilde hem fototoksiteden koruyucu hem de fototoksik fonksiyonlar oküler melanine atfedilmiştir.¹⁹⁹ Bununla birlikte, tipik in vivo koşullar altında, melanin aracılı fotooksidasyonun nispeten önemsiz olduğuna dair genel bir fikir birliği vardır.¹⁶⁶¹⁹⁹²⁰⁰

Sitokrom C Oksidaz

Sitokrom c oksidaz, oksidatif fosforilasyonda rol oynayan önemli bir mitokondriyal enzimdir.²⁰¹ Bu enzimin absorbanı, redoks durumuna göre değişir ve indirgenmiş formunda 440 nm'lik bir pik emilimine sahiptir.^{202,203} Mavi ışığın neden olduğu retina hasarına mitokondriyal solunum enzimleri aracılık ettiği varsayılmıştır.^{200,204} Bu hipotez, mavi ışığa maruz kaldıktan sonra sitokrom c oksidaz içeriğinin RPE de gözlenen azalması ile desteklenmektedir.²⁰⁵

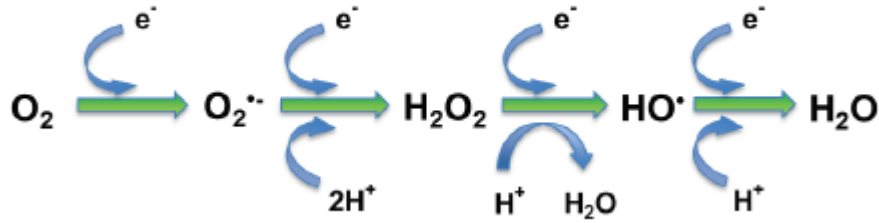
2.4.6 Serbest Radikal Çeşitleri

- Hidroksil Radikali (.OH)
- Süperoksit Radikali (O_2^-)
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- Üçlü Oksijen ($3O_2$)
- Aktif Oksijen

2.4.6.1 Süperoksit

Şekil 2'de gösterildiği gibi, O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesi, elektronlar her seferinde bir tane aktararak kademeli olarak gerçekleşir. İlk adımda, en bol bulunan hücre içi ROS olan, süperoksit anyonu (O_2^-) oluşur. Serbest radikal olarak sınıflandırılmasına rağmen, en güçlü olanı değildir ve bazı hassas enzimler dışında diğer makromoleküllere zarar vermek için yeterli reaktiviteye sahip değildir.²⁰⁶

$O_2^{\bullet-}$ formasyonunun ana kaynağı, mitokondride elektron taşıma zincirinden elektronların kazara kaçmasıdır. Mitokondride kullanılan oksijenin yaklaşık %1'inin süperoksit radikalleri şeklinde sızdığı tahmin edilmektedir. Ancak yaşlı bireylerde bu oran daha fazladır.²⁰⁷



Şekil 2: Mitokondriyal solunumda oksijenin kademeli olarak redüksiyonu, O_2 ye elektronlar teker teker kabul edilir ve sırası ile önce $O_2^{\bullet-}$, sonrasında H_2O_2 ve son olarak bir proton ve bir elektron eklenmesi ile hidroksil radikali (HO^{\bullet}) oluşur. En son basamakta ise H_2O oluşur.

2.4.6.2 Hidrojen Peroksit

Genellikle $O_2^{\bullet-}$, spontan olarak veya süperoksit dismutazın (SOD) enzimatik etkisi ile hızla hidrojen peroksit (H_2O_2) e dönüşür. H_2O_2 , zarlardan kolayca nüfuz eder ve hücrede bölümlere ayrılmaz. Çoğunlukla hızlı bir şekilde bozunur ve suya, özellikle katalaz ve peroksidazların enzimatik etkisiyle dönüşmesine rağmen, her zaman düşük, fizyolojik bir H_2O_2 seviyesi mevcuttur ve bu da sitozolik redoks aktivitenin düzenlenmesinde sinyal molekülü olarak önemli bir işlev görür.^{150,208} Bununla birlikte, antioksidan savunma sistemi ROS aktivitesine karşı koyamadığı zaman oksidatif stres koşulları altında H_2O_2 , bir hidroksil anyonu ve yüksek derecede reaktif bir hidroksil radikalinin (HO^{\bullet}) oluşmasına neden olacak şekilde ayrılır.

Bu ayrışma, Fenton tipi reaksiyonda redoks-aktif demir ile katalize edilir:



2.4.6.3 Hidroksil

HO^{\bullet} çok kısa yarılanma ömrüne sahiptir ve amino asitler, şekerler, yağ asitleri, DNA ve fosfolipidler gibi hücredeki her tür molekül için son derece tehlikelidir. ROS'ların en

reaktif olanıdır ve oluşumdan hemen sonra ve en yakın yapıya zarar verir. Bu nedenle, demir ve H₂O₂ hücre içinde aynı yerde bulunduğu, bu çevreleyen moleküller için büyük risk olabilir.¹⁴⁶ HO•'ya benzer şekilde, tekli oksijen de oldukça agresiftir ve hemen membranlar veya diğer hücresel bileşenlerle reaksiyona girmeye çalışır.

2.4.7 Antioksidanlar

Antioksidan özellikteki moleküller temel olarak serbest radikal temizleme özelliklerinden dolayı hücresel hasarı geciktirir veya inhibe eder.²⁰⁹ Bu düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilir ve vital moleküller zarar görmeden önce zincir reaksiyonunu sonlandırabilir. Glutasyon, ubikinol ve ürik asit dahil olmak üzere bu tür antioksidanların bazıları, vücuttaki normal metabolizma sırasında üretilir.²¹⁰ Diğer hafif antioksidanlar diyetle bulunur. Vücutta serbest radikalleri temizleyen birkaç enzim sistemi bulunmasına rağmen, temel mikro besin (vitaminler) antioksidanları E vitamini (α -tokoferol), C vitamini (askorbik asit) ve beta karotendir.²¹¹ Vücut bu mikro besinleri üretemez, bu nedenle diyetle alınmaları gerekir.

Enzimatik ve Peptid Yapılı Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar için iki temel etki mekanizması öne sürülmüştür.²¹² İlki, birincil antioksidanın vücutta mevcut serbest radikallere bir elektron verdiği zincirleme bir mekanizmadır. İkinci mekanizma, ROS/reaktif azot tür başlatıcılarının (ikincil antioksidanlar) zincir başlatıcı katalizörü söndürerek çıkarılmasını içerir. Antioksidanlar, biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini, elektron bağıışı, metal iyonu şelatı, yardımcı antioksidanlar veya gen ekspresyon düzenlemesi dahil olmak üzere farklı mekanizmalar ile uygulayabilir.²¹³

Birinci savunma hattı serbest radikal oluşumunu baskılayan koruyucu antioksidanlardır. Her ne kadar in vivo radikal oluşumunun kesin mekanizması henüz tam olarak açıklanmamasına rağmen, hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksitin metal kaynaklı parçalanmalarının önemli kaynaklardan biri olduğu düşünülmektedir. Bu tür reaksiyonları bastırmak için, bazı antioksidanlar, serbest radikallerin ve bazı proteinlerin metal iyonlarını serbest bırakmadan, hidroperoksitleri ve hidrojen peroksiti, sırasıyla alkollere ve suya indirgemektedir. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon-transferaz ve peroksidazin;

lipid hidroperoksitleri karşılık gelen alkollere parçaladığı bilinmektedir. GSH-Px, biyozarlara entegre edilmiş fosfolipidlerin hidroperoksitlerini azaltabilmesi bakımından benzersizdir. GSH-Px ve katalaz, hidrojen peroksidi suya indirger.

İkinci savunma hattı zincir başlangıcını bastırmak ve/veya zincir yayılma reaksiyonlarını kırmak için aktif radikalleri temizleyen antioksidanlardır. Çeşitli endojen kök temizleyici antioksidanlar bilinmektedir. Bazıları hidrofilik, bazıları ise lipofiliktir. C vitamini, ürik asit, bilirubin, albümin ve tiyoller hidrofilik radikal temizleyici antioksidanlardır. E vitamini ve ubikuinol lipofilik radikal temizleyici antioksidanlardır. E vitamini, en güçlü radikal temizleyici lipofilik antioksidan olarak kabul edilir.

Üçüncü savunma hattı tamir ve de novo antioksidanlarıdır. Sitolde ve memeli hücrelerinin mitokondrilerinde bulunan proteolitik enzimler, proteinazlar, proteazlar ve peptidazlar oksidatif olarak değiştirilmiş proteinleri tanır, bozar ve uzaklaştırır ve oksitlenmiş proteinlerin birikmesini önler. DNA tamir sistemleri ayrıca toplam savunma sisteminde oksidatif hasara karşı önemli bir rol oynamaktadır. Hasarlı DNA'yı onarabilen glikozilazlar ve nükleazlar gibi çeşitli enzimler bilinmektedir.

Serbest radikallerin üretimi ve reaksiyonları için sinyalin uygun antioksidanların oluşumunu ve doğru bölgeye taşınmasını sağladığı adaptasyon adı verilen başka bir önemli fonksiyon vardır.²¹⁴ Hücreler etkileşimli bir antioksidan enzim ağı ile oksidatif strese karşı korunur.²¹⁵ Burada, oksidatif fosforilasyon gibi işlemler tarafından salınan süperoksit önce hidrojen peroksite dönüştürülür ve daha sonra suya dönüşerek daha da azalır. Bu detoksifikasyon yolu, birden fazla enzimden oluşmaktadır. Süperoksit dismutazlar ilk basamağı katalize eder, sonra katalaz ve hidrojen peroksidi kaldıran çeşitli peroksidazlar ile detoksifikasyon devam eder.²¹⁶

2.4.7.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit anyonunun oksijen ve hidrojen peroksite parçalanmasını 1000 kat hızlandıran bir metaloenzimdir.²¹⁷ SOD enzimleri hemen hemen tüm aerobik hücrelerde ve hücre dışı sıvılarda bulunur.²¹⁸ Çoğu O₂^{•-} mitokondri içinde hücre solunumunun bir yan ürünü olarak oluştuğundan, SOD bu bölgede en fazla bulunur. Metal kofaktöre bağlı olarak başlıca süperoksit dismutazlar; Cu/Zn (hem bakır hem de çinko bağlayan), Fe ve Mn tipleri (demir veya mangany bağlayan) ve son olarak nikeli bağlayan Ni tipi olarak

sınıflandırılmıştır. Mn-SOD, mitokondri ve peroksizomlarda bulunur. Fe SOD, esas olarak kloroplastlarda bulunur, ancak peroksizomlarda da tespit edilmiştir ve Cu/Zn SOD, sitozol, kloroplast, peroksizomda lokalize edilmiştir.²¹⁹⁻²²¹

İnsanlarda, üç süperoksit dismutaz formu mevcuttur. SOD1 sitoplazmada, SOD2 mitokondride ve SOD3 hücre dışında bulunur. Birincisi bir dimerdir (iki birimden oluşur), diğerleri ise tetramerlerdir (dört alt birim). SOD1 ve SOD3 bakır ve çinko içerirken, SOD2 reaktif merkezinde manganez içerir.²²² SOD sentezinde artış oksidatif stres koşulları altında indüklenir.²²³

De La Paz ve ark.²²⁴ 7 ile 85 yaşları arasındaki donörlerden, sağlıklı insan gözlerinin merkezi ve periferel nörosensöriyal retinasında SOD aktivitesini ölçmüş ve makuladaki bu enzimin aktivitesinde yaşa bağlı bir düşüş bulamadığını tespit etmişlerdir. Frank ve ark.²²⁵ eritrosit CuZn-SOD' yi inhibe etmek için bir poliklonal antikör kullanarak, patoloji olmadan 19 insan donör gözünün maküler RPE'sinde süperoksit dismutaz immünoreaktivitesini ve koroid neovasküler membranı (KNVM) benzer sayıda ölçmüşlerdir. Her iki gruptaki gözler için yaş ve sitoplazmik ve lizozomal CuZn-SOD immünoreaktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir, ancak bu ilişki sadece KNVM'li gözlerde sitoplazmik enzim seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. Liles ve ark.²²⁶ toplam RPE-SOD aktivitesinin YBMD olan ve YBMD olmayan gözler için istatistiksel olarak karşılaştırılabilir olduğunu ve yaşla ilgisi olmadığını bulmuşlardır.

Bu nedenle, retinal SOD'nin YBMD'ye karşı korumada genel yerel antioksidan savunma sistemine olan katkısından başka önemli bir rol oynadığı gösterilememiştir.

2.4.7.2 Katalaz

Katalaz esas olarak yağ asitlerinin beta-oksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan H₂O₂'nin ayrışmasını etkin bir şekilde katalize ettiği peroksizomlarda bulunur. Katalaz etkisi çok güçlüdür, tek bir molekül yaklaşık 6 milyon H₂O₂ molekülünü her dakika suya ve oksijen gazına dönüştürebilir.¹⁴⁶ İlginç bir şekilde, katalaz seviyelerinin RPE hücrelerinde diğer tüm oküler dokulara göre altı kat daha yüksek olduğu, ancak yaşlı veya YBMD'den etkilenen gözlerde önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur.²²⁶ Erken başlangıçlı maküler dejenerasyonu olan sinomolguş maymunlarının retinal homojenatlarında, normal akrabalar ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha düşük katalaz

aktivitesi rapor edilmiştir, ancak insan çalışmaları ile uyumlu olarak, iki grup arasında sistemik katalaz aktivitesi açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir.^{202,227}

2.4.7.3 Glutasyon, Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Redüktaz

Sitozolde bulunan bir selenoenzim olan glutasyon peroksidaz, indirgeyici ajan olarak glutasyon kullanılarak H_2O_2 'nin suya indirgenmesini katalize eder.²²⁸ Küçük konsantrasyonlarda, hücrede üretilen H_2O_2 'nin çoğu, düşük seviyelerde oksidatif stres için ana koruma kaynağı olarak kabul edilen bu enzim tarafından temizlenir.¹⁴⁶ Glutasyon, sıgır retinasında bulunmuş ve fotoreseptör PUFA'ları E vitamini veya retinolden bağımsız olarak oksidasyondan koruduğu gösterilmiştir.^{229,230} Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), organik hidroperoksitleri azaltmak için elektron verici olarak glutasyonu kullanır. İnsan retinasında bulunur ve bir kofaktör olarak selenyuma bağımlıdır.²³¹ POLA çalışmasında, 2156 denekte antioksidan enzimler ve yaşa bağlı maküler hastalık arasındaki ilişki analiz edilmiş ve daha yüksek plazma GSH-Px düzeylerinin geç YBMD prevalansında dokuz kat artışla önemli ölçüde ilişkili olduğunu, ancak erken YBMD ile ilişkisiz olduğunu bulunmuştur.²³² Bu bulgu, GSH-Px' in YBMD'nin şimdiye kadar tanımlanmış en güçlü göstergelerinden biri olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, GSH-Px'in retina, siliyer epitel ve humor aköz de bulunduğunu ve hücre dışı bir antioksidan olarak hareket ettiğine inanılmaktadır.²³³ Bu nedenle, YBMD ile artan oksidatif stresin, plazma GSH-Px aktivitesinin artmasına yol açtığı varsayılmıştır. Retinal GSH-Px ile ilgili olarak, De La Paz ve ark.²²⁴ normal insan retinasında yaşın bu enzimin spesifik aktivitesi üzerinde hiçbir etkisini bulamamışlardır, ancak erken başlangıçlı YBMD'si olan sinomolgus maymunlarının retinal homojenatlarında GSH-Px'in azalmış aktivitesi gözlenmiştir.²³⁴

Glutasyon redüktaz doğrudan bir antioksidan görevi görmez, ancak glutasyonun rejenerasyonu için gereklidir. YBMD, hastalığın şiddeti ile glutasyon redüktaz aktivitesi arasında bir ilişki olmamasına rağmen, önemli ölçüde azalmış plazma glutasyon redüktaz seviyeleri ile ilişkilidir.²²⁷

2.4.8 Lizozomal membran geçirgenliği ve apoptozis

Daha önce tarif edildiği gibi, lizozomlar içinde lipofuskin oluşumuna katkıda bulunan küçük, sürekli bir serbest radikal üretimi normal koşullar altında bile kaçınılmazdır. Bununla birlikte, oksidatif stres artarsa, lizozomal zardaki lipidlerin peroksidasyonu,

lizozomlardan kaçak olmasına neden olabilir. Bu tür lizozomal membran geçirgenliği, birçoğu sitozolün daha nötr pH sında kısmen aktif olan proteolitik enzimlerin daha sonra serbest bırakılmasıyla, apoptoz ile hücre ölümüne neden olabilir veya daha ciddi bir sızıntı olması durumunda, doğrudan hücrenin nekrozuna yol açar.²³⁵

Apoptoz veya "programlanmış hücre ölümü", bu bağlamda sadece kısaca özetlenecek çok karmaşık bir süreçtir. Birçok uyaran çeşitli yollardan apoptozu indükleyebilir, intrinsik ve ekstrinsek yol vardır. Ekstrinsek yol, plazma zarındaki ölüm reseptörlerinin, örn. tümör nekroz faktörleri, aracılığı ile, intrinsik apoptotik yol, geçirgen mitokondrilerden sitokrom c salınımı ile hücre hasarını başlatır. Bu yolların her ikisi de efektör protein kaspaz-3'ün aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktive edildikten sonra bu proteolitik enzim, hücrenin organize ve kontrollü degradasyonunu başlatır.^{150,236} Morfolojik olarak apoptoz, hücre büzülmesi, nükleer piknoz, membran sızması ve son olarak hücrenin apoptotik cisimler olarak adlandırılan ve daha sonra komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilen küçük veziküllere parçalanması ile karakterizedir.²³⁷ Oksidatif stres kaynaklı apoptoz koşulları altında mitokondri ve lizozomlar arasında bir çapraz ilişki olduğu görülmektedir, serbest bırakılan lizozomal enzimler mitokondriyal membranları geçirgen hale getirir ve daha da fazla ROS üretimine yol açar, bu da lizozomal membran geçirgenliğini daha da artırır.¹⁵⁰

Apoptotik hücre ölümünün organizma için çeşitli avantajları vardır ve malign transformasyon geçiren hücreleri elimine edebilmesi için çok önemlidir. Hasarlı veya hastalıklı hücrelerin apoptoz ile uzaklaştırıldığı kontrollü, "sessiz" yol, bitişik hücreler için daha şiddetli nekrotik hücre ölümüne göre çok daha az zararlıdır, burada plazma zarının parçalanması ve hücre içeriğinin çevre dokulara salınması enflamatuvar bir yanıtı neden olur.²³⁷

2.5 Lutein

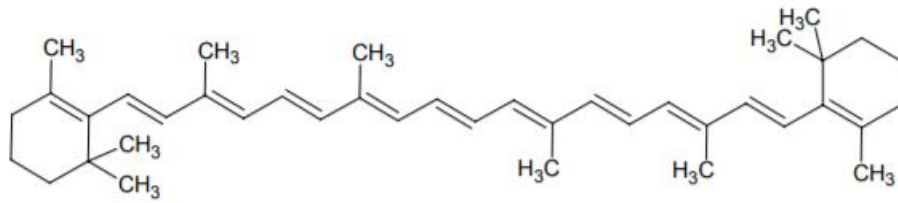
Lutein ve stereo izomeri zeaksantin, karotenoid ailesinin ksantofil üyeleridir. İnsan sağlığı açısından faydaları uzun zamandır bilinen ve kronik hastalıklar üzerinde koruyucu ve tedavi edici potansiyele sahip olan karotenoidler günümüzde ilgi odağı durumundadırlar. Son yıllarda, karotenoid bileşikleri üzerinde gelişmiş teknikler kullanılarak yoğun çalışmalar yapılmış ve insan sağlığı üzerine birçok yeni etkiler

saptanmıştır. Karotenoidlerin bu etkileri ne şekilde gösterdiği üzerinde durulmuş ve kapsamlı araştırmalar sonucunda yeni görüşler ileri sürülmüştür.

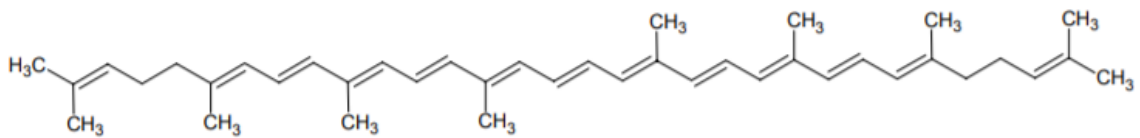
Karotenoidler, genellikle 8 izopren ünitesinin birleşmesi ile oluşmuş izoprenoidlerdir. Karotenoid moleküllerinin en göze çarpan özelliği; 3-15 konjuge çift bağdan oluşan uzun polien zinciridir. Kromoforun uzunluğu molekülün absorpsiyon spektrumunu ve rengini belirlemektedir. Bilinen 600 kadar karotenoid vardır.

Karotenoidler kimyasal yapılarına göre iki grupta incelenir:

Karotenler; yapısında oksijen atomu içermeyen, karbon ve hidrojen atomları taşıyan karotenoidlerdir; α -karoten, β - karoten, likopen vb. (Şekil 3, 4).

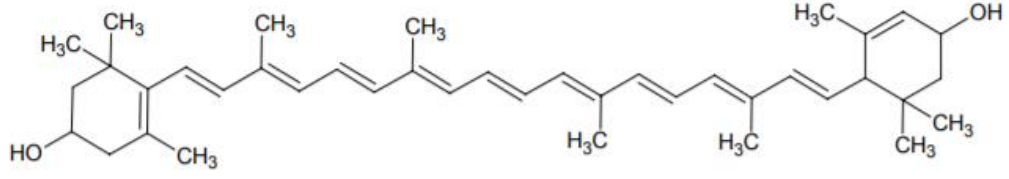


Şekil 3. B- karoten

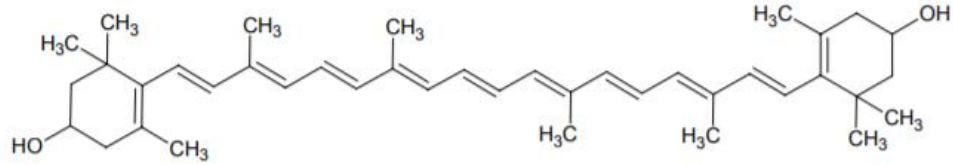


Şekil 4. Likopen

Ksantofiller; yapısında en az bir oksijen atomu içeren, hidroksil ve keton grupları içerebilen karotenoidlerdir; lutein, zeaksantin, kantaksantin, astaksantin vb. (Şekil 5,6).



Şekil 5. Lutein



Şekil 6. Zeaksantin

Karotenoidler sıklıkla halka yapılarıyla sonlanan 35-40 karbonlu polien zinciri ile karakterizedirler. Başlıca biyokimyasal fonksiyonları, renklerinden de sorumlu olan uzun konjuge çift bağlara dayanmaktadır. Çift bağların sayısı arttıkça, konjuge sistemlerle etkileşen elektronlar daha çok yer değiştirme olanağı bulmakta ve daha az enerji sarfettirmektedir. Bu da absorbe edilen ışığın enerji seviyesinin düşük olmasına yol açmaktadır. Karotenoid bileşiklerinin sıklıkla kırmızı renkte olması bu şekilde açıklanabilir. Karotenoidler isimlendirilirken genellikle izole edildikleri kaynakla ilişkilendirilirler (β -karoten-Daucus carota).²³⁸⁻²⁴¹

Lutein ve zeaksantin, RPE dahil olmak üzere insan retinasının anatomik yapılarında biriken tek diyet karotenoidleridir.²⁴²⁻²⁴⁴ Retinada mezo-zeaksantin, 9-trans 13-Z lutein ve zeaksantin, 30-okso-lutein, epilutein ve e-karoten-3,30-dion gibi diğer bazı bileşikler daha az miktarlarda bulunmuştur.²⁴³ Lutein ve zeaksantin, primat retinada yüksek konsantrasyonda biriken diyet dihidroksillenmiş karotenoid iken, luteinden retinada mezo-

zeaksantin oluşur.^{243,244} Kültürleşmiş RPE hücrelerinin hücre kültürü ortamından karotenoidleri aldığı daha önce gösterilmiştir.²⁴⁵

Lutein ve zeaksantin, membran yüzeyine dikey olarak yönlendirilir, bu da yüksek çözünürlük, kararlılık ve membran özellikleri üzerinde önemli etkiler sağlar.²⁴⁶ Bu özel yönelim, maküler ksantofilleri diğer birçok diyet karotenoidinden ayıran bir özelliktir. Yakın zamanda yapılan bir derlemede, ksantofillerin transmembran yöneliminin, dolaylı olarak değişen membran özellikleri ile bu karotenoidlerin antioksidan özelliklerini de artırabileceği ve böylece zararlı oksidatif hasara daha az duyarlı hale gelebileceği belirtilmiştir.²⁴⁷

Lutein, retinada zeaksantin ile insan maküler pigmentleri oluşturan, retinaya zararlı mavi ışığı önleyen ve RPE hücrelerinin antioksidan savunmasının güçlendirilmesine katkıda bulunan bir tür karotenoiddir.^{27,28} İnsan vücudu luteini sentezleyemez. Lutein kaynakları esas olarak diyet kaynaklıdır; ıspanak ve lahanada dahil olmak üzere yeşil yapraklı sebzeler; üzüm ve kivi dahil olmak üzere meyveler; yumurta sarısı ve mısır.²⁴⁸

Ksantofiller, retinada zararlı mavi ışığı emen pigmentler olarak işlev görür, ancak retina yapılarının antioksidan savunmasına da katkıda bulunabilirler.²⁴⁹ Plazmadaki yüksek lutein konsantrasyonları maküler pigment yoğunluğunun artmasına neden olabilir. Yüksek seviyelerde maküler karotenoidler aynı zamanda YBMD için düşük bir risk ile ilişkilidir. Klinik çalışmalar, antioksidan (karotenoidler, tokoferol, askorbik asit) ve çinko takviyeleri alan kişilerde YBMD ilerlemesinde önemli bir azalma olduğunu göstermiştir.¹⁰

Lutein, gözün makulasında yüksek bir konsantrasyonda bulunur.²⁵⁰ Serbest radikalleri temizlemek için ROS ile reaksiyona giren birkaç çift bağ içerir.²⁵¹ Lutein, doğrudan anti-apoptotik veya dolaylı antioksidasyon etki ile sitoprotektif bir antioksidan olarak işlev görür.^{28,252}

Antioksidanlarla tedavi edilen RPE hücrelerinde, artmış canlılık sergilediği ve daha az lipid hidroperoksit biriktiği gözlemlenmiş olup, bu da antioksidanların tekli oksijeni söndürmede sinerjistik etkisiyle açıklanmıştır.²⁵³ Zeaksantin, lutein ve astaksantin, kemilüminesans teknikleri kullanılarak test edildiğinde benzer süperoksit temizleme etkinliğine sahip oldukları bulunmuştur.²⁵⁴

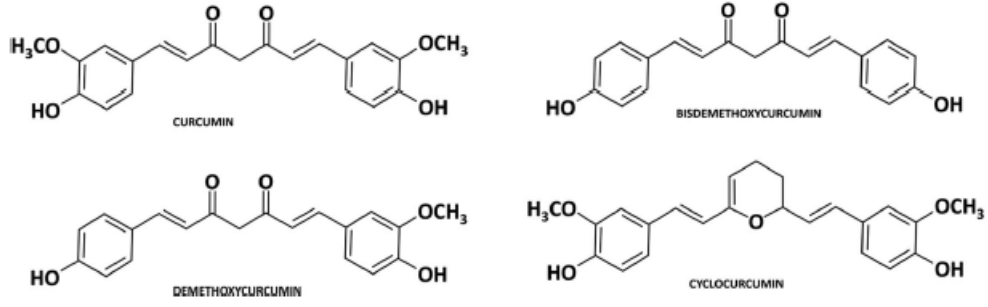
Diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan in vivo çalışmaları, lutein ve zeaksantin diyabet kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkilerini de desteklemektedir. Sıçanlarda zeaksantin takviyesi, diyabet kaynaklı retina hasarında artışı önledi ve lipid peroksidlerin ve oksidatif olarak modifiye edilmiş DNA'nın seviyesini azalttı.²⁵⁵ Lutein ile desteklenen diyabetik farelerin daha düşük malondialdehit değerleri sergilediği ve hem retina hem de hipokampus için glutasyon konsantrasyonu ve glutasyon peroksidaz aktivitesinin değerlerini kontrol seviyesine yükselttiği gözlemlenmiştir.²⁵⁶

Lutein ayrıca iskekiye bağı sıçan retinasında nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve siklooksijenaz-2'nin (COX-2) ekspresyonunu inhibe etmiştir.²⁵⁷ Son zamanlarda, lutein ve dokosaheksaenoik asidin, lipid peroksidasyonunu azaltarak ve azaltılmış glutasyon ve glutasyon peroksidaz aktivitesini artırarak farelerde diyabetik serebral korteksin oksidatif değişikliklerini azaltabildiği gösterilmiştir.²⁵⁸

Pintea ve ark.³⁰ yaptığı çalışmada kültür ortamındaki lutein ve zeaksantin takviyesinin, hidrojen peroksidin neden olduğu akut oksidatif strese maruz kalan hücrelerde canlılığı artırarak RPE hücrelerini koruduğunu göstermişlerdir. Bazal ve uyarılmış oksidatif stres koşullarında antioksidan enzimlerin aktivitesini, glutasyon konsantrasyonunu, lipid peroksidasyon seviyesini ve hücre içi ROS oluşumunu belirleyerek, lutein ve zeaksantin RPE hücrelerinin antioksidan durumu üzerindeki etkisini in vitro olarak değerlendirmişler ve ksantofil tedavisinin oksidatif strese maruz kalan RPE hücrelerinde GSH-Px ve SOD aktivitelerinde ve GSH konsantrasyonunda anlamlı bir artış saptadığını, ancak katalaz aktivitesi üzerinde aynı etkiye sahip olmadığını göstermişlerdir.

2.6 Kurkumin

Kurkumin, Zingiberaceae ve Araceae bitkilerinin rizomlarından ekstrakte edilen bir bileşiktir(Şekil 7). Kurkumin içinde bulunan en aktif maddeler, içeriği % 3 ile 5 arasında olan kurkuminoid olarak bilinen polifenollerdir.²⁵⁹



Şekil 7: Kurkumin ve türevlerinin kimyasal yapısı

Tüm zerdeçal bileşikleri arasında, diferuloilmetan olarak da bilinen kurkumin, hidrofobik polifenollere ait en değerli olanıdır. Kurkumin veya 1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil) -1,6-heptadieno-3,5-dion, bir metilen köprüsüyle birleştirilen iki ferulik asit kalıntısı içerir.²⁶⁰ Kurkumin, anti-enflamatuar ve antioksidan aktivitesi de dahil olmak üzere zerdeçalın terapötik özelliklerinde en önemli rolü oynar.^{261,262} Kurkumin, kronik hastalıklar, enflamatuar bozukluklar, enfeksiyonlar ve diğer patolojik durumlar da dahil olmak üzere çeşitli bozuklukları tedavi etmek için kullanılabilir.²⁶³ Kurkumin'in antioksidan özellikleri, fenoksi radikallerinin oluşumundan veya doğrudan hidrojen soyutlamasından kaynaklanır. Birinci mekanizma, bir elektronun serbest radikale transferini içerir, bu da bir proton kaybı ile fenoksi radikali üreten radikal katyon oluşumuna neden olur. İkinci mekanizma, hidrojenin doğrudan soyutlanmasını içerirken, kurkumin'in hidroksil kalıntısı, radikal saldırıya karşı en savunmasız olarak kabul edilir.²⁶² Jat ve ark. yaptığı bir araştırma, kurkumin'in güçlü antioksidatif etkilere sahip olduğunu ve lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu ve mitokondriyal geçirgenlik geçişine karşı koruduğunu göstermektedir.¹⁹ Kurkumin'in çeşitli hayvan modellerinde lipid peroksidasyonu dahil oksidatif hasarı inhibe ettiği gösterilmiştir.²⁶⁴ Ayrıca süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve S-glutatyon transferazı kodlayan genlerin aktivasyonu yoluyla enzimatik antioksidan tepkimeleri aktive edebilir.²⁶⁵

Wang ve ark.²⁶⁶ kurkuminin normal yağ dokusu hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini inhibe ederek lipolizi inhibe ettiğini ve hepatik insülin direncini önlediğini in vivo

olarak gösterdi. Kurkuminin antimikrobiyal ve antiviral özellikleri in vitro yapılan çok sayıda çalışma tarafından gösterilmiştir.^{267,268} Kurkumin ayrıca hücre proliferasyonunu inhibe eder ve mantar ve virüslerde apoptozu indükler.^{269,270} Kurkumin ile apoptoz indüksiyonundan sorumlu mekanizmalar p53'ün stabilitesi, sitokrom c salınımı ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu üzerindeki etkiler gibi birçok mekanizma ile açıklanmaktadır.^{271,272}

2.7 Krosetin

Crocus sativus stigmalarından elde edilen safran, yüzyıllardır çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılmıştır. Safranın terapötik aktivitesi, esas olarak krosin ve krosetin de dahil olmak üzere başlıca biyoaktif türevlerinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2).²⁷³ Krosetin (8,8-diapo-8,8-karotenoik asit) temel bileşimi C₂₀H₂₄O₄ ve moleküler ağırlığı 328 g/mol olan, serbest asit formunda suda ve piridin ve dimetilsülfoksit dışında çoğu organik çözücüde çözünmeyen krosin glikozid hidrolizinin sonucu oluşan bir bileşiktir. Yapısı, polien zincirini terminallerde stabilize eden iki karboksil grubunun yanı sıra yedi çift bağ ve dört metil grubundan oluşur. Anyonik formundaki krosetin suda oldukça çözünürdür, bu nedenle seyreltik sulu sodyum hidroksit veya diğer sulu alkali çözeltiler pH ≥ 9'da kolayca çözünür.²⁷⁴ Son zamanlarda safranın en önemli tedavi edici etkileri krosetin'e atfedilmiştir.

Bu madde, şok sırasında oksijen taşınması ve yayılma oranının artırılması gibi farklı mekanizmalarla hareket edebilir; artmış ATP üretimi, proinflatuar araçların inhibisyonu, hücrelerin ROS hasarından korunması ve kanser hücrelerinde apoptozun uyarılması ile sonuçlanmıştır.

Bu nedenle krosetin, arteriyoskleroz, kanamalar, artrit, tümörler gibi farklı hastalıklarda faydalı olabilir.²⁷⁵ Safran içinde bol miktarda bulunan bir antioksidan karotenoid olan krosetin, birçok hücre tipinde iskemi/reperfüzyon kaynaklı retina hasarını inhibe etmeyi ve skleroderma fibroblastlarında antifibrotik etkileri gibi farmakolojik rolleri gösterilmiştir.^{32,276}

Krosetin, antioksidasyon, antiinflatuar, apoptoz indükleyici ve nöroprotektif aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir.^{34,277} 3 µM konsantrasyondaki krosetinin, tunikamisin ve H₂O₂ ile indüklenen retinal ganglion hücre

ölümüne karşı %50-60'a kadar inhibitör etki gösterdiği gösterilmiştir ve aynı zamanda kaspaz-3 ve 9 aktivitelerini de arttırmıştır.²⁷⁸ Wang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, krosetinin RPE hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve TGF- β 2 aracılı epitel-mezenkimal geçişi (EMT) üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. EMT süreci proliferatif vitreoretinopatinin gelişiminde önemli bir role sahiptir.²⁷⁹ Başka bir çalışmada, krosetinin (100-400 μ M), Bcl-2 aile düzenleyicilerinin modülasyonu yoluyla insan RPE hücre hattı ARPE-19'un proliferasyonunu ve göçünü baskılayabildiği belirtilmiştir. Bu nedenle krosetin, PVR'li hastaların yönetiminde faydalı olabilir.²⁸⁰

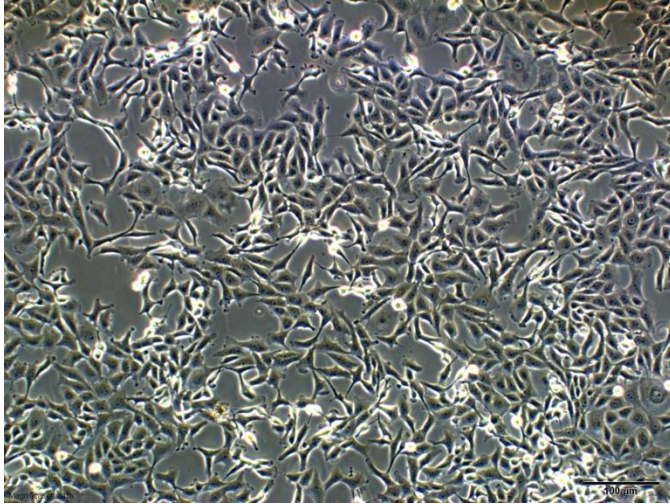
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı'nca, tıpta uzmanlık eğitimi bitirme tezi olarak tek merkezli in vitro koşullarda hücre kültürleri üzerinde kurkumin, lutein ve krosetinin retina pigment epitel hücre kültürleri üzerine olan

antioksidan etkileri ve apoptoz üzerine etkilerini araştırma amacıyla planlanıp deneysel araştırma projesi olarak hazırlanmıştır. Projemiz, KOÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 21.5.2020 tarih ve 80418770-730.99/40392 sayılı oturumunda amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere uygun bulunarak onaylanmış ve 2020/131 proje kodu ile kabul edilmiştir. Araştırma için hücre kültürlerinin hazırlanması, oksidatif model oluşturulması, ilaç uygulamaları, biyokimyasal deneyler, apoptotik gen düzeylerinin belirlenmesi ve sonuçların tespiti KOÜ Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır.

3.1 ARPE-19 Hücrelerinin Kültür Koşulları

Hücre kültürü çalışmalarının tümü laminar akım kabini içinde gerçekleştirilmiştir. ARPE-19 hücreleri (ATCC® CRL 2302) %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotiği içeren DMEM-F12 besiyeri içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂'li nemli ortamda inkübe edilmiştir. Hücrelerin her 3 günde bir besiyerleri tazelenerek %70 yoğunlukta yüzeyi kaplamaları beklenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. ARPE-19 hücrelerinin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi (Ölçek çubuğu: 100 μm)

3.2 ARPE-19 Hücrelerinin Pasajlanması

Hücreler yaklaşık %70 hücre sıklığına ulaştıklarında besiyeri uzaklaştırılmış ve kalsiyum ve magnezyum içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ile yıkanmıştır. 0.25% tripsin-EDTA ile 4 dk 37°C sıcaklık ve %5 CO₂'li ortamda inkübe

edilen hücreler enzim yardımıyla yüzeyden kaldırılarak 15 ml'lik falkon tüpe toplanmıştır. 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek elde edilen hücre peleti 1 ml besiyeri ile sulandırılarak canlılık ve sayının belirlenmesi için 20 µl örnek alınmıştır. 20 µl tripan mavisi ile homojenize edildikten sonra hücre sayısı Thoma lamı kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan sayım sonrası 75 cm²'lik kültür kaplarına 7x10³/cm² olacak şekilde ekim yapılmıştır.

3.3 Oksidatif Hasar Modeli Oluşturulması ve Optimum Dozun Belirlenmesi

Deneyle 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında (10.000 hücre/kuyucuk) gerçekleştirilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra güçlü bir oksidatif stres modeli oluşturmak amacıyla hücreler artan H₂O₂ konsantrasyonlarına (12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM) 1, 2 ve 3 saat tabi tutulmuşlardır. Oksidatif hasar oluşturulan hücrelerdeki morfolojik değişiklikler invert mikroskopta incelenerek değerlendirilmiştir. Ayrıca H₂O₂'ye maruz bırakılan hücreler süre sonlarında %10 WST-1 (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfopenil)-2H-tetrazolyum, Roche) solüsyonu içeren besiyeri ile 2 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve mikropilaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Kontrol grubu hücrelerine göre değerlendirme yapılarak hücre canlılık oranları belirlenmiş ve yaklaşık %50 hücre canlılığını sağlayan H₂O₂ konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.4 ARPE-19 Hücrelerinin Lutein, Kurkumin ve Krosetinle Muamelesi

Oksidatif hasar oluşturmak için 1 saat 800 µM H₂O₂ ile muamele edilen hücreler 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM dozlarında Kurkumin, Krosetin ve Lutein ile 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücre proliferasyon oranlarının karşılaştırılabilmesi için %10 WST-1 solüsyonu içeren besiyeri ile 2 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak antioksidan maddelerin hasar oluşmuş hücrelerdeki canlılığa olan etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.5 Oksidatif Biyobelirteçlerin Tespiti

WST-1 analizi sonucunda her bir antioksidan madde için en etkin doz olduğu düşünülen düşük orta ve yüksek konsantrasyonlar seçilmiştir. Oksidatif hasara uğratılmış ARPE-19 hücreleri ve bu hücrelere tedavi amacıyla farklı dozlarda uygulanan Kurkumin (20, 40, 80 µM), Krosetin (10, 40, 80 µM) ve Lutein'in (5, 40, 80 µM) Süperoksit dismutaz (SOD), malik dialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) oksidatif biyobelirteç seviyeleri üzerine etkileri

kolorimetrik biyokimyasal kitler aracılığı ile belirlenmiştir. Kitler üretici firmanın (Biovision, USA) talimatlarına uyularak çalışılmıştır.

3.5.1 SOD inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD), en önemli antioksidatif enzimlerden biridir ve süperoksit anyonunun (O_2^-) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalize etmektedir. Kullanılan kit, süperoksit anyon indirgenmesini formazan boyası üreten WST-1 ile analiz edilmesini sağlamaktadır. Bir süperoksit anyon ile indirgeme hızı, ksantin oksidaz (XO) aktivitesi ile doğrusal olarak ilişkilidir ve Süperoksit anyonla indirgenme oranı SOD tarafından inhibe edilir. SOD'ın inhibisyon aktivitesi kolorimetrik bu yöntemle belirlenmiştir.

%0.5 Triton X-100, 5 μ M p-ME, 0.1 mg / ml PMSF içeren buz soğukluğunda 0.1 M Tris / HCl, pH 7.4 içinde hücreler lize edildikten sonra 14.000g'de 5 dk 4°C'de santrifüj edilmiş ve hücre kalıntıları atılarak süpernatantlardan alınan 20 μ l örnek üzerine WST-1 solüsyonu ve enzim solüsyonu eklenmiştir. Plaka 37°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra ortamda bulunan SOD enzimi miktarına göre oluşan renk değişimi 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir. Örnek yerine 20 μ l dH₂O eklenen kuyucuklar blank olarak kullanılmıştır.

3.5.2 MDA aktivitesinin belirlenmesi

Patofizyolojik süreçlerde oksidatif stresi değerlendirmek için lipid peroksidasyonunun miktarının belirlenmesi gereklidir. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA'yı ölçmek oksidatif hasarın yararlı bir belirteçidir. Kullanılan kitte deney gruplarındaki MDA ve Tiyoarbitürik Asitin (TBA) reaksiyona sokulmasıyla oluşan renk değişiminin belirlenmesine dayalı bir ölçüm yapılmaktadır.

10 mg (1×10^6) hücre 300 μ l MDA Lysis Buffer (3 μ l BHT (100X) ile buz üzerinde homojenize edilebilir, sonra çözünmeyen materyali uzaklaştırmak için santrifüj edilir (13.000g, 10 dk). Her numuneden 200 μ l süpernatantı mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş, standartları ve numuneyi içeren her şişeye 600 μ l TBA reaktifi eklenmiştir. 95°C'de 60 dk inkübe edilen örnekler bir buz banyosunda 10 dakika boyunca oda sıcaklığına soğutulmuştur. Analiz için 96 kuyucuklu bir plakaya 200 μ l örnek pipetlenmiş ve 532 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Kit içerisindeki MDA

standardı ile oluşturulan standart eğri ile hücrelerde bulunan MDA miktarının belirlenmesi sağlanmıştır.

3.5.3 GSH aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon (GSH) memeli hücrelerinde oksidatif strese karşı hücreyel savunmada kritik bir rol oynayan hücre içi düşük moleküler ağırlıklı bir tiyoldür. Kullanılan kit DTNB (Glutathione Substratı) ve glutasyon redüktaz tarafından sağlanan glutasyon geri dönüşüm sistemine dayanmaktadır. Oluşturulan GSSG, glutasyon redüktaz ile tekrar GSH'ye indirgenebilir ve GSH, daha fazla 2-nitro-5-tiyobenzoik asit üretmek için DTNB ile tekrar reaksiyona girmektedir. Bu nedenle geri dönüşüm sistemi toplam glutasyon tespitinin hassasiyetini önemli ölçüde geliştirmektedir. Glutasyon kolorimetrik bu yöntem ile analiz edilmiştir.

0.5 ml soğuk PBS içinde hücre pelletleri (1×10^6) süspanse edilmiş, 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak ve 700g'de 5 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak hücreler 80 µl soğuk Glutasyon Tampon içinde parçalanmıştır. 10 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra 20 µl %5 SSA eklendikten sonra 8.000g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar yeni bir tüpe aktararak glutasyon testi için kullanılmıştır. GSH konsantrasyonları 405 nm dalga boyunda yapılan absorbans ölçümü sonrası oluşturulan standart GSH grafiğine göre belirlenmiştir.

3.6 Apoptotik Gen Düzeylerinin RT-PCR ile Belirlenmesi

Oksidatif hasar oluşturma ve Lutein, Kurkumin ve Krosetin'le yapılan tedavi sonrasında ARPE-19 hücreleri kültür kabı yüzeyinden enzimatik yolla kaldırılmış ve GeneJet RNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific) ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. cDNA Sentez Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak izole edilen toplam RNA'dan cDNA sentezlenmiştir. İki temel basamaktan oluşan bu işlemde önce RNA'ya 65°C'de 5dk boyunca rastgele bölgelerinden primerlerin bağlanması sağlanmıştır. RNA'nın stabil kalması için hemen buza alınarak ters transkripsiyonu sağlayacak enzimi içeren karışım eklenmiştir. 42°C'de 60 dk, 72°C'de 5 dk bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Hücrelerden elde edilen cDNA'lar ile apoptoz seviyesinin belirlenmesi amacıyla pro-apoptotik etki sağlayan Bax ve anti-apoptotik etki sağlayan Bcl2 genlerinin primerleri

kullanılarak SYBR green içeren master solüsyon (Roche) ile reaksiyon kurulmuştur. Real-Time PCR cihazı (Lightcycler 480, Roche) ile çoğalan DNA parçaları ölçülmüş ve kontrol grubu hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerine oranla apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Gen ekspresyonu analizinde aktin beta (ActB) gen ekspresyonu housekeeping (referans) gen olarak kullanılmıştır.

Şekil 9. Gen Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primerler ve Dizi Bilgisi

Gen	Primer 1 Dizisi (5'–3')	Primer 2 Dizisi (5'–3')
Bax1	CCCTTTTGCTTCAGG GTTTC	GCCACTCGGAAAAA GACCTC
Bcl-2	TTGTTCAAACGGGAT TCACA	ACAAAACCCCACAG CAAAAG
ActB	TTCTACAATGAGCTG CGTGTG	GGGGTGTGAAGGT CTCAAA

3.7 İstatistiksel Analiz

Her deney en az 3 kez tekrar edilmiş olup toplanan veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. Sonuçların değerlendirilmesinde SPSS 20.0 istatistik programı kullanıldı. Toplanan verilerin normal dağılıma uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilip normal dağılıma uyan MDA, SOD ve GSH verilerinin ikiden çok bağımsız grup verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi yöntemi olarak ANOVA testi kullanılmıştır. Grupların ikili karşılaştırmaları için tek kuyruk dağılımlı T-testi kullanılmıştır. Verilerin istatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

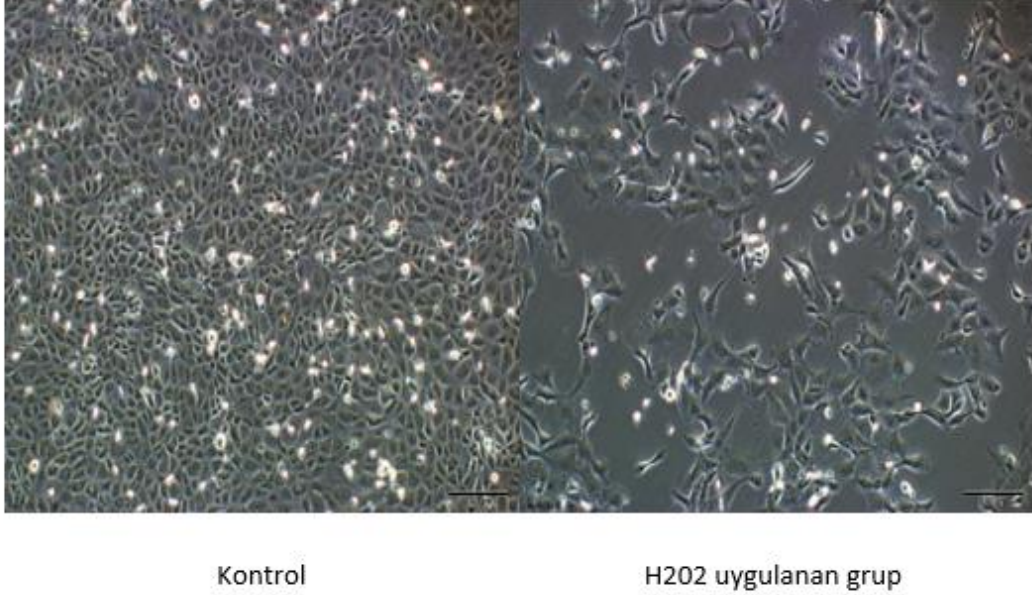


4.BULGULAR

4.1 Hücre Kültürlerinin Mikroskobik Görünümleri

4.1.1 H₂O₂ Uygulamasının Hücre Kültürü Üzerine Etkisi

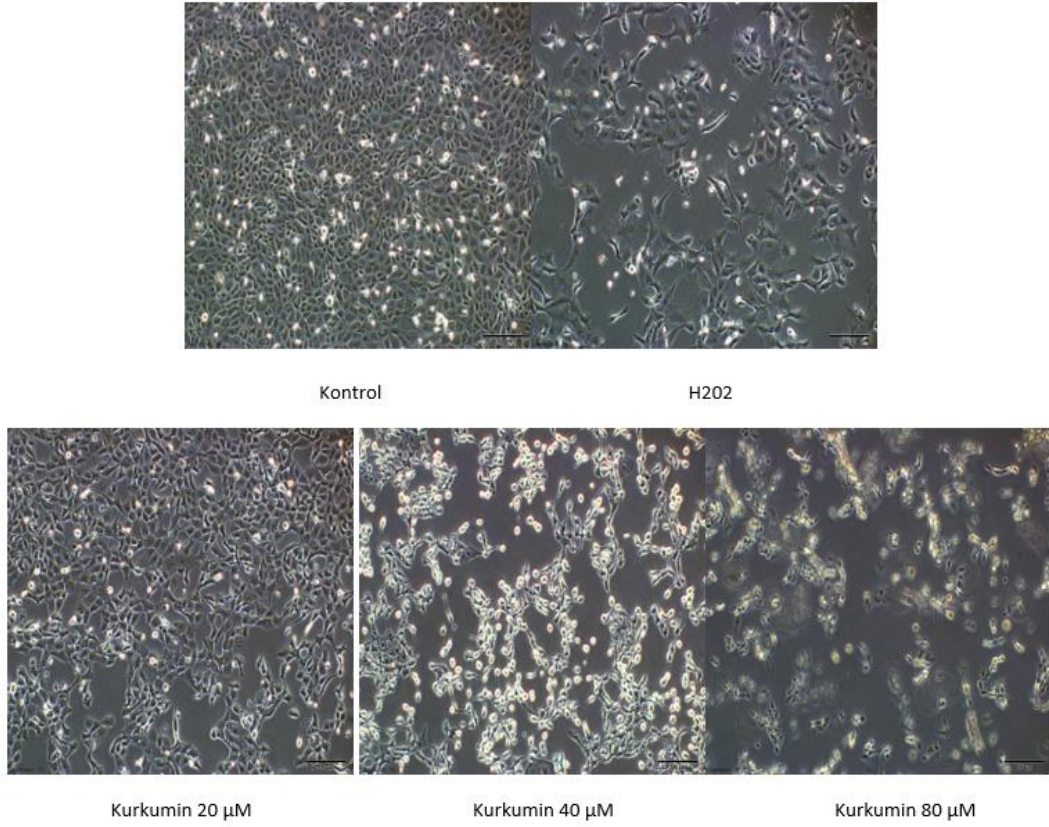
Hücrelerin görüntülerine bakıldığında kültüre başlanan hücrelerde, kontrol grubuna göre H₂O₂ uygulanan gruptaki hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. H₂O₂'in hücre üzerine olan etkilerinin mikroskobik görünümü. (Ölçek çubuğu; 100 µM)

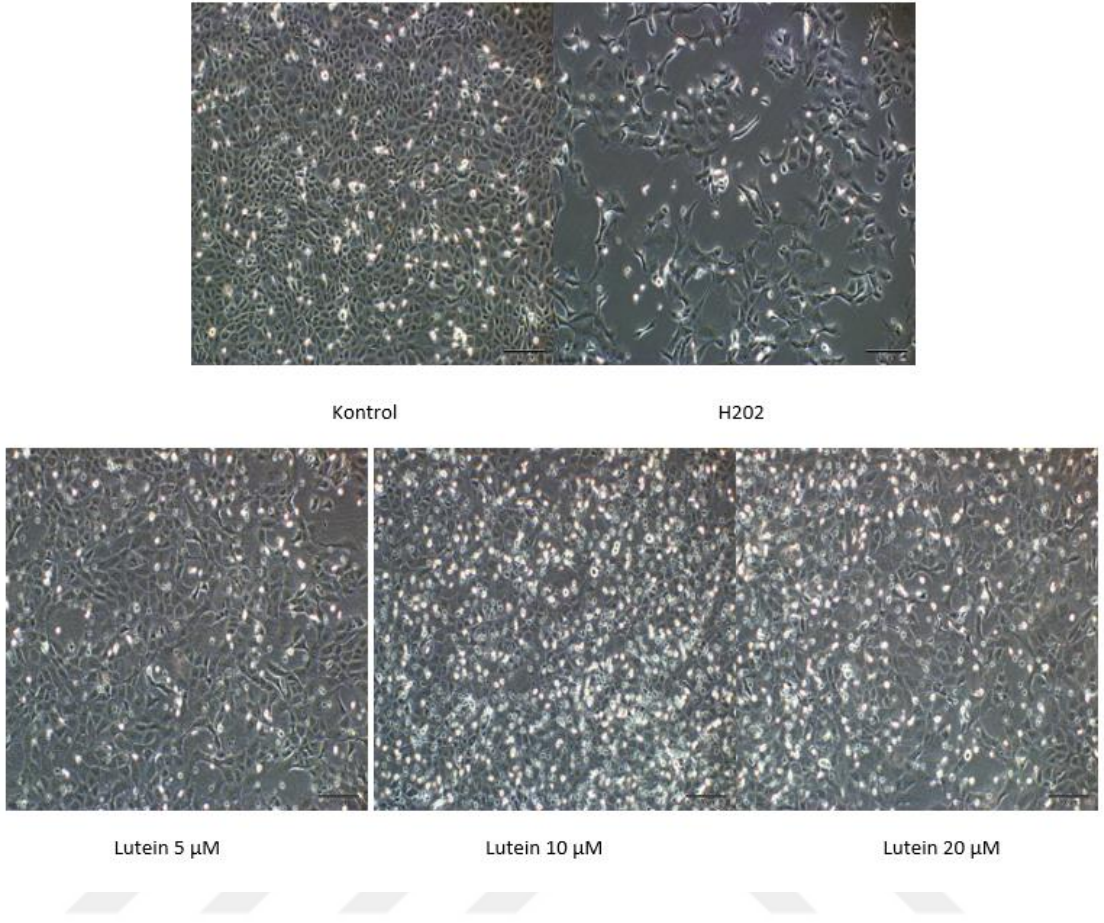
4.1.2 Lutein, Kurkumin ve Krosetinin Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi

Kurkumin uygulanmış gruptaki hücrelerin görüntüleri, oksidatif model ile karşılaştırıldığında, kurkuminin düşük dozu ile hücre sayısı ve canlılığında artış olduğu görülmüştür. Ancak artan kurkumin dozunun hücre sayısında olumsuz etki gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 11).



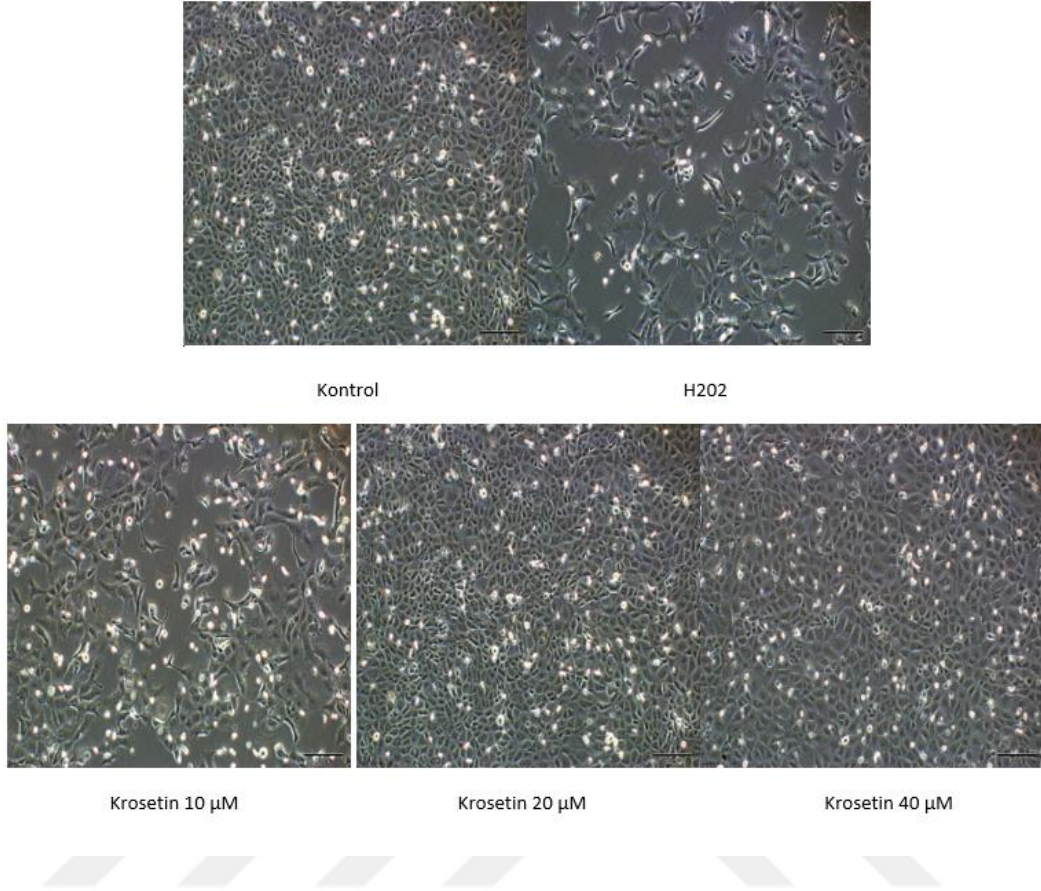
Şekil 11. Kurkuminin hücre üzerine olan etkilerinin mikroskopik görünümü. (Ölçek çubuğu; 100 µM)

Lutein uygulanmış gruptaki hücrelerin görüntüleri, oksidatif model ile karşılaştırıldığında, luteinin artan dozlarında hücre sayısında iyileşme olduğu görülmüştür (Şekil 12).



Şekil 12. Luteinin hücre üzerine olan etkilerinin mikroskopik görünümü. (Ölçek çubuğu; 100 µM)

Krosetin uygulanmış gruplardaki hücrelerin görüntüleri, oksidatif model ile karşılaştırıldığında, krosetinin artan dozlarında hücre sayısında iyileşme olduğu ancak en yüksek dozda olumsuz yönde etki başladığı görülmüştür (Şekil 13).

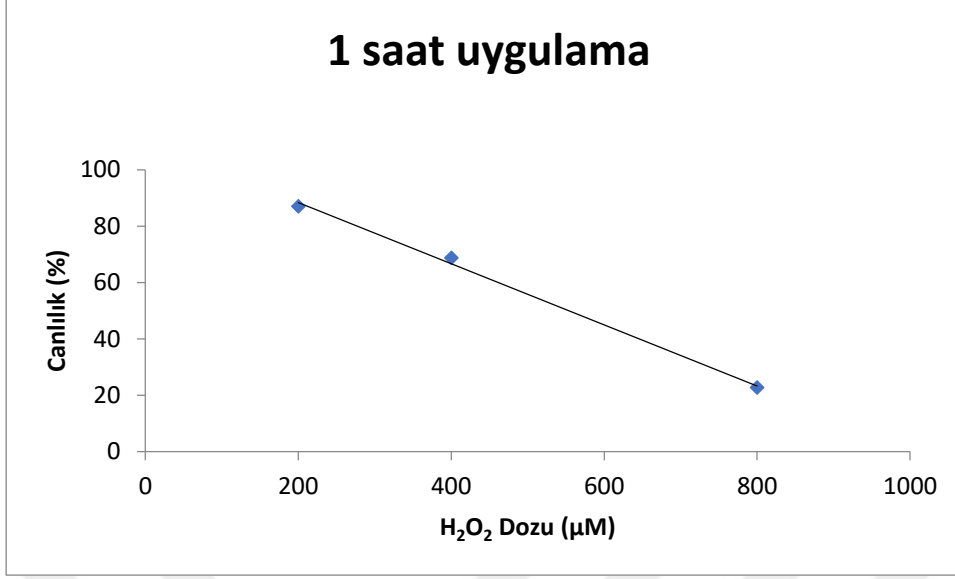


Şekil 13. Krosetinin hücre üzerine olan etkilerinin mikroskopik görünümü. (Ölçek çubuğu; 100 µM)

4.2 Hücrelerin Canlılıklarının Değerlendirilmesi

4.2.1 H₂O₂ in hücre canlılığı üzerine etkisi ve oksidatif model için uygun dozunun belirlenmesi

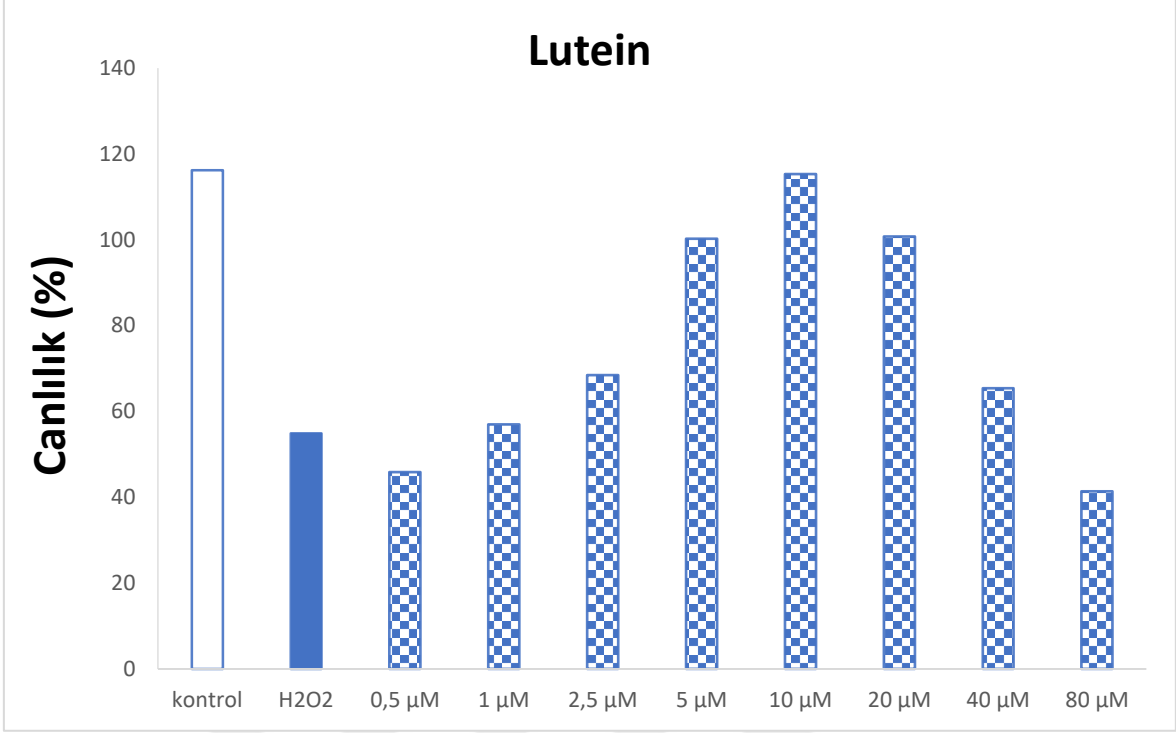
RPE hücreleri, farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ (12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM) ile 1, 2 ve 3 saat işleme tabi tutuldu. Hücre canlılığı WST-1 kullanılarak değerlendirildi. H₂O₂ konsantrasyonu 800 µM' a ulaştığında hücre canlılığının kontroldekinin yaklaşık %50'sine düştüğü görüldü. Bu sonuca dayanarak, apoptozu indüklemek ve oksidatif model oluşturmak için konsantrasyon olarak 800 µM seçildi (Şekil 14).



Şekil 14. H₂O₂ in artan dozlarda canlılık üzerine etkisi

4.2.2 Luteinin hücre canlılığı üzerine etkisi ve etkin dozunun belirlenmesi

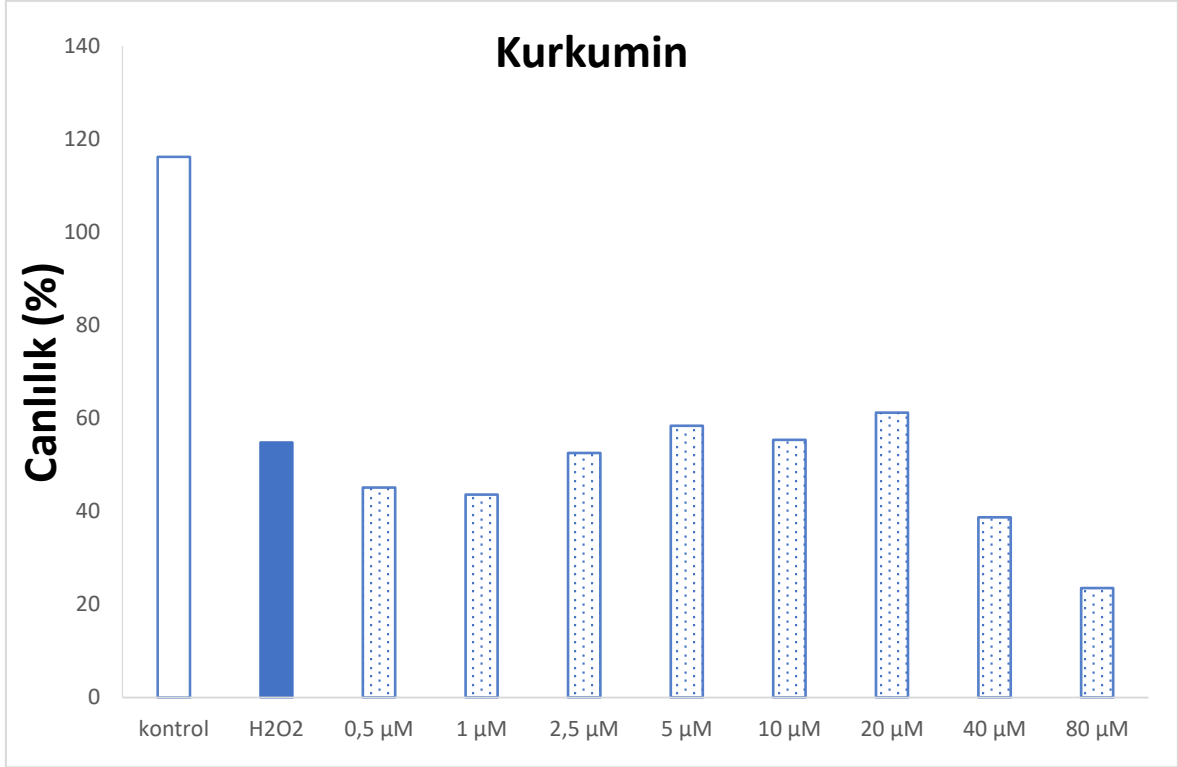
Oksidatif hasar oluşturulmuş hücrelere artan dozlarda lutein uygulandı. Luteinin canlılık ve proliferasyon üzerinde en etkin dozunun 5 µM olduğu, artan dozlarda proliferasyon ve canlılık üzerine olan etkisinin azaldığı görüldü. 5 µM dan düşük dozlarda ise H₂O₂ uygulanan grup ile karşılaştırıldığında; proliferasyon ve canlılık üzerine olan etkisinin anlamlı olmadığı görüldü. Oksidatif belirteçleri değerlendirmek için luteinin en etkin dozu ve artan katları alındı (Şekil 15).



Şekil 15. Luteinin farklı dozlarının canlılık üzerine etkisi

4.2.3 Kurkuminin hücre canlılığı üzerine etkisi ve etkin dozunun belirlenmesi

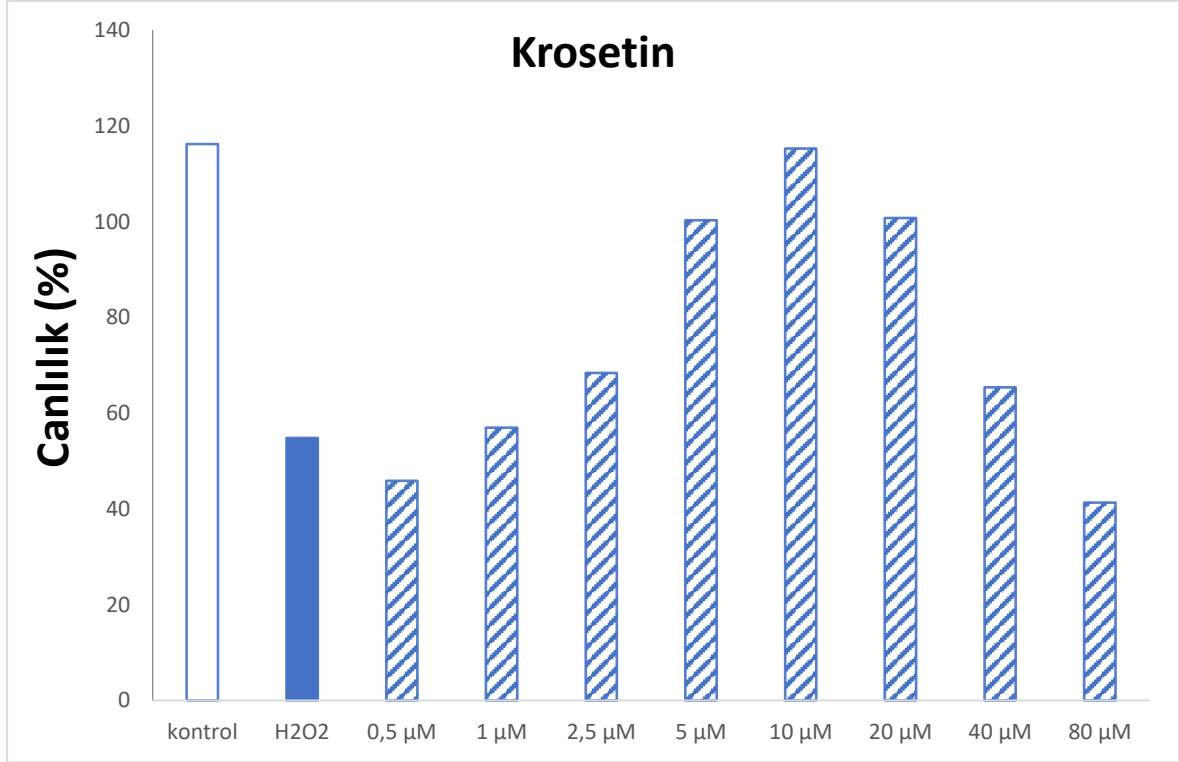
Oksidatif hasar oluşturulmuş hücelere artan dozlarda kurkumin uygulandı. Kurkuminin canlılık ve proliferasyon üzerinde en etkin dozunun 20 µM olduğu görüldü. Artan dozlarda proliferasyon ve canlılık üzerine olan etkisinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. 20 µM dan düşük dozlarda ise H₂O₂ uygulanan grup ile karşılaştırıldığında; proliferasyon ve canlılık üzerine olan etkisinin anlamlı olmadığı görüldü. Oksidatif belirteçleri değerlendirmek için kurkuminin en etkin dozu ve artan katları alındı (Şekil 16)



Şekil 16. Kurkuminin farklı dozlarının canlılık üzerine etkisi

4.2.4 Krosetinin hücre canlılığı üzerine etkisi ve etkin dozunun belirlenmesi

Oksidatif hasar oluşturulmuş hücrelere artan dozlarda kurkumin uygulandı. Kurkuminin canlılık ve proliferasyon üzerinde en etkin dozunun 10 µM olduğu görüldü. 20 µM dozundaki proliferasyon ve canlılık üzerine olan etkisinin de anlamlı olduğu ancak sonrasında artan dozlarda etkinin azaldığı görüldü. Düşük dozlarda ise H₂O₂ uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı etkinliğinin olmadığı görüldü. Oksidatif belirteçleri değerlendirmek için krosetinin en etkin dozu ve artan katları alındı (Şekil 17).



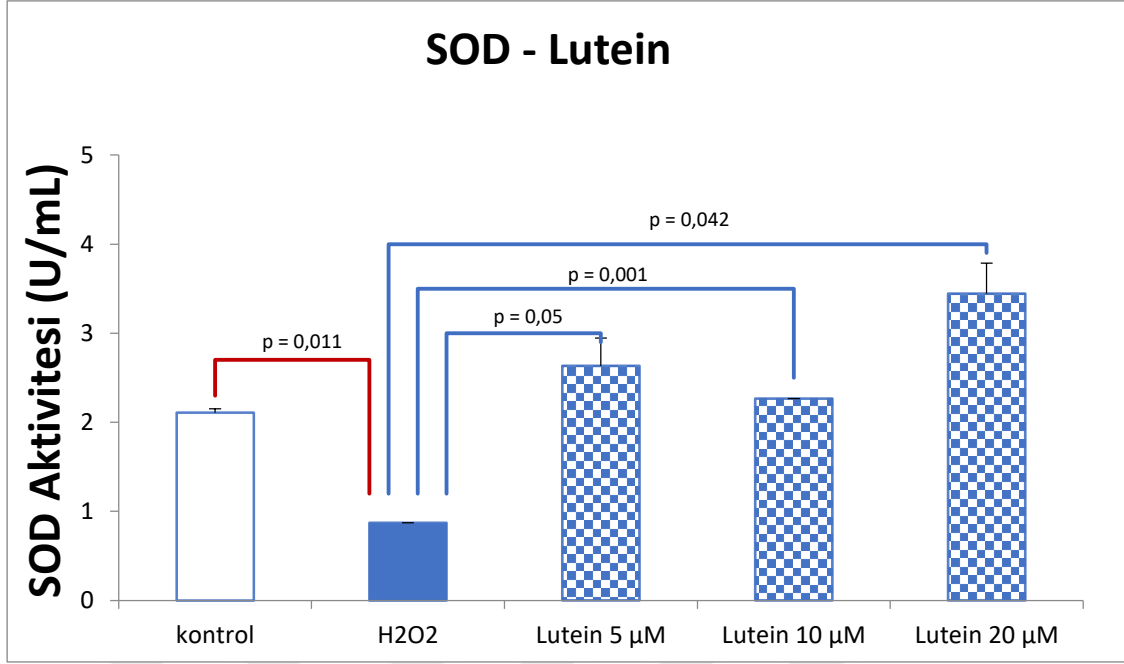
Şekil 17. Krosetinin farklı dozlarının canlılık üzerine etkisi

4.3 Biyokimyasal incelemeler

4.3.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

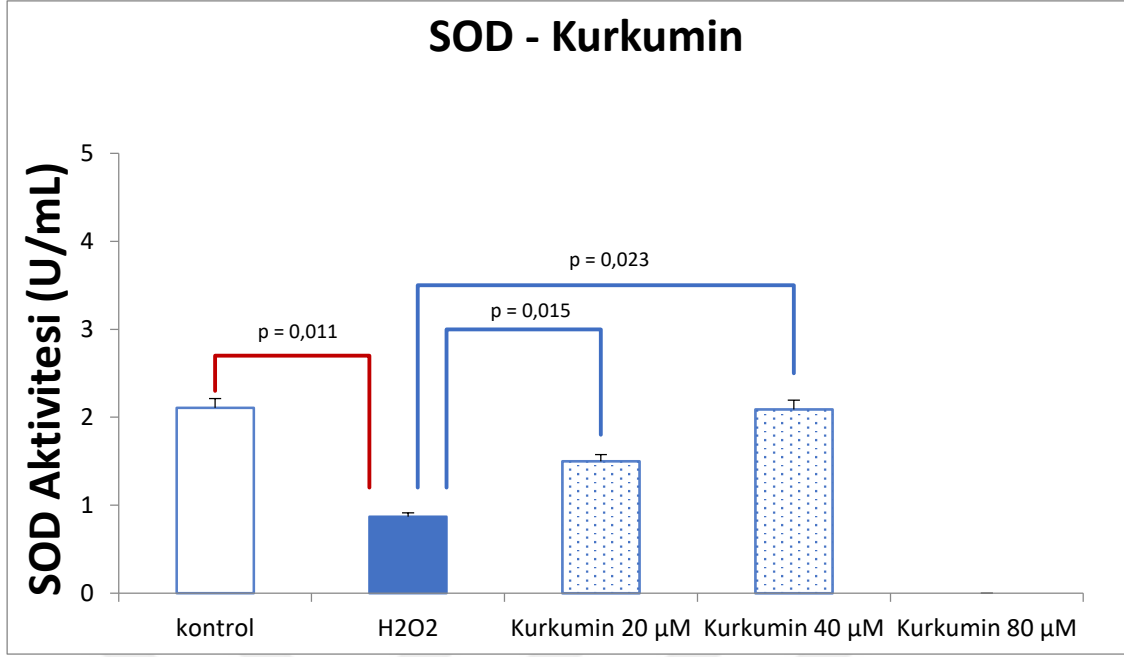
Hücrelerdeki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin biyokimyasal analizinde grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında sadece H₂O₂ uygulanan grupta aktivite en düşük olarak değerlendirildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$).

Kontrol grubu ile 5,10 ve 20 µm lutein uygulanan gruplar karşılaştırıldığında; tedavi verilen gruplarda SOD düzeyi artmış olarak bulundu ancak arasında anlamlı fark izlenmedi ($p > 0,05$). Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi grupları karşılaştırıldığında; tedavi verilen grupta SOD düzeyi artmış olarak bulundu ve aradaki fark lutein uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlıydı ($p \leq 0,05$) (Şekil 18).



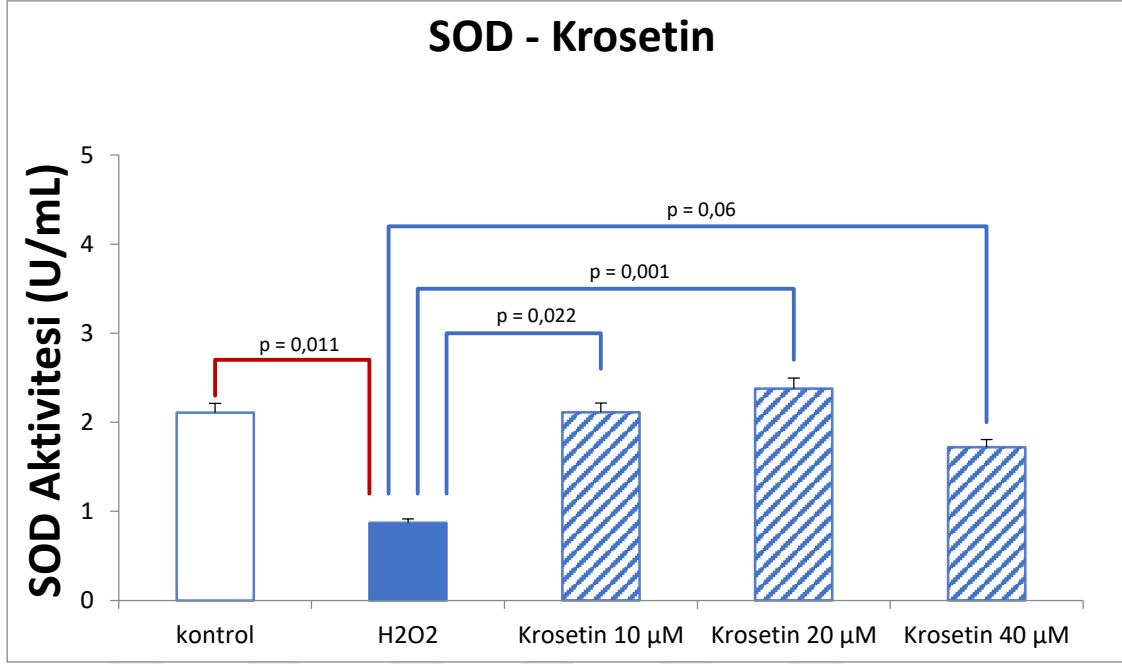
Şekil 18: Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması. 10 ve 20 µm Lutein uygulanan gruplarda SOD aktivitesi H₂O₂ uygulanan grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır.

Kontrol grubu ile 20,40 ve 80 µm kurkumin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında; tedavi verilen gruplardan 20 ve 40 µm kurkumin uygulanan gruplarda SOD düzeyi artmış olarak bulundu. 20 µm kurkumin uygulanan grupla aralarında anlamlı fark ($p < 0,05$) varken, 40 µm kurkumin uygulanan grupta anlamlı fark yoktu ($p = 0,45$). 80 µm kurkumin uygulanan grupta ise SOD aktivitesi ölçülmesine olanak vermeyecek derecede hücre canlılığının azalmış olduğu görüldü. Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi grupları karşılaştırıldığında; tedavi verilen grupta SOD düzeyi artmış olarak bulundu ve aradaki fark 20 ve 40 µm kurkumin uygulanan gruplarda anlamlıydı ($p < 0,05$) (Şekil 19)



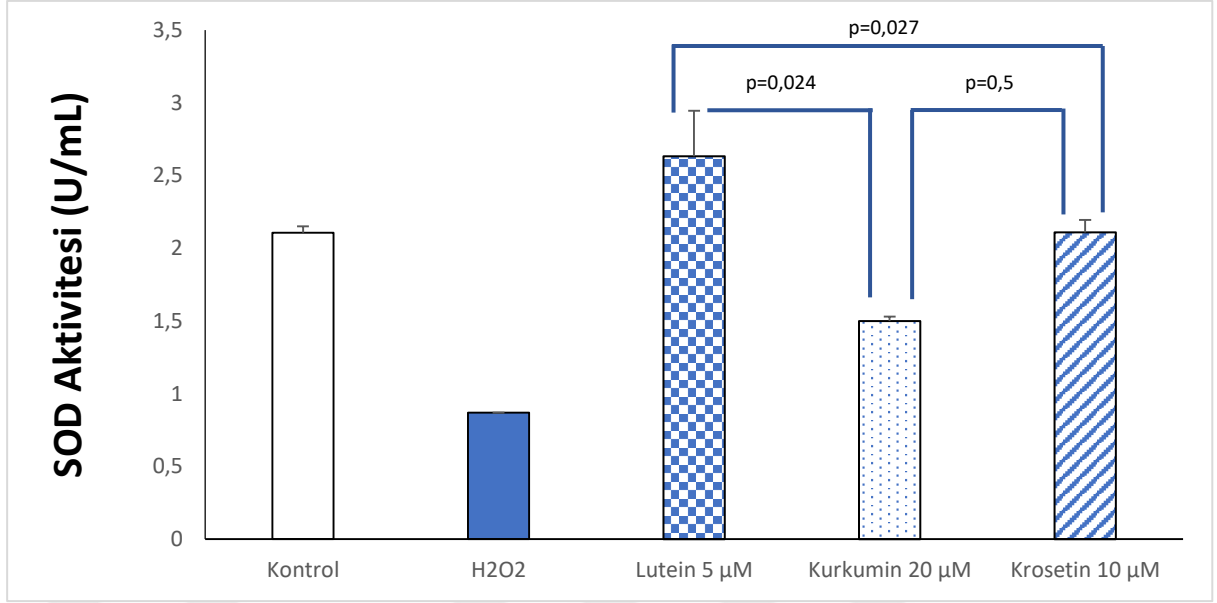
Şekil 19. Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması. 20 ve 40 µm kurkumin uygulanan gruplarda SOD aktivitesi H₂O₂ uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. 80 µm kurkumin uygulanan grupta ise SOD aktivitesi ölçülmesine olanak vermeyecek derecede hücre canlılığının azalmış olduğu görüldü.

Kontrol grubu ile 10,20 ve 40 µm krosetin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında; tedavi verilen gruplarda SOD düzeyi artmış olarak bulundu ancak aralarında anlamlı fark izlenmedi ($p > 0,05$). Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi grupları karşılaştırıldığında; tedavi verilen grupta SOD düzeyi artmış olarak bulundu ve aradaki fark 40 µm krosetin uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p=0,06$), diğer iki grupta anlamlıydı ($p < 0,05$) (Şekil 20)



Şekil 20. Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması. Krosetin uygulanan gruplarda SOD aktivitesi H₂O₂ uygulanan gruba göre artmış olup, 10 ve 20 µM krosetin dozlarında anlamlı olarak yüksek çıkmıştır.

Lutein, kurkumin ve krosetinin en etkin olan dozları karşılaştırılınca bu 3 gruptan SOD aktivitesini en fazla artıran luteinin 5 µM dozu olmuştur. Krosetinin 10 µM dozu, lutein ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup, krosetinin SOD aktivitesini lutein kadar artırmadığı görüldü. Kurkuminin 20 µM dozunun ise diğer iki grupla karşılaştırıldığında SOD aktivitesini artırma oranı diğerlerine göre anlamlı olarak az bulunmuştur (Şekil 21).

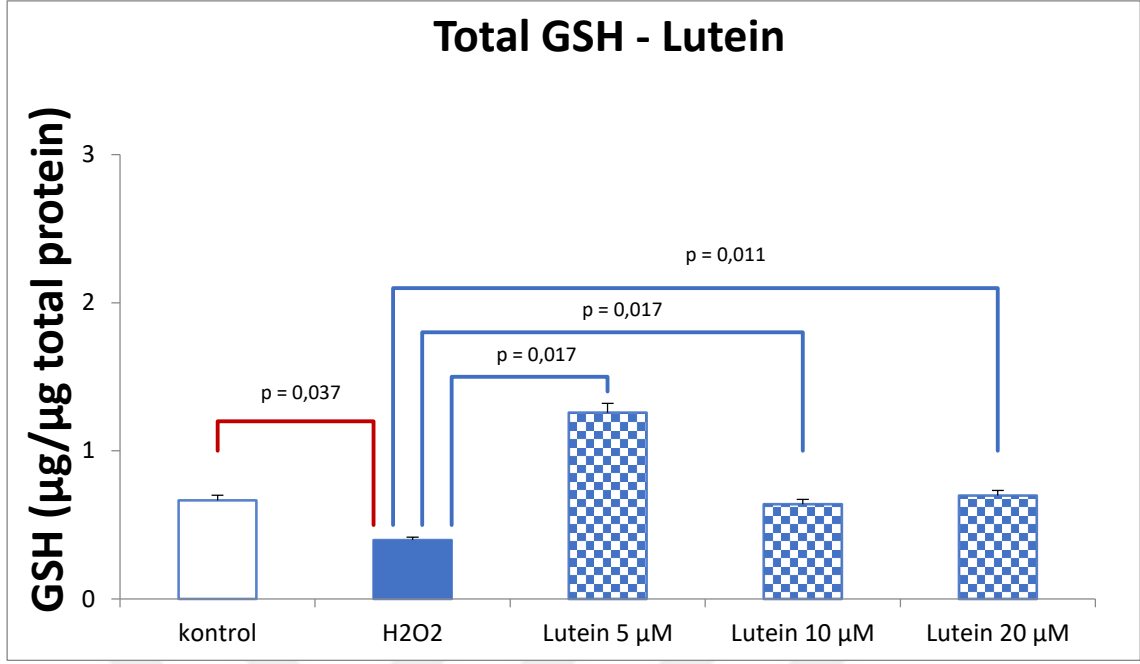


Şekil 21. Süperoksit dismutaz seviyelerinin karşılaştırılması. Lutein, kurkumin ve krosetinin en etkin olan dozları karşılaştırdığında bu 3 gruptan SOD aktivitesini en fazla artıran luteinin 5 µm dozu olmuştur. Krosetinin 10 µm ve kurkuminin 20 µm dozu, lutein ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup, krosetinin SOD aktivitesini lutein kadar artırmadıkları görülmüştür.

4.3.2 Glutatyon (GSH)

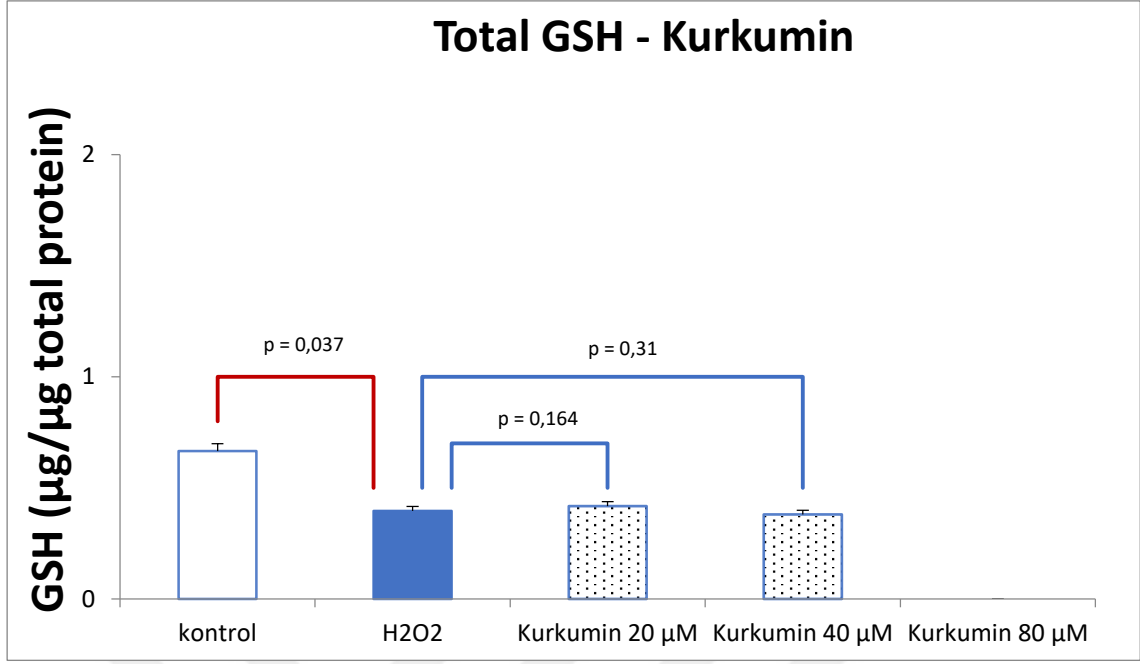
Dokudaki GSH aktivitesinin biyokimyasal analizinde grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, H₂O₂ uygulanan grupta aktivite en düşük olarak değerlendirildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0,05).

Kontrol grubu ile 5,10 ve 20 µm lutein uygulanan gruplar karşılaştırıldığında; tedavi verilen gruplardan 5 ve 20 µm lutein uygulanan gruplarda GSH düzeyi artmış olarak bulundu, bu dozlardan luteinin 5 µm uygulandığı grup ile arasında anlamlı fark vardı (p<0,05). Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi grupları karşılaştırıldığında; tedavi verilen grupta GSH düzeyi artmış olarak bulundu ve aradaki fark bütün lutein dozlarında anlamlıydı (p<0,05) (Şekil 22).



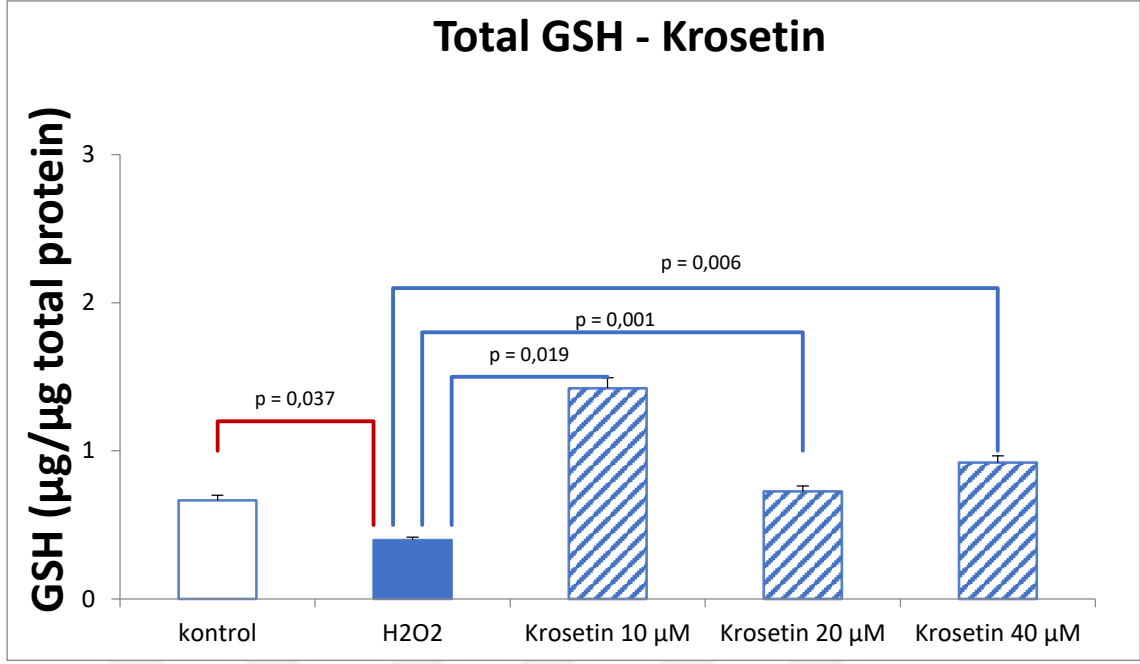
Şekil 22. Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması. H₂O₂ grubunda GSH aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma izlenmiştir. Lutein uygulanan gruplarda GSH aktivitesi, H₂O₂ uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır.

Kontrol grubu ile 20,40 ve 80 µm kurkumin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında; tedavi verilen gruplarda GSH aktivitesinde azalma görülmüş ama bu farkın H₂O₂ uygulanan gruba göre daha az olduğu izlenmiştir. Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi grupları karşılaştırıldığında; tedavi verilen gruplardan 20 ve 40 µm kurkumin uygulananlarda GSH düzeyi artmış olarak bulundu ancak aradaki fark anlamlı değildi (p>0.05). 80 µm kurkumin uygulanan grupta ise GSH aktivitesinin ölçülmesine olanak vermeyecek derecede hücre canlılığının azalmış olduğu görüldü (Şekil 23).



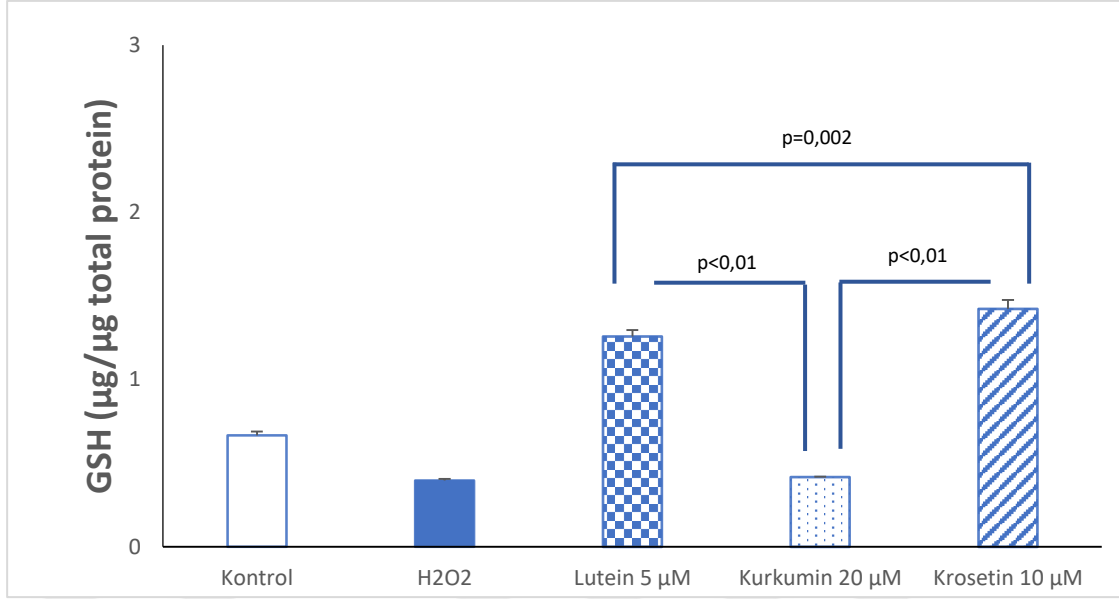
Şekil 23. Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması. Kurkumin uygulanan gruplarda GSH aktivitesi, 20 ve 40 µm kurkumin uygulanan gruplarda H₂O₂ uygulanan grubuna göre yüksek çıkmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. 80 µm kurkumin uygulanan grupta ise GSH aktivitesi ölçülmesine olanak vermeyecek derecede hücreler canlılığının azalmış olduğu görüldü.

Kontrol grubu ile 10, 20 ve 40 µm krosetin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında; tedavi verilen gruplarda GSH düzeyi artmış olarak bulundu, bu dozlardan sadece krosetin 10 µm uygulandığı grup ile arasında anlamlı fark vardı ($p < 0,05$). Hasar modeli oluşturulan grup ile tedavi grupları karşılaştırıldığında; tedavi verilen grupta GSH düzeyi artmış olarak bulundu ve aradaki fark bütün krosetin dozlarında anlamlıydı ($p < 0,05$) (Şekil 24).



Şekil 24. Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması. Krosetin uygulanan gruplarda GSH aktivitesi H₂O₂ uygulanan grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır.

Lutein, kurkumin ve krosetinin en etkin olan dozları karşılaştırılınca bu 3 gruptan GSH seviyesini en fazla artıran krosetinin 10 µm dozu olmuştur. Luteinin 5 µm dozu, krosetin ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup, luteinin GSH seviyesini krosetin kadar artırmadığı görüldü. Kurkuminin 20 µm dozunun ise diğer iki grupla karşılaştırıldığında GSH seviyesini artırma oranı diğerlerine göre anlamlı olarak az bulunmuştur (Şekil 25).

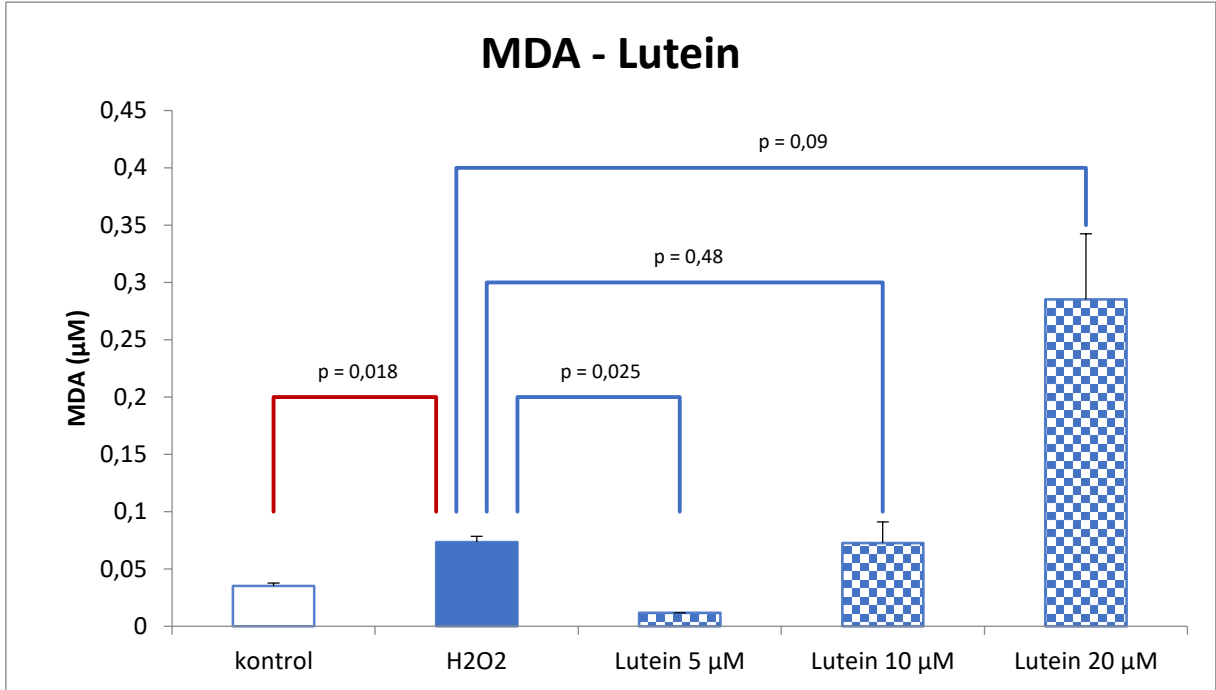


Şekil 25. Glutasyon seviyelerinin karşılaştırılması. Lutein, kurkumin ve krosetinin etkin olan dozları karşılaştırılınca bu 3 gruptan GSH seviyesini en fazla artıran krosetinin 10 µm dozu olmuştur. Luteinin 5 µm ve kurkuminin 20 µm dozu, krosetin ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup, GSH seviyesini krosetin kadar artırmadıkları görüldü.

4.3.3 Malondialdehit (MDA)

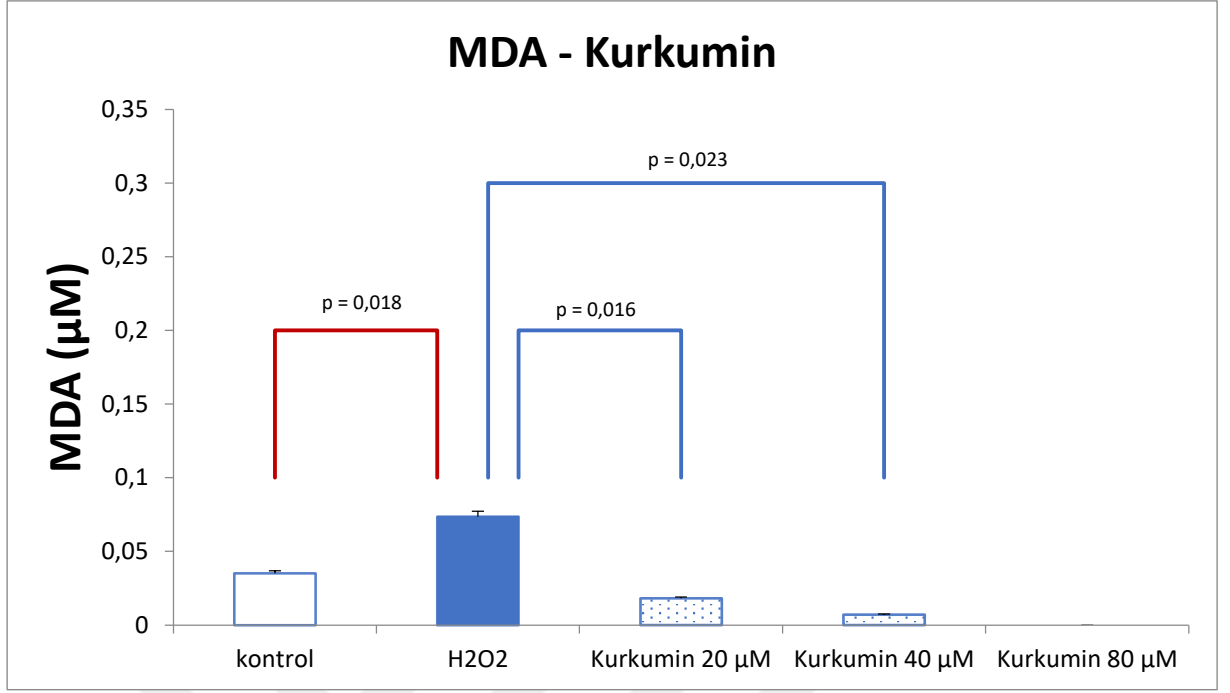
Dokudaki MDA miktarının biyokimyasal değerlendirilmesinde kontrol grubuna göre hasar modeli oluşturulan grupta belirgin artış izlenmiştir ($p<0.05$).

Hasar modeli oluşturularak lutein 5 µm uygulanan grupta MDA düzeyi, hasar oluşturulmuş gruba göre daha düşük bulundu ve bu fark anlamlıydı ($p<0.05$). Lutein 10 µm uygulanan grupta ise hasar modeli ile karşılaştırıldığında MDA düzeyi azalmış olmakta beraber aradaki fark anlamlı değildi ($p=0.48$) (Şekil 26).



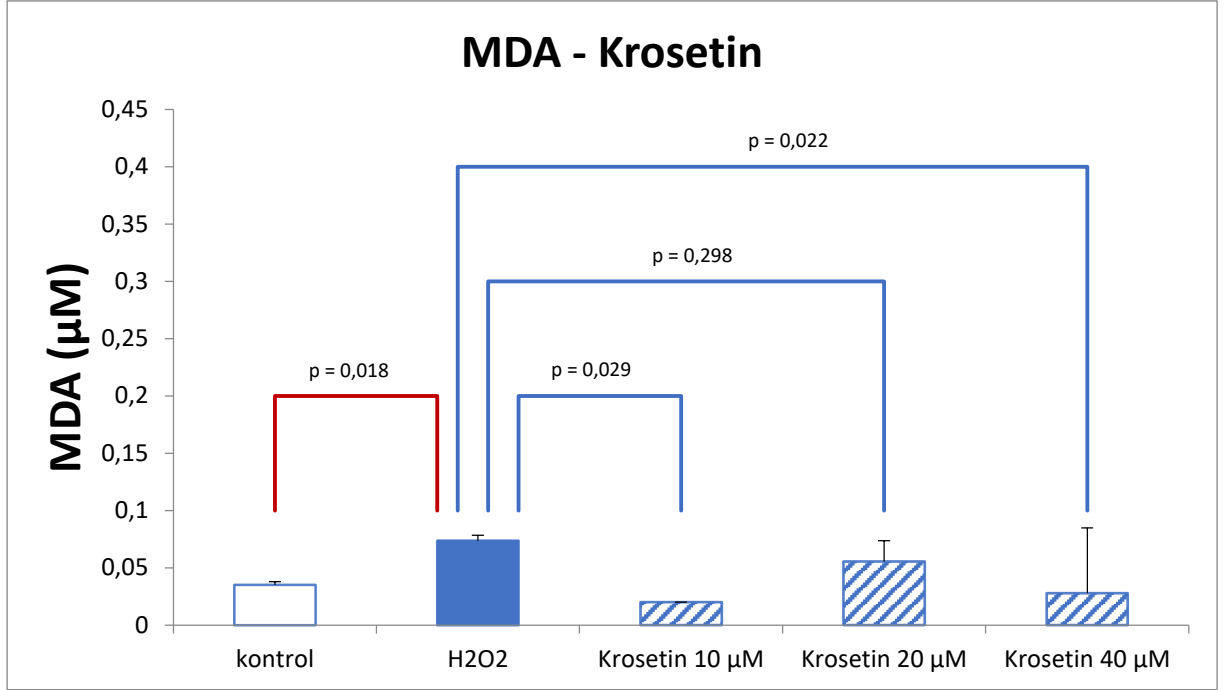
Şekil 26. Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması. H₂O₂ uygulanan grupta MDA seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. 5 μm lutein uygulanan grupta ise hasar grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır.

Hasar modeli oluşturularak kurkumin 20 ve 40 μm uygulanan grupta MDA düzeyi, hasar oluşturulmuş gruba göre daha düşük bulundu ve bu fark anlamlıydı (p<0.05) (Şekil 27)



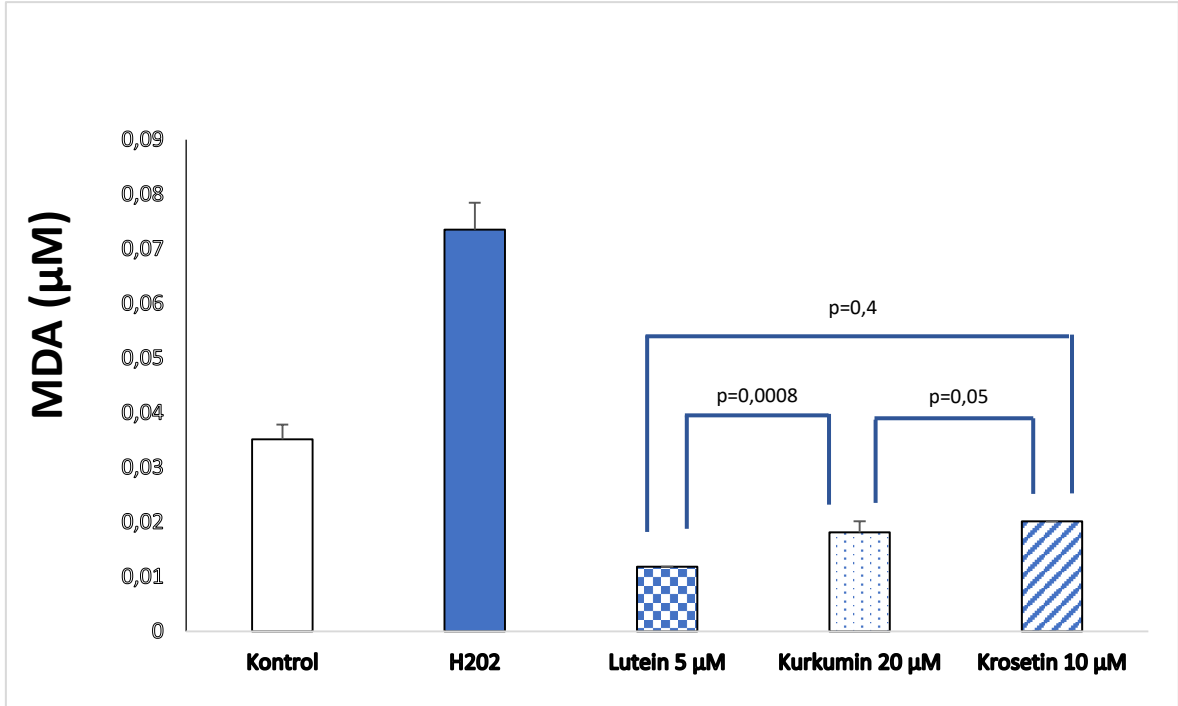
Şekil 27. Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması. 20 ve 40 μm kurkumin uygulanan grupta hasar grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır.

Hasar modeli oluşturularak krosetin uygulanan gruplarda MDA düzeyi, hasar oluşturulmuş gruba göre daha düşük bulundu ve 10 ve 40 μm uygulanan gruplarda bu fark anlamlıydı ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da tedavi gruplarında MDA düzeyleri azalmış olarak bulundu (Şekil 28).



Şekil 28. Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması. Krosetin uygulanan grupta hasar grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyeleri azalmıştır. 10 ve 40 µM uygulanan gruplarda bu azalma istatistiksel olarak da anlamlıydı.

Lutein, kurkumin ve krosetinin en etkin olan dozları karşılaştırılınca bu 3 gruptan MDA düzeyini en fazla azaltan luteinin 5 µm dozu olmuştur. Kurkuminin 20 µm ve luteinin 5 µm dozu karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup luteinin MDA düzeyini kurkuminden daha fazla azalttığı görüldü. Krosetinin 10 µm ve luteinin 5 µm dozu karşılaştırıldığında ise aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olmakla birlikte lutein MDA düzeyini krosetinden daha fazla azalttığı görüldü (Şekil 29).

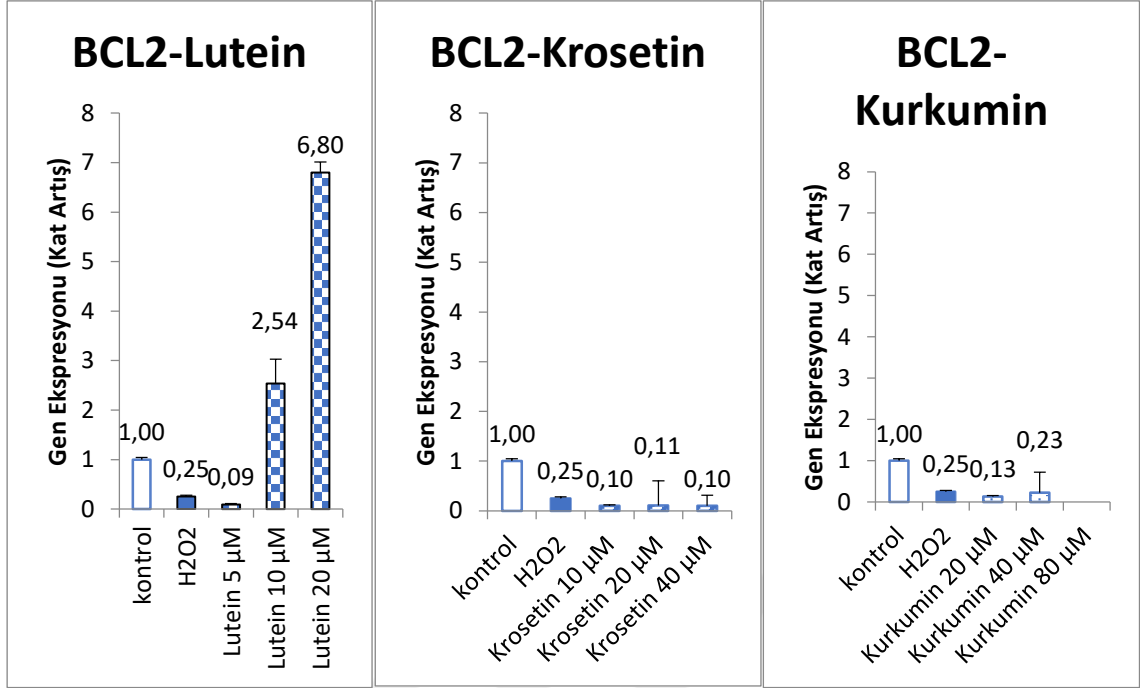


Şekil 29. Malondialdehit seviyelerinin karşılaştırılması. Lutein, kurkumin ve krosetinin en etkin olan dozları karşılaştırılınca bu 3 gruptan MDA düzeyini en fazla azaltan luteinin 5 µm dozu olmuştur. Lutein ile karşılaştırıldıklarında kurkuminin 20 µm dozu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte luteinin MDA düzeyini krosetin ve kurkuminden daha fazla azalttığı görüldü.

4.4 Gen Ekspresyon Analizi

4.4.1 Anti-apoptotik BCL-2 geninin gen ekspresyon analizi

BCL-2 gen ekspresyon analizi değerlendirilmesinde, hasar modeli oluşturulan grupta BCL-2 seviyesinin anlamlı oranda azaldığı görüldü ($p < 0.01$). 10 ve 20 µm lutein uygulanan grupta BCL-2 seviyelerinde anlamlı artış olduğu görüldü; ancak diğer tedavi gruplarında anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Şekil 30).

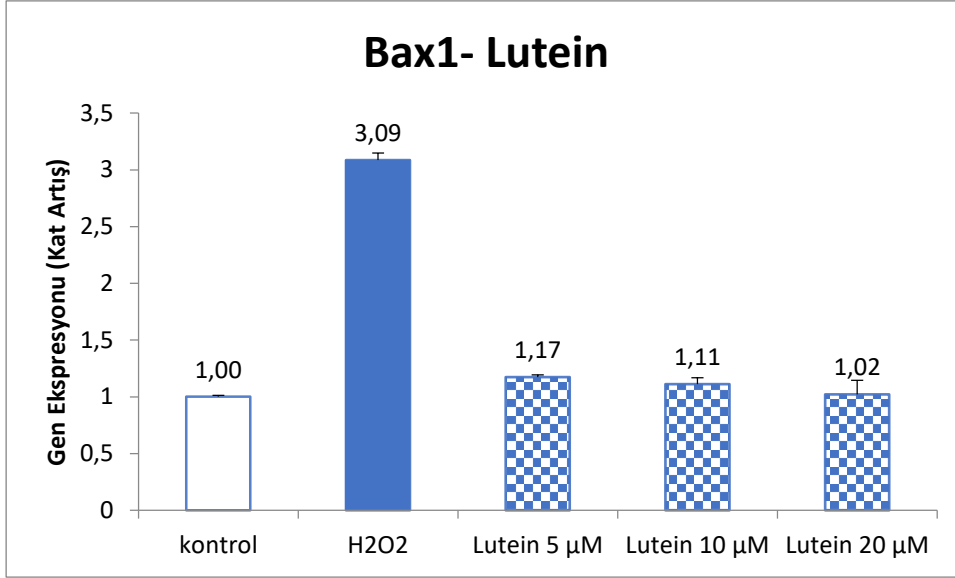


Şekil 30. BCL-2 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması. Hasar modeli oluşturulan grupta BCL-2 seviyesinin anlamlı oranda azaldığı görüldü ($p < 0.01$). 10 ve 20 µM lutein uygulanan grupta BCL-2 seviyelerinde anlamlı artış olduğu görüldü; ancak diğer tedavi gruplarında anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

4.4.2 Pro-apoptotik BAX1 geninin gen ekspresyon analizi

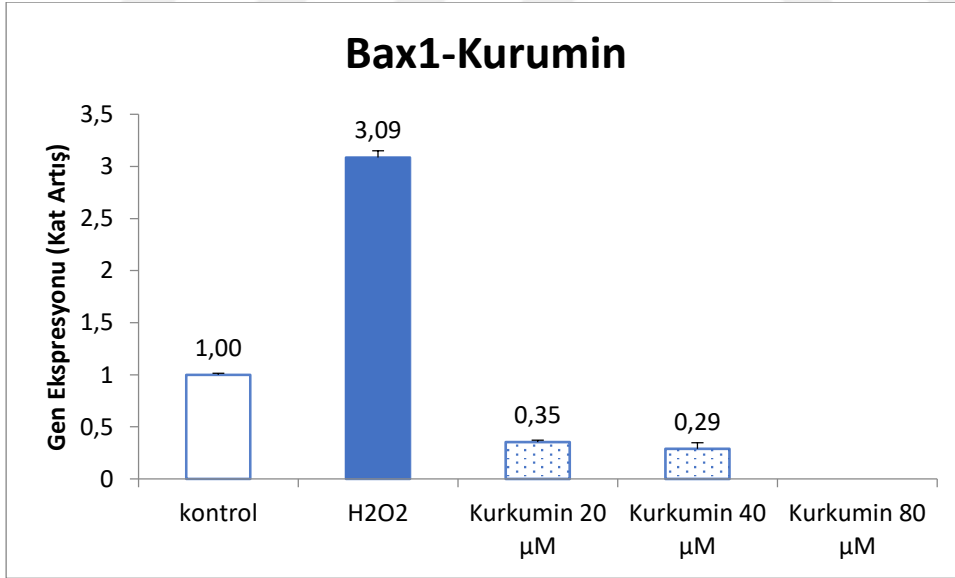
BAX 1 gen ekspresyon analizi değerlendirilmesinde, hasar modeli oluşturulan grupta BAX 1 ekspresyon seviyesinin anlamlı oranda arttığı görüldü ($p < 0.01$).

Lutein uygulanan tedavi gruplarında BAX 1 ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalma olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 31).



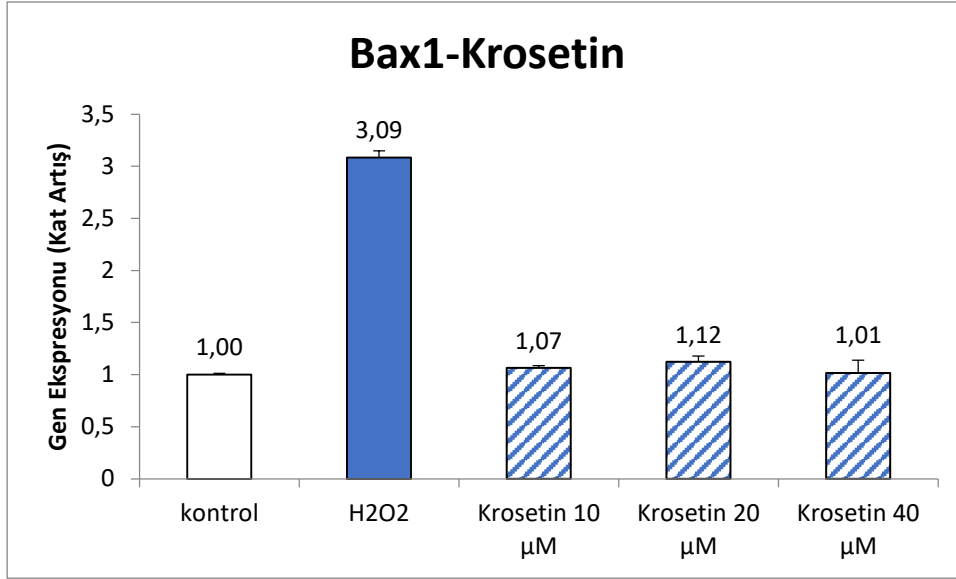
Şekil 31. BAX 1 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.

Kurkumin uygulanan tedavi gruplarında BAX 1 ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalma olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 32).



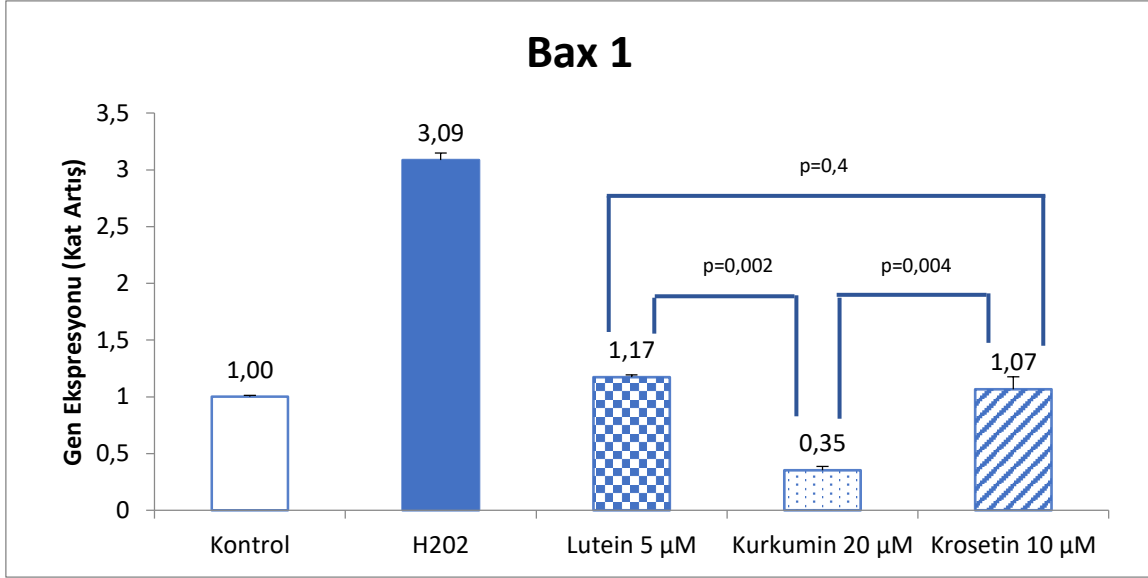
Şekil 32. BAX 1 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.

Krosetin uygulanan tedavi gruplarında BAX 1 ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalma olduğu görüldü ($p<0.01$) (Şekil 33).



Şekil 33. BAX 1 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Lutein, kurkumin ve krosetinin en etkin olan dozları karşılaştırılınca bu 3 gruptan Bax 1 gen ekspresyonunu en fazla azaltan kurkuminin 20 µm dozu olmuştur. Krosetin 10 µm ve luteinin 5 µm dozu karşılaştırıldığında ise aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmayıp bax 1 gen ekspresyonu üzerine olan etkilerinin yakın değerlerde olduğu görüldü (Şekil 34).



Şekil 34. BAX 1 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması. Lutein, kurkumin ve krosetinin en etkin olan dozları karşılaştırılınca bu üç gruptan Bax 1 gen ekspresyonunu en fazla azaltan kurkuminin 20 µm dozu olmuştur.

5.TARTIŞMA

Yaşla Bağlı Maküla Dejenerasyonu (YBMD), makülayı tutan, genetik eğilim ve çevresel faktörlerle ortaya çıkan, prevalansı yaşla artan, ilerleyici, kalıcı santral görme kaybına neden olan ve henüz etkin tedavisi olmayan bir hastalıktır. Kısıtlı tedavi seçenekleri, hastalıktan korunmanın önemini arttırmış ve ciddi halk sağlığı problemi olmasına neden olmuştur.¹ YBMD patogenezinde önemli rol oynayan RPE hücreleri retinanın dış tabakasında bulunup, fotoreseptör hücrelerinin yenilenmesi ve onarımı gibi birçok özelliğe sahiptir.³⁴ RPE hücrelerinde normal fizyolojik işlevin bozulması YBMD'nin patogenezinde en erken bulgulardan biridir.⁵ Artan kanıtlar YBMD'de de, oksidatif strese bağlı RPE de meydana gelen değişikliklerin kritik bir rol oynadığını göstermektedir.⁶ RPE hücreleri, süperoksit radikalleri(O₂-), hidroksil radikalleri (OH-), hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif strese karşı özellikle savunmasızdır.^{8,9,281} ROS'un birçok doku ve hücrede, hücre hasarını ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Araştırmalar, çeşitli antioksidanların ve çinko içeren takviyelerin YBMD ilerlemesini engelleyebileceğini ve görmeyi koruyabileceğini göstermiştir.^{8,9,10} Bu nedenle, oksidatif stresi sınırlandırarak RPE hücrelerini korumak, YBMD hastalarında görme kaybını yavaşlatmak veya muhtemelen tersine çevirmek için etkili bir yaklaşım olabilir. ROS ile indüklenen RPE hücre hasarının önlenmesi, YBMD ilerlemesini engelleyebilir.^{11,12}

Bizim çalışmamızda da oksidatif model oluşturulmak üzere RPE hücreleri H₂O₂ ile muamele edilmiştir. Zhu ve ark.²⁶ RPE hücrelerinde kurkuminin antioksidan etkisine baktıkları çalışmalarında ARPE hücreleri 800 µM H₂O₂ ile 2 saat muamele edilerek oksidatif model oluşturulmuştur. Liu ve ark.²⁸² yaptığı ve luteinin oksidatif stres oluşturulmuş ARPE hücrelerinde, hücre siklusu üzerine etkisinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, 800 µM H₂O₂ ile 24 saat muamele edilerek oksidatif model oluşturulmuştur. Pinteş ve ark.³⁰ yaptığı ve luteinin antioksidan etkisine baktıkları çalışmalarında ARPE hücreleri 500 µM H₂O₂ ile 1 saat muamele edilerek oksidatif model oluşturulmuştur. Bizim çalışmamızda da ARPE-19 hücrelerinin, hücre canlılığını %50 oranında azaltan doz, 1 saat süre ile 800 µM H₂O₂'e maruz bırakılan doz olup, etkin doz olarak belirlenmiştir.

Biz bu çalışmamızda; RPE hücrelerinde oksidatif hasar oluşturduktan sonra, daha önceki çalışmalardan antioksidan etkileri olduğu bilinen lutein, kurkumin ve krosetinin RPE hücrelerindeki antioksidan etkilerini ve apoptoz üzerine olan etkilerini değerlendirdik. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla daha önce bu üç biyoaktif molekülün etkilerini karşılaştıran çalışma yapılmamış olup, bu çalışmamızda antioksidan ve apoptoz üzerine olan etkilerini karşılaştırmayı da amaçladık.

Luteinin, YBMD progresyonu üzerindeki etkisini araştıran birçok klinik çalışma mevcuttur. Yaşa Bağlı Göz Hastalığı Çalışması (AREDS), farklı besin alımı ve YBMD ilerlemesi arasındaki ilişkiyi araştıran en önemli büyük ölçekli klinik çalışmalardan biridir. 2000 yılında yayınlanan ilk AREDS çalışması, her gün ağızdan alınan bir besin takviyesi kombinasyonunun (500 mg C vitamini, 400 IU E vitamini, 2 mg bakır, 80 mg çinko ve 15 mg-karoten) geç YBMD'ye ilerlemeyi %25 oranında azalttığını göstermiştir.²⁸³ Ancak daha sonra β -karotenin sigara içenlerde akciğer kanseri riskini artırabileceği keşfedildiğinden, 2013 yılında yayınlanan AREDS2, lutein ve zeaksantin eklerken β -karoteni kaldırarak formülünü değiştirmiştir. Geç YBMD'ye ilerleme riski, önceki formülle karşılaştırıldığında daha fazla azalmamış olsa da, β -karotenin uzaklaştırılması ve lutein ve zeaksantin eklenmesi, sigara içenler için ek riskler oluşturmadan benzer koruyucu etkiler göstermiştir.¹⁴² Diğer vaka kontrol çalışmaları da YBMD' de lutein alımının yararlı etkilerini destekler niteliktedir. Neovasküler YBMD için 0.65, atrofik YBMD için 0.45 ve büyük veya yaygın orta drusen için 0.73 olan olasılık oranı ile diyetle lutein alımının farklı tipte YBMD riskiyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu tahmin edilmektedir.¹³⁰ Dahası, Blue Mountains Eye Study 2000'den fazla Avustralyalı'nın beslenme alışkanlığını analiz eden ve YBMD'nin görülme sıklığını araştırmak için onları takip eden bir çalışmadır. Sonuçlar, lutein ve zeaksantin tüketiminin fazla olduğu bireylerde, neovasküler YBMD'de düşük tüketime sahip olanlara kıyasla %65 oranında azalma olduğunu göstermektedir.¹³⁶

Lutein Antioxidant Supplementation Trial II (LASTII) ve Lutein Intervention Study Austria (LISA), YBMD progresyonunda etkisi olduğu kanıtlanmış bir gösterge olan MPOD (maküler pigmet optik dansitesi)'un lutein takviyesi üzerine arttığını ancak takviye olmadan azaldığını göstermiştir. Artış en çok düşük başlangıç MPOD'si olan denekler arasında belirgindir.^{284,285} The Combination of Lutein Effects in the Aging Retina

(CLEAR) çalışması da benzer sonuçlar bildirmiş ve ayrıca yaşlanma sırasında yüksek bir MPOD'un görme keskinliğinde azalmayı geciktirdiğini belirtmiştir.²⁸⁶

Diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan in vivo çalışmalar, lutein ve zeaksantin diyabet kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkilerini de desteklemektedir. Lutein ile desteklenen diyabetik farelerin daha düşük malondialdehit değerleri sergilediği ve hem retina hem de hipokampus için glutatyon konsantrasyonu ve glutatyon peroksidaz aktivitesini kontrol seviyesine yükselttiği gözlemlenmiştir.²⁵⁶

Luteinin ayrıca iskemiye bağlı sıçan retinasında nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve siklooksijenaz-2'nin (COX-2) ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.²⁵⁷ Son zamanlarda, lutein ve dokosaheksaenoik asidin, lipid peroksidasyonunu azaltarak ve azaltılmış glutatyon ve glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırarak farelerde diyabetik serebral korteksin oksidatif değişikliklerini azaltabildiği gösterilmiştir.²⁵⁸

A.Pintea ve ark.³⁰ yaptığı çalışmada kültür ortamındaki lutein ve zeaksantin takviyesinin, hidrojen peroksitin neden olduğu akut oksidatif strese maruz kalan hücrelerde canlılığı artırarak RPE hücrelerini koruduğunu göstermişlerdir. Bazal ve uyarılmış oksidatif stres koşullarında antioksidan enzimlerin aktivitesini, glutatyon konsantrasyonunu, lipid peroksidasyon seviyesini ve hücre içi ROS oluşumunu belirleyerek, lutein ve zeaksantin RPE hücrelerinin antioksidan durumu üzerindeki etkisini in vitro olarak değerlendirmişler ve ksantofil tedavisinin oksidatif strese maruz kalan RPE hücrelerinde GSH-Px ve SOD aktivitelerinde ve GSH konsantrasyonunda anlamlı bir artış saptadığını, ancak katalaz aktivitesi üzerinde aynı etkiye sahip olmadığını göstermişlerdir .

Biz de çalışmamızda oksidatif hasar oluşturulmuş RPE hücrelerinden, AREDS formülünde de olduğu bilinen lutein ile tedavi edilen grupta GSH, SOD düzeyi artarken, bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinin azaldığını gözlemledik. Bu durum luteinin oksidatif hasarı azaltıcı etkisini doğrulamaktadır. Yine luteinin pro-apoptotik gen olan bax ekspresyonunu azaltarak ve anti-apoptotik gen olan Bcl-2 ekspresyonunu ise arttırarak apoptozu inhibe ettiğini, oksidatif stresin neden olduğu hücre ölümünü de engellemiş olduğunu gözlemledik.

Antioksidan ve apoptoz üzerine etkilerini incelediğimiz moleküllerden bir diğeri olan kurkuminin, kronik hastalıklar, enflamatuar bozukluklar, enfeksiyonlar ve diğer patolojik

durumlar da dahil olmak üzere çeşitli bozuklukları tedavi etmek için kullanılabilirdiği bildirilmiştir.²⁶³ Jat ve ark.¹⁹ yaptığı bir araştırmada, kurkumin'in güçlü antioksidatif etkilere sahip olduğu ve lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu ve mitokondriyal geçirgenlik artışına karşı koruduğu gösterilmiştir. Kurkumin'in çeşitli hayvan modellerinde lipid peroksidasyonu dahil oksidatif hasarı inhibe ettiği gösterilmiştir.²⁶⁴

Lin ve ark.²⁸⁷ domuz gözlerindeki trabeküler ağ hücrelerinde (TMC'ler) kurkuminin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada; 20 µM kurkumin konsantrasyonunun, H₂O₂ ile muamele sonucu oksidatif stres oluşturulan TMC'ler üzerinde etkili olduğunu bulmuşlardır. Bunu; IL-6, endotelyal-lökosit yapışma molekülü 1 (ELAM-1), IL-1a ve IL-8'in ekspresyonunda bir azalma ile sağladığını ileri sürmüşlerdir. Benzer başka bir çalışmada Luo ve ark.²⁸⁸ aynı hücre hattında ve yine oksidatif stres indükleyicisi olarak H₂O₂ kullanılarak, kurkuminin, H₂O₂ ile muamele edilmiş TMC'lerde ECH ile ilişkili protein 1 (Nrf2-Keap1) sinyal yolu gibi nükleer solunum faktörü 2-Kelch'i aktive ettiğini bulmuştur. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda kurkumin kullanımının sadece apoptozu değil, aynı zamanda TMC'ler üzerindeki nekrozu da engellediğini fark etmişlerdir.

Wang ve ark.²⁶⁶, kurkuminin normal yağ dokusu hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini inhibe ederek lipolizi inhibe ettiğini ve hepatik insülin direncini önlediğini in vivo olarak göstermişlerdir. Kowluru ve Kanwar²⁸⁹ yaptıkları çalışmada diyabetik ratlarda 6 hafta boyunca kurkumin uygulaması sonrası (0,5 g/kg) enflamatuar belirtiçlerin azaldığını ve glutasyon seviyesinin arttığını ve antioksidan etkisini göstermişlerdir. Mandal ve ark.²⁹⁰ kurkumin ile beslenen Wistar sıçanlarının (2000 ppm) retinalarında enflamatuar genlerin ekspresyonunda önemli farklılıklar bulmuştur. Retina hücrelerinin korunmasının sebebi olarak, NF-κB üzerindeki süpresyonunun etkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca, kurkuminin retina hücre hatları 661W ve ARPE-19 kullanarak in vitro oksidatif stres aracılı hasara karşı koruyucu etkisini de incelemişler ve erken büyüme yanıtı protein 1 (EGR1) ve hücreler arası adhezyon molekülü 1 (ICAM1) ekspresyonunda bir azalma ve hem oksijenaz 1 (HMOX1), tioredoksin (Trx-1) ve Nrf2 ekspresyonundaki artışı sağlayarak etkili olduğunu göstermişlerdir.

Kurkuminin yüksek glikoz hasarına karşı ARPE-19 hücreleri üzerindeki koruyucu etkisini inceleyen Bucolo ve ark.²⁹¹ kurkumin uygulamasının doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını arttırdığını ve bunu hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK1/2)

yolunun modülasyonunu, nükleer solunum faktörü 2 (Nrf2) ekspresyonunu ve HO-1 aktivitesini arttırarak yaptığını göstermişlerdir. Ayrıca kurkumin süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve S-glutatyon transferazı kodlayan genlerin aktivasyonu yoluyla enzimatik antioksidan tepkimeleri aktive edebilmektedir.²⁶⁵

Zhu ve ark.²⁶ yaptıkları çalışmada H₂O₂ ile oksidatif model oluşturulmuş ARPE-19 hücrelerinde kurkuminin etkisini değerlendirmiş ve kurkuminin uygulamasının hücre canlılığını arttırdığı ve oksidatif markerlardan superoksit dismutaz ve glutatyon seviyelerini arttırıp, malondialdehit seviyesini azaltarak antioksidan etki gösterdiğini kanıtlamışlardır.

Bizim çalışmamızda da H₂O₂ ile oluşturulmuş oksidatif modelde kurkumin uygulamasının hücre canlılığı ve proliferasyon üzerine etkisinin 20 µM da en iyi olup bundan sonra artan dozlarda hücre canlılığına ve proliferasyona olumsuz etki gösterdiği tespit edilmiştir. Artan dozlarda hücre proliferasyonu üzerine olan olumsuz etkisinin apoptozu indüklemesi sebebiyle olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bulgudan yola çıkarak kurkuminin hücre canlılık ve proliferasyon üzerine etkili olan doz aralığının dar aralıkta olup doz ayarlamasının dikkatli yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızda; kurkumin superoksit dismutaz ve glutatyon seviyelerini arttırıp, malondialdehit seviyesini azaltarak antioksidan etki göstermiştir. Kurkumin yüksek dozlarda ise hücre canlılığını olumsuz yönde etkilediğinden, yüksek dozlarda antioksidan enzim aktivitesini değerlendirmek mümkün olmamıştır. Kurkuminin malondialdehit seviyesini azaltma etkisi belirgin olup, bu veriler bize kurkuminin lipid peroksidasyonunu önemli oranda azaltıyor olduğunu düşündürmektedir.

Etkisini araştırdığımız bir diğer ajan olan krosetinin de antioksidan etkisini belirten yayınlar olmakla birlikte RPE hücrelerinde antioksidan ve apoptoz üzerine olan etkisi değerlendirilmemiştir. Krosetin, antioksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir.^{277,292} Krosetin'in, serbest radikalleri azaltma, GSH S-transferaz ve GSH peroksidaz gibi antioksidan enzimleri aktive etme, lipid peroksidasyonunu baskılama ve plazma gibi sıvılar yoluyla oksijen yayılmasının arttırılması gibi güçlü antioksidan etkiler sergilediği gösterilmiştir.²⁹³⁻²⁹⁵

Higashino ve ark.²⁹⁶ hipertansif erkek sıçanlarda 3 hafta boyunca oral krosetinin (günde 25 veya 50 mg / kg) uygulanmasının kardiyoprotektif etkilerini inceledikleri çalışmada, tedaviden sonra idrarda oksidatif stres (DNA hasarı) belirteci olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) ve NO metabolitleri nitrit/nitrat seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Zheng ve Qian²⁹³, sıçanlarda norepinefrinin neden olduğu kardiyak hipertrofiye karşı krosetinin antioksidan özelliklerini değerlendirmiş ve 15 gün boyunca 25 ve 50 mg/kg dozda intraperitoneal olarak uygulanan krosetin ile tedavi edilen grubun, kalp dokusunda lipid peroksidasyonunda bir azalma ve endojen antioksidan enzimatik aktivitelerde (SOD ve GSH-Px) bir artış olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma, krosetinin antioksidan enzimatik aktivitelerin modülasyonu ve ROS ile ilgili mekanizmaların etkilerini sınırlayarak, kardiyovasküler hasarları iyileştirebilecek kardiyoprotektif etkisini göstermiştir. Yoshino ve ark.³⁴ krosetinin, oksidatif stres modeli olan hipertansif erkek sıçanların beyinde ROS'un neden olduğu oksidatif stresi azalttığını göstermiştir. Krosetinin (100 mg/kg) oral uygulamasından sonra, kontrol ile karşılaştırıldığında, krosetinin hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türevlerinin temizleyicisi olarak, tedavi edilen sıçanların beyinde kontrol grubuna göre oksidatif hasarı azalttığı ve antioksidan özellik sergilediği gösterilmiştir. Bu nedenle, bu bulgular krosetinin antioksidan kapasitesi nedeniyle nöronal bozukluklara koruyucu etkiler sağlayabileceğini göstermektedir.

Bir diğer in vivo çalışma, krosetinin nöroprotektif etkilerine odaklanmıştır. Khan ve ark.²⁹⁷ streptozotosinin neden olduğu bilişsel bozukluğu olan erkek albino sıçanlarda nörodejeneratif bozukluklarda oksidatif strese karşı bazı doğal antioksidanlar (Nardosatchys jatamansi ve sodyum selenit köklerinin özleri) ile birlikte krosetinin etkilerini inceledikleri çalışmada, 15 günlük tedavi (krosetin 25 mg / kg, po) sonrası, kontrol grubuna kıyasla sıçan hipokampus ve frontal korteksinde, lipid peroksidasyonunu (MDA seviyeleri) önemli ölçüde azaltan ve GSH seviyelerini ve antioksidan enzimlerden, GSH-Px, CAT aktivitesini önemli ölçüde arttıran sinerjik bir etki göstermiştir. Böylece, krosetin içeren bu kombinasyonun, nörodejenerasyona karşı koruyucu bir etki sağlayabileceği ileri sürülmüştür.

Venkatraman ve ark.²⁹⁸ krosetinin akciğerlerdeki oksidatif strese karşı antioksidan etkisini ve benzopirenin neden olduğu mitokondriyal hasara karşı etkilerini

araştırmışlardır. Erkek albino farelerde 18 hafta intraperitoneal olarak (20 mg/kg) krosetin uygulandıktan sonra, akciğerde ROS, lipid peroksitler, GSH seviyeleri ve ATPaz ve mitokondriyal enzimlerin aktiviteleri değerlendirilmiştir. Tedaviden sonra sonuçlar, kontrol grubuna kıyasla krosetin'in ATPaz ve mitokondriyal enzim aktivitelerini ve GSH düzeylerini artırdığını, ROS üretimini azalttığını ve lipid peroksitleri normalleştirdiğini ortaya koymuştur.

Magesh ve ark.²⁹⁹ akciğer kanseri taşıyan erkek albino farelerde 4 hafta boyunca intraperitoneal krosetinin (20 mg/kg) uygulamasını değerlendikleri çalışmada, kontrol grubu ile kıyaslandığında tedavi edilen farelerin akciğer ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyon seviyelerinde bir düşüş ve antioksidan enzimlerin (SOD, CAT ve GSH-Px) ve GSH metabolize edici enzimlerin (GR ve GST) aktivitelerinde bir artış göstermiştir. Krosetinin bu antioksidan etkisi nedeniyle detoksifikasyon işlemlerinde, potansiyel bir kemoterapötik ajan gibi kullanılabilceğini ve akciğer bozukluklarının tedavisinde faydalı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Yang ve ark.³⁰⁰ krosetinin farelerde akut akciğer hasarı üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada; krosetin intragastrik olarak uygulanmış (50 ve 100 mg/kg) ve tedaviden sonra sonuçlar, bu biyoaktif bileşiğin oksidatif stres indekslerini kontrol grubuna göre azaltarak akut akciğer hasarına karşı koruyabildiğini göstermiştir. Akciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini önemli ölçüde azaldığı ve SOD aktivitesini farelerin akciğerinde önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir.

Ishizuka ve ark.³² yaptıkları çalışmada, krosetinin erkek farelerde nöronal hücre ölümüne yol açan retinal iskemik hasarı inhibe etme etkisini araştırmış ve 4 gün boyunca krosetinin (günde iki kez 20 mg/kg vücut ağırlığı) oral uygulanmasının, kısmen antioksidan özelliklerinden dolayı retinal iskemik hasara karşı koruyucu bir etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Krosetinle tedavi edilen grupta, oksidatif stres azalmıştır. Retinadaki 8-OHdG ekspresyonu, kontrol grubundakinden önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Ayrıca krosetin, oksidatif stresin neden olduğu retina hücre ölümünde önemli rol oynayan MAPK ve redoksa duyarlı transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonunu önlemiş ve anti-apoptotik özellik göstererek retina hücre ölümünü inhibe etmiştir.

Karimi ve ark.³⁷ ARPE-19 hüclerinde TBHP (tert-bütül hidroperoksit)'nin neden olduğu oksidatif strese karşı korumada krosetin ile ön tedavinin çok önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, TBHP ile muamele edilmiş ARPE-19 hücrelerinin krosetin

ile ön tedavisinin, mitojen aktive edilmiş protein kinaz (MAPK- mitogen-activated protein kinase) sinyal kaskadı üyesi olan hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz (ERK- extracellular signal-regulated kinase) yolunun aktivasyonu yoluyla membran bütünlüğünün yanı sıra, mitokondriyal solunum ve glikolitik yol dahil olmak üzere metabolik fonksiyonları olumlu etkilediğini göstermişlerdir. Krosetin ön tedavisi, lipid peroksidasyonundan, hücre zarı hasarından ve sitozolik içeriklerin salınmasından, ZO1 ekspresyonunun kaybından ve hücre iskeleti bozukluğundan korunmaya neden olmuştur. Dahası, piknotik çekirdeklerin sayısındaki azalma ve hücre içi ATP seviyelerindeki artış, hücre ölümüne karşı korumanın göstergesi olmuştur. Özetle krosetin ile ön işlem, ARPE19 hücrelerini, hücresel enerji üretim yollarının korunması ve ERK1/2 yollarının aktivasyonu yoluyla LDH salınımı, ATP tükenmesi, hücre iskeleti kaybı ve nükleer yoğunlaşma dahil olmak üzere TBHP'nin neden olduğu oksidatif stres özelliklerinden korur.

YBMD hastalarında AREDS tedavisi ve safran tedavisi üzerine yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, safranla tedavi edilen YBMD hastalarında görsel fonksiyon sabit kalmış ve AREDS grubunda kötüleşmiştir şeklinde raporlanmıştır. Her iki grup arasındaki fark, AREDS'de bileşenlerin yalnızca antioksidan olması, safranın antioksidan kapasitesine ek olarak anti-inflamatuar özellikleri gibi başka etkilere sahip olmasıdır ve bu çalışma, saf antioksidan takviyesine kıyasla safran tedavisinin yararını desteklemektedir şeklinde yorumlanmıştır.³⁰¹ Jia ve ark.³⁰² safranın başka bir bileşeni olan krosinle yaptığı çalışmada H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşturulan ARPE-19 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artan ROS seviyesinin, krosin ile maruziyeti sonucu önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, H₂O₂'nin SOD aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğünü, krosinin ise ARPE19 hücrelerinde SOD aktivitesinde H₂O₂ kaynaklı azalmayı önlemiştir. Tersine, H₂O₂ ile muameleden sonra, MDA aktivitesi, kontrol seviyelerine kıyasla artmıştır. Bununla birlikte, H₂O₂ maruziyeti sonrası krosin ile ön muamele, ARPE-19 hücrelerinde MDA seviyesini önemli ölçüde inhibe etmiştir.

Bizim çalışmamızda da H₂O₂ ile oluşturulmuş oksidatif modelde krosetin uygulamasının hücre canlılığı ve proliferasyon üzerine anlamlı etkisinin olduğu ve bu etkinin 10 µM da en iyi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda; krosetin, superoksit dismutaz ve glutatyon seviyelerini arttırıp, malondialdehit seviyesinin azaltarak antioksidan etki göstermiştir.

Antioksidan etkileri yönünden bu üç biyoaktif molekülünden; lutein ile kurkumin karşılaştırıldığında, antioksidan etkisi bilenen kurkuminin, GSH ve SOD u arttırmada lutein kadar etkin olmadığını gözlemledik. Krosetinle luteini karşılaştırdığımızda ise, krosetinin glutasyon seviyesinde yaptığı artış, luteinle kıyaslandığı zaman anlamlı olarak yüksek bulunmuş, SOD aktivitesi üzerinde yaptığı artış ise luteindeki artışa yakın ve anlamlı bulunmuştur. Daha önceki çalışmalardan RPE hücreleri üzerinde antioksidan etkisi bilinen kurkumin ile, RPE hücreleri üzerindeki antioksidan etkisine dair çalışma olmayan krosetinin etkilerini karşılaştırdığımızda, SOD ve GSH aktivitesinin krosetin uygulanan grupta daha kurkumine göre daha fazla artmış olduğunu gözlemledik. Ayrıca krosetinin, luteine benzer antioksidan etki göstermesi nedeniyle YBMD progresyonunu yavaşlatmada alternatif bir tedavi olabileceğini ve lutein ile adjuvan kullanımının birbirlerinin etkilerini potansiyelize edip etmeyeceği yönünde in-vivo deneyler ve ardından insanlar üzerinde yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Emoto ve ark.³⁰³ kurkuminin, bir Sprague-Dawley sıçan modelinde ROS indükleyici bir etkiye sahip olan metil-N-nitrosourea (MNU) tarafından indüklenen fotoreseptör apoptozuna karşı etkisini incelemişlerdir. MNU uygulamasından üç gün önce 100 veya 200 mg / kg kurkumin dozları enjekte edilmiştir. 200 mg/kg kurkumin ile tedavi edilen grupta hücre sağkalımı, diğer MNU ile tedavi edilen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha iyiydi. Oksidatif DNA hasarı ile ilgili olarak, 8-hidroksi-2'-deoksiganosin seviyeleri ölçüldü ve 200 mg/kg kurkumin üzerindeki seviyeler, kontrol grubuna benzer olarak bulunmuş, böylece kurkuminin oksidatif hasar üzerindeki etkisini göstermişlerdir. Son olarak, MNU uygulamasından sonra, kurkumin kullanıldığında apoptotik hücre miktarı da istatistiksel olarak azalmıştır. Zhu ve ark.²⁶ yaptığı çalışmada, kurkuminin H₂O₂ ile oksidatif model oluşturulan ARPE-19 hücreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve kurkuminin apoptoz üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada kurkumin apoptotik olan bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu azaltırken, anti-apoptotik olan Bcl-2 ekspresyonunu artırmıştır.

Bizim çalışmamızda da kurkuminin pro-apoptotik gen olan bax gen ekspresyonunu azaltarak apoptoz üzerine etki gösterdiği, ancak anti-apoptotik gen olan Bcl-2 üzerine etkisi olmadığını gözlemledik. Bu sonuçlar bize kurkuminin apoptozu p53 gibi farklı bir yolak üzerinden etkilemiş olabileceğini düşündürdü.

İntravitreal N-metil-D-aspartat enjeksiyonu ile indüklenen bir retina hasarı oluşturulan deneysel fare modelinde, oral krosetin uygulaması kısmen kaspazları inhibe ederek ve dolayısıyla retina ganglion hücrelerinin apoptozunu azaltarak retina bozukluğunu azaltmıştır.³⁰⁴ Işıkla indüklenen retina hasarı oluşturulmuş bir kemirgen modelinde, krosetinin oral uygulamasının flaş elektoretinogramın hem a-dalgası hem de b-dalgası genliklerinde azalmayı önlediği; ayrıca retina dış nükleer tabakasındaki TÜNEL+ hücrelerinin sayısını azalttığı ve bu tabakanın kalınlığında azalmayı inhibe ettiği gösterilmiştir. Krosetinin, retina hasarından sonra kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerindeki artışı baskılayarak fotoreseptör apoptozunu azaltabileceği gösterilmiştir. 3 µM konsantrasyondaki krosetinin, tunikamisin ve H₂O₂ ile indüklenen retinal ganglion hücre ölümüne karşı %50-60'a kadar inhibitör etki gösterdiği gösterilmiştir ve aynı zamanda kaspaz-3 ve -9 aktivitelerini de arttırmıştır.³⁰⁵

Bizim çalışmamızda krosetinin pro-apoptotik gen olan bax gen ekspresyonunu azaltarak apoptoz üzerine etki gösterdiği, ancak anti-apoptotik gen olan Bcl-2 üzerine etkisi olmadığını gözlemledik. Bu sonuçlar doğrultusunda kurkuminin apoptozu p53 gibi bax gen ekspresyonun etkileyen farklı bir mekanizma üzerinden etkilediğini düşündürdü.

Apoptoz üzerine etkileri yönünden bu üç biyoaktif molekülünden; üçünde Bax ekspresyonunu azalttığını ve kurkuminin daha etkin olduğunu gözlemledik. Ancak kurkuminin artan dozlarında hücre proliferasyonu üzerindeki olumsuz etkisi, artmış kurkumin dozlarının apoptozu indüklüyor olabileceğini düşündürmüştür. Lutein ile krosetini karşılaştırdığımızda ise, krosetinin Bax ekspresyonunda yaptığı azalma luteindeki azalmaya yakın ve anlamlı bulunmuştur. Ancak BCL-2 ekspresyonu üzerine etkilerine baktığımızda ise sadece luteinin Bcl-2 ekspresyonunu arttırdığı, kurkumin ve krosetinin Bcl-2 üzerine etkisinin anlamlı olmadığını ve apoptoz üzerindeki etkilerini luteinden farklı bir mekanizma ile gösterdiğini düşündürmüş olup bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

YBMD patogenezinde önemli rol oynayan RPE hücrelerinde normal fizyolojik işlevin bozulması YBMD'nin patogenezinde en erken bulgulardan biridir. Artan kanıtlar YBMD'de de, oksidatif strese bağlı RPE dejenerasyonun kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle, oksidatif stresi sınırlandırarak RPE hücrelerini korumak, YBMD hastalarında görme kaybını yavaşlatmak veya muhtemelen tersine çevirmek için etkili bir yaklaşım olabilir. ROS ile indüklenen RPE hücre hasarının önlenmesi, YBMD ilerlemesini engelleyebilir.

Daha önceki çalışmalardan antioksidan etkileri olduğu bilinen lutein, kurkumin ve krosetinin RPE hücrelerindeki antioksidan etkilerini ve apoptoz üzerine olan etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmamızda; kurkumin, superoksit dismutaz ve glutatyon seviyelerini arttırıp, malondialdehit seviyesinin azaltarak antioksidan etki göstermiştir. Kurkuminin malondialdehit seviyesini azaltma etkisi belirgin olup, lipid peroksidasyonunu önemli oranda azaltıyor olduğunu düşünmekteyiz. Aynı zamanda kurkuminin pro-apoptotik gen olan bax gen ekspresyonunu azaltarak apoptoz üzerine etki gösterdiği, ancak anti-apoptotik gen olan Bcl-2 üzerine etkisi olmadığını gözlemledik. Bu sonuçlar doğrultusunda kurkuminin apoptozu p53 üzerinden etkilediğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda kurkuminin artan dozlarının proliferasyonu azalttığını gözlemledik. Hücre proliferasyonu üzerine olan olumsuz etkisinin apoptozu inhibe eden kurkuminin, artan dozlarda ise apoptozu indüklemesi sebebiyle olduğunu düşünmekteyiz.

AREDS formülasyonunda bulunan lutein ile tedavi edilen grupta GSH, SOD gibi antioksidan moleküllerin düzeyi artarken, bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinin azaldığını gözlemledik. Bu durum luteinin oksidatif hasarı azaltıcı etkisini doğrulamaktadır. Yine luteinin pro-apoptotik gen olan bax ekspresyonunu azaltarak ve anti-apoptotik gen olan Bcl-2 ekspresyonunu ise arttırarak apoptozu inhibe ettiğini, oksidatif stresin neden olduğu hücre ölümünü de engellemiş olduğunu gözlemledik.

Antioksidan etkisi bilinen ancak bildiğimiz kadarıyla literatürde RPE hücreleri üzerindeki antioksidan etkisi incelenmemiş olan krosetin ile tedavi edilen grupta GSH, SOD düzeyinin arttığını, MDA seviyesinin azaldığını ve aynı zamanda pro-apoptotik gen olan bax gen ekspresyonunu azaltarak apoptoz üzerine etki gösterdiğini gözlemledik. Anti-inflamatuar etkisi de olduğu bilinen krosetinin, YBMD progresyonunu yavaşlatmada alternatif bir tedavi olabileceğini düşünmekteyiz. Bunun in-vivo deneyler ve ardından insanlar üzerinde yapılacak klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

7. ÖZET

Amaç: H₂O₂ ile oksidatif hasar modeli oluşturulan ARPE-19 hücrelerinde, Kurkumin, Lutein ve Krosetin'in antioksidan etkilerini ve apoptozis üzerine olan etkilerini araştırmak ve bu etkilerini karşılaştırmak.

Gereç ve Yöntem: ARPE hücrelerindeki oksidatif hasar, hücrelerin 1 saat süre ile 800 µM H₂O₂ ile muamele edilmesiyle oluşturuldu. Oksidatif hasar oluşturulmuş hücreler, Kurkumin, Krosetin ve Lutein'in değişen dozları (1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM dozlarında) ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücre proliferasyon oranları ve hücrelerdeki canlılığa olan etkileri %10 WST-1 ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. WST-1 analizi sonucunda her bir antioksidan madde için en etkin doz olduğu düşünülen düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlar seçildi. Oksidatif hasara uğratılmış ARPE-19 hücreleri ve bu hücrelere tedavi amacıyla farklı dozlarda uygulanan Kurkumin (20, 40, 80 µM), Krosetin (10, 20, 40 µM) ve Lutein'in (5, 10, 20 µM) Süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) oksidatif biyobelirteç seviyeleri üzerine etkileri ve pro-apoptotik etki sağlayan Bax ve anti-apoptotik etki sağlayan Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildi.

Bulgular: Kontrol ve H₂O₂ uygulanan gruptaki hücre canlılığı değerlendirildiğinde hücre canlılığının kontroldekinin yaklaşık %50'sine düştüğü konsantrasyon 800 µM olarak bulunmuştur. Lutein, krosetin ve kurkuminin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkili olan dozları sırası ile 5,10 ve 20 µM olarak bulunmuştur. Biyokimyasal incelemelerde MDA, GSH, SOD düzeyleri incelendi. H₂O₂, SOD ve GSH'ı anlamlı oranda

azaltmış ve MDA'yı anlamlı oranda yükseltmiştir ($p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$). SOD ve GSH aktivitesi lutein, kurkumin ve krosetin uygulanan gruplarda, H_2O_2 grubuna oranla daha yüksek; MDA düzeyi ise azalmış olarak bulundu ($p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.05$). BCL-2 gen ekspresyon analizi değerlendirilmesinde, hasar modeli oluşturulan grupta BCL-2 seviyesinin anlamlı oranda azaldığı görüldü ($p<0.01$). 10 ve 20 μm lutein uygulanan grupta BCL-2 seviyelerinde anlamlı artış olduğu görüldü ($p<0.05$). BAX 1 gen ekspresyon analizi değerlendirilmesinde, hasar modeli oluşturulan grupta BAX 1 ekspresyon seviyesinin anlamlı oranda arttığı görüldü ($p<0.01$). Lutein, kurkumin ve krosetin uygulanan tedavi gruplarında BAX 1 ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalma olduğu görüldü ($p<0.05$).

Sonuç: Lutein ve kurkumin tedavisinin RPE hücrelerinde antioksidan aktiviteyi arttırdığı ve apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Lutein ile kurkuminin bu etkileri karşılaştırıldığında, kurkuminin lutein kadar etkin olmadığını gözlemledik. Krosetinin de antioksidan etkisini belirten yayınlar olmakla birlikte RPE hücrelerinde antioksidan ve apoptoz üzerine olan etkisi değerlendirilmemiştir. Lutein ile krosetinin bu etkileri karşılaştırıldığında benzer etkiler gözlemledik. Krosetin tedavisinin, YBMD progresyonunu yavaşlatmada luteine alternatif olabileceğini düşünmekteyiz.

8. ABSTRACT

Purpose: To investigate and compare the antioxidant effects and effects of Curcumin, Lutein and Crocetin on apoptosis in ARPE-19 cells, for which an oxidative damage model was created with H₂O₂.

Materials and Methods: Oxidative damage in ARPE cells was created by treating the cells with 800 µM H₂O₂ for 1 hour. Oxidatively damaged cells are incubated with varying doses of Curcumin, Crocetin and Lutein (at doses of 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM) for 24 hours, followed by cell proliferation rates and The effects on viability were evaluated in comparison with 10% WST-1. As a result of the WST-1 analysis, low, medium and high concentrations considered to be the most effective dose for each antioxidant substance were selected. Different doses of Curcumin (20, 40, 80 µM), Crocetin (10, 20, 40 µM) and Lutein (5, 10, 20 µM) were applied to oxidatively damaged ARPE-19 cells and these cells for treatment. The effects of superoxide dismutase (SOD), malic dialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) on oxidative biomarker levels and the expression levels of Bax, which provides pro-apoptotic effect, and Bcl-2 gene expression, which provides anti-apoptotic effect, were evaluated.

Results: When cell viability was evaluated in the control and H₂O₂ groups, the concentration at which cell viability decreased to approximately 50% of that in the control was found to be 800 µM. The most effective doses of lutein, crocetin and curcumin on cell viability and proliferation were found to be 5,10 and 20 µM, respectively. MDA, GSH, SOD levels were examined in biochemical examinations. H₂O₂ significantly decreased

SOD and GSH and increased MDA significantly ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$). SOD and GSH activities were higher in the lutein, curcumin and crocetin applied groups compared to the H₂O₂ group; MDA level was found to be decreased ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$). In the evaluation of BCL-2 gene expression analysis, it was observed that the BCL-2 level was significantly decreased in the damage model group ($p < 0.01$). It was observed that there was a significant increase in BCL-2 levels in the 10 and 20 μ m lutein group ($p < 0.05$). In the evaluation of BAX 1 gene expression analysis, it was observed that the BAX 1 expression level increased significantly in the damage model group ($p < 0.01$). There was a significant decrease in BAX 1 expression levels in the treatment groups treated with lutein, curcumin and crocetin ($p < 0.05$).

Conclusion: It is known that lutein and curcumin treatment increase antioxidant activity in RPE cells and inhibit apoptosis. When these effects of lutein and curcumin were compared, we observed that curcumin was not as effective as lutein. Although there are publications indicating the antioxidant effect of crocetin, its effect on antioxidant and apoptosis in RPE cells has not been evaluated. When these effects of lutein and crocetin were compared, we observed similar effects. We think that crocetin treatment may be an alternative to lutein in slowing the progression of AMD.

KAYNAKLAR

1. Ngai, L. Y. *et al.* The prevalence and analysis of risk factors for age-related macular degeneration: 18-year follow-up data from the Speedwell eye study, United Kingdom. *Eye* **25**, 784–793 (2011).
2. *Principles and Practice of Ophthalmology Clinical Practice. Volume 2.*
3. Zhang, X., research, B. H.-E. eye & 2013, undefined. KCNQ and KCNE potassium channel subunit expression in bovine retinal pigment epithelium. *Elsevier*.
4. Majji, A. B. & de Juan E., J. Retinal pigment epithelial autotransplantation: Morphological changes in retina and choroid. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **238**, 779–791 (2000).
5. Van Lookeren Campagne, M., Lecouter, J., Yaspan, B. L. & Ye, W. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *Journal of Pathology* vol. 232 151–164 (2014).
6. Yu, H. *et al.* Effect of soluble inducible costimulator level and its polymorphisms on age-Related macular degeneration. *DNA Cell Biol.* **32**, 717–721 (2013).
7. Mettu, P., Wielgus, A., Ong, S., of, S. C.-M. aspects & 2012, undefined. Retinal pigment epithelium response to oxidant injury in the pathogenesis of early age-related macular degeneration. *Elsevier*.
8. Beatty, S. *et al.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Elsevier*.

9. Pacifici, R., Gerontology, K. D.- & 1991, undefined. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *karger.com*.
10. Seddon, J. M. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **272**, 1413–1420 (1994).
11. Cao, G.-F. *et al.* Rapamycin sensitive mTOR activation mediates nerve growth factor (NGF) induced cell migration and pro-survival effects against hydrogen peroxide in retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 499–505 (2011).
12. Yao, J. *et al.* Ultraviolet (UV) and hydrogen peroxide activate ceramide-ER stress-AMPK signaling axis to promote retinal pigment epithelium (RPE) cell apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 10355–10368 (2013).
13. Di Mambro, V. M., Borin, M. F. & Fonseca, M. J. V. Topical formulations with superoxide dismutase: Influence of formulation composition on physical stability and enzymatic activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 97–105 (2003).
14. Shamsi, F. A., Chaudhry, I. A., Boulton, M. E. & Al-Rajhi, A. A. L-carnitine protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Curr. Eye Res.* **32**, 575–84 (2007).
15. Zhu, C., Dong, Y., Liu, H., Ren, H. & Cui, Z. Hesperetin protects against H₂O₂-triggered oxidative damage via upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells. *Biomed. Pharmacother.* **88**, 124–133 (2017).
16. Nita, M. & Grzybowski, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2016 (2016).
17. Reisenhofer, M. H., Balmer, J. M. & Enzmann, V. What Can Pharmacological Models of Retinal Degeneration Tell Us? *Curr. Mol. Med.* **17**, 100–107 (2017).
18. Zhao, W. *et al.* Curcumin ameliorated diabetic neuropathy partially by inhibition of

- NADPH oxidase mediating oxidative stress in the spinal cord. *Elsevier*.
19. Jat, D., Parihar, P., Kothari, S. C. & Parihar, M. S. Curcumin reduces oxidative damage by increasing reduced glutathione and preventing membrane permeability transition in isolated brain mitochondria. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **59**, OL1899–OL1905 (2013).
 20. Ak, T. & Gülçin, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* **174**, 27–37 (2008).
 21. Jitoe-Masuda, A., Fujimoto, A. & Masuda, T. Curcumin: from chemistry to chemistry-based functions. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 2084–92 (2013).
 22. Lee, J. C. *et al.* Dietary Curcumin Increases Antioxidant Defenses in Lung, Ameliorates Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis, and Improves Survival in Mice. *Radiat. Res.* **173**, 590–601 (2010).
 23. Chen, M. *et al.* Use of curcumin in diagnosis, prevention, and treatment of Alzheimer's disease. *ncbi.nlm.nih.gov*.
 24. Woo, J. *et al.* Curcumin protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via induction of heme oxygenase-1 expression and reduction of reactive oxygen. *ncbi.nlm.nih.gov*.
 25. Hollborn, M. *et al.* Cytotoxic Effects of Curcumin in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *PLoS One* **8**, (2013).
 26. Zhu, W. *et al.* Effect of curcumin on aging retinal pigment epithelial cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 5337–5344 (2015).
 27. Bian, Q. *et al.* Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment. *Elsevier*.
 28. Silván, J., Reguero, M., function, S. de P.-T.-F. & & 2016, undefined. A protective effect of anthocyanins and xanthophylls on UVB-induced damage in retinal pigment epithelial cells. *pubs.rsc.org*.

29. Obana, A. *et al.* Macular carotenoid levels of normal subjects and age-related maculopathy patients in a Japanese population. *Elsevier*.
30. Pinteá, A., Ruginã, D., Pop, R., ... A. B.-J. of F. & 2011, undefined. Xanthophylls protect against induced oxidation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Elsevier*.
31. G. Gutheil, W., Reed, G., Ray, A., Anant, S. & Dhar, A. Crocetin: an Agent Derived from Saffron for Prevention and Therapy for Cancer. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 173–179 (2011).
32. Ishizuka, F. *et al.* Crocetin, a carotenoid derivative, inhibits retinal ischemic damage in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **703**, 1–10 (2013).
33. Song, Y., Zhu, L. & Li, M. Antifibrotic effects of crocetin in scleroderma fibroblasts and in bleomycin-induced sclerotic mice. *Clinics (Sao Paulo)*. **68**, 1350–7 (2013).
34. Yoshino, F., Yoshida, A., Umigai, N., Kubo, K. & Lee, M.-C.-I. Crocetin reduces the oxidative stress induced reactive oxygen species in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs) brain. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **49**, 182–7 (2011).
35. Nam, K. N. *et al.* Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **648**, 110–6 (2010).
36. He, K. *et al.* Crocetin induces apoptosis of BGC-823 human gastric cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **9**, 521–6 (2014).
37. Karimi, P. *et al.* Crocetin Prevents RPE Cells from Oxidative Stress through Protection of Cellular Metabolic Function and Activation of ERK1/2. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2949 (2020).
38. Snell, R. & Lemp, M. Clinical anatomy of the eye. (2013).
39. Ophthalmology, A. A. of. 2014-2015 Basic and Clinical Science Course (BSSC) Section 2 : Fundamentals and Principles of Ophthalmology. *Am. Acad. Ophthalmol.* 75–121 (2014) doi:10.1007/978-3-319-44920-3_3.

40. Özdemir H, Arf S, K. M. M. H. O. K. T. 2015. *No Title*. (2015).
41. 404 Not Found. <https://store.aao.org/2019-2020-basic-and-clinical-science-course-section-12-retina-and-vitreous.html>.
42. Bron, A. Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit. (1997).
43. Panda-Jonas, S., ... J. J.-A. journal of & 1996, undefined. Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes. *Elsevier*.
44. Schmidt, S. Y. & Peisch, R. D. *Melanin Concentration in Normal Human Retinal Pigment Epithelium Regional Variation and Age-Related Reduction*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* vol. 27 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2177531> (1986).
45. Thumann, G., Hoffmann, S., Retina, D. H.- & 2006, undefined. Cell biology of the retinal pigment epithelium. *Elsevier*.
46. Weirer, J. J., Delori, F. C., Wing, G. L. & Fitch, K. A. *Retinal Pigment Epithelial Lipofuscin and Melanin and Choroidal Melanin in Human Eyes*. *iovs.arvojournals.org* <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2177379>.
47. Eye, J. M.- & 1987, undefined. The ageing retina: physiology or pathology. *nature.com*.
48. Finnemann, S., ... V. B.-P. of the & 1997, undefined. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires $\alpha\beta 5$ integrin for binding but not for internalization. *Natl. Acad Sci*.
49. Tarnowski, B. I., Shepherd, V. L. & Mclaughlin, B. J. *Expression of Mannose Receptors For Pinocytosis and Phagocytosis on Rat Retinal Pigment Epithelium*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* vol. 29 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2160081> (1988).
50. Gundersen, D., Orłowski, J. & Rodriguez-Boulan, E. *Apical Polarity of Na,K-ATPase in Retinal Pigment Epithelium Is Linked to a Reversal of the Ankyrin-Fodrin Submembrane Cytoskeleton*. *rupress.org* <https://rupress.org/jcb/article->

pdf/112/5/863/379375/863.pdf.

51. Ophthalmology, B. F.-A. of & 1961, undefined. Limiting membranes of the sensory retina and pigment epithelium: an electron microscopic study. *jamanetwork.com*.
52. Hudspeth, A. J. & Yee, A. G. *The intercellular junctional complexes of retinal pigment epithelia.* *iovs.arvojournals.org*
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2122482>.
53. Alam, S. *et al.* Clinical application of rapid serial Fourier-domain optical coherence tomography for macular imaging. *Elsevier*.
54. Hollenberg, M. J. & Spira, A. W. Human retinal development: Ultrastructure of the outer retina. *Am. J. Anat.* **137**, 357–385 (1973).
55. Fatt, I., research, K. S.-E. eye & 1971, undefined. Flow conductivity of retina and its role in retinal adhesion. *Elsevier*.
56. Marmor, M. F. & Marmor, M. F. *Control of Subretinal Fluid: Experimental and Clinical Studies.* *Eye* vol. 4 <https://www.nature.com/articles/eye199046> (1990).
57. Streilein, J. *et al.* Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Elsevier*.
58. Young, R. W. *THE RENEWAL OF ROD AND CONE OUTER SEGMENTS IN THE RHESUS MONKEY.* *rupress.org* <https://rupress.org/jcb/article-pdf/49/2/303/449617/303.pdf>.
59. Kennedy, C., Rakoczy, P. E. P., Eye, I. C.- & 1995, undefined. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *nature.com* (1995) doi:10.1038/eye.1995.192.
60. Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., ... L. W.-P. in retinal and & 2017, undefined. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Elsevier*.
61. Garg, T. K. & Chang, J. Y. Oxidative stress causes ERK phosphorylation and cell death in cultured retinal pigment epithelium: Prevention of cell death by AG126 and 15-deoxy-delta 12, 14-PGJ2. *BMC Ophthalmol.* **3**, 1–15 (2003).

62. Tian, B. *et al.* miR-17-3p exacerbates oxidative damage in human retinal pigment epithelial cells. *PLoS One* **11**, e0160887 (2016).
63. Liang, F., research, B. G.-E. eye & 2003, undefined. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular. *Elsevier*.
64. Carocho, M., ... I. F.-O. medicine & 2018, undefined. Antioxidants and prooxidants: effects on health and aging. *downloads.hindawi.com*.
65. Chong, C. M. & Zheng, W. Artemisinin protects human retinal pigment epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative damage through activation of ERK/CREB signaling. *Redox Biol.* **9**, 50–56 (2016).
66. Hanneken, A., Lin, F. F., Johnson, J. & Maher, P. Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 3164–3177 (2006).
67. Cai, H. *et al.* High-throughput screening identifies compounds that protect RPE cells from physiological stressors present in AMD. *Exp. Eye Res.* **185**, 107641 (2019).
68. Felszeghy, S., Viiri, J., Paterno, J., biology, J. H.-R. & 2019, undefined. Loss of NRF-2 and PGC-1 α genes leads to retinal pigment epithelium damage resembling dry age-related macular degeneration. *Elsevier*.
69. Telegina, D., Kozhevnikova, O., reports, S. B.-S. & 2017, undefined. Contributions of age-related alterations of the retinal pigment epithelium and of glia to the AMD-like pathology in OXYS rats. *nature.com*.
70. Goff, M. Le, Eye, P. B.- & 2008, undefined. Adult vitreous structure and postnatal changes. *nature.com*.
71. Chakravarthy, U. *et al.* Clinical risk factors for age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* **10**, (2010).
72. Tomany, S. C. *et al.* Risk factors for incident age-related macular degeneration: Pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology* **111**, 1280–1287 (2004).

73. Wong, W. *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Elsevier*.
74. Leibowitz, H., Krueger, D., ... L. M.-S. of & 1980, undefined. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and. *europemc.org*.
75. Klein, R., Klein, B. E. K., Jensen, S. C. & Meuer, S. M. The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: The beaver dam eye study. *Ophthalmology* **104**, 7–21 (1997).
76. Four-year incidence and progression of age-related macular degeneration: the Los Angeles Latino Eye Study. *Elsevier*.
77. Rahmani, B. *et al.* The cause-specific prevalence of visual impairment in an urban population: the Baltimore Eye Survey. *Elsevier*.
78. Young, R. W. *Friedenwald Lecture Visual cells and the concept of renewal.* *iovs.arvojournals.org*
<https://iovs.arvojournals.org/data/journals/iovs/933068/700.pdf>.
79. Marshall, J. Effects of increasing numbers of phagocytic inclusions on human retinal pigment epithelial cells in culture: a model for aging. *Br. J. Ophthalmol.* **70**, 808–815 (1986).
80. Feeney-Durns, L., Hilderbrand, E. 5 & Eldridge, S. *Aging Human RPE: Morphometric Analysis of Macular, Equatorial and Peripheral Cells.* *iovs.arvojournals.org* <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2176957>.
81. Sundelin, S., Wihlmark, U., Erik Nilsson, S. G. & Brunk, U. T. Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells reduces their phagocytic capacity. *Taylor Fr.* **17**, 851–857 (2009).
82. La Cour, M., Kiilgaard, J. F. & Nissen, M. H. Age-related macular degeneration: Epidemiology and optimal treatment. *Drugs and Aging* vol. 19 101–133 (2002).

83. Mullins, R. F., Sohn, E. & Sohn, E. H. Bruch's Membrane: The Critical Boundary in Macular Degeneration Cell Biology of Macular Degeneration View project 3 Bruch's Membrane: The Critical Boundary in Macular Degeneration. *books.google.com* doi:10.5772/31370.
84. Haugsdal, J., org, E. S.-E. & 2013, undefined. Age-related macular degeneration: from one medical student to another. *eyerounds.org*.
85. Grunwald, J., ophthalmology, S. H.-... of & 1998, undefined. Effect of aging on foveolar choroidal circulation. *jamanetwork.com*.
86. Ramrattan, R. S. *et al.* *Morphometric Analysis of Bruch's Membrane, the Choriocapillaris, and the Choroid in Aging.* *iovs.arvojournals.org* <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2179814>.
87. Guymer, R., Luthert, P., research, A. B.-P. in retinal and eye & 1999, undefined. Changes in Bruch's membrane and related structures with age. *Elsevier*.
88. Korte, G., Burns, M., cytology, R. B.-I. review of & 1989, undefined. Epithelium-capillary interactions in the eye: the retinal pigment epithelium and the choriocapillaris. *Elsevier*.
89. Friedman, E. A hemodynamic model of the pathogenesis of age-related macular degeneration. (1997).
90. Funk, R., research, J. R.-E. eye & 1985, undefined. Comparative morphological studies on blood vessels in eyes of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Elsevier*.
91. Ischemic hypertensive choroidopathy: fluorescein angiography, indocyanine green videoangiography, and measurement of pulsatile blood flow. *jamanetwork.com*.
92. Winkler, B., Boulton, M., vision, J. G.-M. & 1999, undefined. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *ncbi.nlm.nih.gov*.
93. Blasiak, J., Petrovski, G., Veréb, Z., Facskó, A. & Kaarniranta, K. Oxidative Stress, Hypoxia, and Autophagy in the Neovascular Processes of Age-Related Macular

- Degeneration. *hindawi.com* (2014) doi:10.1155/2014/768026.
94. Schneeweis, D., Science, J. S.- & 1995, undefined. Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *science.sciencemag.org*.
 95. Rogers, B., Symons, R., science, K. K.-... & visual & 2007, undefined. Differential sensitivity of cones to iron-mediated oxidative damage. *arvojournals.org*.
 96. Organisciak, D. T. *et al. Light History and Age-Related Changes in Retinal Light Damage.* *iovs.arvojournals.org*
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161721>.
 97. Miller, Y. I. *et al.* Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ. Res.* **108**, 235–248 (2011).
 98. Smith, W., Mitchell, P., Webb, K., Ophthalmology, S. L.- & 1999, undefined. Dietary antioxidants and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Elsevier*.
 99. Ophthalmol, E. D. C. C. S. G.-A. & 1993, undefined. Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. *ci.nii.ac.jp*.
 100. Cohen, S., Olin, K., Feuer, W., ... L. H.-B. journal of & 1994, undefined. Low glutathione reductase and peroxidase activity in age-related macular degeneration. *bjo.bmj.com*.
 101. Snow, K. K. & Seddon, J. M. Ophthalmic Epidemiology Do age-related macular degeneration and cardiovascular disease share common antecedents? *Taylor Fr.* **6**, 125–143 (2009).
 102. Seddon, J. M., Gensler, G., Milton, R. C., Klein, M. L. & Rifai, N. *Association Between C-Reactive Protein and Age-Related Macular Degeneration.* *jamanetwork.com* <https://jamanetwork.com/>.
 103. Seddon, J. M., Cote, J. & Rosner, B. *Progression of Age-Related Macular Degeneration Association With Dietary Fat, Transunsaturated Fat, Nuts, and Fish*

Intake. jamanetwork.com <https://jamanetwork.com/>.

104. Anderson, D., Mullins, R., ... G. H.-A. journal of & 2002, undefined. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Elsevier*.
105. Kaarniranta, K., Salminen, A., Haapasalo, A., Soininen, H. & Hiltunen, M. Age-Related Macular Degeneration (AMD): Alzheimer's Disease in the Eye? *J. Alzheimer's Dis.* **24**, 615–631 (2011).
106. Ferrara, N., Gerber, H., medicine, J. L.-N. & 2003, undefined. *R E V I E W. nature.com* <http://www.nature.com/naturemedicine> (2003).
107. Ebrahimi, K., lipids, J. H.-J. of & 2011, undefined. Lipids, lipoproteins, and age-related macular degeneration. *hindawi.com*.
108. Nowak, J. Z. *Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. pdfs.semanticscholar.org*
<https://pdfs.semanticscholar.org/4c0b/ced37f564ddeeba262c0e09975ee4a9d1580.pdf> (2006).
109. Zhou, J., Jang, Y. P., Kim, S. R. & Sparrow, J. R. *Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium. National Acad Sciences* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0604255103 (2006).
110. Radu, R. A. *et al.* Complement System Dysregulation and Inflammation in the Retinal Pigment Epithelium of a Mouse Model for Stargardt Macular Degeneration *. *ASBMB* (2011) doi:10.1074/jbc.M110.191866.
111. Ophthalmology, A.-R. E. D. S. R. G.- & 2000, undefined. Risk factors associated with age-related macular degeneration: a case-control study in the age-related eye disease study: age-related eye disease study report. *Elsevier*.
112. Eong, K., degeneration, J. H.-A. macular & 2002, undefined. Risk factors for age-related macular degeneration and choroidal neovascularization. *books.google.com*.
113. Sarks¹, J. P., Sarks², S. H. & Killingsworth², M. C. *Evolution of Geographic*

Atrophy of the Retinal Pigment Epithelium. Eye vol. 2
<https://www.nature.com/articles/eye1988106> (1988).

114. Feeney-Burns, L., Burns, R., ophthalmology, C. G.-A. journal of & 1990, undefined. Age-related macular changes in humans over 90 years old. *Elsevier*.
115. Ophthalmol, M. H.-T. A. A. O. & 1972, undefined. Role of the retinal pigment epithelium in macular disease. *ci.nii.ac.jp*.
116. Ophthalmology, M. T.- & 1985, undefined. Pathogenetic factors of aging macular degeneration. *Elsevier*.
117. Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J. & Obberghen, E. Van. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Advanced Glycation End Products*. *ASBMB* (2001) doi:10.1074/jbc.M106534200.
118. Klein, R., Klein, B., Ophthalmology, K. L.- & 1992, undefined. Prevalence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Elsevier*.
119. Bressler, S., Ophthalmol, M. M.-A. & 1990, undefined. Bressler NM, Fine SL. The Macular Photocoagulation Study Group. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis
120. Mukesh, B. *et al*. Five-year incidence of age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Elsevier*.
121. Arnold, J., Quaranta, M., Soubrane, G., ophthalmology, S. S.-... journal of & 1997, undefined. Indocyanine green angiography of drusen. *Elsevier*.
122. Retina, S. S.- & 2001, undefined. Age-related maculopathy: nonneovascular age-related macular degeneration and the evolution of geographic atrophy. *ci.nii.ac.jp*.
123. Bressler, S., Maguire, M., ... N. B.-A. of & 1990, undefined. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration. *jamanetwork.com*.
124. Sunness, J., Gonzalez-Baron, J., Ophthalmology, C. A.- & 1999, undefined. Enlargement of atrophy and visual acuity loss in the geographic atrophy form of

- age-related macular degeneration. *Elsevier*.
125. Coscas, G., Soubrane, G., ... C. R.-A. of & 1991, undefined. Perifoveal laser treatment for subfoveal choroidal new vessels in age-related macular degeneration: results of a randomized clinical trial. *jamanetwork.com*.
 126. Yannuzzi, L., Slakter, J., ... J. S.-R. (Philadelphia & 1992, undefined. Digital indocyanine green videoangiography and choroidal neovascularization. *euopepmc.org*.
 127. Retina-Vitreous, H. A.-J. of & 1998, undefined. Subretinal neovasküler membranlar. *retinavitreus.dergisi.org*.
 128. (Philadelphia, J. G.-R., Pa.), undefined & 1984, undefined. Serous retinal pigment epithelial detachment with a notch. A sign of occult choroidal neovascularization. *euopepmc.org*.
 129. ... A.-R. E. D. S. R.-A. of, 2001, undefined, ophthalmology, A.-R. E. D. S. R.-... of & 2001, undefined. placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision *ncbi.nlm.nih.gov*.
 130. Sangiovanni, P. *et al.* *The Relationship of Dietary Carotenoid and Vitamin A, E, and C Intake With Age-Related Macular Degeneration in a Case-Control Study.* *Arch Ophthalmol* vol. 125 <https://jamanetwork.com/> (2007).
 131. Parekh, N. *et al.* Association between vitamin D and age-related macular degeneration in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 through 1994. *jamanetwork.com*.
 132. Richer, S., Stiles, W., Statkute, L., ... J. P.-O.-J. of the & 2004, undefined. antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation *Elsevier*.
 133. Seddon, J., clinics, C. C.-I. ophthalmology & 2004, undefined. The epidemiology of age-related macular degeneration. *journals.lww.com*.

134. Richer, S., Stiles, W., Statkute, L., ... J. P.-O.-J. of the & 2004, undefined. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular. *Elsevier*.
135. Nolan, J., Stack, J., O'Donovan, O., ... E. L.-E. eye & 2007, undefined. Risk factors for age-related maculopathy are associated with a relative lack of macular pigment. *Elsevier*.
136. Tan, J. *et al.* Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Elsevier*.
137. Trieschmann, M., Beatty, S., Nolan, J., ... H. H.-E. eye & 2007, undefined. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin: the LUNA. *Elsevier*.
138. Bressler, N., Bressler, S., (Chicago, N. C.-..., 1960), I. . & 2003, undefined. Potential public health impact of Age-Related Eye Disease Study results: AREDS report no. 11. *europemc.org*.
139. Taylor, H., Tikellis, G., Robman, L., Bmj, C. M.- & 2002, undefined. Vitamin E supplementation and macular degeneration: randomised controlled trial. *bmj.com*.
140. Retina, M. J. . Y. B. M. D. T. T. O. D. E. Y. N. T. *No Title*.
141. Ferris, F. *et al.* A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *europemc.org*.
142. Chew, E., ... T. C.-J.-J. of & 2013, undefined. Lutein+ zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *miami.pure.elsevier.com*.
143. Wilson, T. A. *et al.* Consumption of one egg per day increases serum lutein and zeaxanthin concentrations in older adults without altering serum lipid and lipoprotein cholesterol concentrations. *FASEB J.* **21**, (2007).
144. Rehak, M., Fric, E. & Wiedemann, P. Lutein und Antioxidantien zur Prävention der

- AMD. *Ophthalmologie* **105**, 37–45 (2008).
145. Cano, M., Thimmalappula, R., Fujihara, M., research, N. N.-V. & 2010, undefined. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and age-related macular degeneration. *Elsevier*.
 146. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., ... M. I.-C. & 2006, undefined. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Elsevier*.
 147. Cuervo, A. M. *et al.* Autophagy and Aging: The Importance of Maintaining. *Clean" Cells, Autophagy* **1**, 131–140 (2005).
 148. Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., Acta, U. B.-B. et B. & 2008, undefined. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Elsevier*.
 149. Alberts, B., et al., Molecular biology of the cell.... - Google Akademik. https://scholar.google.com.tr/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Alberts%2C+B.%2C+et+al.%2C+Molecular+biology+of+the+cell.+1989%2C+Garland+Publishing%3A+New+York&btnG=.
 150. Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E. A. & Brunk, U. T. Mitochondrial Turnover and aging of long-lived postmitotic cells: The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 12 503–535 (2010).
 151. Southorn, P., Proceedings, G. P.-M. C. & 1988, undefined. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Elsevier*.
 152. medicine, B. H.-T. A. journal of & 1991, undefined. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Elsevier*.
 153. Cheeseman, K., bulletin, T. S.-B. medical & 1993, undefined. An introduction to free radical biochemistry. *academic.oup.com*.
 154. Is, Y., Pathol, J. W.-J. C. & 2001, undefined. Antioxidant in health and disease.
 155. Borish, E., Pryor, W., ... S. V.- & 1987, undefined. DNA synthesis is blocked by cigarette tar-induced DNA single-strand breaks. *academic.oup.com*.

156. Machlin, L. J. & Bendich, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients 1 . *FASEB J.* **1**, 441–445 (1987).
157. Liu, T., Stern, A., Jackson Roberts, L., Morrow, J. D. & Karger, S. *The Isoprostanes: Novel Prostaglandin-Like Products of the Free Radical-Catalyzed Peroxidation of Arachidonic Acid.* *J Biomed Sci* vol. 6 www.karger.comhttp://biomednet.com/karger (1999).
158. Davis KJA: Oxidative damage and repair: Chemical,... - Google Akademik. https://scholar.google.com.tr/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Davis+KJA%3A+Oxidative+damage+and+repair%3A+Chemical%2C+biological+and+medical+aspects.+99.+91.+Oxford%2FNew+York%2C+Pergamon+Press%2C+1991%2C+pp+99-109&btnG=.
159. Ames, B. N. & Gold, L. S. *Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer.* *Mutation Research* vol. 250 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002751079190157J> (1991).
160. medicine, H. S.-T. A. journal of & 1991, undefined. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Elsevier*.
161. pathology, R. D.-E. and toxicologic & 1992, undefined. Lipid peroxidation—a common pathogenetic mechanism? *Elsevier*.
162. Sickel, W. Retinal Metabolism in Dark and Light. in 667–727 (1972). doi:10.1007/978-3-642-65340-7_19.
163. research, N. B.-P. in clinical and biological & 1989, undefined. The metabolism of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the eye: the possible role of docosahexaenoic acid and docosanoids in retinal physiology and ocular. *europemc.org*.
164. Delmelle, M. RETINAL SENSITIZED PHOTODYNAMIC DAMAGE TO LIPOSOMES. *Photochem. Photobiol.* **28**, 357–360 (1978).
165. Gaillard, E. R., Atherton, S. J., Eldred, G. & Dillon, J. PHOTOPHYSICAL STUDIES ON HUMAN RETINAL LIPOFUSCIN. *Photochem. Photobiol.* **61**, 448–453 (1995).

166. Rózanowska, M., Jarvis-Evans, J., ... W. K.-J. of B. & 1995, undefined. Blue light-induced reactivity of retinal age pigment in vitro generation of oxygen-reactive species. *ASBMB*.
167. Tale, D. J., Miceli, M. V & Newsome, D. A. *Phagocytosis and H₂O₂ Induce Catalase and Metallothionein Gene Expression in Human Retinal Pigment Epithelial Cells.* *iovs.arvojournals.org*
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161402>.
168. Ham WT Jr, Ruffolo JJ Jr, Mueller HA, et al: Histologic... - Google Akademik.
https://scholar.google.com.tr/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Ham+WT+Jr%2C+Ruffolo+JJ+Jr%2C+Mueller+HA%2C+et+al%3A+Histologic+analysis+of+photochemical+lesions+produced+in+rhesus+retina+by+short-wave-length+light.+Invest+Ophthalmol+Vis+Sci+17%3A1029-35%2C+1978&btnG=.
169. Wiegond, R. D., Giusto, N. M., Rapp, L. M. & Anderson, R. E. *Evidence for Rod Outer Segment Lipid Peroxidation following Constant Illumination of the Rat Retina.* *iovs.arvojournals.org*
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2159524>.
170. Buege, J., enzymology, S. A.-M. in & 1978, undefined. Microsomal lipid peroxidation. *Elsevier*.
171. Wu, J. *et al.* Blue light induced apoptosis in rat retina. *nature.com*.
172. Stone, W., Farnsworth, C., research, E. D.-E. eye & 1979, undefined. A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments. *Elsevier*.
173. Wittig LA: Lipid peroxidation in vivo. *J Am Oil Chem...* - Google Akademik.
https://scholar.google.com.tr/scholar?hl=tr&as_sdt=0,5&q=Wittig+LA%3A+Lipid+peroxidation+in+vivo.+J+Am+Oil+Chem+Soc+42%3A908-13,+1965.
174. Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. T. D. *Metals, Toxicity and Oxidative Stress. Current Medicinal Chemistry* vol. 12
<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2005/00000012/00000010/art000>

- 03 (2005).
175. Krohne, T., Stratmann, N., Kopitz, J., research, F. H.-E. eye & 2010, undefined. Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Elsevier*.
 176. De, M., Paz, L. & Anderson, R. E. *Region and Age-Dependent Variation in Susceptibility of the Human Retina to Lipid Peroxidation. Investigative Ophthalmology & Visual Science* vol. 33 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2178631> (1992).
 177. Van Kuijk, F. J. G. M. & Duck, P. *Fatty Acid Composition of the Human Macula and Peripheral Retina. Investigative Ophthalmology & Visual Science* vol. 33 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2178624> (1992).
 178. Bush, R., Remé, C., research, A. M.-E. eye & 1991, undefined. Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. *Elsevier*.
 179. Organisciak, D. T., Darrow, R. M., Jiang, Y.-L. & Blanks, J. C. *Retinal Light Damage in Rats With Altered Levels of Rod Outer Segment Docosahexaenoate. Investigative Ophthalmology & Visual Science* vol. 37 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2180222> (1996).
 180. Mellerio J: Light effects on the retina, in Albert D, J., Ophthalmology:, F. (eds): P. and P. of, Basic Sciences. Philadelphia, W B Saunders Co, 1994, P. & 1326–45. No Title.
 181. Organisciak, D., & W. N.-I. O. & 1977, undefined. The rod outer segment phospholipid/opsin ratio of rats maintained in darkness or cyclic light. *iovs.arvojournals.org*.
 182. Rapp, L., research, T. W.-V. & 1980, undefined. The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. *Elsevier*.
 183. Rapp, L. M. & Williams, T. P. DAMAGE TO THE ALBINO RAT RETINA PRODUCED BY LOW INTENSITY LIGHT. *Photochem. Photobiol.* **29**, 731–733

- (1979).
184. Organisciak, D. T., Bicknell, I. R. & Darrow, R. M. The effects of l- and d-ascorbic acid administration on retinal tissue levels and light damage in rats. *Curr. Eye Res.* **11**, 231–241 (1992).
 185. Organisciak, D. T., Jiang, Y.-L., Wang, H.-M. & Bicknell, I. *The Protective Effect of Ascorbic Acid in Retinal Light Damage of Rats Exposed to Intermittent Light.* *iovs.arvojournals.org* vol. 31 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2160495> (1990).
 186. Kurz, T., Eaton, J., & U. B.-T. international journal of biochemistry & 2011, undefined. The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Elsevier*.
 187. Feeney-Burns, L., Berman, E., of, H. R.-A. journal & 1980, undefined. Lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *ajo.com*.
 188. Wing, G. L., Blanchard, G. C. & Weiter, J. J. *The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium.* *iovs.arvojournals.org* <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2175734>.
 189. Eldred, G., Nature, M. L.- & 1993, undefined. Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *nature.com*.
 190. Kathleen Dorey, C., Wu, G., Ebersrein, D. & Garsd, A. *Cell Loss in the Aging Retina Rebrionship to Lipofuscin Accumubrion ond Mocubr Degenerorion.* *Investigative Ophthalmology & Visual Science* vol. 30 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2178366> (1989).
 191. ophthalmology, R. Y.-S. of & 1988, undefined. Solar radiation and age-related macular degeneration. *Elsevier*.
 192. ophthalmology, R. Y.-S. of & 1987, undefined. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Elsevier*.
 193. Kurz, T., Eaton, J. W. & Brunk, U. T. Redox activity within the lysosomal compartment: Implications for aging and apoptosis. *Antioxidants and Redox*

Signaling vol. 13 511–523 (2010).

194. Kinnunen, K., Petrovski, G., Moe, M. C., Berta, A. & Kaarniranta, K. Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica* vol. 90 299–309 (2012).
195. Algvere, P. V. & Seregard, S. Age-related maculopathy: Pathogenetic features and new treatment modalities. *Acta Ophthalmol. Scand.* **80**, 136–143 (2002).
196. Sparrow, J., research, M. B.-E. eye & 2005, undefined. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Elsevier*.
197. Wihlmark, U., Wrigstad, A., Roberg, K., ... S. N.-F. radical biology and & 1997, undefined. Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells causes enhanced sensitivity to blue light irradiation. *Elsevier*.
198. Brunk, U., Medicine, A. T.-F. R. B. and & 2002, undefined. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Elsevier*.
199. Biology, T. S.-J. of P. and P. B. & 1992, undefined. New trends in photobiology: properties and function of the ocular melanin—a photobiophysical view. *Elsevier*.
200. Putting, B., Best, J. Van, ... G. V.-E. eye & 1994, undefined. Blue-light-induced dysfunction of the blood-retinal barrier at the pigment epithelium in albino versus pigmented rabbits. *Elsevier*.
201. Capaldi, R. A. Structure and Function of Cytochrome c Oxidase . *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 569–596 (1990).
202. Novack, R. L. & Stefánsson, E. Measurement of Retina and Optic Nerve Oxidative Metabolism in Vivo via Dual Wavelength Reflection Spectrophotometry of Cytochrome a, a 3. in *Noninvasive Diagnostic Techniques in Ophthalmology* 499–509 (Springer New York, 1990). doi:10.1007/978-1-4613-8896-8_25.
203. Lubart, R., Wollman, Y., Friedmann, H., ... S. R.-... of P. and & 1992, undefined. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *Elsevier*.
204. Putting, B. J., van Best, J. A., Zweyppfenning, R. C. V. J., Vrensen, G. F. J. M. &

- Oosterhuis, J. A. Spectral sensitivity of the blood-retinal barrier at the pigment epithelium for blue light in the 400-500 nm range. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **231**, 600–606 (1993).
205. CHEN, E., Soderberg, P., ... W. Q.- & 1992, undefined. INHIBITION OF CYTOCHROME-OXIDASE BY BLUE-LIGHT (404-NM), A FACTOR THAT CAUSES RETINAL INJURY. *LIPPINCOTT-RAVEN PUBL 227*
206. Pinazo-Durán, M., aging, R. G.-P.-... interventions in & 2014, undefined. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *ncbi.nlm.nih.gov*.
207. Alfaro, D. Age-related macular degeneration: a comprehensive textbook. (2006).
208. Stone, J. R. & Yang, S. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 8 243–270 (2006).
209. Halliwell, B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society symposium* vol. 61 73–101 (1995).
210. Shi, H., Noguchi, N., Medicine, E. N.-F. R. B. and & 1999, undefined. Comparative study on dynamics of antioxidative action of α -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and α -tocopherol against lipid peroxidation. *Elsevier*.
211. Levine, M. *et al.* Criteria and recommendations for vitamin C intake. *jamanetwork.com*.
212. Rice-Evans, C., Medicine, A. D.-F. R. B. and & 1993, undefined. Current status of antioxidant therapy. *Elsevier*.
213. Krinsky, N. I. Mechanism of Action of Biological Antioxidants (43429). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **200**, 248–254 (1992).
214. Niki, E. Antioxidant Defenses In Eukariotic Cells: An Overview. in *Free Radicals: from Basic Science to Medicine* 365–373 (Birkhäuser Basel, 1993). doi:10.1007/978-3-0348-9116-5_31.
215. Sies, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* vol. 82 291–295 (1997).

216. Ho, Y. S., Magnenat, J. L., Gargano, M. & Cao, J. *No Title. Environmental Health Perspectives* vol. 106 1219–1228 (Public Health Services, US Dept of Health and Human Services, 1998).
217. Biol, I. F.-A. E. R. A. M. & 1986, undefined. Superoxide dismutases. *Wiley Online Libr.*
218. Johnson, F., medicine, C. G.-M. aspects of & 2005, undefined. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Elsevier.*
219. Wuerges, J. *et al. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. National Acad Sciences* (2004).
220. Corpas, F., Barroso, J., science, L. del R.-T. in plant & 2001, undefined. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Elsevier.*
221. Corpas, F., ... A. F.-O.-P. and cell & 2006, undefined. The Expression of Different Superoxide Dismutase Forms is Cell-type Dependent in Olive (*Olea europaea* L.) Leaves. *academic.oup.com.*
222. Antonyuk, S. V *et al. Structures of the G85R Variant of SOD1 in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis* * □ S Xiaohang Cao ‡1. *ASBMB* (2008) doi:10.1074/jbc.M801522200.
223. Fridovich, I. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 239–257 (1983).
224. De La Paz, M. A., Zhang, J. & Fridovich, I. Antioxidant enzymes of the human retina: Effect of age on enzyme activity of macula and periphery. *Curr. Eye Res.* **15**, 273–278 (1996).
225. Frank, R., Amin, R., ophthalmology, J. P.-A. journal of & 1999, undefined. Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration. *Elsevier.*
226. Liles, M. R., Newsome, D. A. & Oliver, P. D. *Antioxidant Enzymes in the Aging*

Human Retinal Pigment Epithelium. [jamanetwork.com](http://archophth.jamanetwork.com)
<http://archophth.jamanetwork.com/>.

227. De, M. A. *et al.* *Red blood cell antioxidant enzymes in age-related macular degeneration.* *British Journal of Ophthalmology* vol. 80 <https://bjo.bmj.com/content/80/5/445.short> (1996).
228. Lubos, E., Loscalzo, J. & Handy, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 15 1957–1997 (2011).
229. Herrmann, H. & Moses, S. G. *CONTENT AND STATE OF GLUTATHIONE IN THE TISSUES OF THE EYE**. [cabdirect.org](http://www.jbc.org/) <http://www.jbc.org/>.
230. Keys, S., research, W. Z.-E. eye & 1999, undefined. Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. *Elsevier*.
231. Singh, S. V., Dao, D. D., Srivastava, S. K. & Awasthi, Y. C. Purification and characterization of glutathione s-transferases in human retina. *Curr. Eye Res.* **3**, 1273–1280 (1984).
232. Delcourt, C. *et al.* Associations of antioxidant enzymes with cataract and age-related macular degeneration: The POLA study. *Elsevier*.
233. Chu, F.-F., Esworthy, R. S., Doroshov, J. H., Doan, K. & Liu, X.-F. *Expression of Plasma Glutathione Peroxidase in Human Liver in Addition to Kidney, Heart, Lung, and Breast in Humans and Rodents.* www.bloodjournal.org (1992).
234. NICOLAS, M., FUJIKI, K., ... K. M.-E. eye & 1996, undefined. Studies on the mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys. II. Suppression of metallothionein synthesis in the retina in oxidative stress. *Elsevier*.
235. Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J. W. & Brunk, U. T. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3778–3786 (2003).
236. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**,

- 495–516 (2007).
237. Terman, A. & Kurz, T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 18 888–898 (2013).
238. Watson, R. Vegetables, fruits, and herbs in health promotion. (2000).
239. Rao, A., research, L. R.-P. & 2007, undefined. Carotenoids and human health. *Elsevier*.
240. Meléndez-Martínez, A., Britton, G., Chemistry, I. V.-F. & 2007, undefined. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Elsevier*.
241. Olson, J. A. & Krinsky, N. I. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB J.* **9**, 1547–1550 (1995).
242. Snodderly, D. M., Brown, P. K., Delori, F. C. & Auran, J. D. *The Macular Pigment. I. Absorbance Spectra, Localization, and Discrimination from Other Yellow Pigments in Primate Retinas.* iovs.arvojournals.org
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2159509>.
243. Khachik, F., Bernstein, P. S. & Garland%, D. L. *Identification of Lutein and Zeaxanthin Oxidation Products in Human and Monkey Retinas. Invest Ophthalmol Vis Sci* vol. 38 <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2180938> (1997).
244. Bernstein, P., Khachik, F., Carvalho, L., ... G. M.-E. eye & 2001, undefined. Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. *Elsevier*.
245. Lornejad-Schäfer, M., ... C. L.-E. journal of & 2007, undefined. Solubility, uptake and biocompatibility of lutein and zeaxanthin delivered to cultured human retinal pigment epithelial cells in tween40 micelles. *Springer* doi:10.1007/s00394-006-0635-6.
246. Sujak, A., Gabrielska, J., Grudziński, W., ... R. B.-A. of biochemistry & 1999, undefined. Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative

- damage: the structural aspects. *Elsevier*.
247. Subczynski, W., Wisniewska, A., and, J. W.-A. of biochemistry & 2010, undefined. Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. *Elsevier*.
248. Sommerburg, O., E Keunen, J. E., Bird, A. C. & G M van Kuijk, F. J. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *bjournal.com* doi:10.1136/bjo.82.8.907.
249. Krinsky, N., medicine, E. J.-M. aspects of & 2005, undefined. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Elsevier*.
250. Abdel-Aal, E., Akhtar, H., Zaheer, K., Nutrients, R. A.- & 2013, undefined. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *mdpi.com*.
251. Koushan, K., Rusovici, R., Li, W., Ferguson, L. R. & Chalam, K. V. The Role of Lutein in Eye-Related Disease. *Nutrients* **5**, 1823–1839 (2013).
252. Aimjongjun, S., ... M. S.-... of P. and & 2013, undefined. Silk lutein extract and its combination with vitamin E reduce UVB-mediated oxidative damage to retinal pigment epithelial cells. *Elsevier*.
253. Wrona, M., Rózanowska, M., Medicine, T. S.-F. R. B. and & 2004, undefined. Zeaxanthin in combination with ascorbic acid or α -tocopherol protects ARPE-19 cells against photosensitized peroxidation of lipids. *Elsevier*.
254. Santocono, M., Zurria, M., Berrettini, M., ... D. F.-... of P. and & 2006, undefined. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. *Elsevier*.
255. Kowluru, R., ... B. M.-... ophthalmology & visual & 2008, undefined. Beneficial effect of zeaxanthin on retinal metabolic abnormalities in diabetic rats. *iovs.arvojournals.org*.
256. Muriach, M., Bosch-Morell, F., ... G. A.-F. R. B. & 2006, undefined. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Elsevier*.

257. Choi, J. *et al.* Inhibition of nNOS and COX-2 expression by lutein in acute retinal ischemia. *Elsevier*.
258. Arnal, E., Miranda, M., Barcia, J., Neuroscience, F. B.-M.- & 2010, undefined. Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. *Elsevier*.
259. Palve, Y., Sciences, P. N. P. and B. & 2012, undefined. Curcumin: a wonder anticancer drug. *cabdirect.org*.
260. Gupta, S. C., Kismali, G. & Aggarwal, B. B. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. *BioFactors* vol. 39 2–13 (2013).
261. Julie S & Jurenka. *Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of Curcuma longa: A Review of Preclinical and Clinical Research. Alternative Medicine Review* vol. 14 [http://69.164.208.4/files/Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of Curcuma longa: A Review of Preclinical and Clinical Research.pdf](http://69.164.208.4/files/Anti-inflammatory%20Properties%20of%20Curcumin,%20a%20Major%20Constituent%20of%20Curcuma%20longa:%20A%20Review%20of%20Preclinical%20and%20Clinical%20Research.pdf) (2009).
262. Del Prado-Audelo, M. L. *et al.* biomolecules Formulations of Curcumin Nanoparticles for Brain Diseases. *mdpi.com* (2019) doi:10.3390/biom9020056.
263. Aggarwal, B., Surh, Y. & Shishodia, S. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. (2007).
264. Sikora-Polaczek, M., Bielak-Zmijewska, A., Bioch, E. S.-P. & 2011, undefined. Biokomputery DNA. *rcin.org.pl* (2010).
265. Menon, V. P. & Sudheer, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 595 105–125 (2007).
266. Wang, L. *et al.* Curcumin inhibits lipolysis via suppression of ER stress in adipose tissue and prevents hepatic insulin resistance. *ASBMB* (2016) doi:10.1194/jlr.M067397.
267. Sharma, A., Gautam, S. & Jadhav, S. S. Spice extracts as dose-modifying factors in

- radiation inactivation of bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1340–1344 (2000).
268. Dahl, T. A., McGowan, W. M., Shand, M. A. & Srinivasan, V. S. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch. Microbiol.* **151**, 183–185 (1989).
269. Tsao, S., Analysis, M. Y.-J. of F. and D. & 2000, undefined. Enhanced inhibitory effect from interaction of curcumin with amphotericin B or fluconazole against *Candida* species. *search.proquest.com*.
270. De Clercq, E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medicinal Research Reviews* vol. 20 323–349 (2000).
271. Aggarwal, B., Kumar, A., research, A. B.-A. & 2003, undefined. A R system of medicine) for over 6000 years. *scienzemetaboliche.org*
<https://www.scienzemetaboliche.org/app/download/5798573831/Anticancer+Potential+of+Curcumin+Preclinical+and+Clinical+Studies.pdf>.
272. Tsvetkov, P. *et al.* Inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic compound curcumin. *PNAS April* vol. 12 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501828102 (2005).
273. Rameshrad, M., Razavi, B. M. & Hosseinzadeh, H. Saffron and its derivatives, crocin, crocetin and safranal: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* vol. 28 147–165 (2018).
274. Escribano, J., Alonso, G., Coca-Prados, M., letters, J. F.-C. & 1996, undefined. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Elsevier*.
275. Colapietro, A., Mancini, A., D'Alessandro, A. M. & Festuccia, C. Crocetin and Crocin from Saffron in Cancer Chemotherapy and Chemoprevention. *Anticancer Agents Med. Chem.* **19**, 38–47 (2019).
276. Ishizuka, F., Shimazawa, M., ... N. U.-E. journal of & 2013, undefined. Crocetin, a carotenoid derivative, inhibits retinal ischemic damage in mice. *Elsevier*.

277. Ochiai, T., Shimeno, H., Mishima, K., ... K. I.-... et B. A. (BBA & 2007, undefined. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Elsevier*.
278. Yamauchi, M., Tsuruma, K., Imai, S., ... T. N.-E. journal of & 2011, undefined. Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity. *Elsevier*.
279. Wang, H. *et al.* Crocetin inhibits the proliferation, migration and TGF- β 2-induced epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. *Elsevier*.
280. Zhang, H., Shang, Q., An, J., Wang, C. & Ma, J. Crocetin inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **842**, 329–337 (2019).
281. Mettu, P. S., Wielgus, A. R., Ong, S. S. & Cousins, S. W. Retinal pigment epithelium response to oxidant injury in the pathogenesis of early age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* **33**, 376–98 (2012).
282. Liu, H. *et al.* Protective effect of lutein on ARPE-19 cells upon H₂O₂-induced G2/M arrest. *Mol. Med. Rep.* **16**, 2069–2074 (2017).
283. Ardourel, J. E. Risk factors associated with age-related macular degeneration: A case-control study in the Age-Related Eye Disease Study: Age-Related Eye Disease Study report number 3. *Ophthalmology* **107**, 2224–2232 (2000).
284. Richer, S., Devenport, J. & Lang, J. C. LAST II: Differential temporal responses of macular pigment optical density in patients with atrophic age-related macular degeneration to dietary supplementation with xanthophylls. *Optometry* **78**, 213–219 (2007).
285. Weigert, G. *et al.* Effects of lutein supplementation on macular pigment optical density and visual acuity in patients with age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 8174–8178 (2011).
286. Murray, I. J. *et al.* Lutein supplementation over a one-year period in early AMD might have a mild beneficial effect on visual acuity: The CLEAR study. *Investig.*

- Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 1781–1788 (2013).
287. Lin, C. & Wu, X. Curcumin protects trabecular meshwork cells from oxidative stress. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 4327–4332 (2016).
288. Luo, Y., Ding, H., Li, D. & Luo, J. Curcumin protects trabecular meshwork cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis via Nrf2-keap1 pathway. *Trop. J. Pharm. Res.* **17**, 2169–2176 (2018).
289. Kowluru, R. A. & Kanwar, M. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutr. Metab.* **4**, (2007).
290. Mandal, M. N. A. *et al.* Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 672–679 (2009).
291. Bucolo, C. *et al.* Curcumin prevents high glucose damage in retinal pigment epithelial cells through ERK1/2-mediated activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *J. Cell. Physiol.* **234**, 17295–17304 (2019).
292. Yoshino, F., Yoshida, A., Umigai, N., Kubo, K. & Lee, M. Crocetin reduces the oxidative stress induced reactive oxygen species in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs) brain. *J. Clin. Biochem. Nutr* **49**, 182–187 (2011).
293. Zheng, S., Qian, Z., Wen, N. & Xi, L. Crocetin suppresses angiotensin II-induced vascular smooth-muscle cell proliferation through inhibition of ERK1/2 activation and cell-cycle progression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **50**, 519–525 (2007).
294. Giaccio, M. Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 155–172 (2004).
295. Cai, J. *et al.* Crocetin protects against cardiac hypertrophy by blocking MEK-ERK1-2 signalling pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 909–925 (2009).
296. Higashino, S. *et al.* Crocetin, a carotenoid from *Gardenia jasminoides* Ellis, protects against hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phyther. Res.* **28**, 1315–1319 (2014).
297. Khan, M. B. *et al.* Neuroprotective efficacy of *Nardostachys jatamansi* and crocetin

- in conjunction with selenium in cognitive impairment. *Neurol. Sci.* **33**, 1011–1020 (2012).
298. Venkatraman, M., Konga, D., Peramaiyan, R., Ganapathy, E. & Dhanapal, S. Reduction of Mitochondrial Oxidative Damage and Improved Mitochondrial Efficiency by Administration of Crocetin against Benzo[a]pyrene Induced Experimental Animals. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1639–1645 (2008).
299. Magesh, V., Vijeya Singh, J. P., Selvendiran, K., Ekambaram, G. & Sakthisekaran, D. Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. *Mol. Cell. Biochem.* **287**, 127–135 (2006).
300. Yang, R. *et al.* Suppression of NF- κ B pathway by crocetin contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **674**, 391–396 (2012).
301. Di Marco, S. *et al.* Saffron: A multitask neuroprotective agent for retinal degenerative diseases. *Antioxidants* **8**, (2019).
302. Jia, J., Li, K., Liu, X., Zhong, J. & Xiang, Y. *Crocetin protects retinal pigment epithelial cells from oxidative stress through suppression of the MAPK signaling pathway.* *Int J Clin Exp Med* vol. 9 www.ijcem.com/ (2016).
303. EMOTO, Y. *et al.* Curcumin Suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced Photoreceptor Apoptosis in Sprague-Dawley Rats. *In Vivo (Brooklyn)*. **27**, (2013).
304. Ohno, Y. *et al.* Oral administration of crocetin prevents inner retinal damage induced by N-methyl-d-aspartate in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **690**, 84–89 (2012).
305. Yamauchi, M. *et al.* Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity. *Eur. J. Pharmacol.* **650**, 110–119 (2011).