

**T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ
ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**CİVCİV EMBRİYOLARINDA OLUŞTURULAN
DENEYSEL KATARAKT MODELİNDE A, D ve E
VİTAMİNLERİNİN APOPTOTİK YOLAKLAR ÜZERİNE
ETKİSİ**

Rumeysa BALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Halit Buğra KOCA**

**Bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 22.LİS.001 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

2023-AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Yüksek Lisans Öğrencisinin

Adı Soyadı: Rumeysa Balı

İmza:

Danışmanın

Ünvanı, Adı Soyadı: Doç. Dr. Halit Buğra Koca

İmza:

KABUL VE ONAY

Doç. Dr. Halit Buğra Koca danışmanlığında Rumeysa Balı tarafından hazırlanan “Civciv Embriyolarında Oluşturulan Deneysel Katarakt Modelinde A, D ve E Vitaminlerinin Apoptotik Yolaklar Üzerine Etkisi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

14 /06/ 2023

JÜRİ:

Başkan : Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN

(Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

.....

Üye : Doç. Dr. Halit Buğra KOCA

(Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

.....

Üye : Prof. Dr. Ömer HAZMAN

(Afyon Kocatepe Üniversitesi)

.....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /...../

.....

Prof. Dr. Özal Özcan

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, maddi ve manevi olarak desteğini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Halit Buğra KOCA başta olmak üzere çalışmalarımı yürütürken bilgi ve becerilerinden azami derecede istifade ettiğim değerli hocalarım, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a, Prof. Dr. Tülay KÖKEN'e, Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Rumeysa ÇINAR'a; Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Feyza ERDOĞMUŞ'a; Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Recep PALAMUTOĞLU'na ve öğretim görevlisi Merve İNCE PALAMUTOĞLU'na; Sağlık çalışmamızın deney aşamasında tecrübeleriyle bilfiil destek olan Doç. Dr. Emre ATAY başta olmak üzere Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine; ayrıca üzerimde emeği olan diğer bütün hocalarıma ve iş arkadaşlarıma; yüksek lisans sürecinde ve hayatımın her alanında maddi ve manevi katkılarıyla, sabır ve anlayışlarıyla eğitimim ve çalışmalarımındaki başarıma büyük katkısı olan ailem ve arkadaşlarıma en içten dileklerle, teşekkür ederim.

Rumeysa Balı

Afyonkarahisar, Haziran 2023

CİVCİV EMBRİYOLARINDA OLUŞTURULAN DENEYSEL KATARAKT MODELİNDE A, D ve E VİTAMİNLERİNİN APOPTOTİK YOLAKLAR ÜZERİNE ETKİSİ

Rumeysa Balı

**Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Haziran 2023
Danışman: Doç. Dr. Halit Buğra Koca**

ÖZET

Glukokortikoidlerin güçlü antiinflamatuvar ve immünosupresif ajanlar olması, uzun süre veya yüksek dozda kullanılan glukokortikoidlerin şaşırtıcı derecede yan etki riskinin artmasına neden olur. Posterior subkapsüler kataraktın glukokortikoidlerin en önemli oküler komplikasyonlarından birisi olduğu epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan deney modelleri ile kanıtlanmıştır. Posterior subkapsüler kataraktlar, düzgün bir şekilde farklılaşmayan fiber hücrelerin normal lif hücrelerinin aksine uzamadan, uzayan normal lif hücreleri ile birlikte merceğin arka kutbuna göç ederek toplanmasıyla oluşur. Posterior subkapsüler katarakt patogenezi birden fazla mekanizmayı içerebilir ve patogenezi ile ilişkili son çalışmalar glukokortikoid reseptörlerinin genomik etkilerine yoğunlaşmaktadır. Lens epitel hücrelerinden üretilen yeni hücreler lens liflerine farklılaşırken ve merceğe taşınırken meydana gelen apoptotik olayların posterior subkapsüler katarakt patogenizinde rol aldığı düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı civciv embriyosunda steroid kaynaklı katarakt modeli oluşturarak hidrokortizonun (HC) katarakt patogenizinde apoptotik etkisini aydınlatmak; steroid verilen embriyolara A, D ve E vitaminleri ile müdahale ederek A, D ve E vitaminlerinin anti-antiapoptotik potansiyeli açısından insanlarda kataraktogeneze karşı koruyucu rolünü araştırmayı amaçlamaktadır.

Çalışmamızda glukokortikoid sınıfında yer alan HC ile indüklenmiş civciv embriyolarından elde edilen lenslerde p53, NF-κB, Bcl-2 protein düzeyleri ile p53, NF-κB, Bax ve Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeylerine bakılmış ve A, D, E vitamin muamelelerinin bu belirteçler üzerine etkilerinin olup olmadığı incelenmiştir. HC

uygulamasının p53, NF- κ B, Bcl-2 protein düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğü; A vitamininin üç dozunun p53, NF- κ B, Bcl-2 protein seviyelerini artırarak normale yaklaştırdığı; orta doz D vitamininin sadece Bcl-2 protein düzeylerini artırırken yüksek doz D vitamininin p53, NF- κ B, Bcl-2 protein düzeylerini artırdığı; orta ve yüksek doz E vitamininin ise p53, NF- κ B, Bcl-2 protein düzeylerini artırdığı tespit edilmiştir. mRNA ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmasa da HC'nin p53, NF- κ B, Bax/Bcl-2 mRNA düzeylerini düşürdüğü; A vitamini ise p53, NF- κ B, Bax/Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeylerini normale döndürdüğü görülmektedir.

HC'nin lenslerde p53, NF- κ B, Bcl-2 düzeylerine olumsuz etkisinin olduğu ve bu olumsuz etkinin A, D ve E vitaminleri tarafından azaltılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Katarakt, Apoptoz, Glukokortikoid, Lens, Vitamin A, Vitamin D, Vitamin E

THE EFFECT OF VITAMINS A, D, and E ON APOPTOTIC PATHWAYS IN AN EXPERIMENTAL CATARACT MODEL GENERATED IN CHICK EMBRYOS

Rumeysa Balı

**Afyonkarahisar University of Health Sciences
Institute of Graduate Education Department of Medical Biochemistry
Master's Thesis**

June 2023

Supervisor: Assoc. Prof. Halit Buğra Koca

ABSTRACT

The potent anti-inflammatory and immunosuppressive properties of glucocorticoids contribute to an increased risk of surprising side effects when used for a prolonged period or at high doses. Epidemiological studies and animal experimental models have demonstrated that posterior subcapsular cataract is one of the most significant ocular complications associated with glucocorticoids. Posterior subcapsular cataracts occur when undifferentiated fiber cells fail to differentiate properly and instead migrate and accumulate at the posterior pole of the lens alongside elongating normal fiber cells. The pathogenesis of posterior subcapsular cataract may involve multiple mechanisms, and recent studies focusing on the genomic effects of glucocorticoid receptors are associated with its pathogenesis. It is believed that apoptotic events occurring during the differentiation and migration of newly produced lens epithelial cells to lens fibers play a role in the pathogenesis of posterior subcapsular cataracts.

The aim of this study is to create a steroid-induced cataract model in chick embryos and elucidate the apoptotic effects of hydrocortisone (HC) in cataract pathogenesis. Additionally, we aim to investigate the protective role of vitamins A, D, and E against cataractogenesis in humans by intervening with vitamins A, D, and E in steroid-treated embryos, in terms of their anti-apoptotic potential.

In our study, we examined the levels of p53, NF- κ B, Bcl-2 proteins, and p53, NF- κ B, Bax and Bcl-2 mRNA expression levels in lenses obtained from hydrocortisone-induced chick embryos, which belong to the glucocorticoid class. We also investigated the effects

of vitamins A, D, and E treatments on these markers. The application of HC significantly decreased the levels of p53, NF- κ B, and Bcl-2 proteins, while all three doses of vitamin A increased the levels of p53, NF- κ B, and Bcl-2 proteins, bringing them closer to normal levels. The moderate dose of vitamin D only increased the levels of Bcl-2 protein, while the high dose of vitamin D increased the levels of p53, NF- κ B, and Bcl-2 proteins. Both moderate and high doses of vitamin E increased the levels of p53, NF- κ B, and Bcl-2 proteins. Although there were no statistically significant changes in mRNA expressions, HC reduced the levels of p53, NF- κ B, and Bax/Bcl-2 mRNA, while vitamin A restored the levels of p53, NF- κ B, and Bax/Bcl-2 mRNA to normal levels.

It was concluded that HC had a negative impact on p53, NF- κ B, Bcl-2 levels in lenses and this negative effect could be reduced by vitamins A, D, and E.

Keywords: Cataract, Apoptosis, Glucocorticoid, Lens, Vitamin A, Vitamin D, Vitamin E

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	I
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	II
KABUL VE ONAY	III
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KATARAKT	4
2.1.1. Katarakt Epidemiyolojisi	5
2.1.2. Katarakt Patofizyolojisi ve Sınıflandırılması	5
2.1.3. Yaşa Bağlı Kataraktlar	7
2.1.3.1. Nükleer Katarakt	7
2.1.3.2. Kortikal Katarakt	8
2.1.3.3. Posterior Subkapsüler Katarakt	8
2.1.4. Pediatrik Kataraktlar	8
2.1.5. Diğer Kataraktlar	10
2.1.5.1. Kortikosteroidle İndüklenmiş Katarakt	10
2.2. VİTAMİNLER	12
2.2.1. Vitamin A	12
2.2.1.1. Vitamin A Metabolizması	13
2.2.1.2. Retinoid Reseptörleri	15
2.2.1.3. Vitamin A ve Görme Sistemi	16
2.2.2. Vitamin D	18
2.2.2.1. Vitamin D Metabolizması	18
2.2.2.2. Vitamin D Reseptörleri	20
2.2.2.3. VDR Aracılı Gen Kontrolü	21
2.2.3. Vitamin E	22
2.2.3.1. Vitamin E Metabolizması	23
2.2.3.2. Vitamin E Redoks Etkileşimleri	24
2.2.3.3. Vitamin E'nin Sinyal İletimindeki Rolü	26
2.3. APOPTOZİS	27
2.3.1. Apoptosis Morfolojisi	28

2.3.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	29
2.3.3. Apoptozis Süreci	29
2.3.3.1. İçsel Yol (İntrensek Yol).....	30
2.3.3.2. Dışsal Yol (Ekstrensek Yol).....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	34
3.2. LABORATUVAR KOŞULLARI.....	34
3.3. GRUPLARIN OLUŞTURULMASI VE DENEY AŞAMASI	34
3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZ AŞAMASI.....	38
3.4.1. Elisa Ölçümleri.....	38
3.4.2. Protein Ölçümü	42
3.4.3. Real-Time PCR Ölçümü	42
3.5 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. P53 PROTEİN DÜZEYLERİ	48
4.2. NF-KB PROTEİN DÜZEYLERİ	49
4.3. BCL-2 PROTEİN DÜZEYLERİ	51
4.4. P53 GEN EKSPRESYONU DÜZEYLERİ	52
4.5. NF-KB GEN EKSPRESYONU DÜZEYLERİ	54
4.6. BAX/BCL-2 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİ.....	55
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	70

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABCA1	ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı 1
ABCG1	ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı G1
AIP	Apoptoz indükleyici faktör
AP-1	Aktivatör protein 1
APOBD	Apoptotic bodie
ARAT	Açıl KoA-retinol açıltransferaz
ATRA	Tüm trans retinoik asit
ATRo1	Tüm trans retinol
BAX	Bcl-2 ilişki X proteini
BCL-2	B hücreli lösemi/lenfoma 2 proteini.
cGCR	Sitozolik glukokortikoid reseptörü
CRABP	Hücrel retinoik asit bağlayıcı proteinler
CRBP	Hücrel retinol bağlayıcı protein
CYP	Sitokrom P450
DIABLO	Düşük pI ile doğrudan IAP bağlayıcı protein
DISC	Ölüme neden olan sinyal kompleksi
GA	Güven Aralığı
GC	Glukokortikoid
GILZ	Glukokortikoid kaynaklı lösin fermuarı
GİL	Göz içi lens
GR	Glukokortikoid reseptörü
HC	Hidrokortizon
HLE	İnsan lens epiteli
ICS	İnhale glukokortikoid
LEC	Lens epitel hücresi
LRAT	Lesitin-retinol açıltransferaz
MAP	Mitojenle ektive edilen protein
MAPK	Mitojenle ektive edilen protein kinaz
MTTP	Mikrozomal trigliserit transfer proteini
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
NPC1L1	Niemann-Pick C1-benzeri-1

Omi	HtrA2/ mitokondriyal yerleşimli bir serin proteaz
P53	Tümör protein 53
PSC	Posterior subkapsüler katarakt
PUMA	p53 yukarı regüleli apoptoz modülatörü
RALDH	Retinaldehit dehidrojenaz
RAR	Retinoik asit reseptörleri
RARE	Retinoik asit yanıt elementlerine
RBP	Retinol bağlayıcı protein
RBP-IV	Retinol bağlayıcı protein 4
RDH	Retinol dehidrojenaz
REH	Retinaldehid hidrojenaz
RR	Rölatif Risk
RXR	Retinoid X reseptörleri
SIC	Steroidle indüklenmiş katarakt
SMAC	Küçük mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü
SPF	Sipessifik patojen içermeyen
SR-BI	Çöpcü reseptör sınıf B-1
TNFRSF	Tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesi
TNFSF	Tümör nekroz faktörü süper ailesi
VDR	Vitamin D resptörü
VDRE	Vitamin D resptörü yanıt elemanı
α TTP	α -tokoferol transfer proteini
α T	α -tokoferol

TABLOLA R DİZİNİ

Tablo 2.1: Vitamin E Tarafından Düzenlenen Enzimler	26
Tablo 2.2: Vitamin E'nin Etkilediği Transkripsiyon Faktörleri.....	27
Tablo 3.1: Gruplar, kullanılan kimyasal/biyolojik maddeler ve farmakolojik ajanlar.....	37
Tablo 3.2: cDNA Standart Reaksiyonda bir numune ve toplam numune için gereken reaktif miktarları.....	44
Tablo 3.3: cDNA sentezi için kullanılan sıcaklık ve süre değerleri.....	45
Tablo 3.4: RT-QPCR İçin Kullanılan Primerler	45
Tablo 3.5: PCR Ölçümünde Kullanılan Cihaz ve Malzeme Listesi.....	46
Tablo 4.1: Lens dokusuna ait P53 mg/g protein değerleri	49
Tablo 4.2: Lens dokusuna ait NFk-B mg/g protein değerleri	50
Tablo 4.3: Lens dokusuna ait BCL-2 mg/g protein.....	52
Tablo 4.4: Rölatif P53 Gen Ekspresyonu.....	53
Tablo 4.5: Rölatif NFkB Gen Ekspresyonu	54
Tablo 4.6: Rölatif BAX/Bcl-2 Gen Ekspresyonu	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Lensin göz içindeki normal konumunu gösteren gözün ön segmentinin enine kesiti	6
Şekil 2.2: Mercek yapılarının ve farklı katarakt türlerinin özellikleri	9
Şekil 2.3: A vitamini metabolizmasındaki önemli karotenoid ve retinoid molekülleri. .	13
Şekil 2.4: A vitamini emilimi ve taşınması	15
Şekil 2.5: Retina pigment epitelyal hücrelerinde ve fotoreseptör (koni ve çubuk) ile Müller hücrelerinde retinoid sinyalleşmesini gösteren şematik.....	17
Şekil 2.6: Vitamin D Metabolizması.....	19
Şekil 2.7: Vitamin D Etki Mekanizması	20
Şekil 2.8: Vitamin E Kimyasal Yapısı ve Türevleri	23
Şekil 2.9: Oral Alınan Vitamin E Metabolizması	25
Şekil 3.1: Deney Aşamalarına Ait Görüntüler	36
Şekil 4.1: P53 Protein Düzeyleri	49
Şekil 4.2: NFκB Protein Düzeyleri	51
Şekil 4.3: Bcl-2 Protein Düzeyleri	52
Şekil 4. 4 Rölatif P53 Gen Ekspresyonu	53
Şekil 4.5: Rölatif NFκB Gen Ekspresyonu	54
Şekil 4.6: BAX/Bcl-2 Gen Ekspresyon Oranı.....	55
Şekil 5.1: Glukokortikoidlerin genomik etkileri	60
Şekil 5.2: Hücrelerin sitotoksik ilaçlara, radyasyona ve sitokin çekilmesine apoptotik tepkileri için oluşturulmuş model.....	63

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Katarakt, küresel olarak tedavi edilebilen körlük ve görme bozukluğunun önde gelen nedenidir. Katarakt nedenli körlük, düşük sosyoekonomik statüye sahip popülasyonlarda ve az gelişmiş ülkelerde daha yaygındır (Lam ve ark., 2015).

Lens, lens kapsülü adı verilen membranöz bir yapı içinde bulunan liflerden (modifiye epitel hücrelerinden) oluşan şeffaf bir yapıdır. Lens maddesi iki ana bölümden oluşur. Yüzeysel kısımda yer alan korteks daha genç lifler içerir. Daha derin kısımda yer alan çekirdek ise daha eski lifler içerir. Lens büyümesinin herhangi bir aşamasında meydana gelen bozukluklar, lens epitelinin fibröz metaplazisi, lens lifleri arasındaki kortikal hidrasyon, bazı pigmentlerin birikmesi gibi birçok dejeneratif süreç, bahsi geçen lens liflerinde bulunan lens proteinlerini farklı mekanizmalarla denatüre ve koagüle eder, bu da şeffaflık kaybına (opaklaşmaya) ve nihayetinde katarakt oluşumuna neden olur (Nizami ve Gulani, 2022) Katarakt görsel olarak önemli hale geldiğinde, katarakt cerrahisi yerleşik tek tedavi yöntemidir (Davis, 2016).

Kataraktlar nedenlerine göre yaşa bağlı kataraktlar, pediatrik kataraktlar ve diğer nedenlere bağlı kataraktlar olarak sınıflandırılırken lensteki opaklaşmanın konumuna bağlı olarak nükleer, kortikal ve posterior subkapsüler katarakt (PSC) olmak üzere üç türe ayrılabilir (Liu ve ark., 2017). Katarakta yol açan diğer nedenler arasında travma, sistemik hastalıklar, endokrin hastalıklar, birincil göz hastalıkları ya da ilaç komplikasyonları yer alır (Nizami ve Gulani, 2022).

Glukokortikoidler (GC); alerji ve astım, romatoid artrit ve diğer otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere birçok klinik durumun tedavisinde yaygın olarak kullanılan yüksek etkili antiinflamatuvar ajanlardır. Ek olarak, kanser kemoterapisi ve organ transplantasyonunda önemli rol oynarlar. Bununla birlikte, GC'ler nispeten yüksek dozlarda uzun bir süre boyunca uygulandığında ciddi komplikasyonlara neden olur. Steroid tedavisinin oküler komplikasyonlarından birisi, özellikle PSC gelişmesidir (James, 2007).

GC'lerin, oksidatif stres, spesifik olmayan GC bağlanması ve membran steroid reseptörleri dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla lens epitel hücrelerini etkilediği önerilmiş olsa da transkripsiyonel olarak aktif bir hücre içi glukokortikoid

reseptörünün (GR) tanımlanması GC'lerin hedef genlerin transkripsiyonunu modüle ediyor olabileceğini göstermiştir (Gupta ve ark., 2005).

GR'ler, ligandla indüklenebilir transkripsiyon faktörlerinin bir süper ailesi olan steroid hormon reseptörü ailesinin üyeleridir ve antiinflamatuvar proteinlerin artmasına (transaktivasyon) veya proinflamatuvar proteinlerin üretiminin azalmasına (transrepresyon) neden olabilen genomik etkiler sergilerler. Transaktivasyonun, glukokortikoidlerin sayısız yan etkilerinden, transrepresyonun ise glukokortikoidlerin klinik olarak arzu edilen antiinflamatuvar ve immünosupresif etkilerinin çoğundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Stahn ve Buttgereit, 2008). Bununla birlikte glukokortikoid reseptör aktivasyonu, glukoneogenez, büyüme faktörlerinin ekspresyonu ve aktivitesi, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, sinyal iletim yollarındaki değişiklikler ve apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (James, 2007).

Lens epitel hücrelerinin (LEC) apoptozunun, çeşitli katarakt oluşumunun patogeneğinde rol oynadığı bildirilmiş, HLE-B3 hücre hattında yapılan bir çalışmada insan lens epitel hücrelerinin (HLEC) apoptozunun, katarakt tabakası olarak ortaya çıkan opaklıkların gelişiminden sorumlu olduğu düşünülmüştür (Chasan-Taber ve ark., 1999; Takamura ve ark., 2003).

Apoptoz, nekroptoz, piroptoz, ferroptoz veya otofaji gibi hücrel intihar mekanizmaları, canlı organizmaların biyolojisinde iç içe girmiştir ve bu mekanizmalar çoğu durumda bir organizmanın yaşam döngüsünde avantajlar sağlar. Gelişim sırasında dokuları şekillendirmeye, artık ihtiyaç duyulmadığında dokuları çıkarmaya veya heterojenliği sağlamaya katkıda bulunabilir (Griffioen ve Nowak-Sliwinska, 2021). Büyüme faktörü geri çekilmesi, iyonlaştırıcı radyasyon, Ca^{+2} akışı, tümör nekroz faktörü, viral enfeksiyon ve glukokortikoidler apoptozun indükleyecileri arasında yer alır. Bu sinyallere yanıt olarak, hücre kendisinin yok edilmesini sağlayan programlanmış hücre ölümünü indükler (King ve Cidlowski, 2003). Bu nedenle, programlanmış hücre ölümü ile ilgili araştırmalar hastalık süreçlerine fayda sağlayacak terapötik stratejilerin geliştirilmesine olanak tanır (Griffioen ve Nowak-Sliwinska, 2021).

Kataraktın genetik temellerini araştırmak popülasyon kısıtlılıkları sebebiyle zor olduğu için hayvan modellerinin önemi büyüktür (Kaya, 2020). Sıçan, fare, tavşan ve civciv

embriyosu üzerinde steroid kaynaklı katarakt (SIC) modelleri oluşturularak birçok deneysel çalışma yapılmıştır (Duman ve ark., 2019)

Mevcut araştırma çalışması, civciv embriyosunda steroid kaynaklı katarakt modeli oluşturarak hidrokortizonun (HC) katarakt patogenizinde apoptotik etkisini aydınlatmak; steroid verilen embriyolara A, D ve E vitaminleri ile müdahe ederek A, D ve E vitaminlerinin antiapoptotik potansiyeli açısından insanlarda kataraktogeneze karşı koruyucu rolünü araştırmayı amaçlamaktadır (Choi ve ark., 2020; Tuj Johra ve ark., 2020)



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Katarakt

Katarakt, dünya çapında önde gelen görme bozukluğu nedenidir. Dünyadaki katarakt vakalarının % 90'ının gelişmekte olan ülkelerde bildirilmesine rağmen, gelişmiş ülkelerde kataraktın sosyal, fiziksel ve ekonomik etkisi çok fazladır (Prokofyeva ve ark., 2013).

Kristalinler, merceği ve mercek yüzeylerini oluşturan, kırılma işlevinden sorumlu olan temel proteinlerdir. Kristalinlerin modifikasyonu, agregasyonu ve çökmesi katarakt patogenizinin altında yatan temel mekanizmalardır. Henüz bu süreci engelleyebilecek kesin bir yöntem bulunamamıştır. Kataraktların önemli bir kısmına yaşa bağlı dejenerasyon neden olur; ancak travmaya bağlı olarak veya başka bir hastalığın sonucu (sekonder) olarak da gelişebilir, çocuklarda ise nadir rastlanılan bir durumdur (Lam ve ark., 2015).

Tedavi seçenekleri sadece erken evrelerde refraktif gözlüklerle düzeltmeyi içerir ve eğer katarakt rutin aktiviteleri engelleyecek kadar olgunlaşırsa, en etkili yöntem olan katarakt cerrahisi önerilebilir (Nizami ve Gulani, 2022). Günümüzde katarakt cerrahisi, opaklaşmış merceğin çıkarılması ve göz içi lens (GİL) olarak bilinen sentetik bir mercek ile değiştirilmesi olarak tanımlanır (Thompson ve Lakhani, 2015). Cerrahi teknoloji ve tekniklerin ilerlemesi ile katarakt cerrahisi, çoğu hastada hızlı görsel iyileşme, iyi görsel sonuçlar ve minimal komplikasyonlarla küçük insizyonel cerrahiye dönüşmüştür. Katarakt cerrahisindeki yeni gelişmeler görsel, anatomik ve hasta tarafından bildirilen sonuçları iyileştirmeye devam edecektir (Liu ve ark., 2017). Buna rağmen yaşlı nüfusun artması katarakt insidansının ve prevalansının artışına neden olur. Katarakt cerrahisine yönelik artan talebin, önleyici tedbirler alınmadığı takdirde gelecekte karşılanması zor olabilir (Kessel, 2011). Bu nedenle kataraktın değiştirilebilir risk faktörlerinin gözden geçirilmesi ve katarakt ameliyatlarının toplam maliyetine etki eden yönlerinin değerlendirilmesi gereklidir (Prokofyeva ve ark., 2013).

Normalde sağlıklı olan yetişkin gözünün merceğinde katarakt oluşumunu veya ilerlemesini engelleyecek herhangi bir tedavi yöntemi henüz mevcut değildir. Katarakt oluşumu ve yenilikçi yönetim biçimleri hakkındaki teoriler ise tartışmalıdır. Katarakt gelişimi için çeşitli risk faktörleri tanımlanmış olmasına rağmen katarakt riskini azaltmak

için kılavuzlar geliştirmeye yönelik veriler kesin değildir ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Jick ve ark.,2019).

2.1.1. Katarakt Epidemiyolojisi

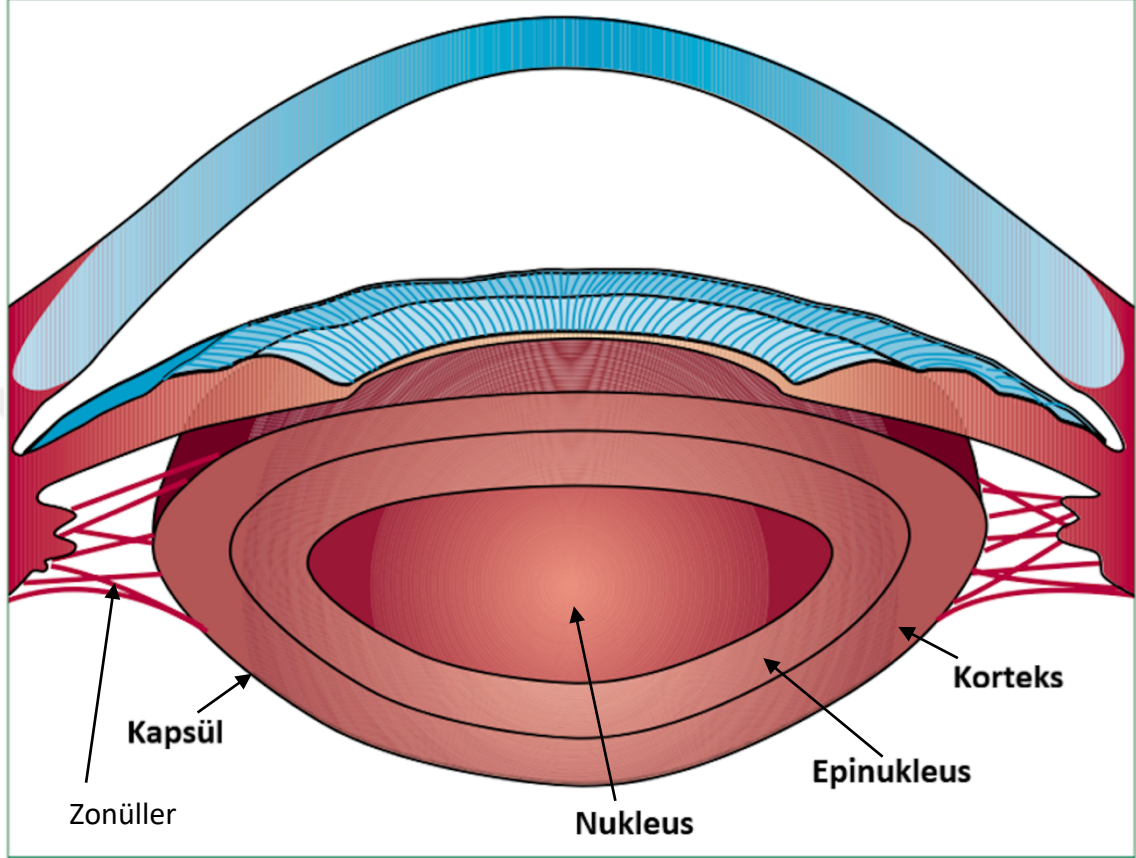
Dünya Sağlık Örgütü, küresel olarak, en az 2,2 milyar insanın yakın ve/veya uzak görme bozukluğuna sahip olduğunu ve bu vakaların en az 1 milyarında (neredeyse yarısında) görme bozukluğunun önlenebileceğini, bu görme bozukluğuna sahip 1 milyar insanın 94 milyonunun ise katarakt nedeni olduğunu bildirmiştir (World Health Organization, 2019). Birkaç büyük ölçekli popülasyona dayalı çalışma, katarakt prevalansının yaşla birlikte arttığını, 55-64 yaşlarında % 3.9 iken 80 yaş ve üzerinde % 92.6'ya çıktığını bildirmiştir (Liu ve ark., 2017). 2010 yılında yapılan birçok araştırma, kataraktın en yaygın olarak Beyaz Amerikan ırkında görüldüğünü ortaya koymuş ve Beyaz Amerikan ırkında prevalansın % 17 ila % 18 arasında değiştiğini göstermiştir. Siyahlar, % 13 yaygınlık oranıyla kataraktan en çok etkilenen ikinci grup olmuş ve bunu yaklaşık % 12 yaygınlık oranıyla Hispanikler izlemiştir. Çocuklarda ve yaşlılarda da vakalar bildirilmiş olsa da, başlangıç genellikle ileri yaş grubunda, tipik olarak beşinci ve altıncı dekatta kademeli ve ilerleyicidir. Yapılan çalışmalar, hastalığın kadınlarda erkeklerden daha yaygın olduğunu, erkek / kadın oranının 1'e 1.3 olduğunu ortaya koymuştur (Nizami ve Gulani, 2022). Ek olarak yapılan bazı çalışmalarda ise dünya çapında katarakt nedeniyle kör olanların sayısının 1990'da 12.3 milyondan 2010'da 20 milyona çıktığı bulunmuştur (Lee ve Afshari, 2017).

2.1.2. Katarakt Patofizyolojisi ve Sınıflandırılması

Mercek, gözün içindeki irisin arkasında oturan şeffaf, bikonveks bir disktr (Thompson ve Lakhani, 2015). İnsan kristalin merceği, ayrılmış şeffaf proteinlerin kapsüllenmiş bir torbasıdır. Lens proteinlerinin dizilişindeki ve karakterindeki değişiklikler, önce lensin sertliğinin artmasına ve sonunda şeffaflığın kaybolmasına neden olur. İlk süreç presbiyopiye (doğal odaklanma yeteneğinin kaybı) neden olurken ikinci süreç katarakta yol açar (Lam ve ark., 2015).

Lens, siliyer cisme Zinn zonülleri olarak bilinen liflerle tutturulmuştur ve bir trambolin gibi asılıdır (Şekil 2.1). Lens, arteriyel veya venöz kan dolaşımından yoksun ve nispeten düşük seviyelerde hücrel metabolizma sergileyen benzersiz bir organdır. Gelişmiş lens

avasküler yapısına ek olarak sinir ağına sahip değildir. Metabolik ihtiyaçları bitişik aköz hümör tarafından karşılanır (Lam ve ark., 2015; Thompson ve Lakhani, 2015).



Şekil 2.1: Lensin göz içindeki normal konumunu gösteren gözün ön segmentinin enine kesiti (Asbell ve ark., 2005).

Lens lifleri, lens epitelinden üretilir ve periferden merkeze doğru göç eder. Bu nedenle, lensin çekirdeği daha eski lens liflerinden oluşur ve yeni oluşan lens lifleri, lensin en dış katmanlarında, kortekste bulunur (Liu ve ark., 2017). Bu yeni oluşan hücreler mercek liflerine farklılaşırken ve böylece şeffaflık kazanırken gerilirler, organellerini kaybederler ve hücresel proteinlerin kütesini önemli ölçüde artırır (Thompson ve Lakhani, 2015). Lens lifi hücreleri çekirdek, mitokondri ve ribozomlar gibi organellerden yoksundur ve yüksek konsantrasyonda farklı proteinler, lens kristalinleri ile doludur. Kristalinler şeffaftır ve yüksek bir kırılma indeksine sahiptir. Mercek proteinleri değiştirilmez veya bozulmaz ve merceğin sürekli şeffaflığı, insan ömrü boyunca doğal yapılarını ve çözünürlüğünü koruyan kristallere bağlıdır (Lam ve ark., 2015). Organeller olmadan bu merkezi hücreler, yaşlanmanın fotooksidatif etkilerine karşı daha hassastır. Bu hücrelere yönelik fotooksidatif saldırılar, kristalinlerin doğal kıvrımlarının kaybına ve kristalinleri

yüksek moleküler ağırlıklı kompleksler halinde toplanmaya eğilimli hale getirir böylece katarakt olarak bilinen lenste renk bozulmasına ve opasitelere yol açar. Kataraktlı bir mercekte kristaller, yüksek molekül ağırlıklı agregatlar veya polimerler ile sıkı bir şekilde ilişkilidir ve bu komplekslerin oluşumu opaklaşmaya, ışığın mercekten geçerken saçılmasına neden olur ve bu da retinaya giden ışık miktarını azaltır (Lam ve ark., 2015; Thompson ve Lakhani, 2015).

Kataraktlar nedenlerine göre yaşa bağlı kataraktlar, pediatrik kataraktlar ve diğer nedenlere bağlı kataraktlar olarak sınıflandırılabilir. Lens içindeki opaklaşmanın konumuna bağlı olarak, yaşa bağlı kataraktlar nükleer, kortikal ve posterior subkapsüler katarakt olmak üzere üç türe ayrılabilir (Liu ve ark., 2017).

2.1.3. Yaşa Bağlı Kataraktlar

Lensteki yaşa bağlı değişikliklerin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır ve çok faktörlü olması muhtemeldir (Asbell ve ark., 2005). Yaşa bağlı kataraktlar, lens kronolojik yaşlanması, oksidasyonu, kalsiyum dengesizliği, hidrasyon ve kristalin modifikasyonları ile yakından ilişkilidir (Periyasamy ve Shinohara, 2017). Klinik görünümüne göre tanımlanan yaşa bağlı üç ana katarakt türü vardır: Nükleer, kortikal ve PSC. Bu katarakt tipleri tek başlarına veya kombinasyon halinde bulunabilirler (Şekil 2.2) (Asbell ve ark., 2005).

2.1.3.1. Nükleer Katarakt

Lens yaşlandıkça, yeni lif katmanları eklenir ve bu yeni lif katmanları lens çekirdeğini sıkıştırır. Lens çekirdeği sararmayla birlikte sertleşir. Nükleer skleroz yıllar içinde yavaş ilerleme eğilimindedir (Asbell ve ark., 2005). 50 yaşından büyük hastalarda bir dereceye kadar nükleer skleroz ve sararma normaldir. Genel olarak, bu durum görsel işleve çok az müdahale eder. Nükleer kataraktlı gözlerde, göz doktorunun sarı-kahverengi bir merkezi lens çekirdeği olarak gözlemlediği merkezi opaklık, artan miktarda ışık saçılmasına neden olur. Nükleer katarakt tipik olarak uzak görüşte yakın görüşten daha fazla bozulmaya neden olur. Katarakt gelişiminin erken evrelerinde, lens çekirdeğinin ilerleyici sertleşmesi sıklıkla merceğin kırılma indeksinde bir artışa ve dolayısıyla kırılmada miyopik bir kaymaya (lentiküler miyopiye) neden olur (Jick ve ark.,2019).

2.1.3.2. Kortikal Katarakt

Kortikal katarakt, yaşa bağlı kataraktın ikinci en yaygın türüdür (Jun ve ark., 2009). Nükleer kataraktların aksine, kortikal kataraktlar, olgun lens lifi hücrelerinin yapısının yerel olarak bozulmasıyla ilişkilidir. Hücrelerin membran bütünlüğü tehlikeye girdiğinde, hücrelerden temel metabolitler kaybolur. Bu kayıp, kapsamlı protein oksidasyonuna ve çökmesine yol açar (Jick ve ark.,2019). Kortikal kataraktlar genellikle merceğin çevresinden uzanan "radyal parmaklıklardan" oluşur. Görme üzerindeki etkileri, görsel eksene göre opaklaşmanın konumuna bağlı olarak büyük ölçüde değişir (Quillen, 1999).

Yaşlanmayla birlikte, merceğin korteksinde, görme eksenini veya tüm korteksi içermediği sürece tipik olarak hiçbir görsel belirtiye neden olmayan ayrı opasiteler (kortikal parmaklıklar) gelişebilir. Opasitelerin gelişmesiyle mercek beyazlaşır. Tüm korteks beyaz ve opak hale geldiğinde kataraktın olgun olduğu söylenir (Asbell ve ark., 2005). Kortikal kataraktlar, ilerleme hızlarında büyük farklılıklar gösterir (Jick ve ark.,2019).

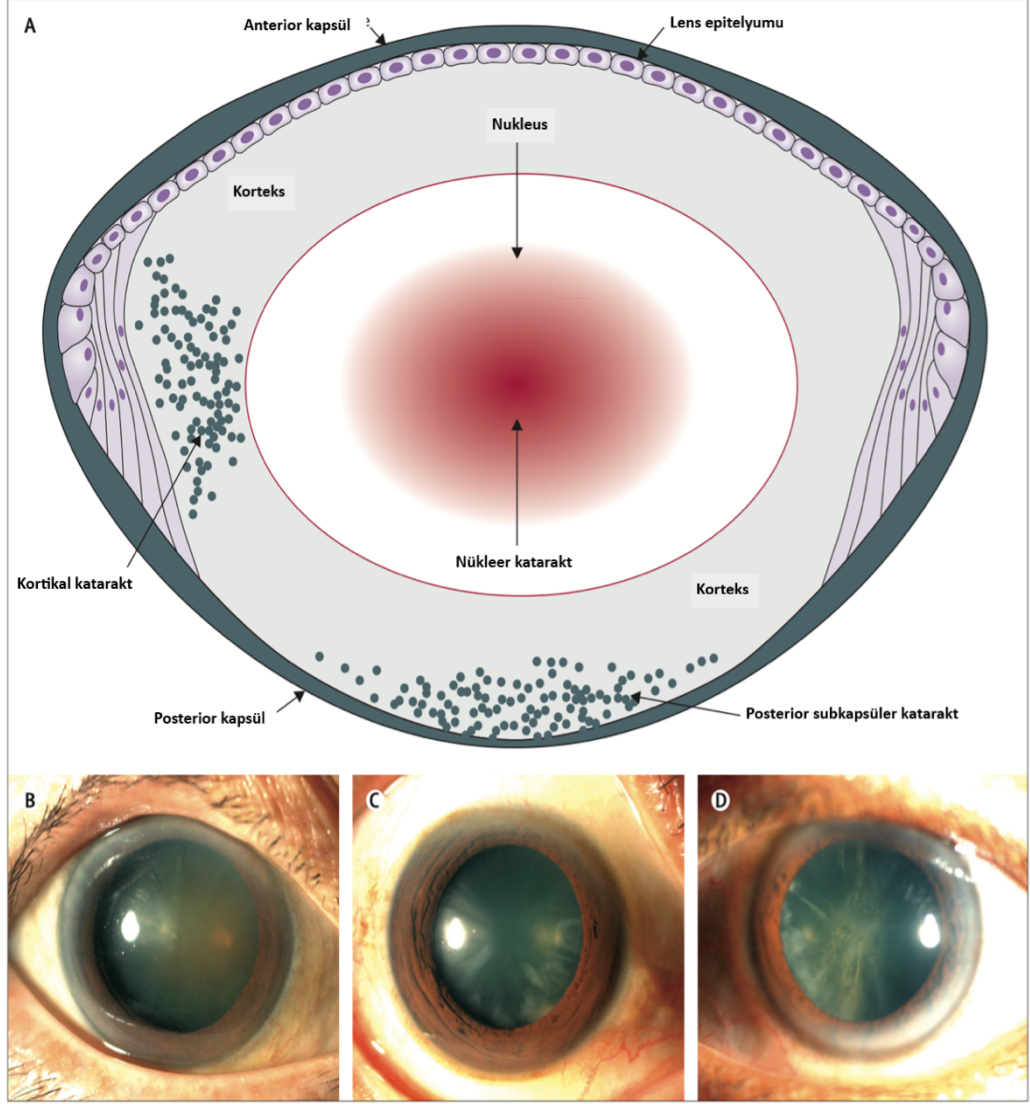
2.1.3.3. Posterior Subkapsüler Katarakt

PSC'ler yaşlanma ile ilgili ana katarakt türlerinden biridir. Ancak; sistemik, topikal veya intraoküler kortikosteroid kullanımı, iltihaplanma, iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma ve uzun süreli alkolün kötüye kullanımı gibi travma sonucu da oluşabilirler (Jick ve ark.,2019). PSC'ler, düzgün bir şekilde farklılaşamayan fiber hücrelerden oluşur. Normal lif hücrelerinin aksine, bu hücreler uzamazlar. Bunun yerine, uzayan lif hücreleri ile birlikte göç ederler veya taşınırlar ve merceğin arka kutbunda toplanırlar. Bu düzensiz hücre kümeleri optik ekseninde yer aldıkları için görme keskinliğini azaltır. İnsan PSC'lerinin biyokimyasal süreci tam olarak aydınlatılamamıştır. Etiyolojileri hakkındaki bilgiler, bu opasitelerin gelişme riskinin artmasıyla ilişkili risk faktörleriyle sınırlıdır (Beebe ve ark., 2010) .

2.1.4. Pediatrik Kataraktlar

Pediatrik katarakt, çocukluk çağı körlüğünün önde gelen nedenlerinden biridir. Pediatrik kataraktın etiyolojisi çeşitlidir ve spesifik etiyolojinin teşhisi prognoz belirlemeye ve etkili tedaviye yardımcı olur (Khokhar ve ark., 2017). Çocukluk çağı kataraktları,

doğumsal, gelişimsel ve travmatik olmak üzere üç ana gruba ayrılır (Vasavada ve ark.,2006).



Şekil 2.2: Mercek yapılarının ve farklı katarakt türlerinin özellikleri: (A) Mercek yapılarının ve bunlara karşılık gelen katarakt türlerinin şematik bir görünümü. (B) nükleer katarakt, (C) kama şeklindeki kortikal katarakt ve (D) eksenel arka kortikal tabakada plak opaklığına sahip subkapsüler arka katarakt. Hastaların çoğunda birden fazla katarakt tipi vardır (Liu ve ark., 2017).

Çocukluk çağı kataraktlarının yaklaşık yarısı genetik olarak belirlenir. Katarakt izole olabilir, gözün diğer gelişimsel anormallikleri ile ilişkili olabilir veya kalıtsal bir multisistem bozukluğunun parçası olabilir. Geri kalanının nedenleri arasında intrauterin enfeksiyonlar (kızamıkçık, suçiçeği, toksoplazmoz), metabolik bozukluklar, travma ve juvenil oküler inflamatuvar hastalık yer alır. Çoğu durumda, özellikle tek taraflı tutulum olanlarda, neden bilinmemektedir. Konjenital katarakt, yaşa bağlı benzerlerinden çok

daha az yaygın olmasına rağmen, çocukluk çağı körlük vakalarının onda birini oluşturmaktadır (Francis ve Moore, 2004). Konjenital katarakt vakalarının % 8,3-% 25'i kalıtsaldır ve bunun % 75'i kalıtımda otozomal dominanttır. Otozomal dominant katarakt, hiperferritinemi katarakt sendromu, Coppock benzeri, Volkmann tipi doğuştan, sütürlü zonüler, posterior polar, anterior polar, gök mavisi, zonüler pulverülent, kristalin akuleiform ve miyotonik distrofi tip-1 benzeri kataraktları içerir. Otozomal resesif katarakt, Warburg mikro sendromu, Hallermann-Streiff sendromu, Martsolf sendromu, Smith-Lemli-Opitz sendromu, Rothmund-Thomson sendromu, Marinesco-Sjogren sendromu, Wilson hastalığı, konjenital katarakt fasiyal dismorfizmi ve nöropatiyi içerir. X'e bağlı resesif katarakt ise Nance-Horan sendromu ve Norrie hastalığını içerir (Khokhar ve ark., 2017).

2.1.5. Diğer Kataraktlar

Travmatik yaralanma genç erişkinlerdeki tek taraflı kataraktın en yaygın nedenidir. Delici veya künt travma, elektrik çarpması, ultraviyole radyasyon, iyonlaştırıcı radyasyon ve kimyasal yaralanmalar travmatik kataraktlara örnek verilebilir. Miyotonik distrofi, atopik dermatit, nörofibromatosis gibi sistemik hastalıklara ve diyabetes mellitus, hipoparatiroidizm ve kretinizm gibi endokrin hastalıklara bağlı olarak da katarakt gelişimi söz konusudur. Bunlara ek olarak kronik anterior üveit (sekonder katarakt nedeni), akut konjestif açı kapanması (subkapsüler veya kapsüler opasite nedeni), yüksek miyopi (arka subkapsüler lens opasiteleri ve erken başlangıçlı nükleer skleroz nedeni), kalıtsal fundus distrofilere (arka ve ön subkapsüler lens opasite nedeni) gibi birincil göz hastalıkları da ikincil katarakt oluşumuna yol açabilir. Katarakt bazı ilaçların komplikasyonları olarak da ortaya çıkabilir. Kortikosteroidler ve antikolinesteraz inhibitörleri sırasıyla arka ve ön subkapsüler opasitelere neden olabilir (Nizami ve Gulani, 2022).

2.1.5.1. Kortikosteroidle İndüklenmiş Katarakt

GC'ler endojen adrenal hormonlardır ve kortizol salgılanması strese tepki olarak artar. Kortizol sadece bir stres belirteci olarak rol oynamaz, aynı zamanda hücresel ve doku fonksiyonunun bir modülatörüdür. Eksojen uyaranlara karşı verilen yanıt ile aktive olan immun ve inflamatuvar sistemler, GC'ler tarafından güçlü bir şekilde baskılanır ve GC'lerin bu özellikleri onların oldukça etkili terapötik ajanlar olarak kullanılmasını

sağlar. GC'lerin güçlü antiinflamatuvar ve immünosupresif ajanlar olması uzun süre veya yüksek dozda kullanılan GC'lerin şaşırtıcı derecede yan etki riskinin artmasına neden olur. Şu anda mevcut olan tüm modern inhale GC'ler (ICS) ve topikal GC'lerin bir miktar sistemik etkisi vardır, ancak bu etkiler, oral GC'lerde görülen etki ile karşılaştırıldığında minimaldir. Uzun süreli kullanım en yüksek risk faktörüdür, ancak dozaj, doz rejimi, spesifik ilaç kullanımı ve bireysel faktörler de risk faktörleri arasında yer alır. En yaygın GC yan etkileri glokom, katarakt, doku atrofisi ve yara iyileşmesinde azalma, adrenal supresyon ve osteoporozdur (Adcock ve Mumby, 2017). PSC'nin günde 5 mg'dan daha düşük dozlarda bile ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Oray ve ark., 2016). Histolojik ve klinik olarak, GC kullanımından sonra ortaya çıkan PSC oluşumu, yaşlanma ile ortaya çıkan PSC oluşumundan ayırt edilemez. Çocuklarda steroid kaynaklı bazı PSC'ler ilacın kesilmesiyle düzelebilir (Jick ve ark.,2019).

SIC'in patogenezi birden fazla mekanizmayı içerebilir. Bir teori, lens partiküllerinin lizin kalıntıları ile steroid molekülünün kovalent adüktlerinin oluşumunun lens opasitelerine yol açtığıdır. Başka bir teori, GC'lerin lens epitelinde sodyum-potasyum pompasının inhibisyonuna neden olarak lens liflerinde su birikmesine ve lens proteinlerinin aglütinasyonuna yol açmasıdır. GC kullanımında ikincil PSC gelişimi için bir dizi başka teori, plazmada glukoz yükselmesi, katyon geçirgenliğinde artış, glikoz-6-fosfat dehidrojenazın inhibisyonu, ribonükleik asit sentezinin inhibisyonu ve lens adenosin trifosfat kaybıdır. Bu teoriler SIC oluşumunun çok faktörlü bir etiyolojiye sahip olabileceğini düşündürmektedir (Carnahan ve Goldstein, 2000).

GC kaynaklı PSC oluşumu mekanizmasında bunlara ek olarak göz içi büyüme faktörlerinin seviyesindeki değişiklikler ve LEC'lerde gen transkripsiyonundaki değişikliklerin yer aldığı varsayılmıştır (Oray ve ark., 2016). Son çalışmalar, aktivasyonu gen ekspresyonunda değişikliklerle sonuçlanan LEC'lerde bir glukokortikoid reseptör alfanın kesin varlığını göstermiştir. Glukokortikoid reseptör aktivasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptoz, glukoneogenez, büyüme faktörlerinin ekspresyonu ve aktivitesi, sinyal iletim yollarındaki değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir (James, 2007).

2.2. Vitaminler

2.2.1. Vitamin A

A vitamini, memeli biyolojisinde bir sinyal molekülü ve kromofor olarak temel işlevlere hizmet eder. Bu lipid, en az bir ikame edilmemiş β -iyonon halkası içeren diyetel provitamin A öncü moleküllerinden sentezlenebilir (Kelly ve ark., 2018). Karotenoidler bitkiler, algler ve fotosentetik bakteriler tarafından üretilen organik pigmentlerdir (Von Lintig, 2010). Bazı karotenoidlerin provitamin A aktivitesi vardır, bu da vücudumuzda A vitaminine dönüştürülebilecekleri anlamına gelir. Hayvanlar karotenoidleri sentezleyemedikleri için, A vitaminini ya hayvansal ürünlerden önceden sentezlenmiş A vitamini olarak almaları ya da β -karoten gibi bitki kaynaklı öncüllerden sentezlemeleri gerekir (Von Lintig, 2012).

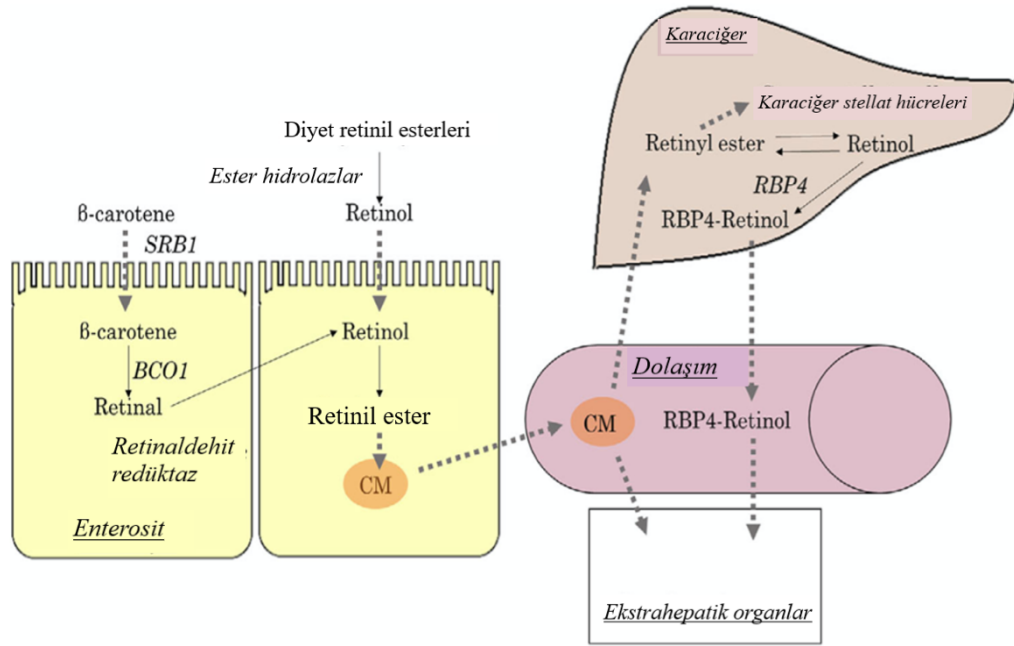
Proretinoid karotenoidler (örneğin, β -karoten) veya önceden oluşturulmuş retinoidler (öncelikle retinil esterler ve retinol), enzim katalizli metabolik dönüşümlere girebilecekleri hücreler tarafından alınır. Retinol, lesitin-retinol açıltransferaz (LRAT) veya açıl KoA-retinol açıltransferaz'ların (ARAT) etkisiyle retinil estere esterlenebilir veya alternatif olarak retinol dehidrojenazların (RDH) etkisiyle retinaldehide oksitlenebilir. Retinoid depolama formu olan retinil esterler ise retinil ester hidrolazlar (REH) tarafından katalize edilerek retinol açığa çıkarılır. Diyetel öncü β -karoten, β -karoten-15,15'-oksijenaz ile oksidasyona uğrayarak kromofor 11-cis-retinale izomerize edilebilen tüm-trans-retinale parçalanır. Tüm-trans-retinalin retinaldehit redüktazları tarafından indirgenmesi ile A vitamininin memelilerde önemli taşıma ve depolama formu olan tüm-trans-retinil estere esterlenebilen, tüm-trans-retinol (A vitamini) oluşur. Tüm-trans-retinal, retinaldehit dehidrojenazın (RALDH) etkisiyle geri dönüşümsüz oksidasyona uğrayarak 500'den fazla genin transkripsiyonunu düzenleyen bir sinyal molekülü tüm-trans-retinoik asite (ATRA) dönüşür (Şekil 2.3). Retinoik asit, bir dizi farklı sitokrom P450 (CYP) türünün eylemleri yoluyla oksitlenmiş formlara dönüştürülebilir. Bu oksitlenmiş retinoik asit türleri, transkripsiyonel aktiviteye sahip olabilir, ancak çoğu vücuttan atılmaya yöneliktir (Blaner ve ark., 2016; Dewett ve ark., 2021).

retinol bağlayıcı protein-2 (CRBP-II) ile bağlanır ve yeniden retinil estere esterleştirilerek şilomikronlara paketlenir (Conaway ve ark., 2013; Blaner ve ark., 2016; Polcz ve Barbul, 2019).

Enterosit içerisine alınan β -karotenin bir kısmı doğrudan şilomikronlara aktarılırken bir kısmı önce β -karoten-15,15'-oksijenaz tarafından retinale bölünür, daha sonra retinaldehit redüktaz tarafından retinole indirgenir ve retinil esterler olarak şilomikronlara paketlenir (Dawson, 2005; Polcz ve Barbul, 2019).

İnce bağırsak epitel hücreleri şilomikronları iyice işledikten sonra onları dolaşıma bırakır. Şilomikronlar dolaşıma ulaştığında, trigliseritlerin bir kısmı hidrolize olur ve lipoprotein partikülleri küçülerek şilomikron kalıntıları oluşturur. Şilomikron kalıntılarının bir kısmı akciğer, kalp, böbrek, yağ dokusu, kas, dalak ve kemik iliği gibi hedef dokulara gider. Retinol, dolaşıma salındığında hedef hücrelerde eksprese edilen retinol bağlayıcı protein (RBP) reseptörü ile etkileşime giren RBP'lere bağlanır, hücre içerisine alınan retinol ya palmitat retinil esterleri veya diğer retinil esterleri oluşturmak üzere hücrede işlenir ya da geri dönüşümlü olarak retinaldehite metabolize olur. Retinoidlerin yaklaşık % 70'ini oluşturan geriye kalan şilomikron kalıntıları ise retinoidlerin depolanmasında ve serum A vitamini düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynayan ana organ olan karaciğere gider. Karaciğerde hepatositler, şilomikronların alımında öncü rolü oynar; burada retinil ester, karboksil ester lipazlar ve karboksilesterazlar ve hepatik lipazlar gibi çeşitli enzimler tarafından retinol oluşturmak üzere tekrar hidrolize edilir. Hepatositte oluşan retinol, hücresel retinol bağlayıcı protein-1'e (CRBP-I) bağlanır ve daha sonra dolaşıma salgılanmak üzere retinol bağlayıcı protein-4'e (RBP-IV) aktarılır veya retinolün LRAT tarafından yeniden esterleştirildiği hepatik stellat hücrelere aktarılır. Hepatositten RBP-IV'e bağlı retinol dolaşıma salınır ve hedef hücre ve organlara iletilir (Şekil 2.4). RBP-IV, kandaki tek spesifik retinol bağlayıcı proteindir ve RBP-IV'e bağlı retinol, açlık durumunda kanda bulunan tüm retinoidlerin yaklaşık % 99'unu oluşturur (Larange ve Cheroutre, 2016; Suzuki ve Tomita., 2022).

Hücresel alımdan sonra, retinol önce sitozolik alkol dehidrojenazlar tarafından tüm-transretinal'e oksitlenir ve CRBP'ye bağlanır. Daha sonra, tüm-transretinal, retinaldehidrojenazlar tarafından biyolojik aktif metabolit ATRA'ya oksitlenir ve hücresel retinoik asit bağlayıcı proteinler (CRABP) ile bağlanır (Conaway ve ark., 2013).



Şekil 2.4: A vitamini emilimi ve taşınması. BCO1: β-karoten oksijenaz 1, CM: şilomikron, RBP4: retinol bağlayıcı protein-4, SRB1: çöpçü reseptör sınıf B tip-1. (Polcz ve Barbul, 2019).

2.2.1.2. Retinoid Reseptörleri

A vitamini, en az iki temel biyolojik olarak aktif molekülün, 11-cis-retinal ve tüm-trans-retinoik asitin öncüsüdür. 11-cis-Retinal, fototransdüksiyona aracılık eden görsel pigmentlerin protein kısmına (opsine) bağlanır. İkinci kritik bileşik olan tüm-transretinoik asit ise üreme, embriyonik gelişim, hücre döngüsü ve farklılaşması, epitelin korunması, bağışıklık, enerji homeostazı ve metabolik kontrol dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçler için gereklidir (Von Lintig, 2010; Czuba ve ark., 2020).

ATRA, 9-cis retinoik asit ve 13-cis retinoik asit çeşitli sitozolik ve nükleer reseptörlerle etkileşimleri yoluyla hücre büyümesi ve farklılaşması, gelişimi ve homeostazında yer alan bir dizi hedef genin ekspresyonunu düzenler (Al Tanoury ve ark., 2013; Polcz ve Barbul, 2019).

Retinoidlerin etkilerine esas olarak 2 nükleer hormon reseptörü ailesi aracılık eder: retinoik asit reseptörleri (RAR) ve retinoid X reseptörleri (RXR). Her reseptör ailesi, ayrı genler tarafından üretilen 3 izotipten oluşur (α , β ve γ) (Bastien ve Rochette-Egly, 2004).

RAR'lar (α , β ve γ), doğal olarak oluşan ATRA'ya yüksek afinite ile bağlanırken, RXR'ler (α , β ve γ) ATRA'ya bağlanmaz. 9-cis-retinoik asit (9cRA), ATRA'nın doğal olarak

bulunan biyolojik olarak aktif bir izomeridir ve hem RXR'leri hem de RAR'ları bağlayarak trans-aktivasyon yapabilir. İnsanlarda, RAR- α için mRNA çoğu dokuda ifade edilir; RAR- β ifadesi nöral dokularda yaygındır ancak deride neredeyse yoktur; ve RAR- γ çoğunlukla deride ifade edilir. RXR'lere gelince, RXR- β hemen hemen tüm dokularda bulunur; RXR- α karaciğerde, böbrekte, dalakta ve deride bol miktarda ifade edilir ve RXR- γ ifadesi çoğunlukla kas ve beyin dokularıyla sınırlı görünmektedir (Siddikuzzaman ve ark., 2011).

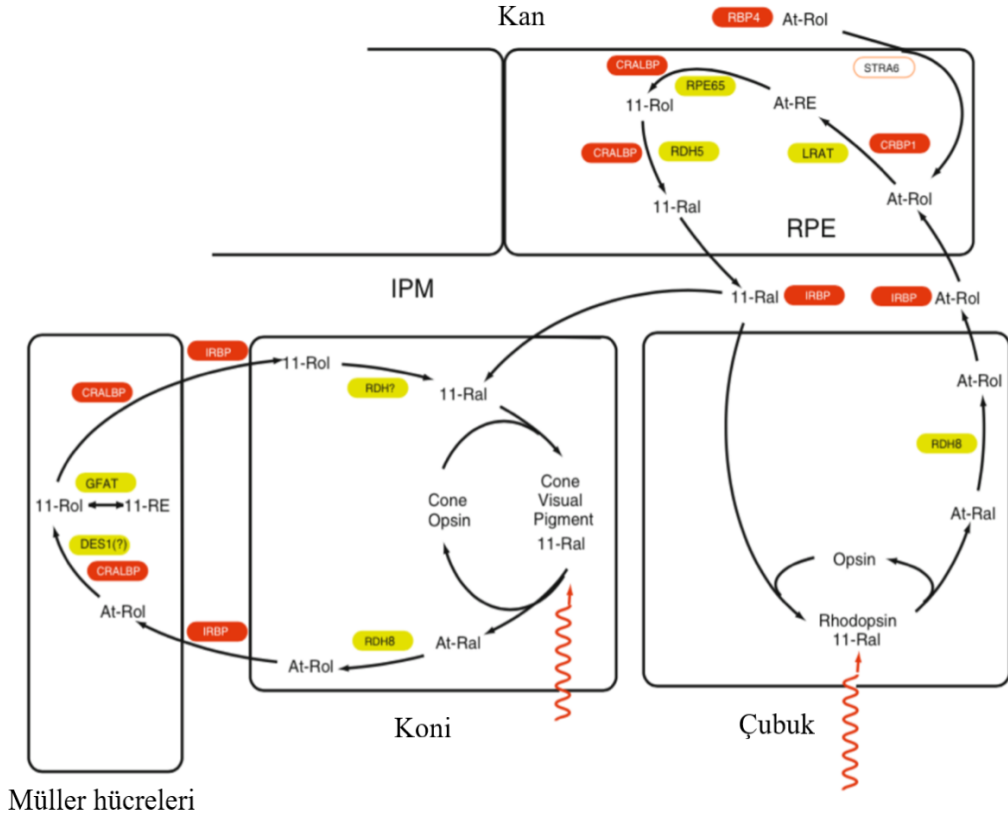
RAR'lar ve RXR'ler genellikle heterodimerler oluşturularak gen promotör bölgesindeki spesifik retinoik asit yanıt elementlerine (RARE) bağlanan ligand bağımlı transkripsiyon faktörleri olarak işlev görür. Çoğu hücre, retinoid sinyalleme sisteminin karmaşıklığını büyük ölçüde etkileyen çeşitli kombinasyonlarda bir veya daha fazla RAR ve RXR alt tipini eksprese eder (Al Tanoury ve ark., 2013). RAR/RXR kompleksinin bir parçası olarak RXR'nin aktivasyonu, RAR ligandlarının yokluğunda susturulur, bu RXR bağımlılığı olarak adlandırılan bir olgudur. RXR'nin katılımı esas olarak heterodimerin DNA bağlanmasını arttırmak içindir ve reseptörlerin eşzamanlı ligasyonu, RAR'ların transkripsiyonel aktivasyonunu artırır (Germain ve ark., 2002).

Transkripsiyonu kontrol etmeye ek olarak, RAR'lar translasyonu da düzenleyebilir. RAR- α , mRNA'larla birleşen bir RNA bağlayıcı protein olarak hareket edebildiği sitoplazmaya ihraç edilebilir. Bu bağlanmaya RAR- α karboksil terminali F alanı ve mRNA spesifik sekans motifleri aracılık eder ve translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır. Retinoik asit (RA) ligasyonu, RAR- α 'yı mRNA'dan serbest bırakır, bu da translasyonun baskısını azaltır ve protein ekspresyonu ile sonuçlanır. RAR- α ve RA'nın bu diziye bağlı, kanonik olmayan ekstrasitoplazmik fonksiyonu, seçilen proteinlerin hızlı fakat geçici ekspresyonuna izin verir. Bu durum RA/RAR α sinyalinin genomik olmayan bir fonksiyonunun aracılık ettiği ligand kapılı bir translasyonel düzenleme mekanizmasının varlığını gösterir (Poon ve Chen, 2008).

2.2.1.3. Vitamin A ve Görme Sistemi

STRA-6, hücre yüzeyinde bulunan bir transmembran reseptördür ve A vitamini metabolizması ve sinyal iletiminde önemli bir rol oynar. Gözde, RBP-IV'e bağlı ATRol, STRA-6 aracılığıyla retinal pigment epiteli tarafından alınır. LRAT, alınan tüm-trans-

retinol'ü, retina pigment epitelinde çok aşamalı bir süreçte görsel pigmentin 11-cis-retinal kromoforunu üretmek için kullanılan ATRE'ye dönüştürür. ATRE, Retinal Pigment Epithelium-65 (RPE65) enzimi tarafından dönüştürülür ve 11-cis-retinole yeniden izomerize edilir (Şekil 2.5) (Dewett ve ark., 2021).



Şekil 2.5: Retina pigment epitelyal hücrelerinde ve fotoreseptör (koni ve çubuk) ile Müller hücrelerinde retinoid sinyalleşmesini gösteren şematik (Saari, 2016).

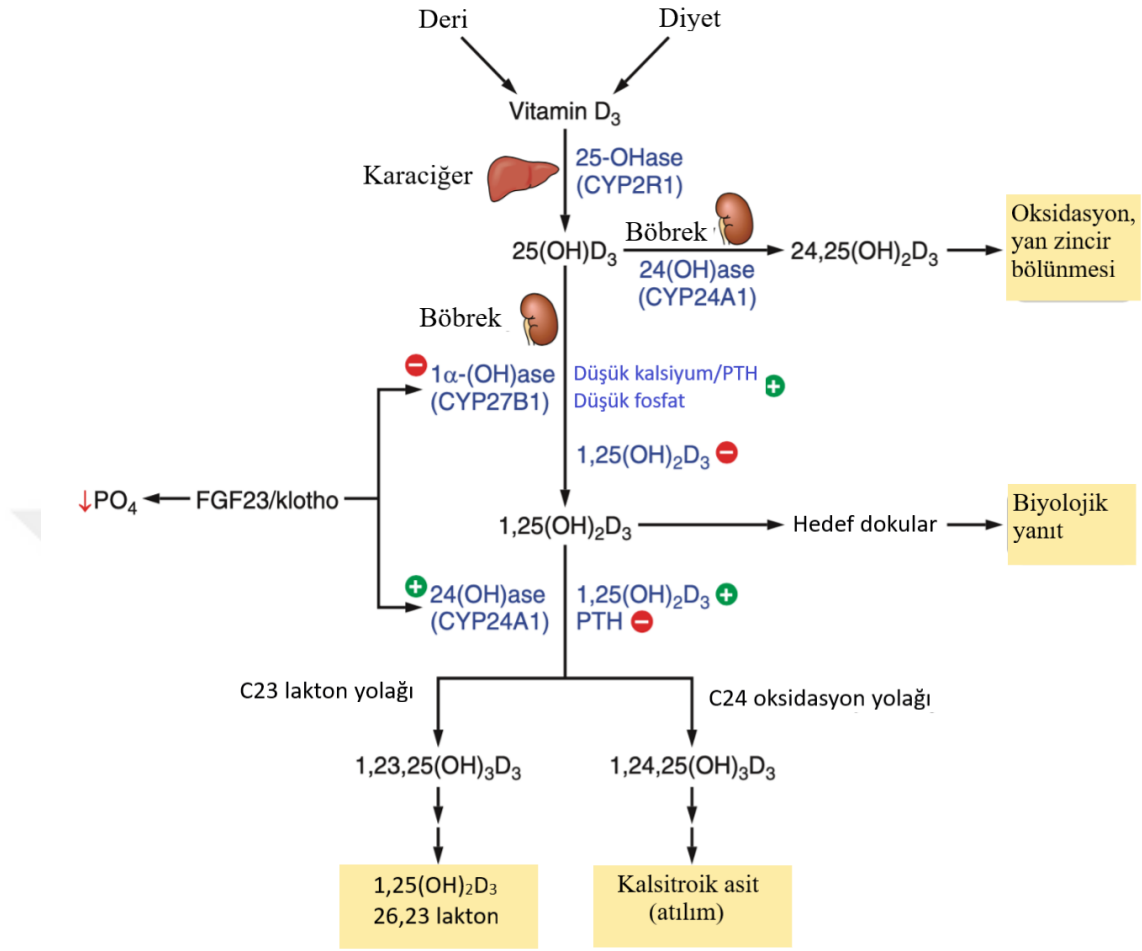
11-cis-Retinol daha sonra Retinol Dehidrojenazlar (RDH5 ve RDH11) tarafından 11-cis-retinal'e oksitlenir (Haeseleer ve ark., 2002). 11-cis-retinal opsin adı verilen proteine kovalent bağlıdır ve bir fotonun soğurulması, 11-cis-retinalin tüm-trans-retinale izomerize edilmesine yol açar. Tüm-trans-retinal opsin proteininin şeklini değiştirerek, onun bir sonraki alt basamakta bileşenlerle etkileşime girmesine ve nihayetinde fotoreseptör hücrelerden glutamat salınım hızını değiştirmesine izin verir (Saari, 2016).

2.2.2.Vitamin D

D vitamininin doğal formu olan D3 vitamini (kolekalsiferol), deride 7-dehidrokolesterolden üretilir. Işınlama üzerine, 7-dehidrokolesterol, D3 vitamini oluşturmak için üç çift bağın sıcaklığa duyarlı yeniden düzenlemesine uğrayarak previtamin D3'ü üretir. D vitamininin deride sentezi en önemli D vitamini kaynağıdır ve mevsime ve enleme bağlı olarak ultraviyole ışınlarının yoğunluğuna bağlıdır. Diyetle de D vitamini alınabilir (güçlendirilmiş süt ürünleri ve balık yağları). D3 vitamininin kendisi biyolojik olarak aktif değildir. D vitamini, plazmada D vitamini bağlayıcı protein (DBP) ile karaciğere taşınır (Christakos ve ark., 2015). D vitamininin dolaşımdaki ana formuna [25(OH)D3] ve hormonal formuna [1,25(OH)₂D3] daha fazla metabolize edilmesi sırasıyla karaciğer ve böbrekte gerçekleşir (Şekil 2.6). Aynı zamanda üretilen 1,25(OH)₂D bağışıklık sistemi hücreleri, paratiroid bezi, bağırsak epiteli, prostat ve meme gibi diğer dokularda bir parakrin/otokrin fonksiyona hizmet eder (Bikle, 2021).

2.2.2.1. Vitamin D Metabolizması

Diyetle alınan veya deride 7-dehidrokolesterolden ultraviyole ışınların katalize ettiği bir reaksiyonla sentezlenen D vitamini, kanda D vitamini bağlayıcı protein tarafından karaciğere taşındıktan sonra burada C-25'te hidroksile edilerek 25(OH)D3 oluşur. 25(OH)D3, serum D vitamini bağlayıcı protein yoluyla böbreğe ilerler. LDL reseptör süper ailesinin bir üyesi olan Megalin, 25(OH)D3'ün renal alımında önemli bir rol oynar (Christakos, 2008). D3 vitamininin biyolojik işlevi, ana vitaminin biyoaktivasyonuna ve inaktivasyonuna aracılık eden spesifik CYP enzimlerine bağlıdır. Sitokrom P450C1 (CYP27B1), bir C-1 α hidroksil grubunun eklenmesi yoluyla biyoaktivasyon sürecini yöneten hız sınırlayıcı (düzenleyici) enzimdir. 1,25(OH)₂D'nin dolaşımdaki ve hücreselel seviyesi, 1,25(OH)₂D'nin sentezini ve bozulmasını içeren koordineli bir süreçle düzenlenir. 1,25(OH)₂D'nin bozunma ve turnover sürecinin merkezinde, C-24R gruplarının hedeflenen substratlara girişini yöneten düzenleyici multi-katalitik sitokrom P450C24 (CYP24) enzimi bulunur (Şekil 2.6) (Omdahl ve ark., 2003).



Şekil 2.6: Vitamin D Metabolizması (Christakos ve ark., 2015).

1,25(OH)₂D sentezinde P450C1 ve P450C24 ekspresyonu için tercih edilen bölge, ana endokrin organ olarak işlev gören böbrektir. Bununla birlikte enzimler, otokrin/parakrin fonksiyonları yoluyla 1,25(OH)₂D'nin hücresel seviyelerini düzenleme işlevi gördükleri geniş bir doku dağılımı gösterirler. Enzimler endokrin, nörolojik, üreme ve immünolojik hücrelerde ve ayrıca 1,25(OH)₂D hormonunun bir dizi hücreye özgü işlevi yönlendirdiği çok sayıda hiperproliferatif kanser hücrelerinde ifade edilir (Jones ve ark., 1998; Omdahl ve ark., 2002).

Renal P450C1 ekspresyonu, paratiroid hormonu (PTH), kalsitonin (CT) ve azalan ortam kalsiyum ve fosfat seviyeleri ile yukarı doğru düzenlenebilir. P450C1'in en güçlü aşağı düzenleyicisi 1,25(OH)₂D'dir ve yüksek kalsiyum seviyeleri aynı zamanda bir enzim baskılayıcı sinyal olarak işlev görür. 1,25(OH)₂D'nin P450C1 ekspresyonunu aşağı regüle etme eyleminin aksine, bu hormon P450C24 gen ekspresyonunun ana indükleyicisidir,

oysa PTH ve düşük fosfat fonksiyonu, ayrı düzenleyici mekanizmalar aracılığıyla 24-hidroksilaz ekspresyonunu baskılar (Omdahl ve ark., 2003).

2.2.2.2. Vitamin D Reseptörleri

1,25(OH)₂D reseptörü (VDR), çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. VDR; mineralokortikoidler, glukokortikoidler, tiroid hormonu, seks hormonları, A vitamini metabolitleri veya retinoidler için reseptörler barındıran oldukça geniş bir nükleer hormon reseptör ailesinin üyesidir (Şekil 2.7). VDR geniş bir dağılıma sahiptir ve bu dokular D vitamininin klasik hedef dokuları ile sınırlı değildir (Bikle, 2021).

Kısaltmalar

VDR: Vitamin D reseptörü, nükleer

VDRE: Vitamin D yanıt elementi

cAMP: Siklik AMP

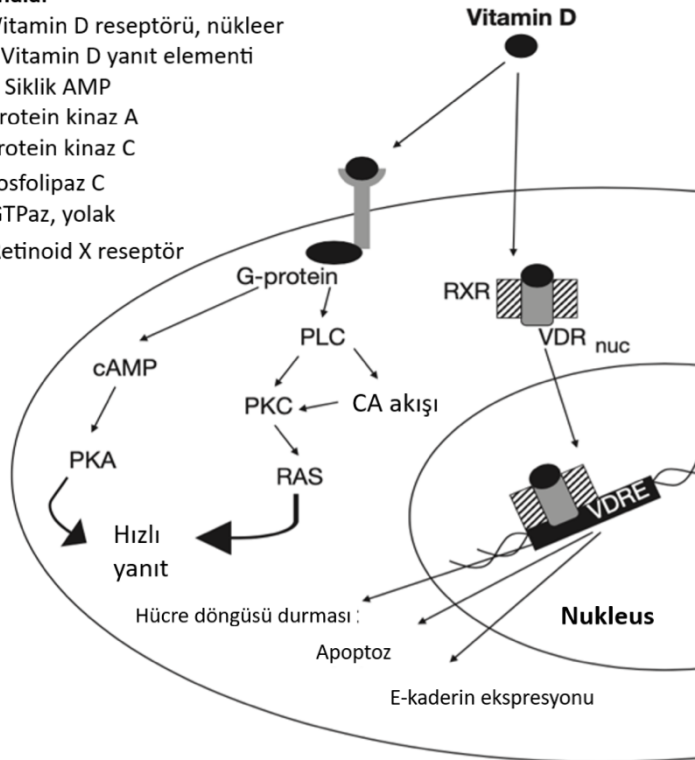
PKA: Protein kinaz A

PKC: Protein kinaz C

PLC: Fosfolipaz C

RAS: GTPaz, yolak

RXR: Retinoid X reseptör



Şekil 2.7: Vitamin D Etki Mekanizması (Ingraham ve ark., 2008).

Transkripsiyon regülasyonu, vitamin D reseptörüne 1,25(OH)₂D bağlanması ile başlatılır. Liganda bağlı VDR, 9-cis retinoik asit nükleer reseptörü retinoid-X-reseptörü (RXR) ile heterodimerik bir kompleks oluşturarak işlev görür. VDR, 1,25(OH)₂D'yi bağlayan ve RXR ile etkileşime giren ligand bağlama alanında iki çinko parmaklı bir DNA bağlama alanı içerir. Ligandlı heterodimerik VDR/RXR kompleksi, hedef genlerin promotöründe spesifik bir kontrol elemanına, D vitamini yanıt elemanına (VDRE) bağlanır. Büyük bir

koaktivatör kompleksi daha sonra heterodimerik kompleks üzerinde toplanır ve hem lokal olarak yoğunlaştırılmış kromatini yeniden modellemek hem de transkripsiyonel başlangıç bölgesinde bulunan RNA polimeraz-II ile iletişim kurmak için işlev görür. VDR aracılı transkripsiyon için birçok koaktivatör kompleksi tanımlanmıştır. 1,25(OH)₂D hedef genlerinin çoğunda veya tamamında, ligandlanmamış VDR/RXR, bir yardımcı baskılayıcı almak için önce VDRE'ye bağlanır ve ilişkili bir histon-deasetilaz aracılığıyla bazal transkripsiyonu baskılar. 1,25(OH)₂D ile indüksiyon daha sonra bu bastırılmış seviyeden devam eder ve sonraki 1,25(OH)₂D'nin VDR'ye bağlanması represörün koaktivatör kompleksi tarafından değiştirilmesine yol açar. Yani VDR, ligandın yokluğunda bir baskılayıcı olarak ve daha sonra ligand bağlandığında bir koaktivatör olarak hareket eden ikili bir rol üstlenebilir (Omdahl ve ark., 2002).

2.2.2.3. VDR Aracılı Gen Kontrolü

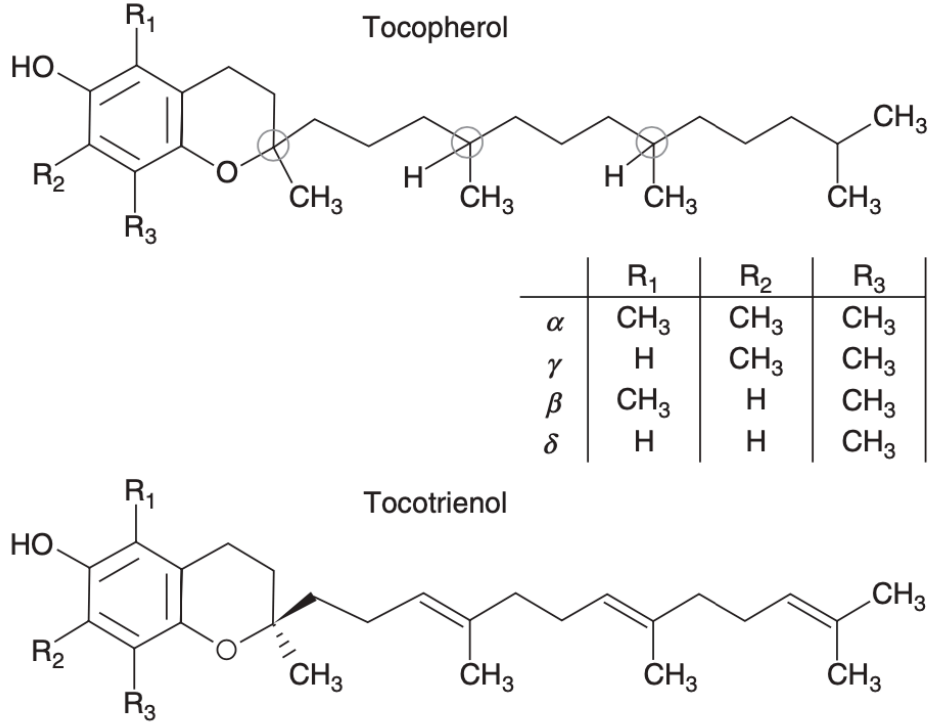
1,25(OH)₂D, osteopontin veya sekrete fosfoprotein-1'i indükleyerek osteoblastlarda ossifikasyonu tetikler ve ayrıca vasküler kalsifikasyon ve ilişkili hastalıkların indüklenebilir bir inhibitörü olarak hizmet eder. Bağırsak kalsiyum alımına kısmen, TRPV6'nın 1,25(OH)₂D-VDR indüksiyonu aracılık eder. Kemiğe katabolik olan RANKL'nin ekspresyonu, 1,25(OH)₂D-VDR ile artar ve osteoklastogenez yoluyla kemik rezorpsiyonuna aracılık eder. Osteokalsin (BGP), osteoblastlarda 1,25(OH)₂D tarafından klasik olarak indüklenen başka bir gendir. FGF23, fosfatürik bir peptittir ve insan FGF23 geninde bir VDRE varlığı tanımlanmıştır. FGF23, osteoblast soyunun osteosit benzeri hücrelerinde 1,25(OH)₂D tarafından belirgin bir şekilde yukarı regüle edilir. 1,25(OH)₂D tarafından düzenlenen genlerin son ağı, hücre yaşamı/kanser, bağışıklık sistemi ve metabolizmayı etkileyen kodlama faktörlerinden oluşur. VDR, kolonda p53 ve p21 tümör baskılayıcıları ve DNA uyumsuzluğu onarım enzimlerini indükleyerek muhtemelen birçok kanser riskini azaltır. Ligandlı VDR ayrıca, litokolik asit gibi gastrointestinal sistemi etkileyebilecek toksik ksenobiyotikleri ortadan kaldırmak için CYP3A4 ve SULT2'yi indükleyerek bir detoksifikasyon nükleer reseptörü olarak işlev görür. 1,25(OH)₂D-VDR, enfeksiyonla savaşmak için doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive etmek üzere katelisidin'i indükler ve adaptif bağışıklık sistemini yumuşatmak ve tip I diabetes mellitus, multipl skleroz, lupus ve romatoid artrit gibi otoimmün bozuklukların riskini azaltmak için IL-17'yi baskılar. 1,25(OH)₂D-VDR, NF-κB p60 ve COX2,61'i

körelterek antiinflamatuvar ve enflamasyon, kalp hastalığı ve inme gibi hastalıkların yanı sıra kanserde ortak bir payda olarak kabul edilir. 1,25(OH)₂D-VDR'nin yakın zamanda Bouillon grubu tarafından homosisteinin metabolik eliminasyonunu katalize eden majör bir enzim olan sistatinyonin β -sentazı indüklediği gösterilmiştir. Son olarak, 1,25(OH)₂D-VDR, yaşlanma nedeni için önde gelen bir aday olan oksidatif hasarı önlemede önemli bir moleküler oyuncu olan FOXO3'ü indükler. Açıkça VDR, hayati genleri kontrol ederek, kırıkları, ektopik kalsifikasyonu, maligniteyi, oksidatif hasarı, enfeksiyonları, otoimmüniteyi, iltihaplanmayı/ağrıyı, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkları geciktirerek kişinin iyi yaşlanmasını sağlar (Haussler ve ark., 2011).

2.2.3. Vitamin E

Bitkiler, α -, β -, γ - ve δ -tokoferol ve bunlara karşılık gelen dört tokotrienol olmak üzere E vitamini antioksidan aktivitesine sahip sekiz farklı molekülü sentezler. α -, β -, γ - ve δ -formları, kromanol halkalarındaki metil gruplarının sayısına ve konumuna göre farklılık gösterir. Tokotrienoller, üç çift bağ içeren doymamış bir yanzincire sahipken, dört tokoferol bir fitil yanzincirine sahiptir (Şekil 2.8) (Mustacich ve ark., 2007).

RRR- α -Tokoferol, 2, 40 ve 80 pozisyonlarındaki R-konformasyonunda kiral karbonlar içeren α -tokoferolün (α T) doğal olarak oluşan formudur. Bununla birlikte, α T'nin kimyasal sentezi, yarısı S-konformasyonunda 2. konuma sahip sekiz farklı stereoizomerin eşit bir karışımıyla sonuçlanır. Sentetik E vitamini all-rac- α -tokoferol olarak adlandırılır. Pozisyon 2, in vivo α T aktivitesi için kritiktir ve yalnızca 2R-formlarının insan gereksinimlerini karşıladığı kabul edilir ("Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids", 2000).



Şekil 2.8: Vitamin E Kimyasal Yapısı ve Türevleri (Mustacich ve ark., 2007).

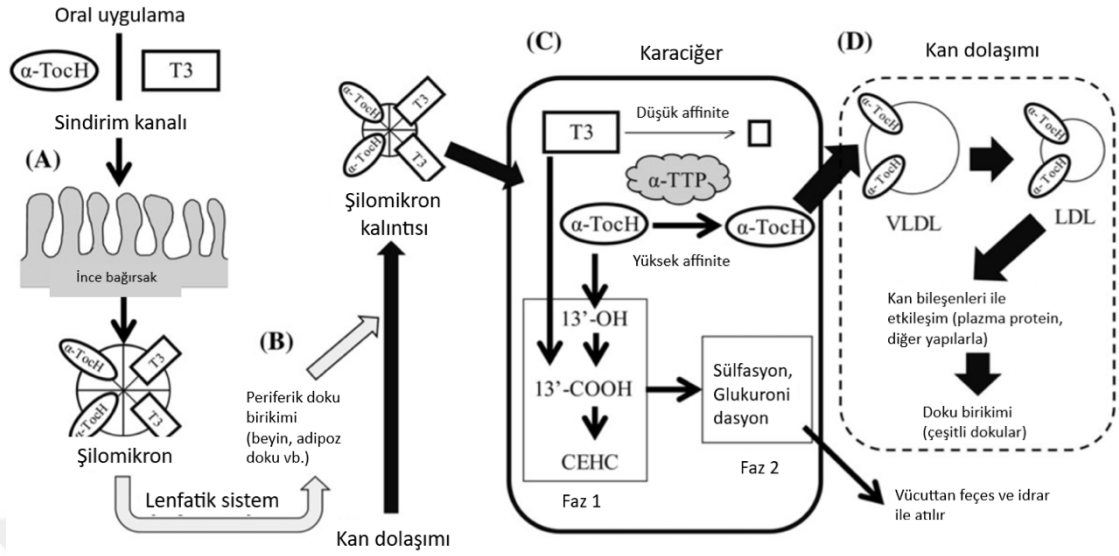
2.2.3.1. Vitamin E Metabolizması

Doğal kaynaklardan alınan diyet E vitamini, bağırsak epitel hücrelerine alınmadan önce bağırsak lümeninde bulunan safra tuzları ve amfipatik lipidler tarafından doğrudan karışık misellere çözünür. Pankreatik lipaz sekresyonu E vitamini absorpsiyonunu kolaylaştırır, ancak bu etki büyük olasılıkla E vitamini sindirimi üzerindeki doğrudan bir etkiden ziyade lipidlerin hidrolizinin bir sonucu olarak artan karışık misel oluşumundan kaynaklanmaktadır (Rigotti, 2007). E vitamini formları, misel difüzyonu ve membran proteinlerinin kolaylaştırdığı taşıma yoluyla enterositlere emilir (Jiang, 2022). Bağırsak epitelinden E vitamini alımına, taşıma proteinleri; mikrozomal trigliserit transfer proteini (MTTP), Niemann-Pick C1-like-1 (NPC1L1), ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı-1 (ABCA1), ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı G1 (ABCG1), çöpçü reseptör sınıf B tip-I (SR-BI) ve çöpçü reseptör farklılaşma kümesi-36 (CD36) aracılık eder (Zingg, 2015). Bu yağda çözünen bileşikler daha sonra triaçilgliserol, fosfolipidler ve kolesterol ile birlikte şilomikron partikülleri halinde paketlenir. Şilomikrona bağlı tokoferoller ve tokotrienoller daha sonra lenfatik sistem ile muhtemelen beyin dahil kemik iliği, adipoz, kas, deri ve periferik dokulara taşınır. E vitamini formlarının dokuya alınma mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, hücresel alım, çeşitli proteinler [SR-BI, CD36, düşük

yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR), afamin ve albümin] tarafından kolaylaştırılmaktadır. Ek olarak yağda çözünen vitaminlerin, lipoprotein reseptörü ve lipoprotein lipaz aracılı süreç yoluyla doku hücrelerine alındığına inanılmaktadır (Zingg, 2015; Jiang, 2022). E vitamini karaciğer tarafından emilip alındığında, formların ve konsantrasyonların düzenlenmesi gerçekleşir. Karaciğer tarafından E vitamini alımında hangi lipoprotein reseptörlerinin yer aldığı açık değildir, ancak tüm lipoproteinler E vitamini taşıdığından, tüm lipoprotein reseptörleri varsayımsal olarak E vitamini içeren lipoproteinleri alabilir. Plazma α T konsantrasyonlarını kontrol etmek için ana düzenleyici mekanizma, α T transfer proteinidir (α -TTP) (Traber, 2007). α T'nin kusurlu taşınması, aynı zamanda, insanlarda E vitamini alımı ve dağıtımında yer alan bir dizi genetik mutasyonlardan kaynaklanan birincil ve ikincil E vitamini eksikliği bozukluklarının ana nedenidir (Zingg, 2015). α T'nin, karaciğerde daha fazla doku tutulmasında E vitamininin şilomikronla ilişkili doku alımı rol oynayabilir. γ T, plazmadaki düşük seviyelerine rağmen insan derisinde, yağ dokusunda ve kasta beklenmedik şekilde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Doku alımından sonra ortaya çıkan şilomikron kalıntıları, E vitamini formlarının taşındığı ve metabolize edildiği karaciğer tarafından alınır. Karaciğerde, tüm tokoferoller ve tokotrienoller metabolize edilirken, E vitamininin α T olmayan formları α T'e göre yüksek miktarlarda, 13'hidroksikromanol (13'-OH) ve 13'karboksikromanol (13'-COOH) üreten sitokrom P450 tarafından başlatılan ω -hidroksilasyon ve oksidasyon yoluyla katabolize edilir (Şekil 2.9) (Jiang, 2022).

2.2.3.2. Vitamin E Redoks Etkileşimleri

E vitamini ailesi insan vücudunda sentezlenemediğinden, bu besinler diyet yoluyla eksojen olarak sağlanmalıdır. Son keşifler, E vitamininin insan sağlığı üzerinde anti-alerjik, anti-aterojenik, anti-kanser, anti-kardiyovasküler, anti-diyabetik, antilipidemik, anti-hipertansif, antiinflamatuvar, anti-obezite, nöroprotektif ve telomeraz aktivitelerinin modülasyonu gibi potansiyel olarak faydalı çeşitli etkiler sergilediği gösterilmiştir (Miyazawa ve ark., 2019).



Şekil 2.8: Oral Alınan Vitamin E Metabolizması. 13'-OH: 13'-hidroksikromanol, 13'-COOH: 13'-karboksikromanol (α -TocH'den), 13'-karboksitrienol (tokotrienolden), α -TocH: α -tokoferol, α -TTP: α -tokoferol transfer proteini, CEHC: karboksietilhidroksikromanoller; LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein, T3: tokotrienol, VLDL: çok düşük yoğunluklu lipoprotein (Miyazawa et al., 2019).

Oksidatif stres terimi, oksidanlar ve antioksidanlar arasında oksidanlar lehine olan ve hasara yol açan bir dengesizliği tanımlamak için kullanılmıştır. Kromanol hidroksil grubunun varlığı nedeniyle, E vitamini kimyasal olarak serbest radikal oksidanları süpürme yeteneğine sahiptir ve ilk in vitro çalışmalar, α T'nin serbest radikal katalizi ile hücreyi lipid peroksidasyonuna karşı koruyabileceğini göstermiştir. Böylece, α T'nin lipidde çözünen, endojen bir antioksidan olarak anahtar bir role sahip olduğu önerisi ortaya çıkmıştır (Wu ve Croft, 2007).

E vitamininin antioksidan işlevi, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA'lar) oksidasyonunun zincir reaksiyonlarını sonlandıran bir peroksil radikal temizleyici işlevidir. Hidroperoksitler (ROOH), peroksil radikallerine (ROO $\cdot$) oksitlendiğinde, ROO $\cdot$, PUFA'lara göre α T ile daha hızlı reaksiyona girer (E vitamini varlığında: ROO $\cdot$ + VitE-OH $\rightarrow$ ROOH + Vit E-O $\cdot$, E vitamini yokluğunda: ROO $\cdot$ + RH $\rightarrow$ ROOH + R $\cdot$, R $\cdot$ +O₂ $\rightarrow$ ROO $\cdot$). Bu şekilde, α T, membranlarda veya lipoproteinlerde PUFA'ların daha fazla oto-oksidasyonunu önleyerek zincir kırıcı bir antioksidan görevi görür. Tokoferoksil radikali (Vit E-O $\cdot$), C vitamini veya tiyoller, özellikle glutatyon gibi diğer hidrojen donörleri ile reaksiyona girerek indirgenmiş E vitamini durumuna geri döner (Vit E-O $\cdot$ + AH $\rightarrow$ Vit E-OH+A $\cdot$) (Traber, 2007).

2.2.3.3. Vitamin E'nin Sinyal İletimindeki Rolü

Son yirmi yılda, birçok sinyal transdüksiyon enziminin aktivitesinin E vitamini tarafından düzenlendiği ve proliferasyon, apoptoz, hayatta kalma, iltihaplanma, bağışıklık, otofagositoz, sekresyon, adezyon, migrasyon, yaşlanma, metastaz, gen ekspresyonu ve farklılaşma gibi hücrel davranış değişikliklerine yol açtığı açıklanmıştır. En belirgin hücrel etkilere yönelik son araştırmalar, E vitamini tarafından modüle edilen moleküler sinyal reaksiyonlarına ışık tutmuştur. Moleküler düzeyde E vitamini, protein kinazlar ve fosfatazlar, lipid kinazlar ve fosfatazlar ve diğer lipid metabolizması enzimleri gibi sinyal iletiminde yer alan spesifik enzimlerin aktivitesini etkiler (Tablo 2.1) (Zingg, 2015).

Tablo 2.1: Vitamin E Tarafından Düzenlenen Enzimler (Zingg, 2015).

Enzim sınıfı	Vitamin E ile modüle edilen enzimler
Protein kinazlar	Protein kinaz C (PKC) Protein kinaz B (PKB/Akt) Protein tirozin kinazları (PTKs)
Protein fosfatazlar	Protein fosfataz 2A (PP2A) Pleckstrin homoloji (PH) alanı lösin-zengin tekrarlayan protein Fosfataz, izoform 1 (PHLPP1) Protein tirozin fosfatazı (PTP)
Lipid kinazlar	Diaçilgliserol kinazı (DAGK) Fosfatidilinozitol-3-kinaz alfa (PI3K α) Fosfatidilinozitol-3-kinaz gama (PI3K γ)
Lipid fosfatazlar	5'- ve 3'- İnozitol polifosfatazlar (SHIP)
Lipid metabolik enzimleri	5-, 12-, ve 15- lipojenazlar (5-, 12-, 15-LOX) Siklooksijenaz-2 (COX-2) Fosfolipaz A2 (PLA2)
cAMP metabolizmasında yer alan enzimler	Adenilil siklaz fosfodiesteraz

E vitamini, ifade seviyelerini değiştirerek bu enzimlerin aktivitesini düzenleyebilir. Sinyal iletimi genellikle, sinyal ağırları ve basamaklarında birbiriyle çapraz etkileşen birkaç enzimin aktivasyonunu ve inaktivasyonunu içerdiğinden, E vitamini tedavisinden sonra gözlemlenen bir düzenleyici etki, farklı bir bölgede meydana gelen ikincil bir olayı da temsil edebilir. Buna göre, E vitamininin gen ekspresyonu üzerindeki düzenleyici

etkileri, spesifik transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini veya ekspresyon düzeyini değiştiren birincil sinyal olaylarının sonucu olarak da açıklanabilir (Rimbach ve ark., 2010).

Landes ve ark. (2003) tüm E Vitamini formlarının, çeşitli ilaç metabolize edici enzimleri düzenleyen bir nükleer reseptör olan pregnan X reseptörü (PXR) aracılığıyla gen ekspresyonunu aktive edebildiğini göstermişlerdir.

Nükleer faktör-kappa B (NFκB), nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) ve peroksizom proliferatörle aktive edilen reseptör gamma (PPARγ) gibi bazı transkripsiyon faktörleri için, E vitamini analoguna özgü düzenleyici etkiler gözlemlenmiştir. E vitamini tarafından gen ekspresyonunun düzenlenmesi ya tek tek genler seviyesinde ya da genom çapında gözlemlenmiştir (Tablo 2.2) (Zingg, 2015).

Tablo 2.2: Vitamin E'nin Etkilediği Transkripsiyon Faktörleri (Zingg, 2015).

Transkripsiyon Faktörü	Vitamin E'nin etkisi
Peroksizom proliferatör-aktivasyonlu reseptör gamma (PPARγ)	Dolaylı mekanizmalarla aktivasyonu artırma ve ekspresyonu yukarı regüle etme
Eritroid nükleer faktör 2- ilişkili faktör 2 (NRF2)	Dolaylı mekanizmalarla ekspresyonu yukarı regüle etme
Nükleer faktör kappa B (NFκB)	Dolaylı mekanizmalarla aktivasyonu inhibe etme
RAR ile ilişkili reseptör alfa (RORα)	Vitamin E eksikliği ile aşağı regüle etme
Hipoksiye bağlı faktör 1 alfa (Hif1α)	Dolaylı mekanizmalarla aktivasyonu inhibe etme
Östrojen reseptörü beta (Erβ)	Tokoferollerin doğrudan bağlanması ile aktivite artırma
Pregnan X reseptörü (PXR)	Tokoferollerin doğrudan bağlanması ile aktivite artırma

2.3. Apoptozis

Tüm çok hücreli organizmalar, sıkı bir şekilde düzenlenmiş hücresel gelişim, onarım ve uzaklaştırma yoluna sahiptir. Hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve hücre eliminasyonu arasındaki dengeye dayanır. Bir hücrenin eliminasyonu için çeşitli mekanizmalar gereklidir. Hücre eliminasyonu sürecinin merkezinde, hücrenin kendi yıkımına aktif olarak katıldığı programlanmış hücre ölümünün fizyolojik bir şekli olan apoptozis vardır. Bu, genlerle yönlendirilmiş hücre intiharının benzersiz bir özelliği,

kalıntı hücre bileşenlerinin komşu dokularda iltihaplanma olmaksızın uzaklaştırılmasıdır (Fleisher, 1997). Bir diğer hücre ölümü nekrozdan farklı olarak, apoptoz, organizmaya fayda sağlamak ya da organizmayı korumak için belirli hücreleri feda eden rasyonel ve aktif bir karardır. İlgili araştırma alanlarında hala pek çok muamma olsa da apoptozun çok hücreli organizmalara koordineli bir şekilde avantajlar sağladığı, bu sayede organizmaların homeostazı koruduğu ve yaşam döngüsüne ince ayar yaptığı iyi bir şekilde belgelenmiştir (Xu ve ark., 2019). Apoptoz, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü dahil olmak üzere çeşitli süreçlerin tabiatında yer alır. Uygunsuz apoptoz (ya çok az ya da çok fazla), nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün bozukluklar, iskemik hasar ve kanser türlerinin de dahil olduğu birçok hastalık için önemli bir faktördür. Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz süreci, genellikle farklı morfolojik özelliklere ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize edilir. (Elmore, 2007).

2.3.1. Apoptozis Morfolojisi

Farklı hücrelerde ortak bir mekanizma olarak kabul edilen apoptotik hücre ölümü iki aşamada meydana gelir. İlk aşama hücrenin ölüm emrinin verilmesi ikinci aşama ise hücre yapısındaki belirli morfolojik değişikliklerle karakterize edilen bir infaz aşamasıdır (Cohen, 1997). Hücrelerin apoptoz sürecinde ortak olarak sergilediği belirli morfolojik değişiklikler iyi tanımlanmış ve belgelenmiştir. Bu değişiklikler arasında hücre kabarması ve büzülmesi, nükleer parçalanma, genetik materyallerin (kromatin ve nükleozomal DNA) yoğunlaşması ve parçalanması ve ApoBD'ler (apoptotic bodies) olarak bilinen küçük veziküllerin oluşumu yer alır. Hücreler apoptozun erken evresinde karakteristik bir şekilde büzülürler. Hücre içerikleri daha yoğun bir şekilde paketlenirken hücre boyutu küçülür. Piknoz yani kromatinin geri dönüşsüz yoğunlaşması olarak bilinen bir başka olgu da apoptozun erken evresinde hücre büzülmesi ile eş zamanlı olarak ortaya çıkar. Apoptozun erken evresini takiben, çekirdeğin parçalanmasını ifade eden karyorrekzis meydana gelir. Karyorrekzis, apoptotik hücreleri küçük ApoBD'ler şeklinde parçalayan plazma zarının daha da kabarıp yırtılmasıyla birlikte gerçekleşir. Mevcut bilgiler, ApoBD'lerin apoptotik hücrelerin artıklarını (yani sitoplazma, organel ve çekirdek içeriği) içerdiğini ve apoptotik hücre içeriğinin her bir apoptotik cisimlere rastgele

dağıldığını belirtmektedir. Dolayısıyla, belirli bir organel veya çekirdek içeriği belirli bir apoptotik cisimde bulunabilir veya bulunmayabilir. Bu ApoBD'ler daha sonra fagositoz yapan hücreler, örneğin nötrofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC'ler) tarafından son aşamada parçalanır. Fagositoz, apoptotik bir döngünün terminal adımını oluşturur ve bu adımın özünün, apoptotik hücrelerin içindeki tehlikeli materyallerin çevreye sızmasını önlemek olduğuna inanılır (Xu ve ark., 2019).

2.3.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Uygun olmayan şekilde çoğalan hücrelerin tanımlanması ve ortadan kaldırılması esas olduğundan, apoptoz ve proliferasyon sıkı bir şekilde bağlantılıdır ve hücre döngüsü düzenleyicileri hem hücre bölünmesini hem de hücre ölümünü etkileyebilir. Hücre döngüsü olaylarının zamanlaması ve sırası, G1/S faz sınırında, S fazında ve G2/M fazlarında meydana gelen hücre döngüsü kontrol noktalarında izlenir. Bu kontrol noktaları, hücre döngüsünün belirli bir fazındaki kritik olayların yeni bir faza başlamadan önce tamamlanmasını sağlayarak genetik olarak anormal hücrelerin oluşumunu engeller. Hücre döngüsü ilerlemesi, hem hücre içi hem de hücre dışı ortamın durumuna yanıt olarak bu kontrol noktalarında bloke edilebilir. Hasarın onarılmasından sonra, hücre döngüsü boyunca ilerleme devam eder. Hasarlı hücreleri onarmanın bir alternatifi, basitçe onları apoptoz süreci yoluyla ortadan kaldırmaktır. Bu nedenle, bir hücre, hücre döngüsü boyunca ilerlerken, hücre bölünmesini tamamlayıp tamamlamayacağını, hücre hasarı onarmak için büyümeyi durdurup durdurmayacağını veya hasar onarılamayacak kadar şiddetliyse veya hücre DNA'yı tamir edemiyorsa apoptoz geçirip geçirmeyeceğini belirlemelidir. Bu seçeneklerden hangisinin uygun olduğu hücre döngüsünün kontrol noktalarında belirlenir (King ve Cidlowski, 2003).

2.3.3. Apoptozis Süreci

Apoptozun başlatılması bir dizi kaspazın aktivasyonuna bağlıdır (Elmore, 2007). İki kaspaz kategorisi vardır: Başlatıcı kaspazlar ve yürütücü kaspazlar. Hücre hasarı algılandığında, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve 9) etkin olmayan prokaspazlardan aktive olur ve ardından yürütücü kaspazları (kaspaz 3, 6 ve 7) etkinleştirir. Yürütücü kaspazların aktive olması, endonükleazların aktivasyonu ile DNA fragmentasyonunu, nükleer proteinlerin ve sitoskeletonunun yok edilmesini, proteinlerin çapraz bağlanmasını,

fagositoz hücreler için ligandların ifadesini ve apoptotik cisimlerin oluşumunu başlatan bir dizi olay zincirini tetikler. Apoptoz, içsel ya da dışsal yol ile başlatılabilir. Apoptozun içsel yolu, hasara yanıt olarak hücrenin kendisi tarafından başlatılır. Dışsal yol, bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından uyarılan ölüm reseptörleri aracılığıyla başlatılır (D'Arcy, 2019). Ancak, şu anda iki yolun birbirine bağlı olduğunu ve bir yolun moleküllerinin diğerini etkileyebileceğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır (Igney ve Krammer, 2002). Hücrenin T hücresi aracılı sitotoksitesisi ve hücrenin perforin-granzim bağımlı öldürülmesini içeren ek bir yol bulunmaktadır. Perforin/granzim yolu, granzim B veya granzim A aracılığıyla apoptozu tetikleyebilir. Dışsal, içsel ve granzim B yolları aynı terminal veya yürütme yolunda birleşir. Bu yol, kaspaz-3'ün parçalanmasıyla başlatılır ve DNA fragmentasyonu, sitoskeletal ve nükleer proteinlerin bozunması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositoz hücre reseptörleri için ligandların ifadesi ve son olarak fagositoz hücreler tarafından alınma ile sonuçlanır. Granzim A yolu, tek iplikli DNA hasarı aracılığıyla paralel bir, kaspaz bağımsız hücre ölüm yolu aktive eder (Martinvalet ve ark., 2005).

2.3.3.1. İçsel Yol (İntrensek Yol)

Apoptozu başlatan içsel sinyal yolları, hücre dışı reseptör aracılı uyaranlardan bağımsız olarak çeşitli içsel sinyalleri içeren ve hücre içinde doğrudan hedeflere etki eden mitokondri başlatıcılı olayları içerir. İçsel yolları başlatan uyaranlar, hücre içinde pozitif veya negatif şekilde etki edebilen intrasellüler sinyaller oluştururlar. Negatif sinyaller, bazı büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin eksikliğini içerir ve bu da ölüm programlarının baskılanmasının başarısızlığına yol açarak apoptozun tetiklenmesine neden olabilir. Diğer bir deyişle, faktörlerin çekilmesi, apoptotik baskının kaybı ve sonrasında apoptozun aktive edilmesi söz konusudur. Pozitif şekilde etki eden diğer uyaranlar arasında radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller gibi etkenler yer alır, ancak bunlarla sınırlı değildir (Elmore, 2007). Bu tür uyaranlar, iç mitokondriyal membranda değişikliklere neden olur, bu da mitokondriyal geçirgenlik geçiş (MPT) gözeneklerinin açılmasına, mitokondriyal transmembran potansiyelin kaybına ve normalde intermembran boşluğa hapsedilen iki ana gruptaki proapoptotik proteinlerin sitozolden salınmasına yol açar (Saelens ve ark., 2004).

İçsel apoptoz yolunun kontrolünü sağlayan başlatıcı kaspaz kaspaz-9'dur. Kaspas-9, kaspaz toplama alanının ortaya çıkmasını takiben adaptör protein apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'le (APAF 1) bağlanma yeteneğine sahiptir. Apoptotik olmayan bir hücrede APAF-1, CARD alanı bloke olacak şekilde katlanır. Böylece bir CARD alanı içeren prokaspaz-9 ona bağlanamaz. Apoptoz pozitif veya negatif uyarılarla indüklendiğinde, mitokondriyal membranda değişiklikler tetiklenir ve sonucunda mitokondriyal geçirgenlik geçiş (MPT) gözeneklerinin açılması gerçekleşir. MPT gözenekleri açıldığında, proapoptotik proteinler (sitokrom c, Smac/Diablo ve HtrA2/Omi dahil) mitokondrilerden sitoplazmaya sızabilir (Cain ve ark., 2002). Sitokrom-c, APAF-1 monomerlerinin WD alanına bağlanarak apoptozu indükler. Bu bağlanma, APAF-1'de ek bir konformasyonel değişikliğe neden olarak hem CARD hem de oligomerizasyon alanlarını açığa çıkarır, böylece birkaç APAF-1'in apoptozom olarak bilinen bir kompleks halinde bir araya gelmesine izin verir (D'Arcy, 2019).

Apoptozom, prokaspaz-9'u ayırarak aktif kaspaz-9'u verir ve aktive edilmiş kaspaz-9 daha sonra prokaspaz-3/7'yi ayırarak aktive eder, bu da farklı hücrel endojen substratları parçalayarak hücre ölümüne yol açar (Xu ve ark., 2019; Jiang ve ark., 2020). Küçük mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü (SMAC) olarak bilinen başka bir protein grubu, sitozole salınmasının ardından apoptoz proteinlerinin inhibitörüne (IAP) bağlanır. SMAC'ler IAP'yi devre dışı bırakarak apoptozun ilerlemesine izin verir. Diablo ve Omi gibi başka IAP inhibitörleri de bildirilmiştir. Bu proteinler, apoptozun kaspaz bağımlı yoluna girerler. Apoptozu indükleyen faktörler (AIF'ler) olarak bilinen ikinci bir protein grubu, apoptozun kaspazdan bağımsız yolunda işlev görür. AIF'ler mitokondrinin iç zarına bağlanır. Kalsiyuma bağımlı bir proteaz olan kalpain tarafından parçalandıktan sonra AIF'ler, DNA parçalanmasını ve kromatin yoğunlaşmasını indüklemek için nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ile çekirdeğe yer değiştirebilir (Xu ve ark., 2019).

Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşir (Cory ve Adams, 2002). Tümör baskılayıcı protein p53 ise, Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir (Schuler ve Green, 2001). Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve proapoptotik veya antiapoptotik olabilir. Bcl-2 protein ailesinin ana etki mekanizmasının, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştirilmesi yoluyla mitokondriden sitokrom-

c salınımının düzenlenmesi olduğu düşünülür. Bugüne kadar Bcl-2 ailesinde toplam 25 gen tanımlanmıştır. Antiapoptotik proteinlerin bazıları Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG'ı içerir ve proapoptotik proteinlerin bazıları Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk'i içerir. Bu proteinler, hücrenin apoptozu yapıp yapmadığını veya süreci iptal edip etmediğini belirleyebildikleri için özel bir öneme sahiptir (Elmore, 2007).

2.3.3.2. Dışsal Yol (Ekstresek Yol)

Ekstrinsik yol, apoptozun reseptör aracılı başlatılmasını ifade eder. Ekstrinsik yoldaki ölüm reseptörlerinin tümü, transmembran bölgeleriyle hücre zarına bağlanır. Hücre dışı bir ligandla etkileşim üzerine, zar reseptörleri ölüm sinyallerini sitoplazmik ölüm alanları aracılığıyla hücre içi boşluğa iletir (Xu ve ark., 2019).

Apoptozun dışsal yolunun kanonik yolu, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin (TNFRSF) üyelerinin CTL gibi başka bir hücrenin yüzeyinde çözünebilen veya ifade edilebilen aynı kökenli trimerik ligandlarına bağlanmasıyla başlar. TNFRSF üyeleri, trimerik ligand bağlanmasına yanıt olarak oligomerleşir, ancak bazı TNFRSF üyeleri ligand yokluğunda da oligomerler olarak bulunabilir. Ligand bağlanmasına yanıt olarak apoptozu indükleyen TNFRSF üyeleri, yaklaşık 80 amino asit uzunluğunda bir "ölüm alanı" içerir. Ölüm alanı, Fadd gibi diğer proapoptotik proteinler için bir kenetlenme bölgesi olarak hizmet eder ve sonuçta kaspazların aktivasyonuna yol açan bir zara bağlı ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) oluşturur (Yanumula ve Cusick, 2022).

Kaspazlar, doğal olarak zimojenler olarak var olan ve aktive edildiklerinde, diğer hücre içi proteinleri parçalama işlevi gören ve sonuçta hücrenin düzenli bir şekilde parçalanmasını sağlayan proteolitik aktiviteye sahip olan sistein açısından zengin proteazlardır (Chang ve Yang, 2000). Reseptörlerin oligomerizasyonu, apoptoza aracılık etmek için prokaspaz-3'ü doğrudan bölen kaspaz-8'in toplanmasına ve aktivasyonuna yol açar. Ayrıca kaspaz-8, Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan Bid'i parçalayarak mitokondriye göç eden ve yüzeyinde Bax/Bak gözenekleri oluşturan, sitokrom-c'yi serbest bırakan ve apoptozu aktive eden kesik bir segment olan tBid'i üretebilir. Kaspaz-3'ün aktivasyonu, plazma zarının kabarmasına, kromatin yoğunlaşmasına, DNA bölünmesine ve plazma zarının ekstrasellüler tarafında fosfatidilserinin açığa çıkmasına yol açar. Böylece

apoptotik hücrelerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri üretilmiş olur (Jiang ve ark., 2020).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 27.01.22 tarih ve 495533702/05 sayı ile onay alınarak Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı'nda çalışmanın deneysel aşaması; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda çalışmanın analiz aşaması yürütüldü. Çalışmamız Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi (AFSÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 22.LİS.001 numaralı proje ile desteklendi.

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada ortalama 60 ± 5 gr ağırlıklara sahip 88 adet döllenmiş spesifik patojen içermeyen (SPF) yumurta kullanıldı. SPF yumurtalar İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi. Yumurtalar sivri uçları aşağıya gelecek şekilde inkübatöre yerleştirildi. Kuluçkaya koyuldukları gün 0. gün olarak kabul edildi.

3.2. Laboratuvar Koşulları

Çalışmanın deney aşamasında AFSÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan inkübatör (37°C , % 70 bağıl nem); 88 adet (sıfır günlük, 60 ± 5 gr ağırlığında, fertil) White Leghorn cinsi SPF yumurta, penset, forceps, Hamilton mikroenjektörü, flaster, makas, eppendorf tüpleri, Stemi 1000/2000/2000-C marka Stereo Mikroskop ve Olympus CX21 marka ışık mikroskobu kullanıldı. Çalışmanın analiz aşaması ise AFSÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Analiz aşamasında Ultra Turrax (IKA Works, USA) marka homojenizatör, Dr Hielscher (Germany) marka sonikatör, Nüve marka (Ankara, Türkiye) santrifüj cihazı, 0,1 M pH:7,4 fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.3. Grupların Oluşturulması ve Deney Aşaması

Yumurtaların inkübatöre yerleştirildiği ilk gün 0. gün olarak kabul edildi. İnkübasyonun 15. gününde tüm yumurtalar kuluçka makinesinden çıkarıldı, yumurta kabuğu batikon ve %70 etanol ile steril hale getirildi. Işık altında yumurtanın hava kesesi incelendi ve

enjeksiyon yapılacak alan işaretlendi. İşaretlenen yerden yumurta kabuğu delinerek ortalama 2-3 mm çaplı porlar açıldı. Rastgele seçilen 8 yumurtadan kontrol grubu (K₁₋₈) oluşturuldu. Kontrol grubu dışında kalan tüm yumurtalara katarakt oluşabilmesi için açılan porlardan insülin enjektörü ile 0.5 µmol HC (hidrokortizon hemi succinate sodium) 100 µl serum fizyolojik içerisinde enjekte edildi (Şekil 3.1A). Oluşturulan civciv embriyo modelinde uygun HC dozlarının ayarlanmasında ve diğer deney aşamalarında, Kosano ve Nishigori'nin (2002) yaptığı çalışma ile Duman ve ark.'nın (2018) yaptığı çalışma örnek alınmıştır.

HC uygulanan yumurtalar arasından rastgele seçim yapılarak her grupta 8 yumurta olmak şartıyla 10 adet deney grubu oluşturuldu (HC₁₋₈, A1₁₋₈, A2₁₋₈, A3₁₋₈, D1₁₋₈, D2₁₋₈, D3₁₋₈, E1₁₋₈, E2₁₋₈, E3₁₋₈). HC uygulamasından hemen sonra tüm yumurtalar porların üzerine steril yara bandı yapıştırılarak tekrar kuluçka makinesine yerleştirildi.

HC uygulaması sonrası 3. saatte Kontrol ve HC grubuna 50 µl mısır yağı,

A1 grup yumurtalarına 50 µl mısır yağı içinde 2500 IU/kg Vitamin A (düşük doz),

A2 grup yumurtalarına 50 µl mısır yağı içinde 5000 IU/kg Vitamin A (orta doz),

A3 grup yumurtalarına 50 µl mısıryağı içinde 10.000 IU/kg Vitamin A (yüksek doz),

D1 grup yumurtalarına 50 µl mısıryağı içinde 2500 IU/kg Vitamin D (düşük doz),

D2 grup yumurtalarına 50 µl mısıryağı içinde 5000 IU/kg Vitamin D (orta doz),

D3 grup yumurtalarına 50 µl mısıryağı içinde 10.000 IU/kg Vitamin D (yüksek doz),

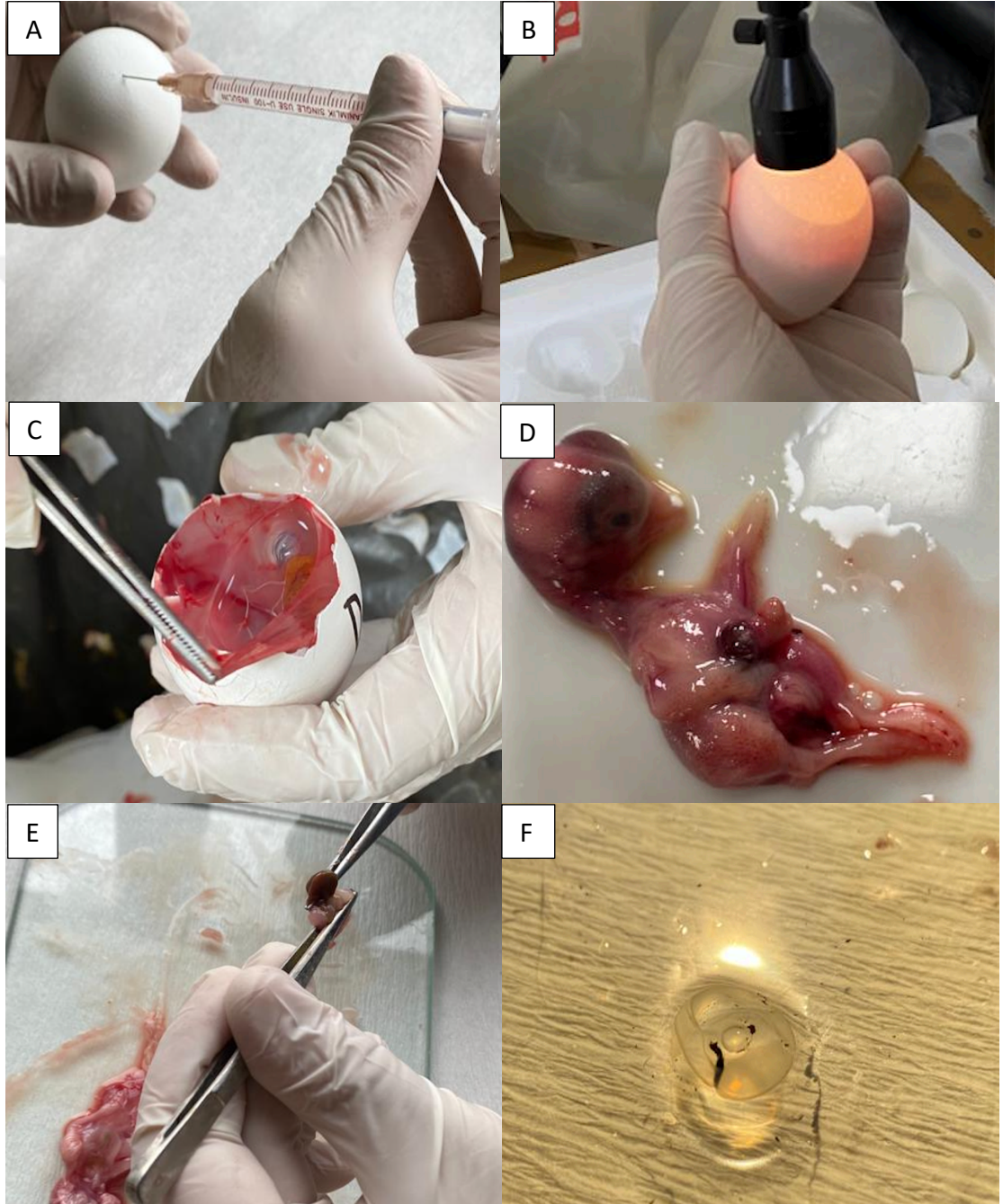
E1 grup yumurtalarına 50 µl mısır yağı içinde 250 IU/kg Vitamin E (düşük doz),

E2 grup yumurtalarına 50 µl mısır yağı içinde 500 IU/kg Vitamin E (orta doz),

E3 grup yumurtalarına 50 µl mısıryağı içinde 1000 IU/kg Vitamin E (yüksek doz) enjekte edildi (Tablo 3.1).

Enjeksiyon sonrası, yumurtalara açılan porlar steril yara bandı yapıştırılarak hava almayacak şekilde kapatıldı ve yumurtalar tekrar kuluçka makinesine yerleştirildi.

Kuluçka makinesindeki 17. günde (enjeksiyondan 48 saat sonra) tüm yumurtalar kuluçka makinasından alındı, ışık altında kontrol edildi (şekil 3.1B), kabukları kırıldı (şekil 3.1C) ve embriyolar çıkarıldı (şekil 3.1D). Embriyolardan ıkarılan lensler disseke edilerek numaralandırılmış ependorflara alındı (şekil 3.1. E, F).



şekil 3.1: Deney Aşamalarına Ait Görüntüler. A) HC ve vitamin enjeksiyonu, B) Yumurtaların ışık altında kontrol edilmesi, C) Kabukların kırılması, D) Emriyoların ıkarılması, E) Lenslerin disseke edilmesi, F) Analizde kullanılacak lens.

Disseksiyon aşamasında kontrol grubundan 2 embriyo ($K_{n:6}$), HC grubundan 2 embriyo ($HC_{n:6}$), A1 grubundan 1 embriyo ($A1_{n:7}$), A2 grubundan 1 embriyo ($A2_{n:7}$), E1 grubundan 1 embriyo ($E1_{n:7}$) ve E3 grubundan 2 embriyo ($E3_{n:7}$) gelişim geriliği gösterdiği için çalışma dışı bırakıldı.

Tablo 3.1: Gruplar, kullanılan kimyasal/biyolojik maddeler ve farmakolojik ajanlar

Grup	Ajan	Doz	Hacim	Veriliş sıklığı	Verilme günü
Kontrol	Mısır yağı		50 µl	Tek doz	15. gün
HC	Mısır yağı HC	5 µmol	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
A1	Mısır yağı HC A vitamini	5 µmol 2500 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
A2	Mısır yağı HC A vitamini	5 µmol 5000 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
A3	Mısır yağı HC A vitamini	5 µmol 10.000 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
D1	Mısır yağı HC D vitamini	5 µmol 2500 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
D2	Mısır yağı HC D vitamini	5 µmol 5000 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
D3	Mısır yağı HC D vitamini	5 µmol 10.000 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
E1	Mısır yağı HC E vitamini	5 µmol 250 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
E2	Mısır yağı HC E vitamini	5 µmol 500 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün
E3	Mısır yağı HC E vitamini	5 µmol 1000 IU/kg	50 µl 100 µl	Tek doz	15. gün

3.4. Biyokimyasal Analiz Aşaması

Homojenatların hazırlanması: Alınan lens örnekleri 0.1 M pH:7.4 fosfat tamponundan 0,4 ml ilave edilerek Ultra Turrax (IKA Works, USA) marka homojenizatörle buz içerisinde 24,000 devir/dk'da 1 dk homojenize edildi. Homojenatlara daha sonra Dr Hielscher (Germany) marka sonikatörle 20,000 cycle/sec olacak şekilde 1 dk ultrasonikasyon gerçekleştirildi. Ardından homojenatlar 10.000 g'de 15 dk santrifüj edilerek supernatant ayrıldı ve çalışılincaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.4.1. Elisa Ölçümleri

Doku homojenatından P53 düzeyleri BT-Lab marka (BT-Lab, Zhejiang, China) Chicken Cellular tumor antigen p53 ELISA Kit, Bcl-2 düzeyleri BT-Lab marka (BT-Lab, Zhejiang, China) Chicken Apoptosis regülatör Bcl-2 ELISA Kit, NF-κB düzeyleri BT-Lab marka (BT-Lab, Zhejiang, China) Chicken Nuclear factor-kappa B ELISA Kit kullanılarak ölçüldü. P53 düzeyleri mg/g protein, Bcl-2 düzeyleri mg/g protein, NF-κB düzeyleri mg/g protein olarak verildi.

P53 Elisa Ölçüm Aşamaları

Standartların hazırlanması: Ölçüme başlamadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. 120 µl (48 ng/ml) Standart 120 µl standart seyreltici ile 24 ng/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için dilüe edildi. Seyreltmeler yapılmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dakika dinlendirildi. Standart noktaların oluşturulması için standart stok solüsyonu (24 ng/ml) standart seyreltici ile 1:2 oranında seri olarak seyreltilerek 12 ng/ml, 6 ng/ml, 3 ng/ml ve 1,5 ng/ml solüsyonlar hazırlandı. Kalan çözelti bir ay içinde kullanılmak üzere -20 °C'de donduruldu. Standart solüsyonların seyreltilmesi aşağıdaki gibidir:

Standart No.5 (24 ng/ml) → 120 µl Orjinal standard + 120 µl Standart seyreltici

Standart No.4 (12 ng/ml) → 120 µl Standard No.5 + 120 µl Standart seyreltici

Standart No.3 (6 ng/ml) → 120 µl Standard No.4 + 120 µl Standart seyreltici

Standart No.2 (3 ng/ml) → 120 µl Standard No.3 + 120 µl Standart seyreltici

Standart No.1(1,5ng/ml) → 120 µl Standard No.2 + 120 µl Standart seyreltici

Yıkama Tamponu hazırlanması: 500 ml yıkama tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresi 25 kat deiyonize su ile seyreltildi. Solüsyon kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

Analiz Prosedürü: Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Analizler, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Standartlar ve numuneler için gereken kuyucuk sayısı belirlendi. İlk 5 kuyucuğa 1, 2, 3, 4, ve 5 nolu standartlardan 50'şer µl eklendi. 6. kuyucuk ise sıfır standart olarak belirlendi. Numune kuyucuklarına 40'ar µl numune eklendi ve ardından numune kuyucuklarına 10 µl anti-TP53 antikoru eklendi (Standart solüsyonlar biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart eklenen kuyucuklara biyotinlenmiş antikor eklenmedi), ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi (Sıfır standart kuyucuğuna streptavidin-HRP eklenmedi). İyice karıştırıldı. Plakanın üzeri kapatıldı ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Plate yıkama tamponu ile 5 kez Labocon LMPW-101 marka otomatik yıkama cihazı kullanılarak yıkandı (Labocon Scientific Limited, UK). Plate kağıt havlu veya diğer emici malzeme üzerinde kurulandı. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu B eklendi. Plate karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi, mavi renk hızlıca sarıya döndü.

Durdurma Solüsyonunu ekledikten sonra en geç 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış ChemWell 2910 marka mikroparka okuyucu (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA) kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi. Konsantrasyonları bilinen standartlar ile oluşturulan eğriler kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

NF-κB Elisa Ölçüm Aşamaları

Standartların hazırlanması: Ölçüme başlamadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. 120 µl (2400 ng/L) Standart 120 µl standart seyreltici ile 1200 ng/L standart stok solüsyonu oluşturmak için dilüe edildi. Seyreltmeler yapılmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dakika dinlendirildi. Standart noktaların oluşturulması için standart stok

solüsyonu (1200 ng/L) standart seyreltici ile 1:2 oranında seri olarak seyreltilerek 600 ng/L, 300 ng/L, 150 ng/L ve 75 ng/L solüsyonlar hazırlandı. Kalan çözelti bir ay içinde kullanılmak üzere -20 °C'de donduruldu. Standart solüsyonların seyreltilmesi aşağıdaki gibidir:

Standart No.5 (1200 ng/L) → 120 µl Orjinal standard + 120 µl Standart seyreltici

Standart No.4 (600 ng/L) → 120 µl Standard No.5 + 120 µl Standart seyreltici

Standart No.3 (300 ng/L) → 120 µl Standard No.4 + 120 µl Standart seyreltici

Standart No.2 (150 ng/L) → 120 µl Standard No.3 + 120 µl Standart seyreltici

Standart No.1 (75 ng/L) → 120 µl Standard No.2 + 120 µl Standart seyreltici

Yıkama Tamponu hazırlanması: 500 ml yıkama tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresi 25 kat deiyonize suda seyreltildi. Solüsyon kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

Analiz Prosedürü: Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Analizler, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Standartlar ve numuneler için gereken kuyucuk sayısı belirlendi. İlk 5 kuyucuğa 1, 2, 3, 4, ve 5 nolu standartlardan 50'şer µl eklendi. 6. kuyucuk ise sıfır standart olarak belirlendi. Numune kuyucuklarına 40'ar µl numune eklendi ve ardından numune kuyucuklarına 10 µl anti-NF-kB antikoru eklendi (Standart solüsyonlar biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart eklenen kuyucuklara biyotinlenmiş antikor eklenmedi), ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi (Boş kontrol kuyucuğuna streptavidin-HRP eklenmedi). İyice karıştırıldı. Plakanın üzeri kapatıldı ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Kapaticıyı çıkarıldı ve plaka yıkama tamponu ile 5 kez Labocon LMPW-101 marka otomatik yıkama cihazı kullanılarak yıkandı (Labocon Scientific Limited, UK). Plaka kağıt havlu veya diğer emici malzeme üzerinde kurulandı. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu B eklendi. Plaka kapaticıyla kapatılarak karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi, mavi renk hızlıca sarıya döndü.

Durdurma Solüsyonunu ekledikten sonra en geç 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış ChemWell 2910 marka mikroparka okuyucu (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA) kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi. Konsantrasyonları bilinen standartlar ile oluşturulan eğriler kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

Bcl-2 Elisa Ölçüm Aşamaları

Standartların hazırlanması: Ölçüme başlamadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. 120 µl (48 ng/ml) Standart 120 µl standart seyreltici ile 24 ng/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için dilüe edildi. Seyreltmeler yapılmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dakika dinlendirildi. Standart noktaların oluşturulması için standart stok solüsyonu (24 ng/ml) standart seyreltici ile 1:2 oranında seri olarak seyreltilerek 48 ng/ml, 12 ng/ml, 6ng/ml ve 3ng/ml solüsyonlar hazırlandı. Kalan çözelti bir ay içinde kullanılmak üzere -20 °C'de donduruldu. Standart solüsyonların seyreltilmesi aşağıdaki gibidir:

Standart No.5 (48 ng/ml) → 120 µl Orjinal standard + 120 µl Standart seyteltici

Standart No.4 (24 ng/ml) → 120 µl Standard No.5 + 120 µl Standart seyteltici

Standart No.3 (12 ng/ml) → 120 µl Standard No.4 + 120 µl Standart seyteltici

Standart No.2 (6 ng/ml) → 120 µl Standard No.3 + 120 µl Standart seyteltici

Standart No.1 (3 ng/ml) → 120 µl Standard No.2 + 120 µl Standart seyteltici

Yıkama Tamponu hazırlanması: 500 ml yıkama tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresi 25 kat deiyonize veya damıtılmış suda seyreltildi. Solüsyon kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

Analiz Prosedürü: Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler kit prospektüsüne göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Analizler, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Standartlar ve numuneler için gereken kuyucuk sayısı belirlendi. İlk 5 kuyucuğa 1, 2, 3, 4, ve 5 nolu standartlardan 50'şer µl eklendi. 6. kuyucuk ise sıfır standart olarak belirlendi. Numune kuyucuklarına 40'ar µl numune eklendi ve ardından numune

kuyucuklarına 10 µl anti-Bcl-2 antikoru eklendi (Standart solüsyonlar biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart eklenen kuyucuklara biyotinlenmiş antikor eklenmedi), ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi (Boş kontrol kuyucuğuna streptavidin-HRP eklenmedi). İyice karıştırıldı. Plakanın üzeri kapatıldı ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Kapatıcıyı çıkarıldı ve plaka yıkama tamponu ile 5 kez Labocon LMPW-101 marka otomatik yıkama cihazı kullanılarak yıkandı (Labocon Scientific Limited, UK). Plaka kağıt havlu veya diğer emici malzeme üzerinde kurulandı. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyucuğa 50ul substrat solüsyonu B eklendi. Plaka kapatıcıyla kapatılarak karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi, mavi renk hızlıca sarıya döndü.

Durdurma Solüsyonunu ekledikten sonra en geç 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış ChemWell 2910 marka mikrolaka okuyucu (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA) kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi. Konsantrasyonları bilinen standartlar ile oluşturulan eğriler kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Konsantrasyonları bilinen standartlar ile oluşturulan eğriler kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

3.4.2. Protein Ölçümü

BSA standart solüsyonu (4000 µg/ml) deiyonize su ile seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlarda (2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31 µg/ml, 15 µg/ml) standartlar hazırlandı. Her bir standarttan ve her bir numuneden 6 µl kuyucuklara eklendi. Daha sonra her kuyucuğa 300 µl Commassie Brilliant Blue (CBB) solüsyonu eklendi. CBB solüsyonunu ekledikten sonra 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 570 nm'ye ayarlanmış ChemWell 2910 marka mikrolaka okuyucu (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA) kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi. Konsantrasyonları bilinen standartlar ile oluşturulan eğriler kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

3.4.3. Real-Time PCR Ölçümü

PCR ölçümünde kullanılan tüm cihaz ve malzeme listesi Tablo 3.5'te verilmiştir.

RNA İzolasyonu Aşamaları:

- 1) Lizis Buffer Hazırlanması: Her bir numune için 14,3 M β -merkaptoetanolden 10 μ l alınarak üzerine 500 μ l LIZIS buffer eklendi.
- 2) 10-20 mg materyale önce 200 μ l PBS (Ca ve Mg içermeyen fosfat tamponu) eklendi. Daha sonra 10 μ l Proteinaz K (20mg/ml), 500 μ l lizis buffer ve 60 mg zirkonyum boncuklar eklendi ve homojenizatörde homojenize edildi. Homojenizat yeni bir 2 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
- 3) 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 4) Üzerine 500 μ l fosfat tamponu eklendi, iyice vortekslendi ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 5) Karışımın üzerine 200 μ l Kloroform izoamilalkol (49:1) karışımı eklendi. Alt-üst ederek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dk daha bekletildi.
- 6) Karışım 4 °C'de 12000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası en üstte bulunan sıvı fazdaki süpernatant (yaklaşık 600 μ l) yeni bir tüpe aktarıldı.
- 7) Üzerine 1.25 kat etanol (%96-100) eklendi (yaklaşık 800 μ l) ve pipetlenerek karıştırıldı.
- 8) 700 μ l lizat kolona transfer edildi ve oda sıcaklığında 12000 x g de 20 sn santrifüj edildi. Tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün içerisine yerleştirildi. Tüm lizatlar kolona transfer edilinceye kadar bu basamak tekrarlandı.
- 9) Kolonun üzerine 700 μ l wash Buffer 1 solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 x g de 20 sn santrifüj edildi. Tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.
- 10) Kolonun üzerine 600 μ l Wash Buffer 2 solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 x g de 20 sn santrifüj edildi, tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.
- 11) Kolon tekrar 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi ve kolon 1,5 ml'lik eppendorf tüpün üzerine yerleştirildi.

12) Kolonun merkezine 50-100 µl, 65-70 °C'de bekletilmiş nükleaz içermeyen, ultra distile su veya DEPC'li su eklendi.

13) Oda sıcaklığında 12000 x g de 1 dakika santrifüj edildi.

14) RNA hemen kullanıldı veya -80 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

cDNA Sentezi Aşamaları:

1) Elde edilen RNA'ların ölçümü nanodrop cihazında yapıldı. Cihazda değerler ng/ µl cinsinden ölçüldü.

2) 1000'er ng RNA içermesi için her bir numuneden alınması gereken hacim (µl) miktarı hesaplandı.

1µl (cihazda ölçülen değer) ng

X (Gereken numune hacmi) 1000ng

$X = 1000 / (\text{cihazda ölçülen değer}) \mu\text{l}$

3) cDNA sentezinde kullanılacak her bir numune için gereken reaktif miktarları ayarlandı (Tablo 3.2). Total karışım 1.5 ml'lik ependorf tüpe kondu. Hazırlanan karışım eşit bir şekilde kuyucuklara dağıtıldı (10'ar µl). Her bir numune için 10 µl karışımın üzerine hesaplanan hacimlere göre RNA'lar eklenerek total hacim 20 µl'den çıkarıldı ve bu hacim su ile tamamlandı.

Tablo 3.2: cDNA Standart Reaksiyonda 1 numune ve toplam numune için gereken reaktif miktarları

10 kat seyreltilmiş RT Buffer	2 µl	158 µl
25 kat seyreltilmiş dNTP Mix (100 mM)	0.8µl	63,2 µl
10 kat seyreltilmiş RT Random Primers	2 µl	158 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl	79 µl
Nuclease-free H₂O	4,2 µl	331,8 µl
Toplam	10 µl	790 µl

4) Veri tablosuna göre sıcaklık ve süre değerleri cihaza girildi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: cDNA sentezi için kullanılan sıcaklık ve süre değerleri

Settings	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temp.	25°C	37°C	85°C	4°C
Time	5 minutes	120 minutes	10 minutes	∞

Primerlerin Sulandırılması Aşaması:

Primerler veri tablosuna göre seyreltildi. Hazırlanan stok primerler 10 µM olacak şekilde dilüe edildi. Kullanılan primerler Tablo 3.4’te sunulmuştur.

Tablo 3.4: RT-QPCR İçin Kullanılan Primerler

Primer Adı	Ürün uzunluğu	Primer sekansı	Saflaştırma yöntemi		
Chicken NF-κB Forward primer	20 bp	CCGCCAATAGCTTGTCTGT	20	50	OPC
Chicken NF-κB Reverse primer	20 bp	GTATGTAGTGCTGTCCGCGT	20	50	OPC
Chicken P53 Forward primer	20 bp	CGTTACCACGACGACGAGAC	20	50	OPC
Chicken P53 Reverse primer	20 bp	GCCCCTCCAGTGTAAGGATG	20	50	OPC
Chicken Bcl-2 Forward primer	20 bp	ACCTGGATGACCGAGTACCT	20	50	OPC
Chicken Bcl-2 Reverse primer	20 bp	GGTCAAACCTTACGTCCCCC	20	50	OPC
Chicken Bax Forward primer	20 bp	TCGTCGCCTTCTTCGAGTTC	20	50	OPC
Chicken Bax Reverse primer	20 bp	GGCCTCATACTGTTGCCGTA	20	50	OPC
Chicken b-aktin Forward primer	20 bp	CCGTGCTGTGTTCCCATCTA	20	50	OPC
Chicken b-aktin Reverse primer	20 bp	TCTGGGCTTCATCACCAACG	20	50	OPC

OPC: Kolon bazlı saflaştırma yöntemi

Real Time PCR aşaması:

1) Real Time PCR Standart Reaksiyonda 1 örnek için gereken reaktifler aşağıdaki gibi hesaplanarak kuyucuklara dağıtıldı. Bir örnekte: 10 µl Master Mix + 2 µl cDNA + 2 µl Primerler + 6 µl Dna free water (20 µl'ye tamamlamak için)

2) RT-QPCR için 95 °C'de 5dk; 95°C'de 15s, 60 °C'de 30s, 72 °C'de 30s; 40 döngü protokolü kullanıldı.

PCR ölçümünde kullanılan tüm cihaz ve malzeme listesi Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.1: PCR Ölçümünde Kullanılan Cihaz ve Malzeme Listesi

Kullanılan Malzemeler	Marka	Kat No
Rna İzolasyon Kiti	A.B.T. TM Blood/Tissue RNA Purification Kit for Leukemia	104-01-10 100 preps
β-Merkaptoetanol	M3148 Sigma-Aldrich 2-Mercaptoethanol	CAS Number 60-24-2
Proteinaz K	Thermo Scientific TM Proteinase K, recombinant, PCR grade	EO0491
Kloroform İzooamilalkol	Merck Isoamyl Alcohol	516726
Nükleaz Free, Ultra Distile Su	Biochrom AG Ultra Pure Water, Sterile, Suitable for HPLC	L0015-BC
cDNA Kiti	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814
Nanodrop	Thermo Scientific TM NanoDrop TM 2000/2000c Spectrophotometers	ND-2000
PCR	Applied Biosystems TM MiniAmp TM Thermal Cycler	A37834
Real Time PCR Master Mix	Thermo Scientific TM Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	K0221
Real Time PCR	CFX96 TOUCH BIORAD Real-Time PCR System	4376600
Primer	100 nmol HPLC Grade	
Santrifüj	Neofuge 13R-Refrigerated Centrifuge-Heal Force Bio	
Su	Thermo Scientific TM Water, Nuclease-free, Molecular Biology Grade, Ultrapure	7732-18-5
PBS	Gibco TM PBS, pH 7.2	20012027

3.5 İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS (Statistical Package for Social Science) 22.0 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde ifade edildi. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Işıklı mikroskop altında disseke edilen lensler incelenmiş ve HC grubunun tamamında opaklaşmanın olduğu gözlemlenmiştir.

ELISA sonuçlarına ait bulgular: Her bir lens numunesine ait ELISA değeri aynı lens numunesine ait protein değeri ile oranlanarak mg/g protein olarak verildi.

RT-PCR sonuçlarına ait bulgular: Kontrol grubundaki gen ekspresyonu 1 alınarak her bir lensteki ekspresyonun kontrol grubuna kıyasla kaç kat arttığı hesaplanmış ve hesaplanan değerler üzerinden istatistiksel analiz yapılmıştır.

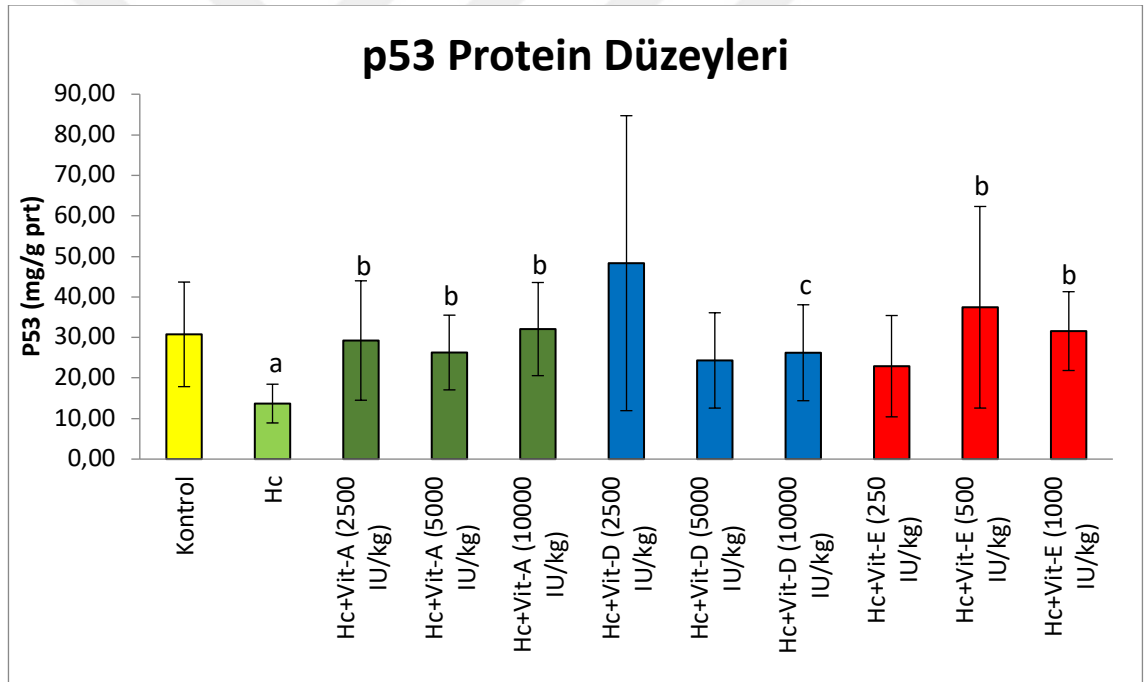
4.1. P53 Protein Düzeyleri

Kontrol, HC, A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 gruplarının ortalama P53 düzeyleri Tablo 4.1’de verilmiştir. HC grubu kontrol ile grubu karşılaştırıldığında P53 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi ($p<0,01$). A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). A1, A2 ve A3 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında P53 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdi ($p<0,01$). A vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). D1 ve D2 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$) D3 grubu HC grubu ile karşılaştırıldığında P53 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,05$). D vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). E1 grubu HC grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$) E2 ve E3 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında P53 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdi ($p<0,01$). E vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1).

Tablo 4.1: Lens dokusuna ait P53 değerleri

Grup	N	Ortalama±SS (mg/g protein)	Min	Max
Kontrol	6	30,77±12,90	18,27	52,52
HC	6	13,69±4,78 ^a	8,26	21,66
A1-HC+Vit-A (2500 IU/kg)	7	29,24±14,72 ^b	17,70	60,87
A2-HC+Vit-A (5000 IU/kg)	7	26,28±9,22 ^b	16,66	39,07
A3-HC+Vit-A (10000 IU/kg)	8	32,07±11,48 ^b	17,28	53,70
D1-HC+Vit-D (2500 IU/kg)	8	48,32±36,37	6,08	114,66
D2-HC+Vit-D (5000 IU/kg)	8	24,33±11,74	8,35	45,28
D3-HC+Vit-D (10000 IU/kg)	8	26,23±11,83 ^c	13,29	50,14
E1-HC+Vit-E (250 IU/kg)	7	22,91±12,49	9,62	47,16
E2-HC+Vit-E (500 IU/kg)	8	37,45±24,85 ^b	18,20	91,93
E3-HC+Vit-E (1000 IU/kg)	6	31,57±9,72 ^b	17,79	46,14

a: $p<0,01$ kontrol grubuna g re, b: $p<0,01$ HC grubuna g re, c: $p<0,05$ HC grubuna g re, istatistiki farklılık olduğunu g stermektedir.



 ekil 4.1: P53 Protein D zeyleri. a: $p<0,01$ kontrol grubuna g re, b: $p<0,01$ HC grubuna göre, c: $p<0,05$ HC grubuna göre, istatistiki farklılık olduğunu göstermektedir.

4.2. NF- B Protein Düzeyleri

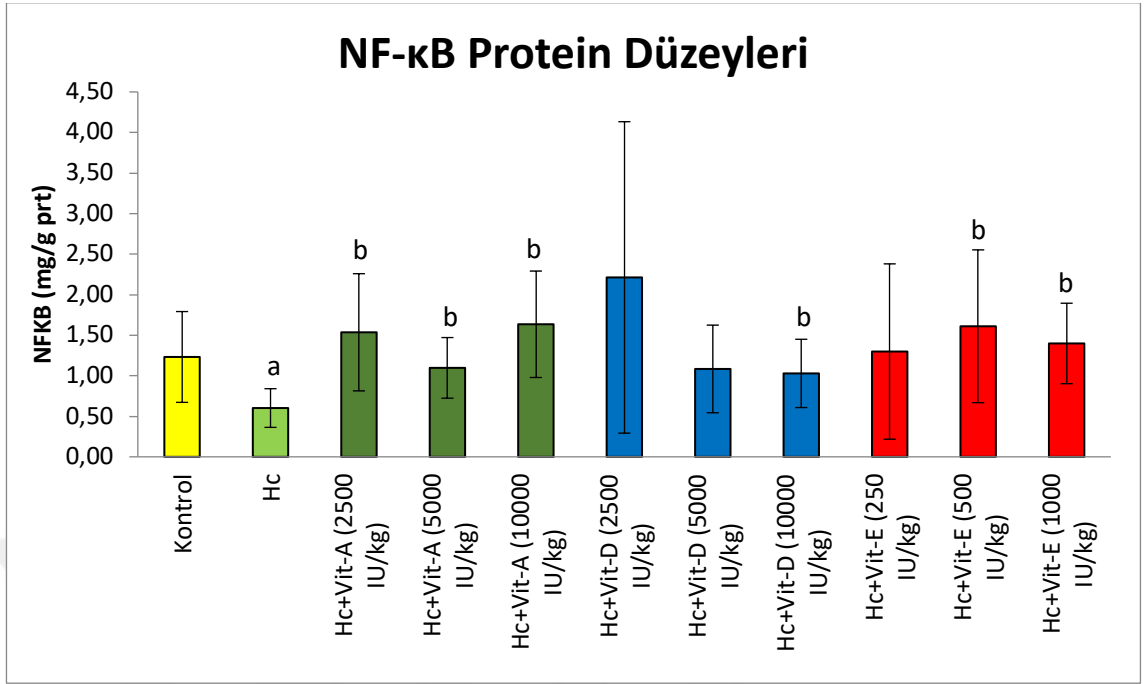
Kontrol, HC, A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 gruplarının ortalama NF- B düzeyleri Tablo 4.2’de verilmiştir. HC grubu kontrol ile grubu karşılaştırıldığında NF- B düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir d şuş gösterdi ($p<0,05$). A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). A1, A2 ve A3 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında NF- B

düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdi ($p<0,01$). A vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). D1 ve D2 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$) D3 grubu HC grubu ile karşılaştırıldığında NF- κ B düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,01$). D vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). E1 grubu HC grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$) E2 ve E3 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında NF- κ B düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdi ($p<0,01$). E vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2).

Tablo 4.2: Lens dokusuna ait NF- κ B değerleri

Grup	N	Ortalama $\pm$ SS (mg/g protein)	Min	Max
Kontrol	6	1,23 $\pm$ 0,22	0,64	1,96
HC	6	0,60 $\pm$ 0,09 ^a	0,36	1,00
A1-HC+Vit-A (2500 IU/kg)	7	1,53 $\pm$ 0,27 ^b	0,70	2,96
A2-HC+Vit-A (5000 IU/kg)	7	1,09 $\pm$ 0,14 ^b	0,74	1,86
A3-HC+Vit-A (10000 IU/kg)	8	1,63 $\pm$ 0,23 ^b	0,83	2,85
D1-HC+Vit-D (2500 IU/kg)	8	2,21 $\pm$ 0,67	0,23	6,15
D2-HC+Vit-D (5000 IU/kg)	8	1,08 $\pm$ 0,19	0,42	2,19
D3-HC+Vit-D (10000 IU/kg)	8	1,02 $\pm$ 0,14 ^b	0,53	1,92
E1-HC+Vit-E (250 IU/kg)	7	1,29 $\pm$ 0,40	0,41	3,63
E2-HC+Vit-E (500 IU/kg)	8	1,61 $\pm$ 0,33 ^b	0,78	3,41
E3-HC+Vit-E (1000 IU/kg)	6	1,39 $\pm$ 0,20 ^b	0,83	1,97

a: $p<0,05$ kontrol grubuna göre, b: $p<0,01$ HC grubuna göre, istatistiki farklılık olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.2: NF-κB Protein Düzeyleri. a: $p < 0,05$ kontrol grubuna göre, b: $p < 0,01$ HC grubuna göre, istatistiki farklılık olduğunu göstermektedir.

4.3. Bcl-2 Protein Düzeyleri

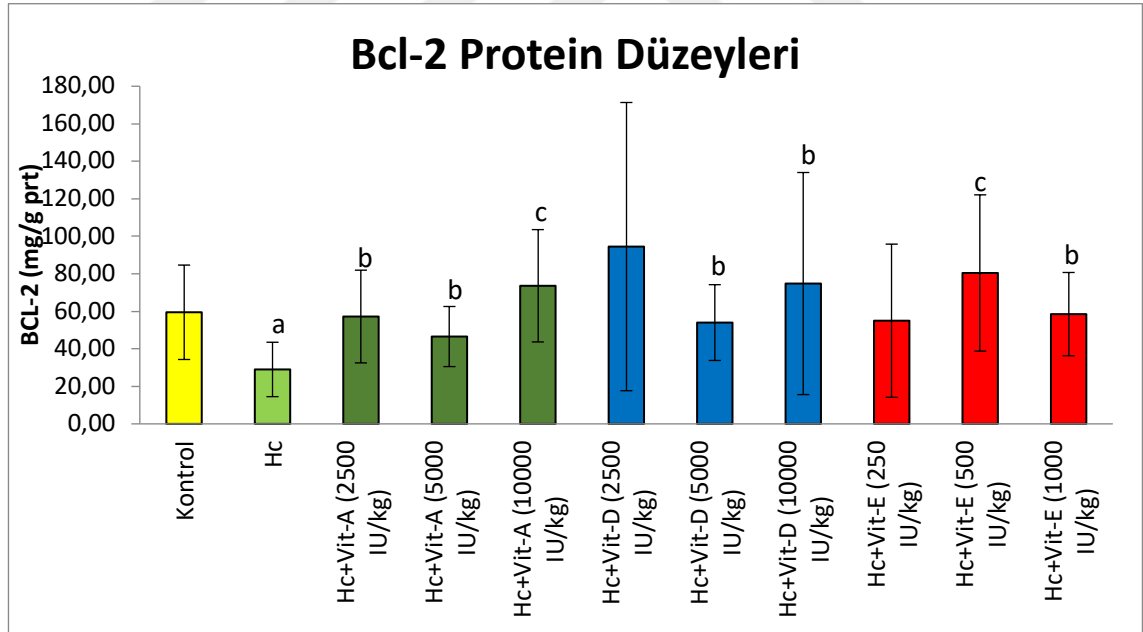
Kontrol, HC, A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 gruplarının ortalama Bcl-2 düzeyleri Tablo 4.3'te verilmiştir. HC grubu kontrol ile grubu karşılaştırıldığında Bcl-2 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi ($p < 0,05$). A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). A1, A2 ve A3 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdi (sırasıyla $p < 0,05$, $p < 0,5$ ve $p < 0,01$). A vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). D1 grubu HC grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0,05$) D2 ve D3 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p < 0,05$). D vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). E1 grubu HC grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0,05$) E2 ve E3 grupları HC grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdi ($p < 0,01$ ve $p < 0,05$ sırasıyla). E vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları

birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). (Tablo 4.3 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.3: Lens dokusuna ait Bcl-2 değerleri

Grup	N	Ortalama±SS (mg/g protein)	Min	Max
Kontrol	6	59,50±25,17	27,03	95,37
HC	6	29,02±14,50 ^a	18,23	56,37
A1-HC+Vit-A (2500 IU/kg)	7	57,22±24,72 ^b	34,95	108,56
A2-HC+Vit-A (5000 IU/kg)	7	46,56±16,02 ^b	33,01	78,26
A3-HC+Vit-A (10000 IU/kg)	8	73,61±29,95 ^c	48,75 ^c	124,05
D1-HC+Vit-D (2500 IU/kg)	8	94,50±76,82	11,88	247,13
D2-HC+Vit-D (5000 IU/kg)	8	54,00±20,20 ^b	21,31	88,69
D3-HC+Vit-D (10000 IU/kg)	8	74,81±59,19 ^b	29,77	214,85
E1-HC+Vit-E (250 IU/kg)	7	55,00±40,83	15,33	142,54
E2-HC+Vit-E (500 IU/kg)	8	80,43±41,64 ^c	36,62	141,81
E3-HC+Vit-E (1000 IU/kg)	6	58,51±22,20 ^b	31,25	86,35

a: $p<0,05$ kontrol grubuna göre, b: $p<0,05$ HC grubuna göre, c: $p<0,01$ HC grubuna göre, istatistiki farklılık olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3: Bcl-2 Protein Düzeyleri. a: $p<0,05$ kontrol grubuna göre, b: $p<0,05$ HC grubuna göre, c: $p<0,01$ HC grubuna göre, istatistiki farklılık olduğunu göstermektedir.

4.4. P53 Gen Ekspresyonu Düzeyleri

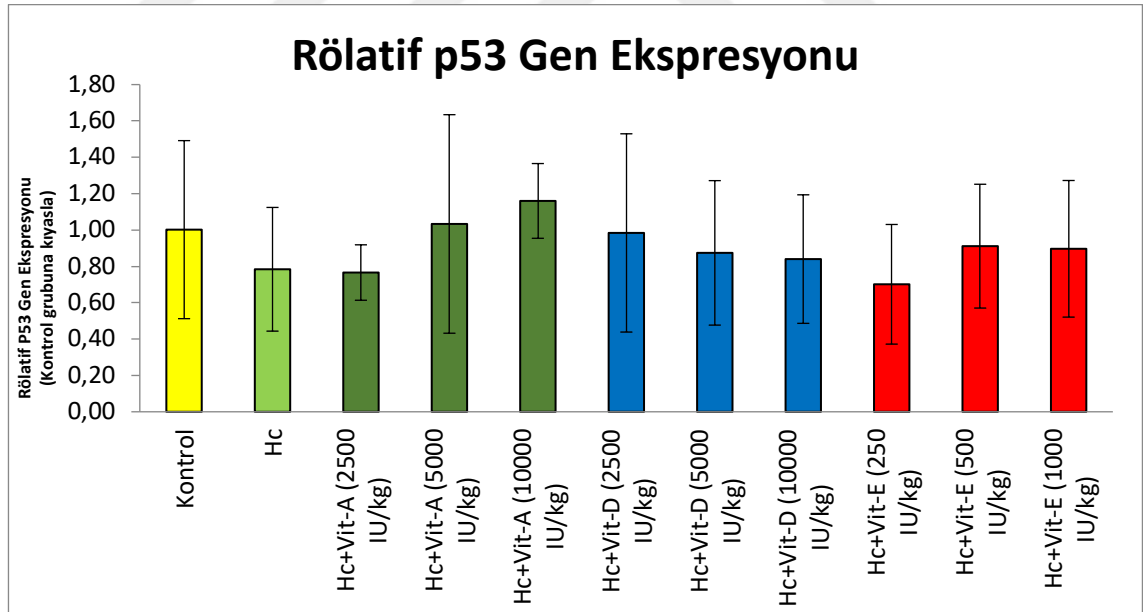
Kontrol, HC, A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 gruplarının ortalama rölatif P53 gen ekspresyon düzeyleri Tablo 4.4'te verilmiştir. HC grubu ile kıyaslandığında A vitamini verilen gruplarda doz artışıyla birlikte P53 gen ekspresyonunda bir artış gözlemlense de

istatistiksel olarak anlamlı değildir. D vitamini ve E vitamini verilen gruplar HC grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.4 ve Şekil 4.4).

Tablo 4.4: Rölatif P53 Gen Ekspresyonu

Grup	N	Ortalama $\pm$ SS	Min	Max
Kontrol	6	1,00 $\pm$ 0,48	0,29	1,52
HC	6	0,78 $\pm$ 0,34	0,31	1,14
A 1-HC+Vit-A (2500 IU/kg)	7	0,76 $\pm$ 0,15	0,60	,97
A2-HC+Vit-A (5000 IU/kg)	7	1,03 $\pm$ 0,60	0,41	1,99
A3-HC+Vit-A (10000 IU/kg)	8	1,16 $\pm$ 0,20	0,91	1,41
D1-HC+Vit-D (2500 IU/kg)	8	0,98 $\pm$ 0,54	0,33	1,74
D2-HC+Vit-D (5000 IU/kg)	8	0,87 $\pm$ 0,39	0,41	1,39
D3-HC+Vit-D (10000 IU/kg)	8	0,84 $\pm$ 0,35	0,40	1,40
E1-HC+Vit-E (250 IU/kg)	7	0,70 $\pm$ 0,32	0,21	1,14
E2-HC+Vit-E (500 IU/kg)	8	0,91 $\pm$ 0,34	0,42	1,53
E3-HC+Vit-E (1000 IU/kg)	6	0,89 $\pm$ 0,37	0,52	1,44

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.



Şekil 4.3: Rölatif P53 Gen Ekspresyonu. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.

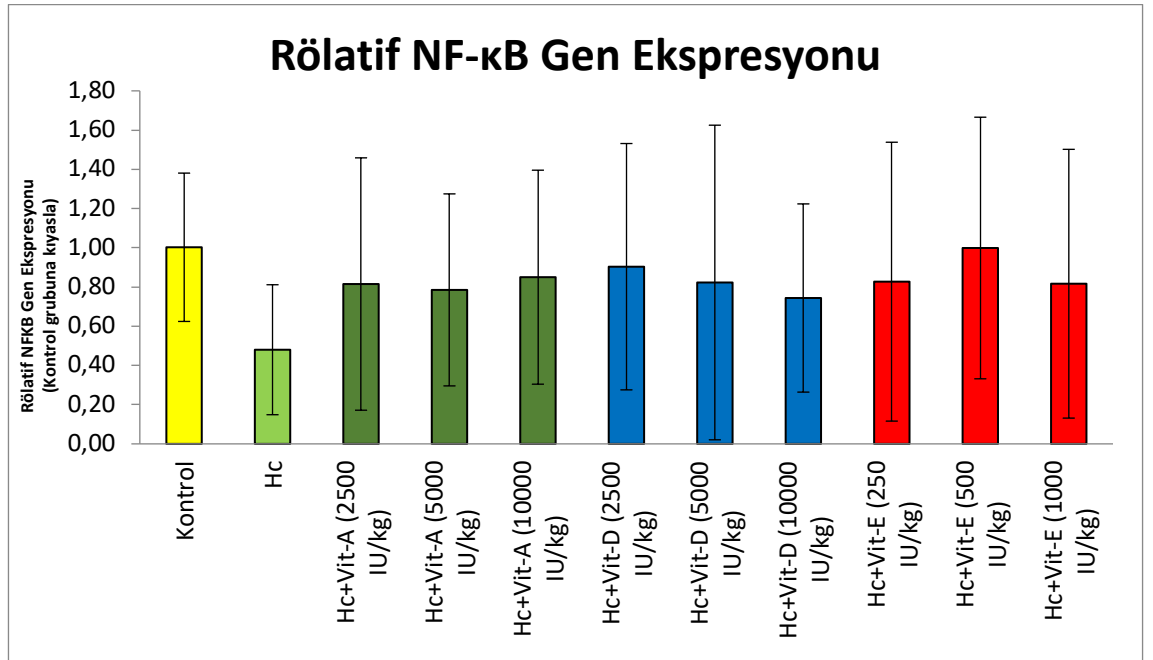
4.5. NF-κB Gen Ekspresyonu Düzeyleri

Kontrol, HC, A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 gruplarının ortalama rölatif NF-κB gen ekspresyon düzeyleri Tablo 4.5'te verilmiştir. Ortalama rölatif gen ekspresyon düzeyleri HC grubu ile kıyaslandığında A, D, E vitamini verilen tüm gruplarda artış gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.5 ve Şekil 4.5).

Tablo 4.5: Rölatif NF-κB Gen Ekspresyonu

Grup	N	Ortalama±SS	Min	Max
Kontrol	6	1,00±0,37	0,67	1,34
HC	6	0,48±0,33	0,15	,78
A1-HC+Vit-A (2500 IU/kg)	7	0,81±0,64	0,02	1,56
A2-HC+Vit-A (5000 IU/kg)	7	0,78±0,48	0,19	1,37
A3-HC+Vit-A (10000 IU/kg)	8	0,85±0,54	0,05	1,37
D1-HC+Vit-D (2500 IU/kg)	8	0,90±0,62	0,32	1,74
D2-HC+Vit-D (5000 IU/kg)	8	0,82±0,80	0,17	2,05
D3-HC+Vit-D (10000 IU/kg)	8	0,74±0,47	0,04	1,41
E1-HC+Vit-E (250 IU/kg)	7	0,82±0,71	0,02	2,11
E2-HC+Vit-E (500 IU/kg)	8	0,99±0,66	0,08	1,89
E3-HC+Vit-E (1000 IU/kg)	6	0,81±0,68	0,12	1,51

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.



Şekil 4.4: Rölatif NF-κB Gen Ekspresyonu. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.

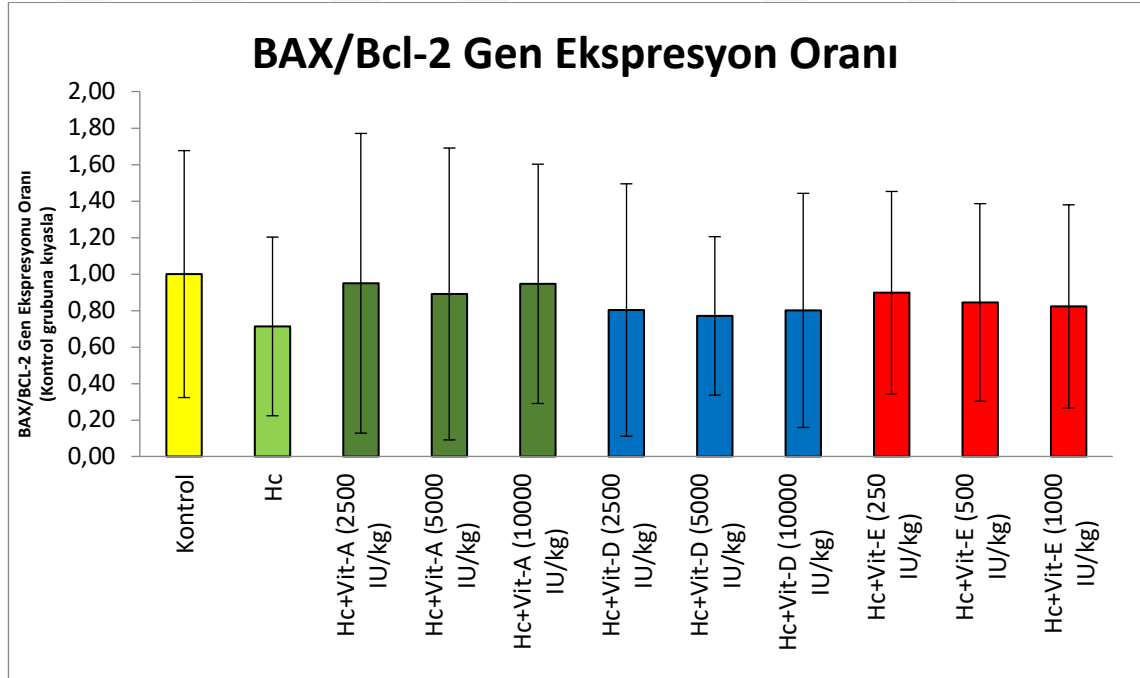
4.6. Bax/Bcl-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri

Kontrol, HC, A1, A2, A3, D1, D2, D3, E1, E2, E3 gruplarının ortalama rölatif Bax/Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri Tablo 4.6’da verilmiştir. A, D, E vitamini verilen tüm gruplar ile HC grubunun ve kontrol grubunun rölatif gen ekspresyon düzeyleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.6 ve Şekil 4.6).

Tablo 4.6: Rölatif BAX/Bcl-2 Gen Ekspresyonu

Grup	N	Ortalama±SS	Min	Max
Kontrol	6	0,9995±0,67	0,12	1,70
HC	6	0,7126±0,48	0,18	1,19
A1-HC+Vit-A (2500 IU/kg)	7	0,9492±0,82	0,32	2,37
A2-HC+Vit-A (5000 IU/kg)	7	0,8905±0,80	0,32	2,08
A3-HC+Vit-A (10000 IU/kg)	8	0,9460±0,65	0,13	1,69
D1-HC+Vit-D (2500 IU/kg)	8	0,8026±0,69	0,15	1,81
D2-HC+Vit-D (5000 IU/kg)	8	0,7703±0,43	0,28	1,32
D3-HC+Vit-D (10000 IU/kg)	8	0,8005±0,64	0,14	1,84
E1-HC+Vit-E (250 IU/kg)	7	0,8977±0,55	0,33	2,01
E2-HC+Vit-E (500 IU/kg)	8	0,8441±0,54	0,16	2,06
E3-HC+Vit-E (1000 IU/kg)	6	0,8225±0,55	0,12	1,48

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.



Şekil 4.5: BAX/Bcl-2 Gen Ekspresyon Oranı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

Eksojen GC'ler, çok çeşitli romatizmal ve diğer inflamatuvar hastalıkların tedavisinde antiinflamatuvar ve immünosupresif ilaçlar olarak kullanılır. GC'ler, immünosüpresif, antiinflamatuvar ve antialerjik etkilerini, doza bağlı bir şekilde farklı etki mekanizmalar yoluyla gösterirler (Strehl ve ark., 2011). Bu mekanizmalar genomik ve genomik olmayan yollar olarak sınıflandırılır. Genomik yolun, GC'lerin özellikle doza bağımlı olan birçok olumsuz etkisinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Son veriler, doza bağlı yan etkilerin genomik yolun aktivasyon derecesi ile yakından bağlantılı olduğunu göstermiştir. Gözlemsel çalışmalar, GC'ler ile osteoporoz, osteonekroz, katarakt, hiperglisemi, koroner kalp hastalığı ve bilişsel bozulmanın dahil olduğu olumsuz etkiler arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (Ruiz-Irastorza ve ark., 2012).

Düşük doz prednizon ile uzun süreli tedavi gören romatoid artrit hastalarını kapsayan kohort bir çalışmada 112 prednizon kullanan romatoid artrit hastası, 112 prednizon kullanmayan romatoid artri hastası ile yaş, cinsiyet, ırk, hastalık süresi bakımından birebir eşleştirilerek tedavi süresinde meydana gelen çeşitli yan etkiler (kırık, ciddi enfeksiyonlar, gastrointestinal kanama ve katarakt) incelenmiştir. Prednizon kullanan grupta toplam 92 yan etkiye karşı prednizon kullanmayan grupta toplam 31 yan etki tespit edilmiştir. Bununla beraber prednizon alan grupta 17 kişide katarakt tespit edilirken prednizon almayan grupta 5 kişide katarakt tespit edilmiş. Prednizon ile tedavi edilen hastalarda katarakt olgusu istatistiksel anlamda yüksek bulunmuştur ($p<0,04$) (Saag ve ark., 1994).

Sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalarında kortikosteroid kullanımı ile organ hasarı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Hopkins Lupus Kohort Çalışmasına kayıtlı 539 hastada steroid tedavisinin ilk hasara etkisini, Cox orantısal risk modellerini kullanılarak değerlendirilmiş, kümülatif dozdaki 36,5 gm'lik artışla, katarakt gelişimi riskinin önemli ölçüde ilişkili (RR 1.9, % 95 GA, $p<0,001$) olduğunu tespit edilmiştir (Zonana-Nacach ve ark., 2000).

Avustralya, Sidney yakınlarındaki Blue Mountains'ın kentsel bir bölgesinde görme ve yaygın göz hastalıkları üzerine nüfusa dayalı, kesitsel bir çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmaya çalışma sırasında veya öncesinde inhale kortikosteroid (beclomethasone veya

budesonide) kullanmış olan 49-97 yaş arası 3654 kişi dahil edilmiştir. Katılımcıların bilgileri anket yoluyla toplanmış ve kortikal, nükleer veya PSC'lerin varlığını ve ciddiyetini belirlemek için deneklerin lenslerinin fotoğrafları değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz, kümülatif olasılık modeli ve sıralı regresyon ile gerçekleştirilmiş olup, deneklerin % 6'sında bir dereceye kadar PSC, % 24'ünde kortikal katarakt tutulumu (merceğin yüzde 5'inden fazlası) ve % 19'unda 4. veya 5. derece nükleer katarakt olduğu görülmüştür. Herhangi bir zamanda inhale kortikosteroidlerin kullanımı, nükleer katarakt (RR 1.5, % 95 GA, 1,2 ila 1,9) ve posterior subkapsüler katarakt (RR 1.9, % 95 GA) prevalansında önemli ölçüde artış ile ilişkilendirilmiştir (Cumming ve ark., 1997).

Katarakt insidansına ilişkin retrospektif bir gözlemsel kohort çalışması yapılmıştır. Çalışma popülasyonu, İngiltere ve Galler'deki 350 genel muayenehaneden alınan 70 yaşın altındaki 286.078 kişiyi içermektedir. Hastalar sadece intranazal kortikosteroid kullananlar, sadece oral kortikosteroid kullananlar ve her iki ilacı da kullanmayanlar olarak sınıflandırılmıştır. Katarakt vakalarını belirlemek için bilgisayarlı tıbbi kayıtlar kullanılmıştır. Tüm intranazal kortikosteroidler için insidans oranları, maruz kalmayan kohorttakilere benzer bulunmuş olup (RR 1, % 95 GA) oral kortikosteroidler için insidans oranı maruz kalmayan kohorttakilere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (RR 2.1, % 95 GA) (Derby ve Maier, 2000).

Bu çalışmalara ek olarak kortikosteroidlerin; türüne, kullanım süresine ve dozuna bağlı olarak farklı derecelerde lens opaklaşmasına ve katarakta yol açtığını destekleyen birçok çalışma mevcuttur (Black et al., 1960; Garbe et al., 1998; Simons et al., 1993).

Prednizolon, flutikazon, budesonid ve deksametazon gibi modern GC'ler, antiinflamatuvar etkileri arttırmak için modifiyeler içeren kortizol (hidrokortizon) yapısına dayanmaktadır (Adcock ve Mumby, 2017).

Hidrokortizonun katarakt üzerine etkilerini, moleküler mekanizmalarını ve antikatarojenik ajanların etkilerini araştırmak amacıyla kesitsel çalışmalara ek olarak hayvanlar üzerinde veya hücre kültürü ortamında kontrollü deneyler ve incelemeler yapılmıştır.

Bir çalışmada civciv embriyolarında glukokortikoid kaynaklı kataraktları, bir görüntü analiz sistemi ile incelemişler, frontal düzlemde lens opasifikasyonunun farklı bölgelerini temsil eden kontrast bir görüntü elde etmişler ve opaklıkların topografisi, yoğunlukları, bölgelerin ve sınırların geometrik ölçümleri gibi objektif veriler elde etmişlerdir. Mercekteki opasitelerin görsel olarak kortikal ve nükleer bölgelerde önemli değişikliklerle birlikte karmaşık bir model gösterdiğini tespit etmişlerdir (Babizhayev ve ark., 1992).

Antikatarakt ajanlar için etkili bir tarama modeli geliştirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, gelişmekte olan civciv embriyolarında glukokortikoid ile katarakt indüksiyonunun yaş ile ilişkisini incelemişler, 13 günlük olmadan veya 15 günlük olduktan sonra uygulanan HC'nun katarakt indüksiyonuna etkisinin yetersiz olduğunu, 15. günde (15 günlük) civciv embriyolarına uygulanan hidrokortizon sodyum süksinat (0.25 µl/mol) ile 48 saat sonra en etkili katarakt indüksiyonunun gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ek olarak bu çalışmada 15. günde HC ile tedavi edilen embriyo lenslerindeki GSH miktarının, 48 saat içerisinde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık % 50 azaldığı ve katarakt indüklenmesinin yetersiz olduğu diğer yaş gruplarından elde edilen lenslerde ise GSH'de çok az azalma olduğu veya hiç azalma olmadığı tespit edilmiştir (Lee ve ark., 1995).

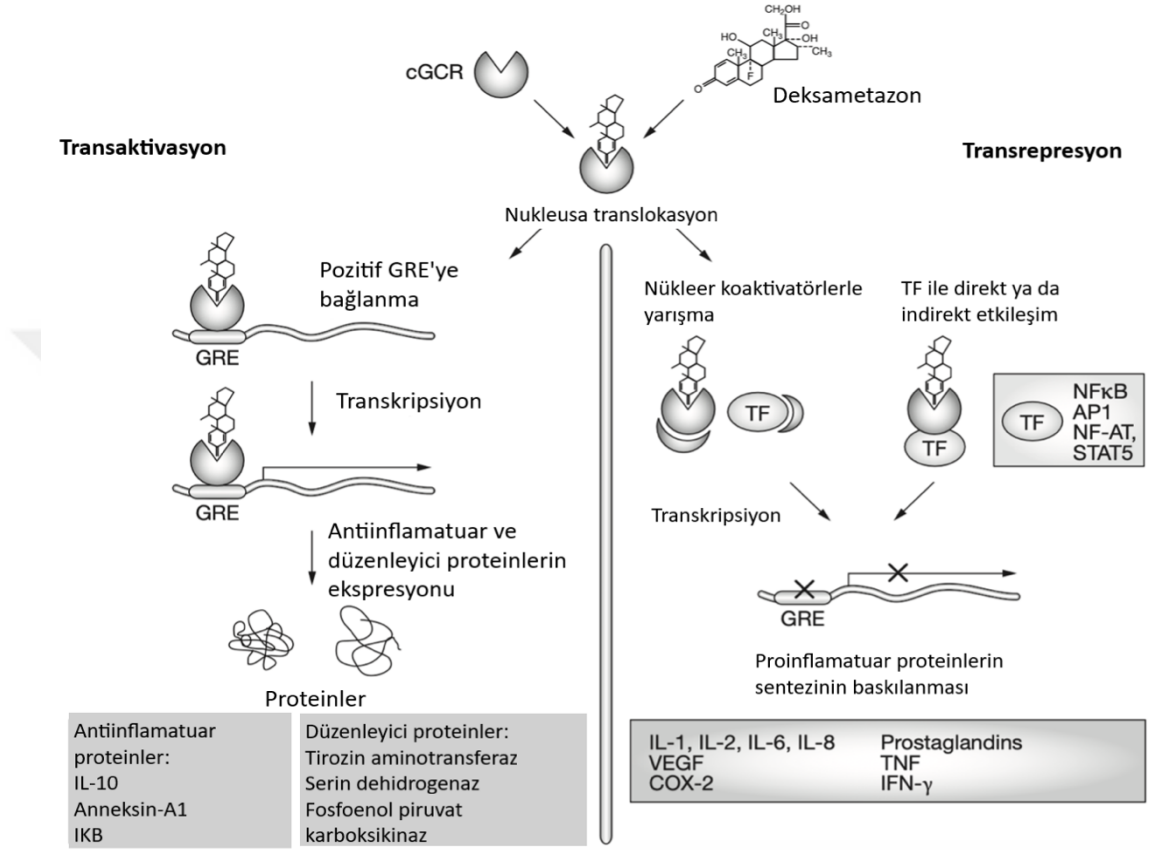
Bir başka çalışmada glukokortikoid kaynaklı katarakt oluşumunun mekanizmasını araştırmak için civciv embriyolarının lenslerini, glukokortikoidlerin yanı sıra androjen, östrojen ve mineralokortikoid ile kültürlemişlerdir. Kültür sisteminde ve tüm vücut sisteminde bu steroidlerin neden olduğu şeffaflık kaybı insidansları karşılaştırılmıştır. 15 günlük civciv embriyolarına steroid verildiğinde, sadece deksametazon, hidrokortizon ve prednizolon gibi biyolojik olarak aktif glukokortikoidlerin katarakta neden olduğunu, metiltestosteron, östradiol, etinilestradiol, progesteron ve 19-nor-etisteron'un katarakt oluşumuna neden olmadığını tespit etmişlerdir. Tüm vücut sisteminde kataraktın, glukokortikoidlerin biyolojik aktivitesine bağlı olarak ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır. İzole civciv lensleri kaplarda kültürlendiğinde ise deksametazon ve hidrokortizonun yanısıra benzer dozlarda testosteron, estradiol ve aldosteronun da opaklaşmaya neden olduğu görülmüştür (Kosano ve Nishigori, 2002).

Duman ve ark. (2019) betain'in antikataraktojenik etkisini araştırmak için HC ile indüklenmiş civciv embriyo katarakt modeli kullanmışlardır. Çalışma her bir grupta 10 döllelenmiş yumurta olmak üzere toplam 60 yumurta üzerinde yapılmıştır. İki gruba HC verilmemiş olup bir gruba sadece HC diğer üç gruba ise HC ile birlikte betainin farklı dozları verilmiştir. HC verilmeyen grupların birine sadece fosfat tamponlu salin diğerine ise sadece betain verilmiştir. Lenslerdeki opaklaşma değerlendirildiğinde HC verilmeyen gruplardaki tüm lenslerin şeffaf olduğu, yalnızca HC verilen gruptaki lenslerin ise tamamında 3., 4. veya 5. derecede opaklaşma olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak yalnızca HC uygulanan grup ile PBS uygulanan grup (kontrol grubu) karşılaştırıldığında HC uygulanan grubun GSH düzeylerinin daha düşük olduğu görülmüştür.

Bizim çalışmamızda da HC indüklenen kataraktlı lens oluşumları bahsi geçen çalışmalarla beraber steroid ile indüklenmiş katarakt (SIC) modelinin kullanıldığı birçok çalışma ile benzerdir (Nishigori ve ark., 1985, 1986, 1988, 2004; Mizuno ve ark., 1989; Lee ve ark., 1991; Setogawa ve ark., 1994; Uga ve ark., 1994; Ogiso ve ark., 1999; Ishikawa ve ark., 2015). Kuluçkanın 15. gününde HC uygulanan grupta yer alan civciv embriyo lenslerinin tamamında opaklaşma gözlemlenmiştir. Civciv embriyolarını HC ile indükleyerek elde ettiğimiz bu katarakt modeli ise kataraktogenezin moleküler mekanizmasını ve A, D, E vitaminlerinin antikatarojenik etkisini araştırmamıza olanak tanımıştır.

DNA bağlayıcı protein olarak transkripsiyon başlangıcını düzenleyen bir glukokortikoid reseptörünün (GR) keşfedilmesi ile glukokortikoidlerin moleküler mekanizmaları hakkında çok şey öğrenilmiştir (Coutinho ve Chapman, 2011). Klasik genomik eylemler, GC etkisinin en önemli moleküler mekanizmalarıdır ve gen ifadesinde değişikliklere yol açar. Bu etkilere, GC moleküllerinin plazma zarından geçişi, inaktif sitozolik glukokortikoid reseptörüne (cGCR) yüksek afiniteli bağlanma, aktifleştirilmiş GC/cGCR kompleksinin oluşumu ve kompleksin çekirdeğe translokasyonu neden olur. "Transaktivasyonda" dimerize GR-protein kompleksi, GC tarafından düzenlenen genlerin promotörüne bağlanır ve sonunda transkripsiyonel aktivasyon yoluyla antiinflamatuvar proteinler dahil olmak üzere belirli düzenleyici proteinlerin yukarı doğru düzenlenmiş sentezine yol açar. "Transrepresyonda" GR monomerleri, aktivatör protein-1 (AP-1), nükleer faktör-kB (NF-κB), interferon düzenleyici faktör-3 (IRF-3) gibi proinflamatuvar

genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan transkripsiyon faktörlerinin aktivitesine müdahale ederek protein sentezinin aşağı regülasyonuna yol açar (Şekil 5.1) (Stahn ve ark., 2007; Spies ve ark., 2011).



Şekil 5.1: Glukokortikoidlerin genomik etkileri.

Kısaltmalar: AP1: aktivatör protein 1, cGCR: sitozolik glukokortikoid reseptörü, COX-2: siklooksijenaz 2, GRE: glukokortikoid yanıt elemanı, IκB: NFκB inhibitörü, IFN-γ: interferon γ, IL: interleukin, NF-AT: aktiveleştirilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü, NFκB: nükleer faktör κB, STAT5: sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 5'in etkinleştiricisi, TF: transkripsiyon faktörü, TNF: tümör nekroz faktörü, VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü (Stahn ve Buttgerit, 2008b).

Gupta ve Wagner'ın (2003) fonksiyonel GR'nin insan ve fare lens epitel hücrelerinde (HLE B-3 ve αTN4 hücre hatlarında) ifade edilip edilmediğini belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada tüm numunelerde beklenen boyutta PCR ürünleri tespit edilmiş, her iki yönde sekanslandığında GR ile % 97 ila % 100 homolojiye sahip olduğu bulunmuştur.

Gupta ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada yeni izole edilmiş insan LEC'lerinin glukokortikoid tedavisine yanıt verip vermediğini belirlemeyi ve LEC'lerde global gen ekspresyonunda glukokortikoid kaynaklı değişiklikleri incelemeyi amaçlamışlardır. Deksametazon ile tedavi edilen insan LEC kültüründe glukokortikoid tepkisi 4 kattan

fazla artış göstermiştir. Mikroarray verileri deksametazon ile 4 saatlik uygulamanın, 136 genden 93'ünün transkripsiyonunu yukarı ve 43'ünün transkripsiyonunu aşağı regüle etmiştir; 16 saatlik deksametazon uygulaması ile 86 genden 30'unun transkripsiyonunu yukarı ve 56'sının transkripsiyonunu aşağı regüle etmiştir. Değişimlerin 1.5 kattan fazla olduğu bildirilmiştir. Genlerin ve genomların işlevlerini, düzenlemelerini ve etkileşimlerini anlamak için kullanılan bir biyoinformatik veritabanı olan Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) yolları kullanılarak 4 ve 16 saat modüle edilmiş genlerin EASE analizi (gen ifadesi verilerini anlamlı biyolojik kategorilere bağlamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntem) yapılmış ve sonuçlar glukokortikoidlerin, fosfatidil inozitol ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yollarının bileşenlerini ve düzenleyicilerini modüle edebileceğini göstermiştir. Fosfatidil inozitol yolu, hücrenin hayatta kalması, hücre proliferasyonu, hücre büyümesi ve transformasyonu gibi hücresel yanıtlarda yer alır. MAPK yolu ise, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre hareketliliği, hücre sağkalımı ve apoptoz ile ilgilidir.

HLEC'lerde spesifik GR aktivasyonunu göstermek ve gen ekspresyonundaki GC kaynaklı değişikliklerin biyolojik etkisini tanımlamak için yapılan bir çalışmada; LEC'lere deksametazon uygulamasının hücre apoptozunda veya proliferasyonda önemli bir azalış ya da artışa yol açmadığı görülmüştür. Ek olarak deksametazon ile modüle edilmiş genler arasındaki temel ilişkileri belirlemek için biyolojik yol analizi yapan bir yazılım aracı kullanılmıştır. Delta sleep-inducing peptit (DSIP) büyük ölçüde yukarı regüle edilmiştir. Gerçekleştirilen yol analizinde, DSIP'in, MAPK kaskadının yukarı ve aşağı akışında bulunan RAF-1 ve c-Fos/c-Jun ile etkileşime girdiği görülmüştür. Bilgisayar programı, DSIP'nin glukokortikoid kaynaklı lösün fermuarına (GILZ-Glucocorticoid-induced leucine zipper) benzer olduğunu öne sürmüş ve DSIP ile GILZ mRNA dizilerinin %100 homolog olduğu tespit edilmiştir. GILZ, MAPK fosforilasyonunun ve sonrasında aktivasyonunun düzenleyicisidir. Daha ileri analiz MKP-1 (MAPK fosfataz-1/DUSP-1) dahil olmak üzere GC tarafından modüle edilen genlerin 30 kadarının MAPK yolunda yer aldığını ortaya çıkarmıştır. MKP-1, MAP kinazlarındaki (ERK, JNK ve p38) kritik kalıntıları defosforile eden bir fosfatazdır. Sonuç olarak bu çalışmada GC'nin hLEC'lerde GILZ ve MKP-1 (MAPK düzenleyicileri) mRNA'larının ve proteinlerinin artan ekspresyonu gözlenmiştir. Bu, RAF, ERK, p38 ve AKT'nin fosforile formlarında bir

azalmaya karşılık gelmiş; ancak JNK'da değişiklik gözlemlenmemiştir (Gupta ve ark., 2007).

MAPK veya PI3K/AKT yollarının uzun süreli modülasyonunun, proliferasyonda artışa, farklılaşmada azalmaya, migrasyonda artışa, apoptozda azalmaya veya hücre sağkalımında artışa yolaçabileceği ve bunların tümünün PSC'ye neden olabileceği öne sürülmüştür (Gupta ve Wagner, 2009).

MAPK ve Bcl-2 sistemlerinin, hücrelerin çoğalmasını ve ölümünü düzenlemek için birbirleriyle iletişim kurduğu, sırayla fosforillenen Raf/MEK/ERK yolunun proapoptotik olan Bad'i S112'de fosforile ederek Bad'ın inaktivasyonuna katkıda bulunduğu ve bu olayın homodimerlerin oluşumuna ve Bcl-2'nin antiapoptotik cevabına katkıda bulunduğu literatürde yer almaktadır (Vitagliano ve ark., 2013).

GC'nin MKP-1 ekspresyonunu artırması, buna bağlı olarak RAF, ERK fosforile formlarının azalması (Gupta ve ark., 2007); BAD'ın inaktivasyonunu ortadan kaldıracak şekilde, homodimerlerin oluşumunun engellenebileceği ve Bcl-2 antiapoptotik yanıtının azalabileceğini düşündürür (Vitagliano ve ark., 2013).

Bizim çalışmamızda, HC uygulanan lenslerdeki Bcl-2 protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı azalışı ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da rölatif Bcl-2 mRNA ekspresyon ortalamasının daha düşük olması uyguladığımız HC'nin GR reseptörleri aracılığı ile MAPK yolunu modüle ederek lens hücrelerini apoptoza götürdüğü fikrini desteklemektedir.

p53 yukarı regüleli apoptoz modülatörü (PUMA), Bcl-2 ailesinin BH3-only alt grubunun üyesidir. Genotoksik stres, düzensiz onkogen ekspresyonu, toksinler, değişmiş redoks durumu, büyüme faktörü/sitokin çekilmesi ve enfeksiyon dahil olmak üzere çok çeşitli uyaranlarla indüklenen p53'e bağımlı ve bağımsız apoptozun kritik bir aracısıdır (Yu ve Zhang, 2009). Glukokortikoidler tarafından indüklenen p53'ten bağımsız apoptoz, hematopoietik ve nöronal hücrelerin dahil olduğu birkaç hücre tipinde PUMA'ya bağımlıdır (Jeffers ve ark., 2003; Villunger ve ark., 2003; Noguchi ve ark., 2008). PUMA, ölüm sinyallerini öncelikle mitokondriye iletir, burada antiapoptotik üyelerin dayattığı engellemeyi hafifleterek Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyeleri Bax ve/veya Bak üzerinde dolaylı olarak etki eder. PUMA, mitokondriyal işlev bozukluğunu ve kaspaz

aktivasyonuna aracılık ettiği bilinmektedir. GR ve NF- κ B, immün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde taban tabana zıt işlevlere sahip indüklenebilir transkripsiyon faktörleridir. GR, NF- κ B tarafından aktive edilen sitokinlerin ve sitokin kaynaklı genlerin çoğunun ekspresyonunu inhibe eder ve böylece bağışıklık ve iltihaplanma baskılayıcı işlev görür. NF- κ B'nin indüklediği genler GR'nin bastırdığı genlerle karşılaştırıldığında, NF- κ B ve GR'nin fizyolojik antagonistler olduğu ortaya çıkmaktadır (McKay ve Cidlowski, 1999).

GILZ'nin karboksi terminalinin, NF- κ B p65'in işlem alanını bağladığı, nükleer translokasyonunu önlediği ve böylece GILZ proteininin, çoklu hücresel işlemlerde NF- κ B'nin transkripsiyonel aktivitesini düzenleyebildiği gösterilmiştir (Di Marco ve ark., 2007; Srinivasan ve Janardhanam, 2011). Sonuç olarak, GC'ler GILZ'in ekspresyonunu yukarı regüle ederek ve böylece NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek iltihaplanma ve bağışıklık tepkilerini inhibe edebilir ve/veya proliferasyon ve hücre ölümünü modüle edebilir (Srinivasan ve Walker, 2022). Bizim  alışmamızda, HC uygulanan lenslerdeki NF- κ B protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı azalışı ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da rölatif NF- κ B mRNA ekspresyon ortalamasının daha düşük olması uyguladığımız HC'nin civciv embriyosuna ait lenslerde GILZ/DSIP aracılığı ile NF- κ B transkripsiyonunu modüle ettiğini ve lens hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini desteklemektedir.

P53 tümör baskılayıcı, DNA hasarı, hipoksi ve onkojen aktivasyonu gibi hücresel streslere yanıt olarak hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indükleyerek hücresel proliferasyonu sınırlar (Shen ve White, 2001).

GR'ler, hücreye özgü bir şekilde yalnızca apoptozu değil, aynı zamanda hayatta kalmayı destekleyebilen ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörü olarak karşımıza çıkar. Aziz ve ark. (2012), meme epitel hücrelerinde ve meme kanser hücrelerinde dex ile uyarılmışmış GR aktivasyonunun, PKC ekspresyonunu indükleyerek ve böylece P53'  inhibe ederek apoptozdan koruduğunu göstermişlerdir.

Sengupta ve ark. (2000), nöroblastoma hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada deksametazon ile aktive olan endojen ve eksojen GR'nin yol açtığı p53 sitoplazmik

sekestrasyonun sonucu olarak p53'ün transkripsiyonel aktivitesinin inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

Sengupta ve ark.'nın (2001), normal endotel hücreler üzerinde yaptığı bir diğer çalışma ve Zhang ve ark.'nın (2006), osteosarkoma hücre hattında yaptığı çalışmalar da GR ve p53 arasındaki karşılıklı inhibisyonun bazı hücre tiplerinde bazı özel durumlarda var olduğunu doğrulamaktadır.

Bizim çalışmamızda, HC uygulanan lenslerdeki P53 protein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı azalışı ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da rölatif P53 mRNA ortalamasının daha düşük olması GR ve P53 arasındaki karşılıklı inhibisyonu ve HC'nin lens hücrelerinde p53 seviyelerini azaltarak lens hücreleri apoptozdan koruduğunu desteklemektedir.

Bax'ın p53 tarafından düzenlenen bir yolda apoptozun indüklenmesi için yer alan birincil yanıt geni olduğu ve P53'ün, pro-apoptotik bir protein olan Bax'ın transkripsiyonunu doğrudan indükleyebildiği bilinmektedir (Toshiyuki ve Reed, 1995; Xu ve ark., 2019).

Deng ve ark. (2022), insan lens epitel hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada ve Nie ve ark. (2021), fare lens epitel hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada P53 transkripsiyon aktivitesinin Bax'ı yukarı regüle ettiğini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda HC uygulanan lenslerdeki rölatif Bax/Bcl2 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmasa da nispeten daha düşük olmasını HC uygulanan lenslerdeki BAX'ın doğrudan indükleyicisi olan p53'ün ekspresyon düzeylerinin azalmasına bağlayabiliriz.

Kültürlenmiş hücreleri kullanan Lacroix ve ark. (1984), ve Reiss ve ark. (1988), retinol ile tedavi edilen hücrelerde deksametazon bağlanmasında bir azalma olduğunu göstermiştir.

Audouin ve ark. (1993) sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada A vitamini eksikliği olan sıçanlarda kontrollere göre glukokortikoid reseptör bağlanmasının daha yüksek olduğunu ve retinoik asit takviyesi ile normale döndüğünü, ancak A vitamini aşırı yüklenmiş sıçanlardaki glukokortikoid bağlanmasının kontrollerden farklı olmadığını bildirmişlerdir.

Oshika ve ark. (1998), deksametazon tedavisinin erken embriyonik sıçan akciğerlerinin kültür ortamında, akciğer olgunlaşması, epitelyal farklılaşma ve büyüme ile ilgili genlerin morfolojisini ve ekspresyonu incelemişler; deksametazonun hem bozulmuş hem de hızlandırılmış olgunlaşmayı indüklediğini, retinoik asitin deksametazonun neden olduğu olumsuz etkileri ve hızlandırılmış olgunlaşmayı inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda A vitamininin düşük, orta ve yüksek dozları, HC ile indüklenmiş lenslerde azalan P53, NF- κ B, Bcl-2 protein düzeylerini normale döndürdü ve P53, NF- κ B, Bax/Bcl-2 mRNA ekspresyon ortalamalarını ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da normale yaklaştırdı. Sonuçlarımız civciv embriyolarına uyguladığımız vitamin A'nın tüm dozlarda GC-reseptör bağlanmasını baskılandığını ve lens hücrelerini GC'lerin olumsuz etkilerine karşı koruduğunu destekler.

VDR, çok çeşitli fizyolojik etkileri olan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. D vitamini doğrudan veya dolaylı olarak insan genomunun % 5'ini veya 900'den fazla farklı geni düzenler (Wang ve ark., 2005). Ek olarak VDR'nin neredeyse her yerde ifade edildiği bildirilmiştir (Bouillon ve ark., 2008). Son zamanlarda, D vitamini hidroksilazlarının (CYP27B1, CYP27A1, CYP2R1 ve CYP24A1) varlığı kornea epitelinde, endotelde, skleral fibroblastlarda, pigmentsiz siliyer cisim epitelinde ve yetişkin retinal pigment epitel hücre hatlarında gösterilmiş ve bu hücre türlerinin çoğunun 25(OH)D'yi fonksiyonel olarak aktif 1,25(OH)₂D'ye dönüştürebildiği bulunmuştur (Reins ve McDermott, 2015).

Albert ve ark. (2002), retinoblastoma hücre hattında yaptıkları çalışmada 16,23-D3 ve 1 α -OH-D2 analoglarının, azaltılmış toksisite ile tümörleri inhibe ettiğini, etki mekanizmasının, artmış apoptoz ile sonuçlanan p53 gen ekspresyonunun yukarı regülasyonu, Bax ve P21'in aktivasyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

1,25(OH)₂D'nin hidrojen peroksit ile muamele edilmiş retinal pigment epitel hücre hatları üzerindeki anti-sitotoksik, anti-apoptotik ve anti-genotoksik etkilerinin ve tedavi edilen hücre hatlarının mitokondriyal membran potansiyellerinin değerlendirildiği bir çalışma sonucunda Vitamin D3'ün, tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı anti-sitotoksik etkiler gösterdiğini, hücre canlılığını artırdığını, apoptozu ve DNA hasarını

azalttığını, ek olarak doza bağlı olarak D3 vitamininin mitokondriyal membran potansiyelini önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir (Ekinci ve ark., 2021).

Chen ve ark.'nın (2019) fareler üzerinde yaptıkları çalışma, 1,25(OH)2D3'ün, Nrf2'yi yukarı doğru düzenleyerek, oksidatif stresi ve DNA hasarını önleyerek, p53-p21 ve p16-Rb sinyal yollarını etkisiz hale getirerek ve hücre yaşlanmasını ve SASP'yi önleyerek yaşlanmayı geciktirmede rol oynadığını öne sürmektedir. Jiang ve ark. (2021), VDR'nin ligandı (aktif D vitamini veya Parikalsitol gibi agonisti) ile bağlandıktan sonra aktive olduğunu ve IκBa kinaz aktivitesini inhibe ederek NF-κB aktivitesini aşağı doğru düzenleyerek antiinflamatuvar etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada HC ile indüklenmiş lenslerde yüksek doz vitamin D'nin P53'ü yukarı regüle etmesi apoptozu deseklemektedir. Ek olarak yüksek doz vitamin D, NF-κB protein düzeylerini artırarak normal seviyelere yaklaştırmış; orta düzey D vitamini Bcl-2 protein düzeylerini normale yaklaştırırken yüksek doz D vitamini Bcl-2 protein düzeylerini normalin üzerine çıkarmıştır. NF-κB ve Bcl-2'nin yukarı regülasyonu ise vitamin D'nin hücreyi apoptozdan koruduğunu göstermektedir. Çalışmamızda hem antiapoptotik hem de proapoptotik belirteçlerin artışı vitamin D'nin GC'lerin olumsuz etkisini tersine çevirdiğini ve GC'lerin genomik etkilerinin karmakşıklığını orataya koymaktadır. Bahsi geçen çalışmalar ile çelişen sonuçlar elde etmemiz, hücreleri indükleyen faktörün, çalışılan hücre tipinin ve kullanılan vitamin D dozunun farklılıklar arzemesinden kaynaklı olabilir.

E vitaminin antioksidan rolünün dışında hücre çoğalmasının inhibisyonu, NADPH oksidaz aktivasyonu, çöpçü reseptör CD36'nın yukarı regülasyonu ve adezyon moleküllerinin aşağı regülasyonu gibi yeni fonksiyonları tespit edilmiştir (Landes ve ark., 2003).

E vitamini hücre sistemlerindeki diğer antioksidanlarla karşılaştırılmış, E vitamininin hücre proliferasyonunu engellemesinin, serbest radikalleri süpürme yeteneğinden kaynaklanmadığı sonucuna varılmıştır. İlgi çeken nokta ise E vitaminin, antioksidan olmayan bir mekanizma ile protein kinaz C'nin (PKC) negatif regülasyonuna yol açmasıdır. Ek olarak E vitamininin, PPARγ, NRF2, NFκB, RORα, Hif1α, ERβ ve PXR gibi transkripsiyon faktörlerini etkilediği bildirilmiştir (Khadangi ve Azzi, 2019).

PKC'nin negatif regülasyonu ile Bcl-2'nin baskılanması beklenmektedir. Bizim çalışmamızda ise vitamin E2, Bcl-2'yi yukarı regüle ederek lens hücrelerini apoptozdan korumaktadır. Bu çelişkinin uygulanan E vitamini formlarının ve hücre tipinin farklı olmasından kaynaklanması mümkündür.

Bir başka çalışmada oksidatif stres koşulları altındaki bir sıçan modelinde α T ve α T-fosfatın apoptoz üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. α T ve α T-fosfatın; Bcl-2 ve Akt'yi teşvik ederek, ve JNK, Notch-1 ve p38MAPK genlerini baskılayarak yüksek glukoz/hipoksi kaynaklı hücre apoptozunu zayıflattığını tespit etmişlerdir (Wu ve ark., 2018).

MAPK stres sinyal yollarının lens epitelinde ve HLE hücre hattında bulunduğu bilinmektedir (Li ve ark., 2003). İnsan lens epitel hücreleri üzerinde yapılan çalışmada ise Chitchumroonchokchai ve ark. (2004), sağlıklı insan lens epitel hücrelerinde JNK ve P38'in fosforile formlarına rastlamazken bu hücreleri UVB ile indüklerinde JNK ve P38'in belirgin şekilde fosforlandığını tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda kültürlerin UVB'ye maruz bırakmadan önce α T ile ön tedavisinin JNK aktivasyonunu % 50-60 oranında, P38 aktivasyonunu % 18 oranında bastırdığını göstermişlerdir. P38 ve JNK fosforile formlarının azalmasıyla proapoptotik faktörlerin azalması ve Bcl-2'nin artması ile hücre apoptozdan korunmaktadır (Morrison, 2012).

Yaptığımız çalışmada benzer şekilde vitamin E müdahalesinin doza bağlı olarak Bcl-2 seviyelerini yukarı regüle ettiğini ve lens hücrelerini apoptozdan koruduğunu görmekteyiz. Ek olarak HC ile indüklenmiş lenslerde orta doz E vitamini P53, Bcl-2 ve NF- κ B protein düzeylerini artırarak normal seviyelerin üzerine çıkarırken yüksek doz E vitamini HC grubuna kıyasla P53, Bcl-2 ve NF- κ B protein düzeylerini artırsa da etkisi orta doz E vitamini kıyasla daha azdır.

Çalışmamızda ELISA yöntemi ile protein analizleri istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar verirken mRNA ekspresyon düzeylerinin ortalamalarında değişiklikler olsa da istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermemesini denek sayımızın azlığına bağlamaktayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda dikkat çeken nokta lenslerin HC ile indüklenmesi sonucu hem antiapoptotik hem de proapoptotik belirteçlerin kontrol grubuna kıyasla protein düzeylerinin önemli derecede azalması ve mRNA ekspresyon düzey ortalamalarının azalmasıdır. Bu da glukokortikoidlerin etki mekanizlarının karmaşıklığını ortaya çıkarmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise A, D ve E vitaminlerinin doza bağlı olarak glukokortikoidlerin inhibe ettiği antiapoptotik ve proapoptotik belirteçlerin tamamını etkileyerek normal seviyeye çekmesidir. Burada A, D ve E vitaminlerinin GC'lerin olumsuz etkilerini zayıflatarak normale döndürdüğünü söyleyebiliriz; ancak bu etkilerin mekanizmasını net olarak açıklayabilmek için daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Steroidle indüklenmiş katarakt etiyopatogenezi belirsizliğini korumaktadır. SIC etiyopatogenezinde apoptozun rolünü anlayabilmek için ve antikatarojenik öğelerin koruyucu mekanizmasını ortaya çıkarabilmek için lens hücreleri üzerinde sinyal yollarının daha ayrıntılı biçimde incelenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Adcock, I.M., Mumby, S. (2017) 'Glucocorticoids'. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 237, pp.171–196.
- Al Tanoury, Z., Piskunov, A., Rochette-Egly, C. (2013) 'Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects: thematic review series: fat-soluble vitamins: vitamin A'. *Journal of lipid research*, 54(7), pp.1761-1775.
- Albert, D.M., Nickells, R.W., Gamm, D.M., Zimbric, M.L., Schlamp, C.L., Lindstrom, M.J. et al (2002) 'Vitamin D analogs, a new treatment for retinoblastoma: The first Ellsworth Lecture'. *Ophthalmic Genetics*, 23(3), pp.137–156.
- Asbell, P.A., Dualan, I., Mindel, J., Brocks, D., Ahmad, M., Epstein, S. (2005) 'Age-related cataract'. *Lancet (London, England)*, 365(9459), pp.599–609.
- Audouin-Chevallier, I., Higuieret, P., Pallet, V., Higuieret, D., Garcin, H. (1993) 'Dietary vitamin A modulates the properties of retinoic acid and glucocorticoid receptors in rat liver'. *The Journal of Nutrition*, 123(7), pp.1195–1202.
- Aziz, M.H., Shen, H., Maki, C.G. (2012) 'Glucocorticoid receptor activation inhibits p53-induced apoptosis of MCF10Amyc cells via induction of protein kinase C ϵ '. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(35), pp.29825–29836.
- Azzi, A., Gysin, R., Kempná, P., Munteanu, A., Negis, Y., Villacorta, L. et al (2004) 'Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression'. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1031, pp.86–95.
- Babizhayev, M.A., Zhukotskii, A.V., Sologub, A.A. (1992) 'Image analysis of the lens opacities induced in developing chick embryo by glucocorticoid'. *Experimental Eye Research*, 55(4), pp.521–537.
- Bastien, J., Rochette-Egly, C. (2004) 'Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes'. *Gene*, 328(1–2), pp.1–16.
- Beebe, D.C., Holekamp, N.M., Shui, Y.B. (2010) 'Oxidative Damage and the Prevention of Age-Related Cataracts'. *Ophthalmic Research*, 44(3), pp.155–165.
- Bikle, D.D. (2021) 'Vitamin D: Production, Metabolism and Mechanisms of Action'. Endotext [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278935/> (06.12.2022)
- Black, R.L., Oglesby, R.B., Von Sallmann, L., Bunim, J.J. (1960) 'Posterior subcapsular cataracts induced by corticosteroids in patients with rheumatoid arthritis'. *JAMA*, 174(2), pp.166–171.
- Blaner, W.S., Li, Y., Brun, P.J., Yuen, J.J., Lee, S.A., Clugston, R.D. (2016) 'Vitamin A Absorption, Storage and Mobilization'. *Sub-Cellular Biochemistry*, 81, pp. 95–125.
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., Van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H.F. et al (2008) 'Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice'. *Endocrine Reviews*, 29(6), pp.726–776.
- Cain, K., Bratton, S.B., Cohen, G.M. (2002) 'The Apaf-1 apoptosome: A large caspase-activating complex'. *Biochimie*, 84(2–3), pp.203–214.

- Carnahan, M.C., Goldstein, D.A. (2000) 'Ocular complications of topical, peri-ocular, and systemic corticosteroids'. *Current Opinion in Ophthalmology*, 11(6), pp.478–483.
- Chang, H.Y., Yang, X. (2000) 'Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp.821–846.
- Chasan-Taber, L., Willett, W.C., Seddon, J.M., Stampfer, M.J., Rosner, B., Colditz, G.A. et al (1999) 'A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women'. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(4), pp.509–516.
- Chen, L., Yang, R., Qiao, W., Zhang, W., Chen, J., Mao, L. et al. (2019) '1,25-Dihydroxyvitamin D exerts an antiaging role by activation of Nrf2-antioxidant signaling and inactivation of p16/p53-senescence signaling'. *Aging Cell*, 18(3).
- Chitchumroonchokchai, C., Bomser, J.A., Gamm, J.E., Failla, M.L. (2004) Xanthophylls and alpha-tocopherol decrease UVB-induced lipid peroxidation and stress signaling in human lens epithelial cells. *The Journal of Nutrition*, 134(12), pp.3225–3232.
- Choi, J.H., Lee, E., Heo, Y.R. (2020) 'The Association between Dietary Vitamin A and C Intakes and Cataract: Data from Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2012'. *Clinical Nutrition Research*, 9(3), pp.163.
- Christakos, S. (2008) 'Vitamin D Gene Regulation'. *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set*, 1, pp.779–794.
- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G. (2015) 'Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects'. *Physiological Reviews*, 96(1), pp.365–408.
- Cohen, G.M. (1997) 'Caspases: the executioners of apoptosis'. *Biochemical Journal*, 326(1), pp.1–16.
- Conaway, H.H., Henning, P., Lerner, U.H. (2013) 'Vitamin A Metabolism, Action, and Role in Skeletal Homeostasis'. *Endocrine Reviews*, 34(6), pp. 766–797.
- Cory, S., Adams, J.M. (2002) 'The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch'. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), pp.647–656.
- Coutinho, A.E., Chapman, K.E. (2011) The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1), pp.2–13.
- Cumming, R.G., Mitchell, P., Leeder, S.R. (1997) 'Use of inhaled corticosteroids and the risk of cataracts'. *The New England Journal of Medicine*, 337(1), pp.8-14.
- Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., Häussler, U. (2005) 'Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids'. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(1), pp.61–98.
- Czuba, L.C., Zhong, G., Yabut, K.C., Isoherranen, N. (2020) 'Analysis of vitamin A and retinoids in biological matrices'. *Methods in Enzymology*, 637, pp.309–340.
- D'Arcy, M.S. (2019) 'Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy'. *Cell Biology International*, 43(6), pp.582–592.
- Davis, G. (2016) 'The Evolution of Cataract Surgery'. *Missouri Medicine*, 113(1), pp.58.

- Dawson, M. (2005). The Importance of Vitamin A in Nutrition. *Current Pharmaceutical Design*, 6(3), pp.311–325.
- Deng, Y., Shi, Y., Wen, C. (2022) ‘TRIM3 Inhibits H₂O₂-Induced Apoptosis in Human Lens Epithelial Cells by Decreasing p53 via Ubiquitination’. *Current Eye Research*, 47(5), pp.747-752.
- Derby, L., Maier, W.C. (2000) ‘Risk of cataract among users of intranasal corticosteroids’. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(5), pp.912–916.
- Dewett, D., Lam-Kamath, K., Poupault, C., Khurana, H., Rister, J. (2021) ‘Mechanisms of vitamin A metabolism and deficiency in the mammalian and fly visual system’. *Developmental Biology*, 476, pp.68–78.
- Di Marco, B., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Di Virgilio, R., Velardi, E. et al (2007) ‘Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain’. *Nucleic Acids Research*, 35(2), pp.517-528.
- Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. (2000). Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25077263/> (10.12.2022).
- Duman, R., Ertekin, T., Duman, R., Vurmaz, A., Çetinkaya, E., Güzel, H. (2019) ‘Anticataractogenic effect of betaine in chick embryo hydrocortisone-induced cataract model’. *Indian Journal of Medical Research*, 150(4), pp.407-411.
- Ekinci, C., Guler, E.M., Kocyigit, A., Kirik, F., Ozdemir, H. (2021) ‘Effects of 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ on Human Retinal Pigment Epithelial Cell Lines’. *International Ophthalmology*, 41(10), pp.3333–3340.
- Elmore, S. (2007) ‘Apoptosis: a review of programmed cell death’. *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp.495-516.
- Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L. et al (2005) ‘BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo’. *Blood*, 106(13), pp.4131–4138.
- Fleisher, T.A. (1997) ‘Apoptosis’. *Annals of Allergy, Asthma*, 78(3), pp.245–250.
- Francis, P.J., Moore, A.T. (2004) ‘Genetics of childhood cataract. *Current Opinion in Ophthalmology*, 15(1), pp.10-15.
- Garbe, E., Suissa, S., Leloir, J. (1998) ‘Association of inhaled corticosteroid use with cataract extraction in elderly patients’. *JAMA*, 280(6), pp.539–543.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C., Gronemeyer, H. (2002) ‘Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy’. *Nature*, 415(6868), pp.187–192.
- Griffioen, A.W., Nowak-Sliwinska, P. (2021) ‘A quarter century of Apoptosis’. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 26(5–6), pp.233–234.
- Gupta, V., Wagner, B.J. (2003) ‘Expression of the functional glucocorticoid receptor in mouse and human lens epithelial cells’. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(5), pp.2041-2046.

- Gupta, V., Wagner, B. J. (2009) 'Search for a functional glucocorticoid receptor in the mammalian lens'. *Experimental Eye Research*, 88(2), pp.248-256.
- Gupta, V., Awasthi, N., Wagner, B.J. (2007) 'Specific activation of the glucocorticoid receptor and modulation of signal transduction pathways in human lens epithelial cells'. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(4), pp.1724-1734.
- Gupta, V., Galante, A., Soteropoulos, P., Guo, S., Wagner, B.J. (2005). 'Global gene profiling reveals novel glucocorticoid induced changes in gene expression of human lens epithelial cells'. *Molecular Vision*, 11, pp.1018-1040.
- Haeseleer, F., Jang, G. F., Imanishi, Y., Driessen, C.A.G.G., Matsumura, M., Nelson, P.S. et al (2002) 'Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina'. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), pp.45537-45546.
- Haussler, M.R., Jurutka, P.W., Mizwicki, M., Norman, A.W. (2011) 'Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms'. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(4), pp.543-559.
- Ingraham, B.A., Bragdon, B., Nohe, A. (2008) 'Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer'. *Current Medical Research and Opinion*, 24(1), pp.139-149.
- Ishikawa, S., Hashizume, K., Nishigori, H., Tezuka, Y., Sanbe, A., Kurosaka, D. (2015) 'Effect of astaxanthin on cataract formation induced by glucocorticoids in the chick embryo'. *Current Eye Research*, 40(5), pp.535-540.
- James, E.R. (2007) 'The etiology of steroid cataract'. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 23(5), pp.403-420.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J.L., Brennan, J. et al (2003) 'Puma is an essential mediator of p53-dependent and independent apoptotic pathways'. *Cancer Cell*, 4(4), pp.321-328.
- Jiang, M., Qi, L., Li, L., Li, Y. (2020) 'The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer'. *Cell Death Discovery*, 28(6):112, pp.1-11.
- Jiang, Q. (2022) 'Metabolism of natural forms of vitamin E and biological actions of vitamin E metabolites'. *Free Radical Biology & Medicine*, 1(179), pp.375-387.
- Jiang, S., Zhang, H., Li, X., Yi, B., Huang, L., Hu, Z. et al (2021) 'Vitamin D/VDR attenuate cisplatin-induced AKI by down-regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 206:105789.
- Jick, S.L., Beardsley, T.L., Brasington, C.R., Buznego, C., Grostern, R.J., Parl, L. et al.(2019). ed. San Francisco: *American Academy of Ophthalmology*; 2019(92), pp.207-210.
- Jones, G., Strugnell, S.A., DeLuca, H.F. (1998) 'Current understanding of the molecular actions of vitamin D'. *Physiological Reviews*, 78(4), pp.1193-1231.
- Jun, G., Guo, H., Klein, B.E.K., Klein, R., Jie, J.W., Mitchell, P. et al. (2009) 'EPHA2 Is Associated with Age-Related Cortical Cataract in Mice and Humans'. *PLOS Genetics*, 5(7), e1000584.

- Kaya, H. (2020) 'Deney Hayvanlarında Katarakt Ve Retinopati Modelleri'. *Klinik Bilimlerde Deney Hayvanı Modelleri*. Ankara: Özyurt matbaacılık. pp.411-416.
- Kelly, M.E., Ramkumar, S., Sun, W., Colon Ortiz, C., Kiser, P.D., Golczak, M., et al. (2018) 'The Biochemical Basis of Vitamin A Production from the Asymmetric Carotenoid β -Cryptoxanthin'. *ACS Chemical Biology*, 13(8), pp.2121-2129.
- Kessel, L. (2011) 'Can we meet the future demands for cataract surgery?' *Acta Ophthalmologica*, 89(3), pp.289-290.
- Khadangi, F., Azzi, A. (2019) 'Vitamin E- The Next 100 Years'. *IUBMB Life*, 71(4), pp.411-415.
- Khokhar, S., Pillay, G., Dhull, C., Agarwal, E., Mahabir, M., Aggarwal, P. (2017) 'Pediatric cataract'. *Indian Journal of Ophthalmology*, 65(12), pp.1340-1349.
- King, K.L., Cidlowski, J.A. (2003) 'Cell Cycle Regulation And Apoptosis¹'. *Annual Review of Physiology*, 60, pp.601-617.
- Kosano, H., Nishigori, H. (2002) 'Steroid-induced cataract: other than in the whole animal system, in the lens culture system, androgens, estrogens and progestins as well as glucocorticoids produce a loss of transparency of the lens'. *Developments in Ophthalmology*, 35, pp.161-168.
- Lacroix, A., Bonnard, G.D., Lippman, M.E. (1984). 'Modulation of glucocorticoid receptors by mitogenic stimuli, glucocorticoids and retinoids in normal human cultured T cells'. *Journal of Steroid Biochemistry*, 21(1), pp.73-80.
- Lam, D., Rao, S.K., Ratra, V., Liu, Y., Mitchell, P., King, J. et al. (2015) 'Cataract'. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), pp.1-15.
- Landes, N., Pfluger, P., Kluth, D., Birringer, M., Rühl, R., Böhl, G.F. et al. (2003) 'Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor'. *Biochemical Pharmacology*, 65(2), pp.269-273.
- Larange, A., Cheroutre, H. (2016) 'Retinoic Acid and Retinoic Acid Receptors as Pleiotropic Modulators of the Immune System'. *Annual review of immunology*, 34, pp.369-394.
- Lee, C.M., Afshari, N.A. (2017) 'The global state of cataract blindness'. *Current Opinion in Ophthalmology*, 28(1), pp.98-103.
- Lee, J.W., Iwatsuru, M., Nishigori, H. (1991) 'Preventive effect of isocitrate on glucocorticoid-induced cataract formation of developing chick embryo'. *Current Eye Research*, 10(7), pp.629-635.
- Lee, J.W., Iwatsuru, M., Nishigori, H. (1995) 'Glucocorticoid-induced cataract of developing chick embryo as a screening model for anticataract agents'. *The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 11(4), pp.533-541.
- Li, D.W.C., Liu, J.P., Wang, J., Mao, Y.W., Hou, L.H. (2003). 'Expression and activity of the signaling molecules for mitogen-activated protein kinase pathways in human, bovine, and rat lenses'. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(12), pp.5277-5286.

- Liu, Y.C., Wilkins, M., Kim, T., Malyugin, B., Mehta, J.S. (2017) 'Cataracts'. *The Lancet*, 390(10094), pp.600-612.
- Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J. (2005) 'Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis'. *Immunity*, 22(3), pp.355-370.
- McKay, L.I., Cidlowski, J.A. (1999) 'Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways'. *Endocrine Reviews*, 20(4), pp.435-459.
- Miyazawa, T., Burdeos, G.C., Itaya, M., Nakagawa, K., Miyazawa, T. (2019) 'Vitamin E: regulatory redox interactions'. *IUBMB life*, 71(4), pp.430-441.
- Mizuno, A., Nishigori, H., Iwotsuruf, M. (1989) 'Glucocorticoid-induced cataract in chick embryo monitored by Raman spectroscopy'. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 30(1), pp.132-137.
- Morrison, D.K. (2012) 'MAP Kinase Pathways'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1;4(11):a011254.
- Mustacich, D.J., Bruno, R.S., Traber, M.G. (2007) Vitamin E. *Vitamins and Hormones*, 76, pp.1-21.
- Nie, Q., Chen, H., Zou, M., Wang, L., Hou, M., Xiang, J.W. et al. (2021) 'The E3 Ligase PIAS1 Regulates p53 Sumoylation to Control Stress-Induced Apoptosis of Lens Epithelial Cells Through the Proapoptotic Regulator Bax'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 14(9):660494.
- Nishigori, H., Hayashi, R., Lee, J. W., Maruyama, K., Iwatsuru, M. (1985). 'Preventive effect of ascorbic acid against glucocorticoid-induced cataract formation of developing chick embryos'. *Experimental Eye Research*, 40(3), pp.445-451.
- Nishigori, H., Iwatsuru, M., Hikida, M. (1988). 'Pigmentation of glucocorticoid-induced cataractous lenses of developing chick embryos on heating'. *Current Eye Research*, 7(10), pp.989-993.
- Nishigori, H., Kosano, H., Umeda, I.O., Nishigori, H. (2004) 'Inhibition of glucocorticoid-induced cataracts in chick embryos by RU486: a model for studies on the role of glucocorticoids in development'. *Life Sciences*, 75(25), pp.3027-3033.
- Nishigori, H., Lee, J.W., Yamauchi, Y., Iwatsuru, M. (1986) 'The alteration of lipid peroxide in glucocorticoid-induced cataract of developing chick embryos and the effect of ascorbic acid'. *Current Eye Research*, 5(1), pp.37-40.
- Nizami, A.A., Gulani, A.C. (2022) Cataract. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539699/> (01.01.2023)
- Noguchi, K.K., Walls, K.C., Wozniak, D.F., Olney, J.W., Roth, K.A., Farber, N.B. (2008) 'Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death'. *Cell Death & Differentiation*, 15(10), pp.1582-1592.
- Ogiso, M., Hoshi, M., Nishigori, H. (1999) 'Neutral and acidic glycosphingolipids in glucocorticoid-induced cataract in chick lens'. *Experimental Eye Research*, 68(2), pp.229-236.

- Omdahl, J. L., Bobrovnikova, E. V, Annalora, A., Chen, P., Serda, R. (2003) 'Expression, Structure-Function, and Molecular Modeling of Vitamin D P450s'. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88, pp.356–362.
- Omdahl, J.L., Morris, H.A., May, B.K. (2002) 'Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation'. *Annual Review of Nutrition*, 22, pp.139-166.
- Oray, M., Abu Samra, K., Ebrahimiadib, N., Meese, H., Foster, C.S. (2016). 'Long-term side effects of glucocorticoids'. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(4), pp.457-465.
- Oshika, E., Liu, S., Singh, G., Michalopoulos, G.K., Shinozuka, H., Katyal, S.L. (1998) 'Antagonistic effects of dexamethasone and retinoic acid on rat lung morphogenesis'. *Pediatric Research*, 43(3), pp.315-324.
- Periyasamy, P., Shinohara, T. (2017) 'Age-Related Cataracts: Role of unfolded protein response, Ca²⁺ mobilization, epigenetic DNA modifications, and loss of Nrf2/Keap1 dependent cytoprotection'. *Progress in Retinal and Eye Research*, 60, pp.1-19.
- Polcz, M.E., Barbul, A. (2019) 'The Role of Vitamin A in Wound Healing'. *Nutrition in Clinical Practice*, 34(5), pp.695-700.
- Poon, M.M., Chen, L. (2008a) 'Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RARalpha'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), pp.20303-20308.
- Prokofyeva, E., Wegener, A., Zrenner, E. (2013). 'Cataract prevalence and prevention in Europe: a literature review'. *Acta Ophthalmologica*, 91(5), pp.395-405.
- Quillen, D.A. (1999) 'Common causes of vision loss in elderly patients'. *American family physician*, 60(1), pp.99-108.
- Reins, R.Y., McDermott, A.M. (2015) 'Vitamin D: Implications for ocular disease and therapeutic potential'. *Experimental Eye Research*, 134, pp.101-110.
- Reiss, M., Dibble, C.L., Sartorelli, A.C. (1988) 'Down-regulation of glucocorticoid binding sites by retinoic acid in squamous carcinoma cells resistant to the induction of keratinization by hydrocortisone'. *The Journal of Investigative Dermatology*, 91(4), pp.344-348.
- Rigotti, A. (2007) 'Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E'. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5–6), pp.423-436.
- Rimbach, G., Moehring, J., Huebbe, P., Lodge, J.K. (2010) 'Gene-Regulatory Activity of α -Tocopherol'. *Molecules*, 12;15(3), pp.1746-1761.
- Ruiz-Irastorza, G., Danza, A., Khamashta, M. (2012) 'Glucocorticoid use and abuse in SLE'. *Rheumatology*, 51(7), pp.1145-1153.
- Saag, K.G., Koehnke, R., Caldwell, J.R., Brasington, R., Burmeister, L.F., Zimmerman, B. et al (1994). 'Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events'. *The American Journal of Medicine*, 96(2), pp.115-123.
- Saari, J.C. (2016) 'Vitamin A and Vision'. *Sub-Cellular Biochemistry*, 81, pp.231-259.

- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., Van Gurp, M., Van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004) 'Toxic proteins released from mitochondria in cell death'. *Oncogene*, 23(16), pp.2861-2874.
- Schuler, M., Green, D.R. (2001) 'Mechanisms of p53-dependent apoptosis'. *Biochemical Society Transactions*, 29(6), pp.684-688.
- Sengupta, S., Vonesch, J.L., Waltzinger, C., Zheng, H., Wasylyk, B. (2000) 'Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells'. *The EMBO Journal*, 15;19(22), pp.6051-6064.
- Sengupta, S., Wasylyk, B. (2001) 'Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2'. *Genes & Development*, 15;15(18), pp.2367-2380.
- Setogawa, T., Kosano, H., Ogihara-Umeda, Z., Kayanuma, T., Nishigori, H. (1994) 'Preventive Effect of SA3443, a Novel Cyclic Disulfide, on Glucocorticoid-induced Cataract Formation of Developing Chick Embryo'. *Experimental Eye Research*, 58(6), pp.689-695.
- Shen, Y., White, E. (2001) 'p53-dependent apoptosis pathways'. *Advances in Cancer Research*, 82, pp.55-84.
- Siddikuzzaman, Guruvayoorappan, C., Berlin Grace, V.M. (2011). 'All trans retinoic acid and cancer'. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 33(2), pp.241-249.
- Simons, F.E.R., Persaud, M.P., Gillespie, C.A., Cheang, M., Shuckett, E.P. (1993) 'Absence of posterior subcapsular cataracts in young patients treated with inhaled glucocorticoids'. *The Lancet*, 342(8874), pp.776-778.
- Spies, C.M., Strehl, C., Van Der Goes, M.C., Bijlsma, J.W.J., Buttgerit, F. (2011) 'Glucocorticoids'. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 25(6), pp.891-900.
- Srinivasan, M., Janardhanam, S. (2011) 'Novel p65 Binding Glucocorticoid-induced Leucine Zipper Peptide Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis'. *The Journal of Biological Chemistry*, 30;286(52), pp.44799-44810.
- Srinivasan, M., Walker, C. (2022). 'Circadian Clock, Glucocorticoids and NF-κB Signaling in Neuroinflammation- Implicating Glucocorticoid Induced Leucine Zipper as a Molecular Link'. *ASN NEURO*, 14:17590914221120190.
- Stahn, C., Buttgerit, F. (2008) 'Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids'. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 4(10), pp.525-533.
- Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D.W., Buttgerit, F. (2007) 'Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists'. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1-2), pp.71-78.
- Strehl, C., Spies, C.M., Buttgerit, F. (2011) 'Pharmacodynamics of glucocorticoids'. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 29(5 Suppl 68), pp.13-18.
- Suzuki, M., Tomita, M. (2022) 'Genetic variations of vitamin A-absorption and storage-related genes, and their potential contribution to vitamin A deficiency risks among different ethnic groups'. *Frontiers in Nutrition*, 28;9:861619.
- Takamura, Y., Kubo, E., Tsuzuki, S., Akagi, Y. (2003) 'Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract'. *Experimental Eye Research*, 77(1), pp.51-57.

- Thompson, J., Lakhani, N. (2015). 'Cataracts'. *Primary Care*, 42(3), pp.409-423.
- Toshiyuki, M., Reed, J.C. (1995) 'Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene'. *Cell*, 80(2), pp.293-299.
- Traber, M.G. (2007) 'Vitamin E regulatory mechanisms'. *Annual Reviews Nutrition*, 27, pp.347-362.
- Tuj Johra, F., Kumar Bepari, A., Tabassum Bristy, A., Mahmud Reza, H. (2020) 'A mechanistic review of β -carotene, lutein, and zeaxanthin in eye health and disease'. *Antioxidants*, 26;9(11):1046.
- Uga, S., Nishigori, H., Ishikawa, S. (1994) 'Morphological study on glucocorticoid-induced cataract in developing chick embryo'. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 232(7), pp.415-420.
- Vasavada, A.R., Nihalani, B.R. (2006) 'Pediatric cataract surgery'. *Current Opinion in Ophthalmology*, 17(1), pp.54-61.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M. J. et al. (2003) 'p53-and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa'. *Science*, 302(5647), pp.1036-1038.
- Vitagliano, O., Addeo, R., D'Angelo, V., Indolfi, C., Indolfi, P., Casale, F. (2013) 'The Bcl-2/Bax and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways: implications in pediatric leukemia pathogenesis and new prospects for therapeutic approaches'. *Expert Review of Hematology*, 6(5), pp.587-597.
- Von Lintig, J. (2010) 'Colors with functions: elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism'. *Annual Review Of Nutrition*, 30, pp.35-56.
- Von Lintig, J. (2012) 'Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology'. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(5), pp.1234-1244.
- Wang, P., Qiu, W., Dudgeon, C., Liu, H., Huang, C., Zambetti, G.P. et al. (2009) 'PUMA is directly activated by NF- κ B and contributes to TNF- α -induced apoptosis'. *Cell Death & Differentiation*, 16(9), pp.1192-1202.
- Wang, T.T., Tavera-Mendoza, L.E., Laperriere, D., Libby, E., MacLeod, N.B., Nagai, Y. (2005) 'Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes'. *Molecular Endocrinology*, 19(11), pp.2685-2695.
- World Health Organization. (2019). World report on vision.
- Wu, J.H., Croft, K.D. (2007) 'Vitamin E metabolism'. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5-6), pp.437-452.
- Wu, Z., Zheng, X., Meng, L., Fang, X., He, Y., Li, D., et al. (2018) ' α -Tocopherol, especially α -tocopherol phosphate, exerts antiapoptotic and angiogenic effects on rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells under high-glucose and hypoxia conditions'. *Journal of Vascular Surgery*, 67(4), pp.1263-1273.
- Xu, X., Lai, Y., Hua, Z.C. (2019) 'Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials'. *Bioscience Reports*, 18;39(1):BSR20180992.
- Yamaoka, K., Shindo, M., Iwasaki, K., Yamaoka, I., Yamamoto, Y., Kitagawa, H. et al. (2007) 'Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR'. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 15;460(2), pp.166-171.

- Yanumula, A., Cusick, J.K. (2022) 'Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis'. *StatPearls*. <https://www.statpearls.com/point-of-care/108928> (05.03.2023)
- Yu, J., Zhang, L. (2009) 'PUMA, a potent killer with or without p53'. *Oncogene*, 27(1), pp.71-83.
- Zhang, L., Nie, L., Maki, C.G. (2006) 'P53 and p73 differ in their ability to inhibit glucocorticoid receptor (GR) transcriptional activity'. *Molecular Cancer*, 5(68), pp.1-18.
- Zingg, J.M. (2015) 'Vitamin E: A Role in Signal Transduction'. *Annual Review of Nutrition*, 35(1), pp.135-173.
- Zonana-Nacach, A., Barr, S.G., Magder, L.S., Petri, M. (2000) 'Damage In Systemic Lupus Erythematosus And Its Association With Corticosteroids'. *Arthritis & Rheumatism*, 43(8), pp.1801–1808.

