

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Anatomi Anabilim Dalı

CİVCİV EMBRİYOLARINDA OLUŞTURULAN
DENEYSEL KATARAKT MODELİNDE CHRYSİN'İN
ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Gölan ALBAŞ KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Tolga ERTEKİN

**Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 20.LİS.001 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

2022-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: Gülan ALBAŞ KURT

İmza:

Danışmanın

Adı Soyadı: Prof. Dr. Tolga ERTEKİN

İmza:

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Tolga ERTEKİN danışmanlığında Gülan ALBAŞ KURT tarafından hazırlanan **“Civciv Embriyolarında Oluşturulan Deneysel Katarakt Modelinde Chrysin’in Antioksidan Etkisinin Araştırılması”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

23 / 06 / 2022

JÜRİ:

Başkan: Prof. Dr. İsmail TÜRKMENOĞLU

(Afyon Kocatepe Üniversitesi)

.....

Üye : Prof. Dr. Tolga ERTEKİN

(Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

.....

Üye : Doç. Dr. Emre ATAY

(Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

.....

ONAY:

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

..... / /

Prof. Dr. Özal ÖZCAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin oluşumunda ve yazılmasında olduğu kadar eğitimimin her aşamasında bana destek veren, engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, çıktığım akademisyenlik yolculuğumda her zaman daha iyi olmam için elinden geleni yapan, hoşgörülü, sabırlı ve babacan hocam sayın Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Tolga Ertekin'e, Anatomi Anabilim Dalı'nda geçirdiğim süre boyunca hem yüksek lisans eğitim hem de asistanlık sürecinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yetişmemde büyük emekleri olan Anatomi Anabilim Dalı değerli hocaları sayın Doç. Dr. Esra KOYUNCU, Doç. Dr. Emre ATAY ve Dr. Öğr. Üyesi Abdülkadir BİLİR'e,

Yüksek lisans eğitimim ve asistanlık hayatımda kendisinden birçok tecrübe edindiğim, farklı bakış açılarından etkilendiğim saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ozan TURAMANLAR'A

Yüksek lisans eğitimi ve asistanlık sürecinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşım Arş. Gör. Alperen SARITAŞ'a, pozitifliğiyle moral kaynağı olan kıymetli yüksek lisans arkadaşım Orhan ŞENKAL'a ve yoğun olduğumuz dönemlerde çalışkanlık ve özverileriyle desteklerini esirgemeyen diğer yüksek lisans arkadaşlarıma, Tezin deneysel aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Halit Buğra Koca ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Öğr. Gör. Dr. Esra ASLAN'a,

Tezimin hazırlanmasındaki desteğinden dolayı AFSÜ BAP Birimi'ne

Bugünlere gelmem için fedakârlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen, maddi manevi üzerimde büyük emekleri olan sevgili annem Hanife ALBAŞ ve kahraman babam Halil ALBAŞ'a, iyi ki varlar dediğim ablam ve kardeşlerime ve ikinci ailem olarak hep yanımda olan, desteklerini esirgemeyen KURT ailesine,

Üniversiteye başladığım yıllardan bugüne kadar her zaman yanımda olan, bundan sonra da hep yanımda olacağını bildiğim en büyük destekçim, hayat arkadaşım Alper Emre KURT'a, son olarak da geldiği gün hayata bakış açımı değiştiren her şeyim, biricik oğlum Yiğit KURT'a teşekkürlerimle.

Gülan ALBAŞ KURT
Afyonkarahisar, Haziran 2022

CİVCİV EMBRİYOLARINDA OLUŞTURULAN DENEYSEL KATARAKT MODELİNDE CHRYSİN'İN ANTIÖKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Gölan ALBAŞ KURT

**Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi**

Haziran 2022

Danışman: Prof. Dr. Tolga ERTEKİN

ÖZET

Lens'in opaklaşması sonucu oluşan katarakt, görme kaybının en yaygın nedenlerinden biridir. Literatürde reaktif oksijen türlerinin ve oksidan düzeylerinin artmasına bağlı olarak antioksidan sistemin bozulması, katarakt oluşumunun sebepleri arasında gösterilmektedir. Uzun süreli steroid kullanımının komplikasyonlarında biri de katarakt oluşumudur. Doğal bir flavonoid olan chrysin antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Bu veriler göz önüne alındığında araştırmamızın amacı, deneysel civciv embriyo modelinde steroid kaynaklı katarakt gelişimi üzerine chrysin'in antioksidan etkisini belirlemektir.

Çalışma kapsamında 150 adet spesifik patojen free (SPF) döllenmiş yumurta kullanıldı. Yumurtalar; kontrol grubu, mısır yağı grubu, hidrokortizon hemisüksinat sodyum (HC) grubu, düşük (0.1 ml HC ve 25 mg/kg chrysin), orta (0.1 ml HC ve 50 mg/kg chrysin) ve yüksek doz (0.1 ml HC ve 100 mg/kg chrysin) chrysin verilen olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Chrysin ve HC uygulamaları inkübasyonunun 15. gününde insülin enjektörü kullanılarak hava kesesine yapıldı. 17. günde, civciv embriyoları yumurtalardan çıkarıldı ve embriyoların bulbus oculi'leri diseke edildi. Her grupta; Katarakt derecelendirmesi için 9 embriyo, glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), toplam antioksidan düzeyi (TAS), toplam oksidan düzeyi (TOS), kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeylerinin biyokimyasal analizi için 8 embriyo ve histolojik değerlendirme için 7 embriyo (TUNEL yöntemi) kullanıldı. Kontrol grubunda yer alan hiçbir lenste opaklık gözlemlenmedi. Sadece HC uygulanan grupta tüm lenslerde katarakt gözlemlendi ve lenslerin ortalama katarakt derecesi 3.5 olarak hesaplandı. Ortalama opaklık dereceleri HC+chrysin gruplarında düşük dozdan yüksek doza doğru sırasıyla 3.1, 2.3 ve 1.5 olarak belirlendi ve yüksek doz chrysin grubu ile HC grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Lenslerde HC uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalan ($p<0.05$) GSH ve TAS düzeyleri chrysin'in uygulama dozuyla doğru orantılı olarak artarken ($p<0.05$), HC grubunda düzeyleri artan MDA, TOS, kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri chrysin dozu ile ters orantılı olarak anlamlı düzeyde azaldı ($p<0.05$). Ayrıca TUNEL yöntemi ile belirlenen apoptotik hücre oranı gruplar arasında karşılaştırıldığında; sadece HC uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekken ($p<0.05$), chrysin gruplarında doz oranı ile ters orantılı şekilde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı ($p<0.05$).

Bu bulgular chrysin'in katarakt oluşumunu önleyen potansiyel bir antioksidan ajan olarak gösterilmesi açısından önemlidir. Çalışmamızın ileride yapılacak benzer çalışmalara referans teşkil edebileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Chrysin, Göz, Katarakt, Lens, Steroid

INVESTIGATION OF CHRYSIN'S ANTIOXIDANT EFFECT IN EXPERIMENTAL CATARACT MODEL CREATED IN CHICK EMBRYOS

Gölan ALBAŞ KURT

Afyonkarahisar Health Sciences University Graduate Education Institute,
Department of Anatomy, Master's Thesis

June 2022

Supervisor: Prof. Dr. Tolga ERTEKİN

ABSTRACT

Cataract, which is the result of opacification of the lens, is one of the most common causes of vision loss. In the literature, deterioration of the antioxidant system due to the increase in reactive oxygen species and oxidant levels is shown among the causes of cataract formation. One of the complications of long-term steroid use is the formation of cataracts. Chrysin, a natural flavonoid, has various properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer. Considering these data, the aim of our study is to determine the antioxidant effect of chrysin in a steroid-induced cataract formation in experimental chick embryo model.

Within the scope of the study, 150 specific pathogen free (SPF) fertilized eggs were used. Eggs divided into 6 groups as control group, corn oil group, HC group, low (0.1 ml HC and 25 mg/kg chrysin), medium (0.1 ml HC and 50 mg/kg chrysin) and high dose (0.1 ml HC and 100 mg/kg chrysin) chrysin. Chrysin and HC applications were made in to the air sac using an insulin injector on the 15th day of incubation. On day 17, all chick embryos were removed from the eggs and the bulbus oculi of the embryos were dissected. In each group; 9 embryos for cataract grading, 8 embryos for biochemical analysis of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), total antioxidant level (TAS), total oxidant level (TOS), caspase 3 and caspase 9 levels, and 7 embryo for histological evaluation (TUNEL method) was used.

Opacity was not observed in any lens in the control group. In the HC group only, cataracts were detected in all of the lenses, and the mean cataract grade was calculated as 3.5. The mean opacity grades were determined as 3.1, 2.3 and 1.5 in the HC+chrysin groups from low dose to high dose, respectively, and the difference between high dose chrysin group and HC group was statistically significant ($p<0.05$). GSH and TAS levels, which statistically decreased significantly ($p<0.05$) in the lenses compared to the control group due to HC application, increased in direct proportion to the application dose of chrysin ($p<0.05$). The increased levels of MDA, TOS, caspase 3 and caspase 9 in the HC group decreased significantly inversely with the chrysin dose ($p<0.05$). In addition, when the rate of apoptotic cells determined by the TUNEL method was compared between the groups; while it was statistically significantly higher in the HC administered group than in the control group ($p<0.05$), it was statistically significantly decreased in chrysin groups, inversely proportional to the dose rate ($p<0.05$).

These findings are important in terms of demonstrating chrysin as a potential antioxidant agent that prevents cataract formation. We consider that our study may serve as a reference for similar studies to be conducted in future.

Keywords: Cataract, Chrysin, Eye, Lens, Steroid

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
GRAFİKLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Göz Embriyolojisi	3
2.1.1. Retina Gelişimi	4
2.1.2. Nervus Opticus Gelişimi.....	4
2.1.3. Lens Gelişimi	5
2.2. Gözün Anatomisi.....	5
2.2.1. Bulbus Oculi	5
2.2.2. Gözde Işığı Kırın Yapılar	12
2.3. Lens Histolojisi.....	15
2.3.1. Lens Epiteli	15
2.3.2. Lens Kapsülü	15
2.3.3. Lens Fibrilleri	16
2.4. Katarakt	17
2.4.1. Tarihçe	17

2.4.2. Katarakt Etiyolojisi	17
2.4.3. Katarakt Sınıflandırması	18
2.5. Cıvciv Embriyo Modeli	23
2.5.1. Tarihçe	23
2.5.2. Cıvciv Embriyosu Gelişimi	24
2.5.3. Cıvciv Embriyosu Göz Gelişimi	25
2.5.4. Hamburger ve Hamilton Evrelerinde Göz Gelişimi	27
2.6. Kuluçka Koşulları	31
2.6.1. Sıcaklık	31
2.6.2. Nem	32
2.6.3. Havalandırma	32
2.6.4. Çevirme (Rotasyon)	32
2.7. Cıvciv Embriyosu ile Çalışmanın Avantajları	33
2.8. Cıvciv Embriyo Modelinde Steroid Kaynaklı Katarakt Oluşumu	34
2.9. Flavonoidler	35
2.10. Chrysin	37
2.10.1. Chrysin'in Yapısı	38
2.10.2. Chrysin'in Etki Mekanizması	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Deney Hayvanları	42
3.2. Laboratuvar Koşulları	43
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	43
3.4. Deney Aşamaları	46
3.4.1. Cıvciv Embriolarına HC ve Antioksidan Madde (Chrysin) Enjeksiyonu ...	46
3.4.2. Cıvciv Embriolarının Elde Edilmesi ve İncelenmesi	47
3.4.3. Katarakt Derecelendirmesinin Yapılması	49
3.5. Biyokimyasal Analiz	50
3.5.1. Lens Homojenatının Hazırlanması	50
3.5.2. Ölçümler	51
3.6. Histolojik Doku Takibi	51
3.6.1. Tunel Boyama	52
3.6.2. Histolojik Görüntü Analizi	53
3.7. İstatistiksel Analiz	53

4. BULGULAR.....	54
4.1. Katarakt Derecelerine Ait Bulgular.....	54
4.2. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular	57
4.2.1. GSH Düzeyine Ait Bulgular	57
4.2.2. MDA Düzeyine Ait Bulgular.....	59
4.2.3. TAS Düzeyine Ait Bulgular	61
4.2.4. TOS Düzeyine Ait Bulgular	63
4.2.5. Kaspaz 3 Düzeyine Ait Bulgular	65
4.2.6. Kaspaz 9 Düzeyine Ait Bulgular	67
4.3. Immunohistokimyasal Boyama (TUNEL) Yöntemine Ait Bulgular	69
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
7. KAYNAKLAR	89

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

SPF	: Specific Patogen Free
HC	: Hidrokortizon Hemisüksinat Sodyum
ml	: Mililitre
Mg	: Miligram
Kg	: Kilogram
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
MDA	: Malondialhedid
GSH	: Glutasyon
μ	: Mikron
Mm	: Milimetre
°C	: Santigrat Derece
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz
μL	: Mikrolitre
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
DM	: Diabetes Mellitus
O₂	: Oksijen
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S Transferaz
GSH-Rd	: Glutasyon Redüktaz
CTL	: Sitotoksik Lenfositler
NK	: Natural Killer
COX-2	: Cyclooxygenase-2

DOX	: Doksorubisin
LDH	: Laktat Dehidrojenaz
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
NF-Kb	: Nuclear Factor kappa B
PSC	: Posterior subkapsüler katarakt
CVD	: Kardiovasküler hastalıklar
UVB	: Ultraviyole B
ICCE	: Intrakapsüler katarakt ekstraksiyonunu
HLEC	: İnsan lens epitel hücresi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
SF	: Serum Fizyolojik
CAM	: Korioallantoik zar
AS	: Hava Kesesi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Katarakt tipleri	19
Tablo 3.1: Deney gruplarının dağılımı	46
Tablo 4.1: Tüm gruplardaki lenslerin katarakt dereceleri	56
Tablo 4.2: Tüm gruplara ait GSH (nmol/lens) düzeyleri.	58
Tablo 4.3: Tüm gruplara ait MDA (μ mol/lens) düzeyleri.....	60
Tablo 4.4: Tüm gruplara ait TAS (U/lens) düzeyleri.	62
Tablo 4.5: Tüm gruplara ait TOS (pg/lens) düzeyleri.....	64
Tablo 4.6: Tüm gruplara ait kaspaz 3 (ng/lens) düzeyleri.....	66
Tablo 4.7: Tüm gruplara ait kaspaz 9 (ng/lens) düzeyleri.....	68
Tablo 4.8: Tüm gruplarda TUNEL (TUNEL pozitif hücre sayısı/Toplam hücre) yöntemine ait bulgular.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Flavonoidlerin genel yapısı	35
Şekil 2.2: Flavonoidlerin ana sınıfları	37
Şekil 2.3: Chrysin'in kimyasal yapısı.....	338



RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1: 15 haftalık bir fetüsün gözünden kesit	3
Resim 2.2: Optik sapın nervus opticus'a dönüşmesi.....	5
Resim 2.3: Bulbus Oculi.	7
Resim 2.4: Bulbus oculi'nin bir bölümü, şematik yatay kesit.....	11
Resim 2.5: Lens anatomisi	14
Resim 2.6: Lens anatomisi	14
Resim 2.7: Lens'in ön bölümünden bir kesit.....	16
Resim 2.8: 9,10,11,12,14. evrelerde civiv embriyoları	27
Resim 2.9: 15, 19, 20, 21 ve 22. evrelerde civiv embriyoları	28
Resim 2.10: 30, 31 ve 32. evrelerde civiv embriyoları	29
Resim 2.11: 33, 34 ve 35. evrelerde civiv embriyoları.....	29
Resim 2.12: 36, 37, 38 ve 39. evrelerde civiv embriyoları	30
Resim 2.13: 43. evrede civiv embriyosu.	31
Resim 3.1: 0 günlük fertil SPF (specific patogen free) yumurtalar.....	42
Resim 3.2: a) Çalışmada kullanılan inkübatör b) Çalışmada kullanılan materyaller	43
Resim 3.3: 15. günde grupların oluşturulması ve yumurtaların inkübatöre yerleştirilmesi	44
Resim 3.4: 15. günde civiv embriyolarına HC ve chrysin enjeksiyonu aşamaları	47
Resim 3.5: Embriyoların yumurtalardan çıkarılması ve bulbus oculi diseksiyonu.....	48
Resim 3.6: a) Civiv embriyosuna ait bulbus oculi, b) Civiv embriyosuna ait lens.....	49
Resim 3.7: 17. günde yumurtadan çıkarılan ve gelişim geriliği gösteren embriyolar....	49
Resim 3.8: a) Lenslerin sonikatörle ultrasonikasyonu, b) Homojenatların 10.000 g santrifüj edilmesi.....	51
Resim 4.1: Gruplara ait katarakt derecelerine ait görseller	55
Resim 4.2: Tüm gruplara ait lens TUNEL boyamaları.	71

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4.1: Tüm gruplara ait lenslerdeki katarakt dereceleri.....	56
Grafik 4.2: Tüm gruplara ait lenslerdeki GSH (nmol/lens) düzeyleri grafiği..	58
Grafik 4.3: Tüm gruplara ait lenslerdeki MDA (μ mol/lens) düzeyleri grafiği.....	60
Grafik 4.4: Tüm gruplara ait lenslerdeki TAS (U/lens) düzeyleri grafiği.	62
Grafik 4.5: Tüm gruplara ait lenslerdeki TOS (pg/lens) düzeyleri grafiği.	64
Grafik 4.6: Tüm gruplara ait lenslerdeki kaspaz 3 (ng/lens) düzeyleri.	66
Grafik 4.7: Tüm gruplara ait lenslerdeki kaspaz 9 (ng/lens) düzeyleri.	68
Grafik 4.8: TUNEL (TUNEL pozitif hücre sayısı/Toplam hücre) grafiği.	70

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kortikosteroidler birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ve yan etkileri sık görülen bir ilaç grubudur. Uzun süreli kortikosteroid tedavisinin yaygın komplikasyonlarından biri de katarakt oluşumudur (Black ve ark., 1960).

Katarakt, göz merceğinin saydamlığını kaybedip bulanıklaşması ve görme keskinliğinin azalmasıdır (McCarty 2002). Katarakt, gelişen bilimsel ve teknolojik tedavi metotlarına rağmen görme bozukluğunun dünya çapında önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (Duman ve ark., 2018).

Akademik çalışmalarda; kataraktın etyopatogenezini incelemek, kataraktı önleyici ve tedavi edici ajanları belirlemek amacıyla fare, rat, tavşan, köpek, zebra balığı, civciv gibi farklı deneysel hayvan modelleri, farklı tip kataraktları incelemek için kullanılmaktadır (Duman ve ark., 2018). Son dönemde civciv embriyo modeli steroid kaynaklı kataraktın araştırılmasında kullanılan deneysel hayvan modellerinden biridir (Velpandian ve ark., 2010; Vurmaz ve ark., 2021). Önceki çalışmalar, hidrokortizon uygulaması ile civciv embriyolarında katarakt oluşturulabileceğini göstermiştir (Nishigori ve ark., 1983; Nishigori ve ark., 1987; Lee ve ark., 1995).

Flavonoidler biyolojik özellikleri nedeniyle insan sağlığına faydalı, antioksidan özelliği olan polifenollerdir. Literatürde, katarakt gelişimini önleme ve tedavi etmede çeşitli flavonoidlerin antioksidan etkisi araştırılmıştır (Ugboaja ve ark., 2012; Duman ve ark., 2019).

Chrysin (5,7-dihidroksiflavon) antioksidan özelliği bulunan flavonoidlerden biridir (Chiu ve ark., 2013). Chrysin tutku çiçeklerinden *Passiflora Caerulea*, *Passiflora Incarnata* ve *Oroksilum Indicum*’dan elde edilen flavon grubuna ait bir flavonoiddir. Ayrıca propolis ve balda da bulunur (Kedika ve ark., 2016). Chrysin antiinflamatuvar, antikanserojen, antioksidan şeklinde sınıflandırabileceğimiz birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Lapitot ve ark., 2002). Chrysin’in, katarakt üzerindeki antioksidan etkisi henüz netleşmemiş olup araştırdığımız kadarıyla literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Sundararajan ve ark., 2016; Wojnar ve ark., 2020).

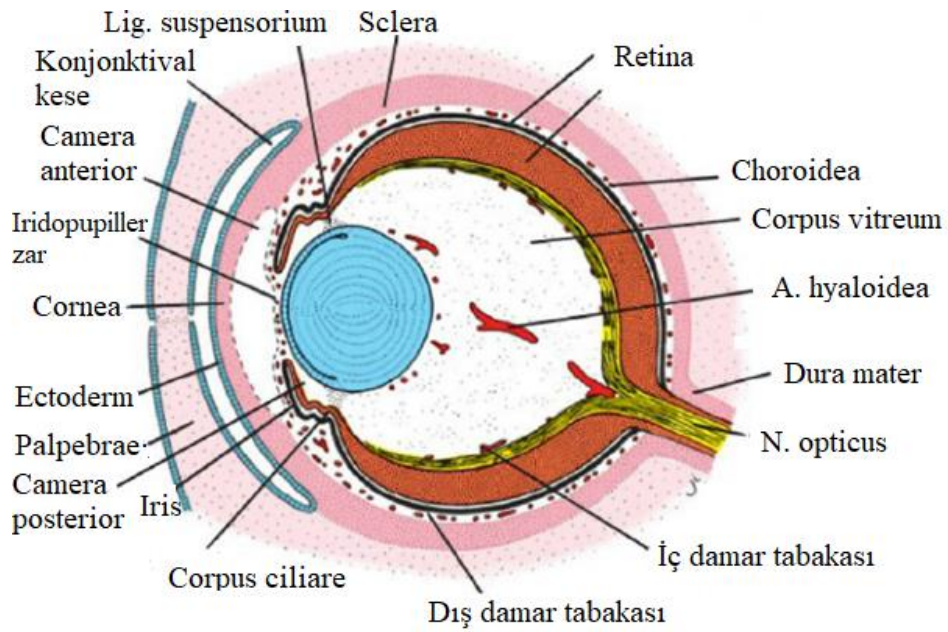
Bu veriler ışığında; chrysin'in antioksidan aktivitesinin, katarakt oluşumunu engellemede olumlu etki sergileyebileceği düşünülerek; çalışmamızda chrysin'in, civciv embriyolarındaki steroid kaynaklı deneysel katarakt modeli üzerine olan etkisinin morfolojik, biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Göz Embriyolojisi

Gözler, ön beynin nöroektoderminden, başın yüzey ektoderminden, bu tabakalar arasındaki mezoderminden ve crista nöralis hücrelerinden gelişir. Ön beynin nöroektoderminden nervus opticus, retina ve iris'in arka tabakası, başın yüzey ektoderminden cornea ve lens, mezoderminden bulbus oculi'nin vasküler ve fibröz tabakaları, crista nöralis'ten ise choroidea, sclera ve corneal endotel gelişir (Moore ve Persaud, 2002).



Resim 2.1: 15 haftalık bir fetüsün gözünden kesit (Sadler 1990).

İnsan embriyosunda, göz embriyolojik sürecin dördüncü haftasının başında gelişmeye başlar. Embriyonun kranial bölümündeki nöral kıvrımlarda göz çukurları belirginleşir. Ön beynin oluşması aşamasında nöral kıvrımlar birleşir. Bu esnada optik çukurlar içeri kıvrılıp optik kesecikleri oluşturur. Optik keseciklere ait boşluklar ön beyne ait boşluklarla devam eder. Optik keseciklerin ön beyin ile olan bağlantıları genişleyerek boş optik sapları oluşturur. Daha sonra optik kesecikler ektoderm ile temas eder ve yan yüzeylerinde girinti meydana gelir. Bu esnada optik keseciklere komşu olan ektoderm kalınlaşır ve lens'in başlangıç hali olan lens plağını meydana getirir. Her bir lens plağı yüzey ektodermine derinine ilerleyerek lens çukurunu oluşturur. Lens çukurlarının

kenarları birleşerek yuvarlak lens kesesini oluşturduktan bir süre sonra yüzey ektodermden ayrılır (Sadler 1990; Moore ve Persaud, 2002).

Lens kesecikleri gelişirken, optik kesecikler optik çukur adı verilen çift duvarlı yapılar meydana getirir. Bu optik çukurların boşluğu başlangıçta geniştir. Daha sonraları optik çukurun kenarları kıvrılarak, lens'ler etrafında birbirine yaklaşır. Bu esnada, lens kesecikleri yüzey ektodermi ile bağlantılarını kaybeder ve optik çukurların boşluklarına girer (Sadler 1990; Gartner ve Hiatt, 2013).

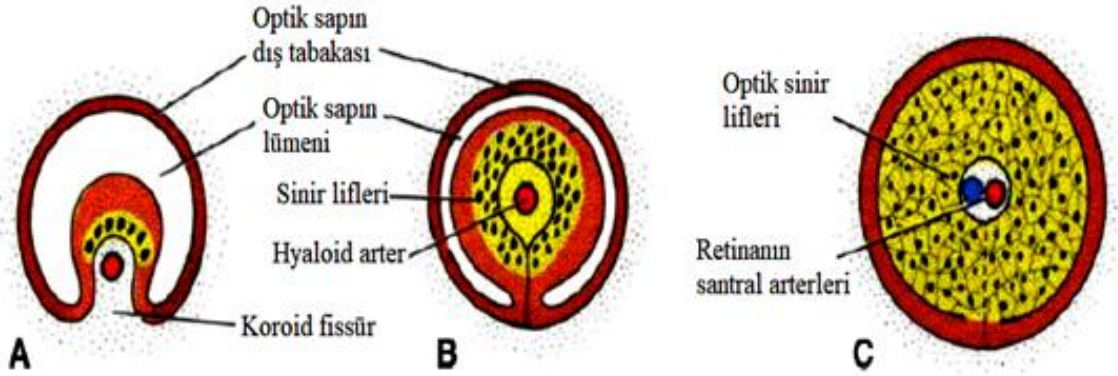
Optik çukurların ventral yüzünde ve optik saplar boyunca optik fissur adı verilen çizgisel yarıklar oluşur. Optik fissurlarda arteria ve vena hyaloidea'nın geliştiği vasküler mezenşim bulunur. Arteria hyaloidea, arteria ophthalmica'nın bir dalıdır ve optik çukurun iç tabakasını, lens keseciğini ve mezenşimi besler. Vena hyaloidea aynı yapılardan kanı drene eder. Optik fissurların kenarları zamanla birleşir ve bunun sonucunda arteria ve vena hyaloidea nervus opticus içine yerleşir. Bu damarların distal bölümleri zamanla dejenere olur, proksimal bölümleri retinanın damarları olarak kalır (Şeftalioğlu 1998), (Resim 2.1).

2.1.1. Retina Gelişimi

Retina optik çukur duvarlarından önbeynin bir uzantısı olarak gelişir. Nöral retina optik çukurun kalın tabakasının, retinanın pigment epiteli ise optik çukurun ince tabakasının farklılaşması ile oluşur. Bu iki tabaka erken fetal dönemde intraretinal boşluk ile ayrılır ve burası gerçek optik çukur boşluğudur. İki tabakanın birleşmesi sonucu bu optik çukur kaybolur. Bu birleşme esnasında aradaki bağ sıkı değil gevşektir. Bu sebeple yetişkin bir göz diseke edilirse nöral retina ile pigment epiteli kolayca birbirinden ayrılabilir (Şeftalioğlu 1998). Retina'nın tüm hücre tabakaları, sekizinci ayda son şeklini almış olur (Schoenwolf ve ark., 2009).

2.1.2. Nervus Opticus Gelişimi

Retina altıncı haftada beyne kadar optik sap boyunca uzanır. Sekizinci haftada optik sap ikinci kranial sinir olan nervus opticus'a dönüşür (Resim 2.2). Nervus opticus'lar birleşerek chiasma opticum'u oluşturur. Nervus opticus'un gelişimi ve miyelinizasyonu doğumdan sonra tamamlanır (Schoenwolf ve ark., 2009; Gartner ve Hiatt, 2013).



Resim 2.2: Optik sapın nervus opticus'a dönüşmesi. A: Altıncı hafta (9 mm), B: Yedinci hafta (15 mm), C: Dokuzuncu hafta (Sadler 1990).

2.1.3. Lens Gelişimi

Lens yüzeyi ektoderm kökenli olup optik vezikülden gelişir. Bikonveks ve esnek yapıdadır. Esnekliği yaş ilerledikçe kaybolur sertleşir. Primer lens lifleri gelişimin yedinci haftasında, sekonder lens lifleri ise gelişimin sekizinci haftasında oluşur. Gelişmekte olan lens'i arteria hyaloidea besler. Bu arter optik çukurluk etrafındaki annüler damarlarla bağlantılıdır. Arteria hyaloidea fetal hayatın beşinci ayından sonra atrofiye uğrar (Şeftalioğlu 1998; Moore ve Persaud, 2002; Gartner ve Hiatt, 2013).

2.2. Gözün Anatomisi

Göz, ışığa duyarlı (fotosensitif) bir duyu organıdır. Göz ona şeklini veren dayanıklı fibröz küreden, görüntüyü odaklayan lens sisteminden, görüntü bilgisini merkezi sinir sistemine ileten sinir sisteminden oluşur. Bulbus oculi gözün görme işlevini gerçekleştiren en önemli bölümdür (Arıncı ve Elhan, 2020).

2.2.1. Bulbus Oculi

Bulbus oculi ortalama iki buçuk cm çapında, yedi gram ağırlığında, küre şeklinde bir organdır. Bulbus oculi'nin öndeki en çıkıntılı noktası polus anterior, arkadaki en çıkıntılı noktası polus posterior olarak adlandırılır. Polus anterior korneal konveksliğinin, polus posterior scleral konveksliğinin merkezinde bulunur. Nervus opticus polus posterior'un üç mm nasal tarafından, orbitaya paralel olarak bulbus oculi'ye girer. Polus anterior ve polus posterior bulbus oculi'nin dış yüzünde axis bulbi externus, bulbus oculi'nin iç yüzünde

axis bulbi internus denilen eksenlerle birleşir. Axis bulbi internus, fovea centralis ile discus nervi optici arasında yer alır. Ön tarafta polus anterior, arka tarafta fovea centralis birleştirildiğinde axis opticus oluşur. Axis opticus ve axis bulbi göz küresinin ön yarısında çarpazlaşır. Polus anterior ve polus posterior arasında bulunan ve bulbus oculi'yi ön ve arka olmak üzere ikiye ayıran çembere ise equator (ekvator) adı verilir. Equator'a dik olarak geçen çizgiler meridiani (meridyen) olarak adlandırılır (Arifoğlu 2019; Arıncı ve Elhan, 2020).

Bulbus oculi ve orbita duvarı arasındaki boşluğu musculi bulbi (göz kasları), yağ dokusu, damar ve sinirler doldurur. Bulbus oculi'nin arka kısmını örten zara vagina bulbi adı verilir. Vagina bulbi, bulbus oculi'yi orbita içinde bulunan diğer oluşumlardan ayırır. Bulbus oculi ile orbita'nın üst duvarı arasında 9-10 mm, dış yan duvar ile 5-6 mm, alt duvarı ile 10-11 mm ve iç yan duvar ile 10-11 mm mesafe vardır (Arıncı ve Elhan, 2020), (Resim 2.3).

spatium perichoroideale olarak adlandırılır. Sclera'nın iç yüzü siliar damarları ve sinirleri bulunduran oluklu bir yapıya sahiptir ve choroidea'nın dış tabakasına gevşek bir şekilde tutunur. Arka bölümünde lamina cribrosa sclerae denilen delikli bir alan bulunur. Buradan nervus opticus, arteria ve vena centralis retina geçer ve bu bölge sclera'nın en zayıf bölümüdür. Sclera'nın önünde cornea bulunur ve ikisi arasında sulcus sclerae adı verilen bir oluk vardır. Sclera'nın cornea ile birleşen ön kenarı, çatal şeklinde görülür. Çatalın arasında kalan oluk cornea'nın ince kenarı olan limbus corneae'yı içine alacak şekildedir. Sulcus sclerae'nın iç tarafında musculus ciliaris'lerin tutunduğu bağ doku yapısında olan tendo centralis bulunur. Sclera'nın ön tarafta cornea ile birleştiği bölümde retinaculum trabeculare sclera (ligamentum pectinatum) adında bir yapı bulunur ve bu yapı camera anterior'u sinüs venosus sclera'dan (schlemm kanalı) ayırır. Ligamentum pectinatum lifleri arasında spatia anguli iridocornealis (fontana aralıkları) adında aralıklar bulunur. Camera anterior ve schlemm kanalı arasındaki bağlantı bu aralıklar sayesinde sağlanır. Retinaculum trabeculare'nin cornea ile sclera'ya uzanan bölümüne pars corneoscleralis, iris'e uzanan bölümüne ise pars uvealis denilir. Villi pectinati aracılığıyla camera anterior'da bulunan sıvı schlemm kanalına akar (Paulsen ve Waschke 2013; Arifoğlu 2019; Arıncı ve Elhan, 2020), (Resim 2.3).

Cornea, bulbus oculi'nin ön kısmında bulunur. Cornea'nın periferik kenarlarına limbus corneae ismi verilir. Limbus cornea sulcus sclerae'ya yerleşir ve buradan itibaren sclera ile devam eder. Cornea renksiz, saydam ve damarsız bir yapıya sahiptir. Cornea ile sclera'yı ayıran en önemli özellik cornea'nın saydamlığıdır. Cornea gözün esas refraksiyon yüzeyidir. Cornea'nın yüzeyi konvektir ve ışık konveks olan bu yüze çarparak kırılır. Cornea'nın konveks olan ön yüzüne facies anterior, konkav olan arka yüzüne facies posterior denir. Ön yüz göz kapandığında göz kapakların konjunktivası ile temas eder. Facies anterior'un en çıkıntılı kısmına vertex cornea adı verilir. Arka yüz camera anterior'u önden sınırlar ön kamerada bulunan humor aquosus ile temas eder. Cornea ışığın en fazla kırıldığı yapıdır. Cornea yapısında damar bulunmaz. Beslenmesi lameller arasındaki aralıklarda bulunan doku sıvısı, gözyaşı ve havadan aldığı oksijen ile sağlanır (Arifoğlu 2019; Arıncı ve Elhan, 2020).

Cornea yeni doğanlarda diğer organlarla kıyaslandığında daha büyüktür. 2 yaşında erişkindeki boyutlarına ulaşır. Ölümünden sonra camera anterior bulbi'deki sıvının kollogen lifleri şişirmesiyle cornea'nın saydamlığı kaybolur.

2.2.1.2. Tunica Vasculosa Bulbi (Tunica Media Bulbi)

Bulbus oculi'nin orta katını yapan tunica vasculosa bulbi, damardan çok zengindir ve içerdiği pigment nedeniyle siyahımsı renktedir (Snell and Lemp, 2012). Uvea ismi de verilen bu tabakanın asıl fonksiyonu oküler yapıların beslenmesini sağlamaktır. Bu tabaka arkadan öne doğru choroidea, corpus ciliare ve iris olmak üzere üç bölümden oluşur.

Choroidea tunica vasculosa bulbi'nin en büyük kısmını oluşturur. Bulbus oculi'nin arka 5/6'lık bölümünde, sclera'nın iç yüzünde bulunur. Damardan zengin, ince bir tabakadır. Koyu kahve rengine olan choroidea'nın kalınlığı arkada 0.5 mm, önde 0.25 mm kadardır. Çok ince olduğundan kolaylıkla yırtılabilir. Choroidea'nın ön sınırının, corpus ciliare ile birleştiği yere ora serrata adı verilir. Choroidea'nın arka dış kısmına tapetum denir. Choroidea sclera'ya, nervus opticus'un girdiği yerde sıkıca, geri kalan bölümde ise gevşek bir şekilde tutunmuştur. İç yüzü ise retina'nın pigment tabakasına sıkıca yapışıktır. Choroidea temel olarak kapiller ağ ile bu ağa ait afferent ve efferent damarlardan oluşur. Bu damar tabakasının en önemli fonksiyonu retina'nın dış yarısının beslenmesini sağlamaktır (Unur 2014; Arifoğlu 2019).

Corpus ciliare, tunica vasculosa bulbi'nin en kalın bölümüdür. Ortada yer alan bu yapı ora serrata'dan iris'in dış kenarına kadar uzanır. Esas yapısını musculus ciliaris ve bağ dokusu oluşturur. Musculus ciliaris'in kasılması veya gevşemesi, fibrae zonulares'lerin gerilip, gevşemesini sağlar ve bunun sonucunda lens'in ön-arka çapı artar veya azalır. Corpus ciliare, enine kesitlerde üçgen şeklinde görülür. Üçgenin tepesi choroidea, tabanı iris ve cornea ile temas eder. Corpus ciliare'nin dış yüzü sclera'ya, iç yüzü corpus vitreum'a yaslanmıştır (Waschke ve ark., 2016; Arıncı ve Elhan, 2020).

Corpus ciliare fonksiyonel olarak akomodasyon mekanizmasında rol oynar ve lens'in asılı pozisyonda kalmasını sağlar. Corpus ciliare'nin camera posterior'a bakan ön yüzünden iris başlar. Corpus ciliare'nin arka yüzünü retina örter. Bu yüz, pars plana ve pars plicata olmak üzere iki bölümden oluşur. Pars plana'da plicae ciliares adında ince plikalar yer alır. Plica ciliares'lerin birkaçı pars plicata'da birleşerek processus ciliaris adındaki çıkıntıları oluşturur. Bu çıkıntılar yan yana dizilerek corona ciliaris denilen yapıyı oluşturur ve humor aqueus'u salgılar.

Iris, tunica vasculosa bulbi'nin ön bölümünde bulunur. İris lens'in önünde, cornea'nın arkasında yer alır. Camera anterior bulbi ile camera posterior bulbi arasında bulunur (Resim 2.4). Kalınlığı 0.4-0.6 mm, çapı 11-14 mm'dir. Ortası pupilla denilen açıklıkla delinmiş diyafram şeklindedir. Camera anterior ve camera posterior, pupilla aracılığıyla birleşir. İris'in corpus ciliare'ye bağlanan kenarına margo ciliaris, pupilla'yı sınırlayan kenarına margo pupillaris denir. Pupilla'nın çapı 1-8 mm arasındadır. Çapı göze gelen ışığın miktarına, yakınlık durumuna göre değişir. Az ışıktaki ve uzağa bakarken pupilla'nın çapı artar. Çok ışıktaki ve yakına bakarken ise çapı azalır. Göze çok fazla ışık geldiğinde ise musculus sphincter pupilla kasılarak pupilla'yı daraltır. Pupilla'nın genişlemesini ise musculus dilator pupilla sağlar. Aynı zamanda pupilla ilaç etkisi ile genişleme özelliğine sahiptir (Paulsen ve Waschke 2013; Arıncı ve Elhan, 2020), (Resim 2.3).

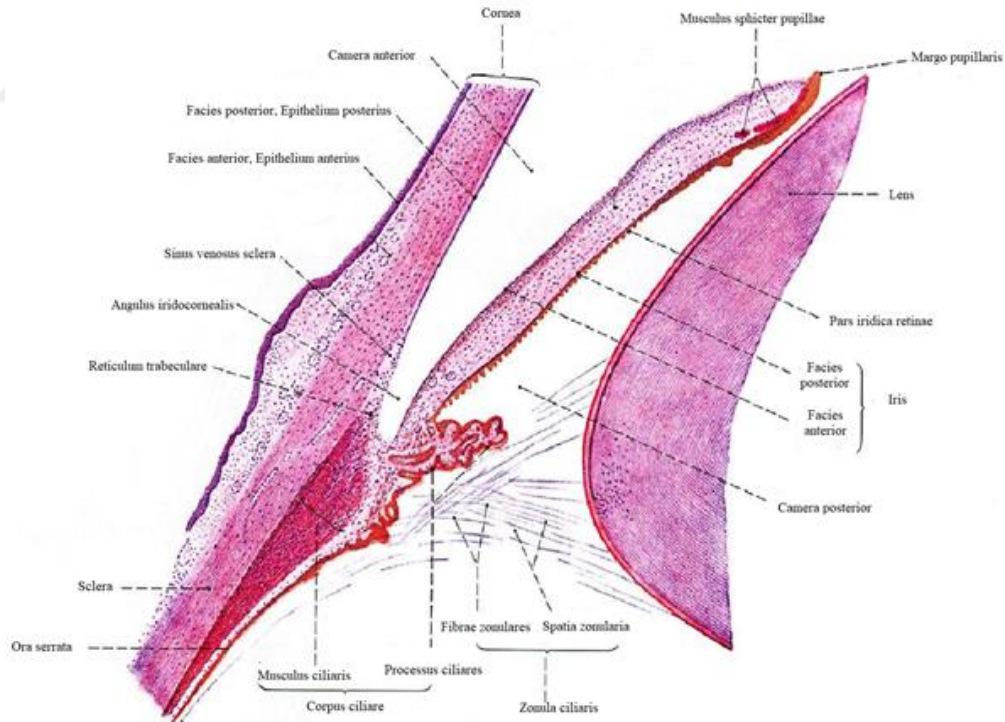
2.2.1.3. Tunica Nervosa Bulbi (Tunica Interna Bulbi)

Bulbus oculi'nin ışığa hassas olan en iç tabakasıdır. Retina da denilen bu tabaka, yumuşak ve yarı şeffaf yapıdadır. Retina arkada kalın olup önde incedir. Dışta stratum pigmentosum, içte stratum nervosum olarak iki tabakadan oluşur.

Stratum pigmentosum tunica vasculosa'nın iç yüzünü örter. Melaninden zengin tek tabakalı kübik, pigmentli hücrelerden oluşur. Dışta choroidea, içte koni ve basil hücrelerinin uzantılarıyla bağlantılıdır. Stratum pigmentosum ora serrata'da corpus ciliare'nin pigment epiteli ile devam eder. Bu tabakanın fonksiyonu ışığı emerek ışığın yansımalarını önlemektir.

Stratum nervosum (duyusal retina) önde ora serrata'da 0.15 mm, nervus opticus yakınında 0.4 mm kalınlığında, saydam ve ince bir tabakadır. Bu tabaka fotoreseptör olan koni ve basil hücrelerinin periferik uzantılarından oluşur. Discus nervi optici'den ora serrata'ya kadar uzanan stratum nervosum tabakası retinanın ışık duyusunu alan bölümüdür. Bu yüzden bu bölüme pars optica retinae denir. Pars optica retinae sinir hücreleri ve glia hücrelerinin uzantılarından oluşan bir tabakadır. Retina'da koni ve basil hücreleri, bipolar ve multipolar ganglion hücreleri bulunur. Multipolar ganglion hücrelerinin aksonları da papilla nervi optici'ye doğru uzanarak nervus opticus'u oluşturur (Resim 2.3).

Retina'nın iç yüzünde, corpus ciliare'nin arka kenarını çevreleyen ora serrata adında bir çizgi bulunur. Discus nervi optici, macula lutea ve fovea centralis retina'nın en ince yerleridir. Ora serrata'nın önünde, sadece stratum pigmentosum tabakası bulunur. Burası retina'nın ışık duyusunu almayan bölümüdür ve pars caeca retinae olarak adlandırılır. Pars caeca retinae'nın, corpus ciliare'nin iç yüzünü örten bölümüne pars ciliaris retinae, iris'in arka yüzünü örten bölümüne de pars iridica retinae adı verilir. Retina'nın arka bölümünde axis opticus'un geçtiği 2-4 mm çapında, sarı pigmentli oval sahaya macula lutea, buradaki çukurluğa fovea centralis, bunun da ortasında sadece koni hücrelerinin bulunduğu bölgeye foveola adı verilir. Burası ışığı en iyi alan bölümdür. Retina, fovea centralis'te çok incedir. Retina'da arteria ve vena centralis retinae'nın geçtiği discus nervi optici adında bir bölge ve ortasında excavatio disci adında bir çukurluk bulunur. Bu bölge ışığa hassas değildir. Kör nokta olarak adlandırılır. Retina canlıda içerdiği rodopsinden dolayı morumsu renktedir (Arifoğlu 2019; Arıncı ve Elhan, 2020).



Resim 2.4: Bulbus oculi'nin bir bölümü, şematik yatay kesit (Paulsen ve Waschke, 2013).

2.2.2. Gözde Işığın Kıran Yapılar

Göze gelen ışık sırasıyla; cornea, humor aquosus, lens ve corpus vitreum'dan kırılarak geçer ve macula üzerine gelir. Zonula ciliaris ve musculus ciliaris'ler de lens kalınlığı üzerine etki ederek ışığın kırılmasında dolaylı olarak görev alır (Arifoğlu 2019).

2.2.2.1. Cornea

Bulbus oculi'nin 1/6'lık ön kısmını oluşturan saydam bölümdür. Tunica fibrosa bulbi'nin ön tarafında bulunan yapıdır (Waschke ve ark., 2016; Arıncı ve Elhan, 2020), (Resim 2.4).

2.2.2.2. Humor Aquosus

Camera anterior ve camera posterior'u dolduran alkali yapıdaki berrak sıvıdır. Processus ciliaris'ler tarafından salgılanır. Önce, camera posterior'u doldurur, sonra pupilladan geçip camera anterior'a gelir. Buradan angulus iridocornealis'te bulunan fontana aralıklarından geçer ve villi pectinati'ler tarafından emilerek sinus venosus sclerae'ya (Schlemm kanalı) boşalır. Daha sonra venae ciliares anteriores'e dökülür ve böylece humor aquosus'un dolaşımı sağlanmış olur. Humor aquosus'un fonksiyonu, bulbus oculi'nin duvarlarına iç basınç uygulayarak bulbus oculi'nin optik şeklini korumaktır. Ayrıca cornea ve lens'in beslenmesini sağlar ve metabolizma artıklarını uzaklaştırır (Arifoğlu 2019; Arıncı ve Elhan, 2020).

2.2.2.3. Lens

Lens, yaklaşık 9 mm çapında, avasküler, saydam ve optik bir organdır. İris ile corpus vitreum arasında yerleşim gösterir. Bikonveks yapıda olan lens'in arka konveksliği ön konveksliğinden fazladır. Lens yeni doğanlarda ve gençlerde elastik bir yapıya sahipken, yaş ilerledikçe sertleşir. Lens görüntünün retina'da bulunan macula üzerine odaklanmasını sağlar. Lens'in facies anterior lentis ve facies posterior lentis olmak üzere iki yüzü vardır (Resim 2.4). Bu iki yüz konveks yapıdadır ve equator adı verilen kenarla birleşmiştir. Konveks olan bu yüzlerin en çıkıntılı noktalarına polus anterior lentis ve polus posterior lentis denilir. Polus anterior ve polus posterior, axis lentis denilen bir eksenle birleşir. Axis lentis'in kalınlığı 3.6 mm olup akomodasyonda 4.5 mm'ye kadar

artar. Equator lentis'in çapı, yetişkinlerde 9 mm kadardır (Arıncı ve Elhan, 2020; Arifoğlu 2019).

Lens kan damarı ve sinir içermez. Beslenmesi humor aquosus ile gerçekleşir. Lens'in ağırlığı doğumda 65 mg'dır. Ağırlığı zamanla artar ve 220 mg'a kadar ulaşır. Lens'te su miktarının düşüklüğü (%65), lens'in kırıcılığının yüksek olmasını sağlar.

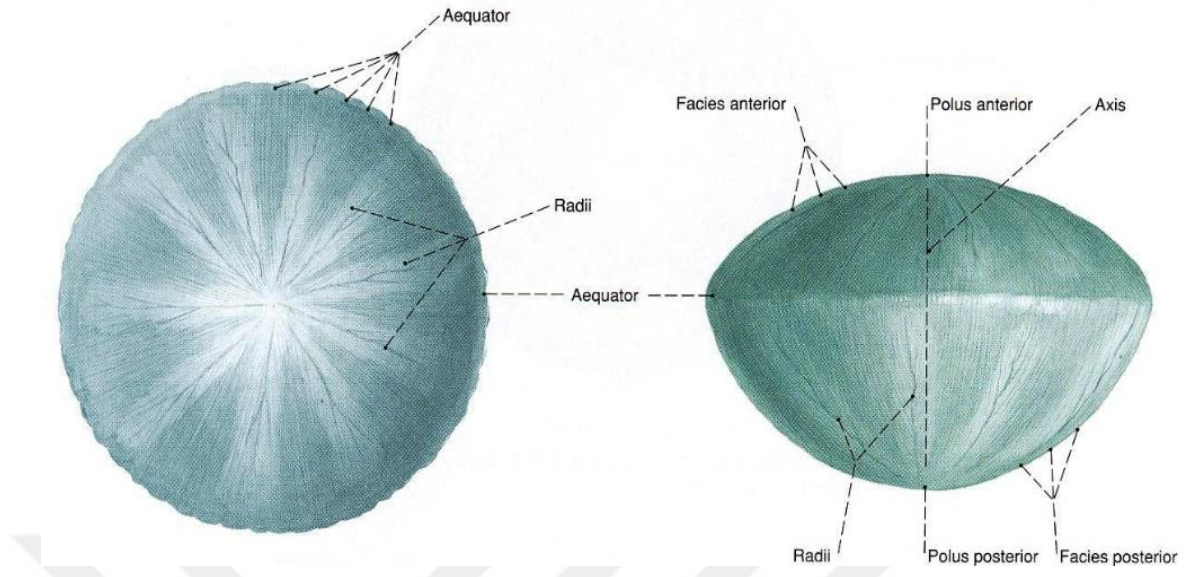
Lens'in yapısını capsula lentis, epithelium lentis ve fibrae lentis oluşturur.

Capsula lentis, homojen ve elastik bir yapıdadır ve lens'i çevreler. Kapsülün kalınlığı 10-20 mikron arasında değişir. Kalınlık her tarafta aynı değildir. Kapsül poluslarda ince, arka kutupta öne göre ince, poluslarla equator arasında ise kalındır.

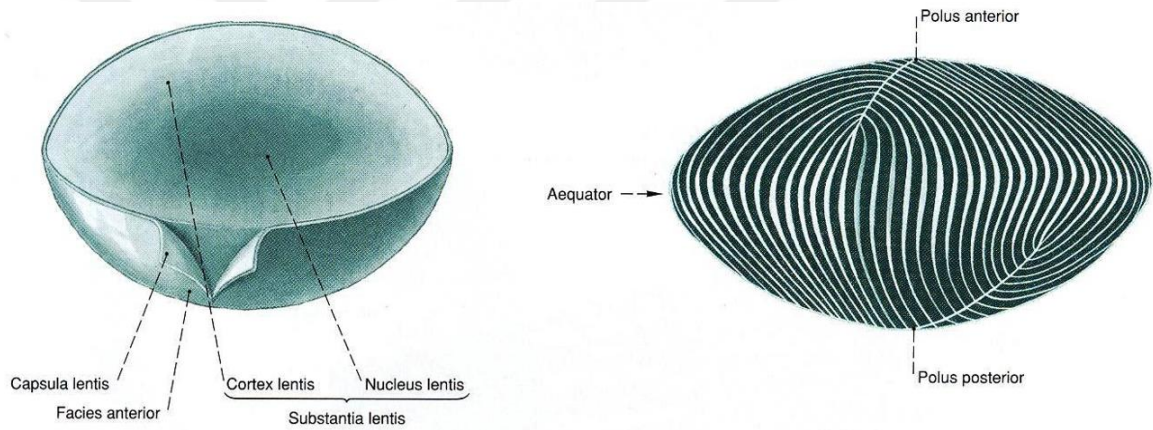
Epithelium lentis, lens'in ön yüzünde tek tabakalı olarak kapsülün altında bulunur. Equator'da kalındır. Lens'in arka yüzünde ise bu tabaka yoktur. Bu epitel tabaka bütün yaşam boyunca yeni lens fibrillerini oluşturur.

Fibrae lentis, lens'in ön ve arka yüzünü çevreler. Equator lentis'in epitel tabaka hücreleri şekil değiştirerek fibrae lentis'i oluşturur. Lens'in merkezi kısmına nucleus lentis, dış kısmına cortex lentis adı verilir. Nucleus lentis, cortex lentis'e göre daha sert yapıdadır.

Fibrae zonulares lens'i yerinde tutan en önemli oluşumdur ve lifler şeklinde lens ile processus ciliaris arasında uzanır. Bu lifler iplikçik şeklindedir ve normal şartlarda gergindir. İplikçiklerin gevşemesi ile lens kalınlığı ve kırıcılığı artar. Bu lifler lens'i equator yakınında tutarak lens'in olduğu pozisyonda kalmasını sağlar. Fibrae zonulares arasında kalan aralıklara spatia zonularia (Petit aralığı) denir. Fibrae zonulares ve spatia zonularia, zonula ciliaris adını alır (Waschke ve ark., 2016; Arıncı ve Elhan, 2020), (Resim 2.4).



Resim 2.5: Lens anatomisi (Paulsen ve Waschke, 2013).



Resim 2.6: Lens anatomisi (Paulsen ve Waschke, 2013).

2.2.2.4. Corpus Vitreum (Vitreus)

Işığ kırıan yapılar içinde en büyük olandır. Bulbus oculi'nin 4/5'ünü oluşturan camera vitrea bulbi'yi doldurur. İçerisinde yer alan sıvıya humor vitreus denir. Bu sıvının %90'ı su olup jel kıvamında ve şeffaf yapıdadır. Hyalüronik asit ve kollogen ilişkili bir protein yapısındadır. Kan damarı içermez. Processus ciliaris'in damarları ve retina'dan beslenir. Corpus vitreum ışığın retinaya geçmesini sağlar (Arifoğlu 2019; Arıncı ve Elhan, 2020).

Corpus viterum'un önündeki çukurluğa fossa hyaloidea denir. Fossa hyaloidea'yı discus nevi optici'ye bağlayan kanala canalis hyaloideus adı verilir. Bu kanal intrauterin dönemde bulunan arteria hyaloidea'nın kalıntısıdır ve yetişkinlerde saydam bir sıvı ile doludur. Corpus vitreum, canalis hyaloideus çevresinde daha yoğundur.

Yaşın ilerlemesiyle corpus vitreum'da bozulmalar meydana gelir. Zamanla yapısı daha fibröz bir hal alır, çevresindeki bazal lamina kalınlaşır, vitreus ile retina arasında bulunan bağlantı gücünü kaybeder. 40-50 yaşlardan sonra vitreus'un jel hacmi azalır, buna karşılık sıvı hacmi artar. 80-90 yaşlarda vitreus'un yarıdan fazlası sıvı hale gelir. Sıvılaşma öncelikle vitreus'un merkezinde başlar. Arka vitreus'ta laküna denilen sıvı cepleri oluşur. Bu lakünalar anatomik bir yapı olmayıp sadece yaşla birlikte ortaya çıkan sıvılaşma, yani sinkizisin bir bulgusudur (Drake ve ark., 2018; Arifoğlu 2019).

2.3. Lens Histolojisi

Lens, gelen ışınları retina üzerinde odaklayan bikonveks, bükülebilir, saydam bir disk'tir. Üç tabakadan, elastik kapsül (bazal membran), önde yerleşen tek katlı kübik epitel ve lens'in equator bölgesindeki epitel hücrelerinden modifiye olan lens fibrillerinden oluşur.

2.3.1. Lens Epiteli

Lens epitel hücreleri tek sıra şeklinde ön kapsülün arkasında bulunur. Epitel hücrelerinin equator'da bulunanları ile merkezde bulunanları fonksiyon bakımından farklılık gösterir. Equator'da bulunan hücreler bölünebilen ve lens fibrillerine dönüşen hücrelerdir. Merkezde bulunan hücreler ise bölünmez (Bhat 2001). Lens epitel hücreleri metabolik olarak aktiftir ve ATP yapımı ile lens için gerekli olan enerjiyi sağlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Epitel hücreleri mitoz bölünürler. Bu bölünmeler lens'in ön kapsülünde germinatif zonda gerçekleşir. Mitoz bölünme sonucu oluşan hücreler hacimce genişler. Daha sonra bu hücreler ribozom, nükleus, mitokondri gibi organellerini kaybederek fibriller bir yapıya dönüşürler. Meydana gelen organel kaybı optik açıdan avantaj sağlar. Çünkü ışık bu sayede lens'ten saçılmaya uğramadan ve emilmeden geçer (Junqueira ve Carneiro, 2006), (Resim 2.5).

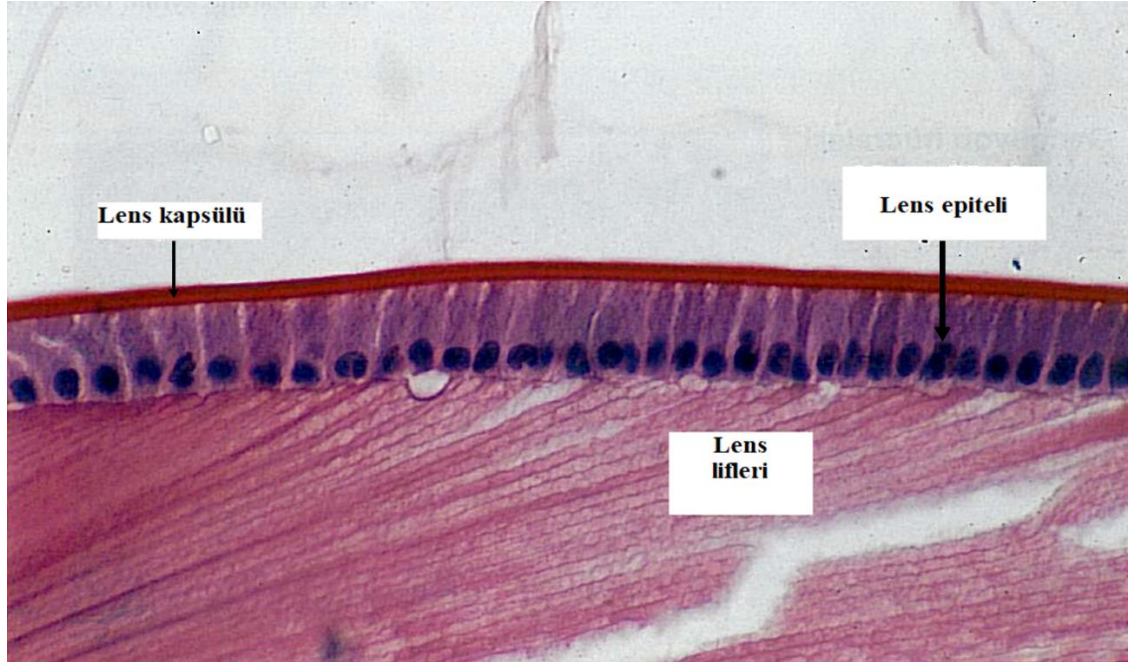
2.3.2. Lens Kapsülü

Lens kapsülü elastik ve saydam yapıda bir bazal membrandır, epitel hücrelerini ve fibrillerini tamamen sarar. Lens kapsülünün büyük bir bölümü Tip 4, küçük bir bölümü de Tip 1 ve Tip 3 kollajen içerir. Lens kapsülü vücuttaki en kalın bazal membran olma özelliğinin yanı sıra diğer bazal membranlardan farklı olarak sürekli kalınlaşır (Junqueira

ve Carneiro, 2006). Doğumda 8 mikron kalınlığında olan ön kapsül, erişkin bir insanda 14 mikrona (μ) ulaşır. Arka kapsül ise epitel hücrelerinin uzantılarıdır. Anterior ve posterior kapsülün en kalın olduğu yer olan preekvatoryel bölgede kalınlık 17- 23 μ , en ince olduğu yer olan santral arka kutupta ise 2-4 μ 'dur (Krag ve Andreassen, 2003), (Resim 2.5).

2.3.3. Lens Fibrilleri

Substantia lentis, lens'in asıl içeriğini oluşturur ve liflerden oluşur. Bulundukları ortamda ekstraselüler aralık oldukça az miktardadır. Lens, hacimsel olarak sürekli gelişir. Bu gelişme, lens equator'unda yerleşmiş olan hücrelerden oluşan yeni lens lifi oluşumu ile sağlanır. Lens liflerinin yüzeyde bulunanları yeni, merkezde bulunanları ise eski olanlarıdır. Lens lifleri, yassı ve uzun şekildedir. Epitel hücreleri ile lens lifleri iç içe geçmiş vaziyettedir. Yaş ilerledikçe, lens liflerinin özellikleri değişir. Çekirdekleri ve diğer organelleri kaybolur ve lens lifleri 7-10 μ m uzunluğa, 2 μ m genişliğe ve 10 μ m kalınlığa ulaşırlar. Lens lifi üretimi sürekli dir. Lif artışı karşısında lens hacminin aynı hızla artmaması bir miktar su kaybıyla açıklanır (Junqueira ve Carneiro, 2006), (Resim 2.5).



Resim 2.7: Lens'in ön bölümünden bir kesit (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.4. Katarakt

2.4.1. Tarihçe

Göz anatomisi eski zamanlardan bu yana araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Aristo, hayvan gözlerini incelemiş ve gözün üç farklı tabakasını keşfetmiştir. Rufus, dördüncü bir tabaka daha olduğunu, gözün ön kamara ve arka kamara olarak iki bölümden oluştuğunu açıklamıştır. Ayrıca kornea, lens, retina bölümlerini keşfetmiş ve yeni bir terminoloji geliştirmiştir. Bu bölümler için geliştirdiği terminoloji, günümüzde hâlâ kullanılmaktadır. Bergamalı Galen (130-210), kornea, lens ve optik sinirin anatomisini tanımlamıştır. Aulus Cornelius Celsus, Antik çağ tıbbının en önemli kaynaklarından biri olan De Medicina Libri Octo adlı tıp ansiklopedisinde göz anatomisini, göz hastalıklarını ve katarakt cerrahisini anlatmıştır (<https://tarihdergi.com/gozbilimin-tarihsel-gelisimi/>, Erişim tarihi: 15 Mart 2022).

Katarakt, Eski Mısır'da MÖ 1550'de yazıldığı düşünülen Eber Papirüsü adlı kitapta, göz hastalıkları arasında yer almaktadır (<https://tarihdergi.com/gozbilimin-tarihsel-gelisimi/>, Erişim tarihi: 15 Mart 2022). Kelime anlamı olarak katarakt, latince şelale, parmaklık anlamına gelen 'cataracta' ve yunancada 'katarraktes' kelimelerinden türemiştir (Gupta ve ark., 2014).

Katarakt cerrahisi, katarakt tedavisinde MÖ 5. yüzyıla kadar uzanan bir geçmişe sahiptir. 1748'te, Paris'te uygulanan ilk cerrahi yöntemin adı, Fransızca 'coucher' fiilinden gelmektedir. Bu yöntemde opak lens, iğne ile gözün içine doğru itilerek dibe yatırılır. MÖ 600'de Hintli cerrah Sushruta, ekstrakapsüler katarakt ekstraksiyonu gerçekleştiren ilk kişi olmuştur (Grzybowski ve Ascaso, 2014). 1753'te Samuel Sharp, belgelenmiş ilk intrakapsüler katarakt ekstraksiyonunu (ICCE) gerçekleştirmiştir. Bu yöntemde lens kapsülü de dahil olmak üzere tüm lens, geniş bir insizyonla çıkarılır. (Hubbell 1904).

2.4.2. Katarakt Etiyolojisi

Katarakt lens'in optik netliğini kaybetmesidir (McCarty 2002). Opaklıklar genellikle merceğin bir bölümünde görülür ve statik veya ilerleyici olabilir. Katarakt, azalmış görme keskinliği, parlama ve azalmış kontrast duyarlılığı ile kendini gösterir ve görme yetisini

azaltır. Yetişkinlerde katarakt, dünya çapında görme bozukluğunun en yaygın nedenidir. (Francis 2001).

Kataraktın etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, en önemli faktörün yaşlanma olduğu düşünülmektedir. Katarakt her yaşta ortaya çıkabilen bir sağlık sorunudur, özellikle de 50 yaş sonrası görülme sıklığı artmaktadır. Genç yaşta görülen katarakt zamanla ilerlemekte ve görme kaybına neden olmaktadır (Turno-Krecicka ve ark., 2016).

Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre ultraviyole ışınlar maruz kalma, sigara kullanımı, oksidatif stres ve yetersiz E ve C vitamini alımı katarakt oluşumu için risk faktörleridir (Varma 1991; Gupta ve ark., 2003). Aynı zamanda katarakt oluşumunda, kortikosteroid tedavisinin komplikasyonu önemli bir yer tutmaktadır (Turno-Krecicka ve ark., 2016). Oksidatif stres de katarakt oluşumundaki en önemli etkenlerden biridir. Vücut, yükselen serbest radikal ve reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesini normale indirmek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan bir antioksidan sistemine sahiptir. Oksidatif stres seviyeleri, lens'in doğal antioksidan potansiyelini aştığında, lens opaklığı gelişir. Ayrıca, lens'deki GSH seviyesi azalır. Bu da opaklığın oluşumunu artırır (Ishikawa ve ark., 2015). Gözdeki askorbik asit, E vitamini formu olan alfa-tokoferol, süperoksit dismutaz (SOD), GSH-Px ve katalaz gibi antioksidanlar ise ROS'un zararlı etkilerini nötralize etmekten sorumludur (Varma ve ark., 2011).

Lens'in fizyolojisi, biyokimyası ve lens opaklığına neden olan faktörler araştırılmaya devam etmektedir. Göz içi lens kullanımı ve katarakt cerrahisi ile katarakt tedavisi yapılmakta ve etkili sonuçlar alınabilmektedir. Kataraktın travma, gelişimsel anormallikler, metabolik bozukluklar ve ilaca bağlı değişiklikler gibi çeşitli nedenleri olmasına rağmen genel olarak kataraktın ana nedeni yaşlanmadır ve yaşa bağlı kataraktlara senil katarakt denmektedir (Bayraktar 2008).

2.4.3. Katarakt Sınıflandırması

Kataraktın sınıflandırılması, pek çok araştırmacı tarafından yapılmaya çalışılmıştır. Ancak katarakt morfolojisindeki geniş çeşitlilik nedeniyle sınıflandırma yapmak zordur. Opaklığın yoğunluğu, lokalizasyonu, etyopatogenezi ve kişinin yaşı gibi farklı şekillerde katarakt sınıflandırılması yapılabilir. Tablo 2.1'de yer alan sınıflandırma bu sınıflandırmalar arasında en kapsayıcı olanıdır.

Tablo 2.1: Katarakt tipleri (Aydın O'Dwyer ve Aydın Akova, 2015).

A) Anatomik Lokalizasyonuna Göre	B) Seyrine Göre	C) Etiyolojisine Göre
1) Nükleer 2) Kortikal 3) Subkapsüler 4) Mikst	1) Doğumsal 2) Edinsel	1) Konjenital ve İnfanıl 2) Senil 3) Travmatik 4) Komplike 5) Patolojik 6) Sekonder

2.4.3.1. Anatomik Lokalizasyonuna Göre Katarakt Tipleri

2.4.3.1.1. Nükleer katarakt

Nükleer katarakt lens'in merkezini etkileyen bir katarakt türüdür. Yaşa bağlı ortaya çıkar. Bu sebeple diğer türlere göre daha yavaş ilerler. Yaş ilerledikçe lens çekirdeğinin pigmentasyonu artar ve lens çekirdeği sıkışarak sertleşir. Zamanla göz merceği sarıya döner ve görüş bulanıklaşır. Opaklaşma lens merkezinde meydana gelir ve kademeli olarak kötüleşir. Lens çekirdeği lameller yapısını kaybeder ve kahverengi renk almaya başlar. Lens'te meydana gelen bu değişiklikler lens'in kırıcılık indeksini artırır. Lens'in kırıcılık indeksinin artmasıyla hastada miyopik kırma kusuru gelişebilir. Nükleer katarakt tipik olarak uzak görüşü, yakın görüşten daha fazla etkiler (Asbell ve ark., 2005).

2.4.3.1.2. Kortikal katarakt

Kortikal katarakt, katarakt tipleri içinde en yaygın olanıdır. Tek olarak ya da nükleer katarakt ile birlikte görülebilir. İlk evrelerde vakuoller gözlemlenir ve kortikal lameller arasında şeffaf alanlar oluşur. Bu şeffaf alanlar zaman geçtikçe büyüyerek bulanık hale gelir. Kortikal yırtıklar gelişir. Kortekste meydana gelen bu yırtıklar sonucu lens opaklaşır. Opasiteler lens'in alt yarımında, özellikle de nasal kadranda periferden başlar ve kapsülden nükleusa kadar tüm korteks tutulduğunda matür katarakt adını alır. Yaşın ilerlemesiyle birlikte lens çekirdeğinin sertliği artar. Bu sertleşme sonucu yaşa bağlı gelişen yakını görememe sorunu meydana gelir. Kortikal kataraktlarda nükleer kataraktlarda olanın tersine olgun lif hücreleri bölgesel olarak bozulur. Hücreler yapısal metabolitler bakımından kayba uğrar. Biyomikroskopik incelemelerde ileri safhalarda periferde kama şeklinde opasiteler ile birlikte lens'te lameller arasında ayrılmalar gözlemlenir (Pau 2006; Utlü 2017).

Kortikal kataraktlar sıklıkla asimetriktir. Opasitelerin görme ekseninde bulundukları yere göre görme üzerindeki etkileri farklılık gösterir. Kortikal kataraktta uzağı görmede sorun yaşanmaz. Araç farları gibi yoğun ve odaksal ışık kaynaklarına bağlı parıldamalar, ışığa bakarken zorlanma kortikal katarakt bulgularındandır. Hastada derinlik algısının bozulmasına neden olur. Bunun sonucunda hasta denge kayıpları yaşar. Ayrıca çift görme tablosu da gelişebilir. Kortikal kataraktların hepsi aynı seyri göstermez, progresyonları değişkendir (Aydın O'Dwyer ve Aydın Akova, 2015).

2.4.3.1.3. Posterior Subkapsüler Katarakt

Katarakt tipleri içinde en az görülen tiptir. Diğer katarakt tiplerine göre belirtileri daha erken başlar ve daha hızlı ilerler. Posterior subkapsüler katarakt (PSC) genellikle toksik ajanlara, posterior göz içi hastalığına, iyonlaştırıcı radyasyona veya künt travmaya maruz kalma sonrası meydana gelir (Black ve ark., 1960).

PSC her yaşta ortaya çıkabilir. Genellikle santral yerleşimlidir. Daha çok yakını görmede bozulma meydana gelir. Erken evrelerinde yakındaki objelere bakarken odaklanma zorluğu ve kamaşma gibi semptomlar ortaya çıkar (Taylor ve ark., 1989). PSC tanılı hastanın gözüne ışıkla bakıldığında opasitenin sınırları kolayca farkedilir ve opasiteler arka kapsülün merkezinde ada veya gölge şeklinde gözlemlenir. Ancak erken evrelerde, göze ışıkla bakıldığında lens'teki opasiteler güçlkle görülür. Çünkü opaklıklar erken evrede toz benzeri yapıdadır. Yaş ilerledikçe bu toz benzeri yapılar gölge yaparak ışıktaki kolaylıkla gözlemlenebilir. Daha ileri safhalarda ise kalsifiye plak şeklinde daha belirgin duruma gelir (Utlı 2017).

2.4.3.1.4. Mikst Tip Katarakt

Genellikle katarakt tek tip olarak başlar ve dejenerasyonun artmasıyla daha sonra mikst hale gelir. Mikst tip katarakt varlığı, kataraktın ilerlemiş durumda olduğunu gösterir. Hastalarda görme kusuru oldukça artmıştır ve artık bu aşamada kesin olarak cerrahiye ihtiyaç vardır (Yaşar 2005)

2.4.3.2. Seyrine Göre Katarakt Tipleri

2.4.3.2.1. Doğumsal Katarakt

Annenin hamileliğin ilk 3 ayında geçirdiği ateşli hastalıklar, kullandığı ilaçlar, radyasyon maruziyeti, bebeğin anne karnında geçirdiği enfeksiyonlar, bebeğin metabolizma hastalıkları, genetik hastalıklar, kromozom anomalileri ve bazı doğuştan enzim eksikliklerine bağlı olarak gelişebilir (Snell ve Lemp, 2012).

2.4.3.2.2. Edinsel Katarakt

Yaşamın ilk yılından sonra ortaya çıkan kataraktlar akkiz (edinsel) katarakt olarak tanımlanmakta ve senil katarakt, travmatik, komplike, patolojik, sekonder katarakt olarak sınıflandırılmaktadır (Aydın O'Dwyer ve Aydın Akova, 2015). Edinsel katarakt gelişiminde, yaşa bağlı süreç dışında, metabolik, toksik, travmatik ve çevresel birçok faktörün etkisi olduğu bilinmektedir (Guidotti 2011).

2.4.3.3. Etiyolojisine Göre Katarakt Tipleri

2.4.3.3.1. Konjenital ve İnfantil Katarakt

Konjenital katarakt, lens'in intrauterin dönemde opaklaşması sonucu oluşur. Lens hamileliğin yedinci haftasında gelişimini tamamlar. Lens'in gelişimini tamamladığı bu süreçte annenin geçirdiği enfeksiyonlar, yetersiz beslenmiş olması, kullandığı ilaçlar, radyasyon maruziyeti, bebeğin metabolizmal hastalıkları ve genetik yatkınlık konjenital katarakt oluşuma neden olmaktadır. Ayrıca Down sendromu gibi kromozomal anomalilerde de konjenital katarakt meydana gelebilir (Snell ve Lemp, 2012).

Konjenital katarakt, Avrupa ve ABD'de, her 10.000 canlı doğumda 1-6 vakada görülme sıklığı ile çocukluk çağında meydana gelen körlüğün en yaygın nedenidir. Genellikle bilateral ve simetrik olarak meydana gelir. Yavaş ilerleyen lens opasiteleri ile karakterizedir. Opasitelerin posterior yerleşimli ve yoğun olması, kataraktın görme üzerindeki etkisini belirler. Konjenital katarakt, cerrahi olarak tedavi edilse dahi hastaların tamamında tam iyileşme sağlanamayıp, görme problemleri devam edebilmektedir (Francis 2001).

2.4.3.3.2. Senil Katarakt

Senil katarakt, en sık rastlanan katarakt tipidir. Fiziopatolojisi tam olarak bilinmemektedir. Yaşlanmaya bağlı geliştiği düşünülmektedir. Yaşlanmayla birlikte lens'in kalınlığı artar, akomodasyon gücü azalır. Merkezde yeni kortikal lifler oluşur ve bunun sonucunda lens sıkışıp sertleşir. Nükleer skleroz denilen tablo ortaya çıkar. Lens epitel hücrelerinin yoğunluğunda azalma ve lens fibrillerinin yapısında anormal değişimler meydana gelir ve lens'in saydamlığı giderek kaybolur. Ayrıca yaşın ilerlemesiyle, lens'in nükleus hücrelerine gelen su, suda çözünür düşük molekül ağırlıklı metabolitler ve antioksidanların girişinde azalma olur. Bunun sonucunda ortaya çıkan oksidatif hasar, senil katarakt gelişimine yol açmaktadır. Senil kataraktın nükleer, kortikal ve posterior subkapsüler olmak üzere üç tipi vardır (Young 1991).

2.4.3.3. Travmatik Katarakt

Travmatik katarakt, delici ve künt travmalar, elektrik şoku, yıldırım çarpması, kızıl ötesi radyasyon gibi travmalara maruz kalınması sonucu meydana gelir. Göz yaralanmaları sonucu oluşan travmatik kataraktlar genellikle tek taraflıdır. (Artuner 1972).

2.4.3.4. Komplike katarakt

Komplike katarakt başka göz hastalıkları nedeniyle oluşan katarakt çeşididir. Göz içi iltihabı, göz içi tümörleri, miyop, tedavi edilmemiş retina dekolmanı gibi hastalıklar komplike katarakta neden olabilir (Artuner 1972).

2.4.3.5. Patolojik Katarakt

Diyabet, galaktozemi, hipokalsemi, hipotroidi, miyotonik distrofi, atopik dermatit, protein ve vitamin yetmezliği ve kemik hastalıkları sonucunda oluşan katarakt tipidir (Gökmen Kavak 2021).

2.4.3.6. Sekonder Katarakt

Önceden katarakt operasyonu geçirmiş kişilerde görülen sekonder katarakt, lens'in arkasında bulunan kapsülün işlevini yitirmesi sonucu meydana gelir. İkincil katarakt

olarakta bilinen sekonder kataraktın nedenleri arasında diyabet, üveit, romatizmal hastalıklar, bazı ilaçların (kortizon, diüretikler) uzun süreli kullanımı ve radyasyon gibi ışınlara maruz kalmak sayılabilir (Karel ve ark., 1997).

2.5. Cıvciv Embriyo Modeli

Gelişimsel biyoloji uzun zamandır erken embriyonik aşamalara ulaşmak ve embriyo gelişimini daha detaylı incelemek için çeşitli canlılardan yararlanmıştır. Caenorhabditis elegans, Drosophila, Xenopus gibi modeller arasında cıvciv embriyosu, gelişim ve organogenez hakkındaki çalışmalarda çoğunlukla tercih edilen bir modeldir (Rashidi ve Sottile, 2009).

Cıvciv embriyosu, ablasyon, rotasyon ve oto-, allo- ve kseno transplantasyonların kullanıldığı deneysel bir model olarak uzun ve önemli bir geçmişe sahiptir. İmmünoloji, genetik, viroloji, kanser ve hücre biyolojisi alanlarına önemli kavramlar katmıştır. Greftleme, soy izleme, aksonal yol bulma gibi klasik tekniklerin uygulanabilirliği sayesinde, cıvciv embriyo modeli literatürdeki mevcut çok yönlü deney modellerinden biridir. Gelişen teknoloji sayesinde bu model daha da güçlü hale gelmektedir (Stern 2005).

Günümüzde, kanser hücre hatlarının cıvciv embriyosuna transplantasyonu, tümöröjenezi kontrol eden mekanizmaları tanımlamak ve tedavi yönünde yeni hedefleri belirlemek ve doğrulamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Cıvciv embriyosu kolay erişilebilir ve az bakım gerektiren bir model olduğu için gelecek yıllarda sağlık alanına katkısının daha da artması muhtemeldir (Rashidi ve Sottile, 2009).

2.5.1. Tarihçe

Embriyonik gelişim, tarihin başlangıcından bu yana insanı etkileyen bir süreç olmuştur. Döllenme sonrasında bir canlının oluşumunun nasıl olduğu, bilgilerin nerede kodlandığı ve hangi mekanizmaların etkili olduğu gibi soruları cevaplamak için bilim farklı avantajlara sahip birçok deneysel model sisteminden yararlanmıştır. Cıvciv embriyosu bu deneysel modeller arasında gelişimsel araştırmalarda ilk kullanılanlardan biridir (Stern 2005).

Eski Mısırlılar ve Yunanlılar, insan gelişimini gözlemlemek için cıvcivleri bir model olarak kullanan ilk topluluklardır. MÖ 343'te, Yunanlı Aristoteles cıvciv

embriyosunu, canlı oluşumunun sırlarını keşfetmenin bir yolu olarak görmüş, civciv embriyosunun tüm gelişim süreçlerinin tanımını yapmıştır. Aristoteles civciv embriyosunun göz gelişimini incelemek için güçlü bir model olarak vurgulamıştır. Yapmış olduğu tanımlamalarda gözlerin oldukça büyüdüğünü, gelişimin 10. gününde kafanın, civciv embriyosunun vücudunun geri kalanından daha büyük, gözlerin de kafadan daha büyük olduğunu ve henüz görme duyusunun olmadığını açıklamıştır. Gözlerin, bu süre zarfında çıkarıldığında, fasulyeden büyük, siyah renkte ve içinde beyaz bir sıvının bulunduğunu belirtmiştir (Belecky-Adams ve ark., 2008).

Pek çok araştırmacı tarafından göz araştırmalarında deneysel civciv modellerinin kullanılması, 19. ve 20. yüzyıl sonlarında yapılan araştırmaların bugün olduğu yere gelmesini sağlamıştır (Rashidi ve Sottile, 2009).

Keibel ve Abraham 1900’lü yıllarda civciv embriyosunun morfolojik gelişim aşamaları üzerinde çalışmıştır. Ancak sonraki çalışmalarda gelişim aşamalarında eksikliklerin olduğu görülmüştür (Saunders 1947). Hamburger ve Hamilton, 1951 yılında civciv embriyolarında yapmış oldukları bir çalışmada, embriyo gelişimini 45 seri kronolojik sınıflamaya ayırmıştır. Evre evre civciv embriyo gelişimini açıklamış ve günümüzde de hala kullanılan bu sınıflandırmayı literatüre kazandırmıştır (Hamburger ve Hamilton, 1951).

2.5.2. Civciv Embriyosu Gelişimi

Civciv embriyosu gelişimi ortalama 22 günde tamamlanır. Bu sürecin bir günü tavuk vücudunda yumurtlamaya kadar olan dönemde, diğer 21 günü ise yumurtlama sonrası kuluçkada geçmektedir. Memelilerde, embriyonal gelişim uterus’ta tamamlanırken tavuklarda yumurta içinde tamamlanmaktadır (Aksoy 1999).

Yumurtaların döllenmesi, tavuk ve horozun çiftleşmesi sonucu meydana gelir. Sperm yumurta kanalında hızla yol alarak 30 dakikada infundibulum’a ulaşır. Döllenme infundibulum veya yumurta kanalında meydana gelir. Döllenme sonrası zigot oluşur ve zigot oluşumundan yaklaşık dört saat sonra ilk hücre bölünmesi meydana gelir. Yumurta, istmus’a girdikten bir saat sonra embriyo 16 hücrelidir. Uterus’taki ilk dört saat içerisinde hücre sayısı 256’ya ulaşır. Embriyo, bu aşamada yumurta kanalında blastoderm adı verilen disk şeklinde bir hücre kümesi olarak görülür. Embriyonik gelişme bu merkezden

devam eder. 18. saatte ilkel çizgi görülmeye başlar. İlkel çizgi gastrulasyon sürecinde doku ve organların oluşmasını sağlar. Gelişimin bu aşamasında, göç eden hücreler ilk hücre farklılaşmasını gerçekleştirerek dışta ektoderm, içte endoderm olmak üzere iki hücre tabakasını oluşturur. Bu aşamaya kadar olan gelişim dönemi, döllenme sonrası 24. saate denk gelir. 24 saatlik embriyoda notokord, somitler ve nöral oluk belirginleşmiştir (Hamburger ve Hamilton, 1951; Aksoy 1999; Sing 2019). Yumurtlama 24. saat sonrasında olur. Yumurtlama sonunda döllenmiş yumurta ektoderm ve endoderm tabakalarından oluşmaktadır. Yumurtlama sonrası hücre bölünmesi hızla devam eder ve ektoderm ile endoderm tabakalarından 3. tabaka olan mezoderm oluşur. Ektoderm tabakasından; deri, tüyler, gaga, tırnaklar, sinir sistemi, gözün mercek ve retina tabakaları ile ağızın mukoza tabakası gelişir. Endoderm tabakasından sindirim, solunum sistemi ve endokrin sistem oluşur. Mezoderm tabakasından; kas, kemik, kan, üreme sistemi ve boşaltım sistemi gelişir (Hamburger ve Hamilton, 1951; Aksoy 1999).

Civciv embriyosunun gelişiminde fonksiyonel olan dört membran vardır. Bunlar amnion, korion kesesi, allantois kesesi ve yumurta sarısı kesesidir. Amnion, kuluçkanın ikinci gününde oluşmaya başlar ve dördüncü gün embriyoyu tamamen içine alacak şekilde kapanır. Kan damarları yoktur ve saydamdır. Embriyonun gelişimine yardım eder ve onu mekanik şoklardan korur. Kuluçkanın ikinci gününde korion kesesi oluşur. Metabolik fonksiyonların tamamlanmasında rol oynar. İnkübasyonun üçüncü gününde korion ile amnion arasında kan damarları ile kaplı allantois kesesi ortaya çıkar ve 12. günde gelişmesini tamamlar. Bu kese fonksiyonel akciğer gelişinceye kadar geçici solunum organı olarak görev yapar. Embriyo, bu membran yardımıyla oksijen alır ve karbondioksit verir. Böbreklere ait salgılar, bu zar tarafından allantoik boşluğa atılır. Yumurta sarısını çevreleyen kan damarları ile kaplanmış yumurta sarısı kesesi ikinci günde oluşmaya başlar ve kuluçka süresince embriyoyu besler. Bu kese, yumurta sarısının eriyebilir ve sindirilebilir olması için bir enzim salgılar. Bu sayede yumurta sarısı, kuluçkadan çıkış öncesi embriyo içerisine taşınabilir ve kuluçka sonrasında embriyo için besin deposu görevi görür (Hamburger ve Hamilton, 1951; Aksoy 1999).

2.5.3. Civciv Embriyosu Göz Gelişimi

Civciv embriyo gelişimi esnasında göz nöroektoderm, yüzey ektodermi ve crista neuralis kökenli mezoderm'den köken alır. Göz gelişimini başlatan taslak, prosencephalon

kıvrımının her iki tarafında bir çift sıg oluk halinde ortaya çıkar. Anterior nöropor'un kapanması sonrasında bu oluklar vesicula optica'ları şekillendirir. Vesicula optica'lar laterale doğru genişler ve duvarları yüzey ektodermi ile temas eder. Böylece vesicula optica'ların nöroepiteli, yüzey ektodermini, lens taslağını oluşturmak üzere indükler. Bu süreçten sonra vesicula optica'lar konkav bir şekil almaya başlar ve calices opticus'lara dönüşür. Vesicula optica'ların kök kısmının daralması sonucu ise optic sap oluşur. Calices opticus'un ventral sınırında, optic sapın ventral yüzü boyunca devam eden fissura choroidea adı verilen bir oluk oluşur. Fissura choroidea gelişmekte olan retina ve lens'in beslenmesini sağlayan hyaloid kan damarları için bir geçiş yolu sağlar. Embriyonik dönemin sonuna doğru fissura choroidea kapanır ve hyaloid damarlar optic sap tarafından çevrelenir. Calices opticus'un gelişmesiyle, lens taslağı vesicula optica'nın kenarına invagine olur ve lens vezikülünü şekillendirir (Mcgeady ve ark., 2011).

Lens vezikülünün şekillenmesinden kısa süre sonra, vezikülün arka duvarındaki epitel hücreleri uzamaya ve vezikülün ön duvarına doğru çoğalmaya başlar. Gelişim esnasında bu epitel hücreleri köklü bir değişikliğe uğrar ve kristalinler olarak adlandırılan çok miktarda proteini içeren şeffaf uzun hücrelere dönüşür. Başlangıçta normal hücre organellerine sahip olan bu hücreler, daha sonra bu organellerin apoptoza uğramasıyla şeffaf kristalinlerden oluşan yapıya dönüşür (Mcgeady ve ark., 2011).

Retina, calices opticus'un karşı karşıya gelen duvarlarından gelişir. Başlangıçta, calices opticus'un dış duvarı incedir ve pigmentasyona uğrayarak retina'nın pigmentli tabakasını oluşturur. Dış duvar aynı zamanda corpus ciliaris ve iris'in şekillenmesine de katılır. Calices opticus'un iç duvarının nöroepitel hücreleri farklılaşarak, retina'nın ışığa duyarlı basil ve koni hücreleriyle, bipolar ganglion hücreleri ve destek görevi yapan glia hücrelerini içeren özel katmanlarını oluşturur. İris ve retina arasındaki ışığa duyarlı olmayan (non-visual) bölge, processus ciliaris'leri oluşturmak üzere kıvrım oluşturur. Processus ciliaris'ler ve lens arasındaki mezenşim hücreleri, ışınal (radyer) iplikler halindeki lens'in asıcı ligamentlerini yapar. Genç fetal dönemde irido-pupillar membran dağılır ve lens, ligamentum suspensorium ve iris'in yerleştiği boşluk, camera posterior'u şekillendirir. Musculus ciliaris'ler, ligamentum suspensorium'un gerilmesini kontrol eder. Bu ligament, lens'in şeklini düzenler ve böylece görsel akomodasyonu sağlar. Retina'nın ışığa duyarlı olmayan kör kısmının dış yüzündeki mezenşim dokusu, iris'in bağ dokusu elementleriyle pupillanın dilatatör ve sphincter kaslarının oluşumuna katkıda

bulunur. Ayrıca ışığa duyarlı olmayan bölge, processus ciliaris'i oluşturmak üzere kıvrım oluşturur (Mcgeady ve ark., 2011).

Erken gelişim döneminde, calices opticus'u saran bir miktar gevşek mezenşim dokusu retina ve lens arasındaki bölgeye göç eder. Bu mezenşim hücreleri corpus vitreum'u oluşturur. Corpus vitreum'un beslenmesini arteria hyaloidea sağlar ve zamanla atrofiye uğrayarak hiyaloid kanal olarak adlandırılan kanalı oluşturur. Lens ve yüzey endodermi arasındaki bölgede bulunan mezenşim hücreleri iki tabakaya ayrılır ve bunların arasında camera oculi anterior oluşur (Mcgeady ve ark., 2011).

2.5.4. Hamburger ve Hamilton Evrelerinde Göz Gelişimi

Hamburger-Hamilton civciv gelişimini 45 seri kronolojik evreye ayırmıştır. Bu evrelemeye göre göz gelişimi evre 9'da 29.-33. saatler arasında primer optik veziküllerin oluşmasıyla başlar. Çalışmamızın deney aşamasının sonlandırıldığı 17. güne kadar Hamburger-Hamilton evrelerinde göz gelişimi ile ilgili süreçler aşağıda özetlenmiştir;

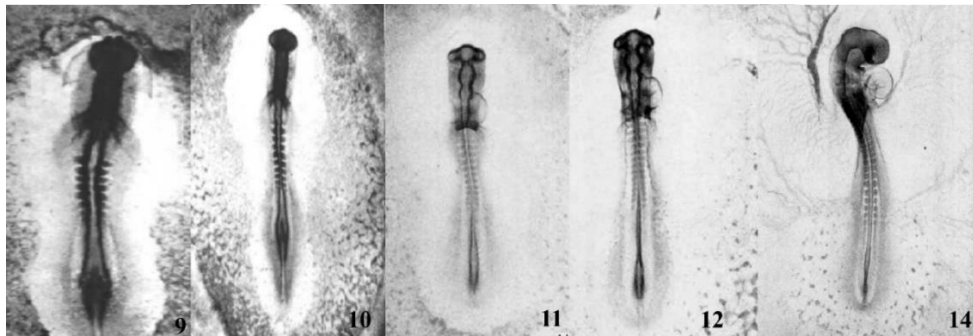
Evre 9 (29–33 saat): Primer vesicula optica'lar oluşmaya başlar (Resim 2.8).

Evre 10 (33–38 saat): Vesicula optica'lar net değildir (Resim 2.8).

Evre 11 (40–45 saat): Vesicula optica'lar belirginleşmiştir (Resim 2.8).

Evre 12 (45–49 saat): Primer vesicula optica'lar ve optik sak net bir şekilde görülür (Resim 2.8).

Evre 14 (50-53 saat): Lens taslağı oluşur (Resim 2.8).



Resim 2.8: 9, 10, 11, 12 ve 14. evrelerde civciv embriyoları (Hamburger ve Hamilton, 1951).

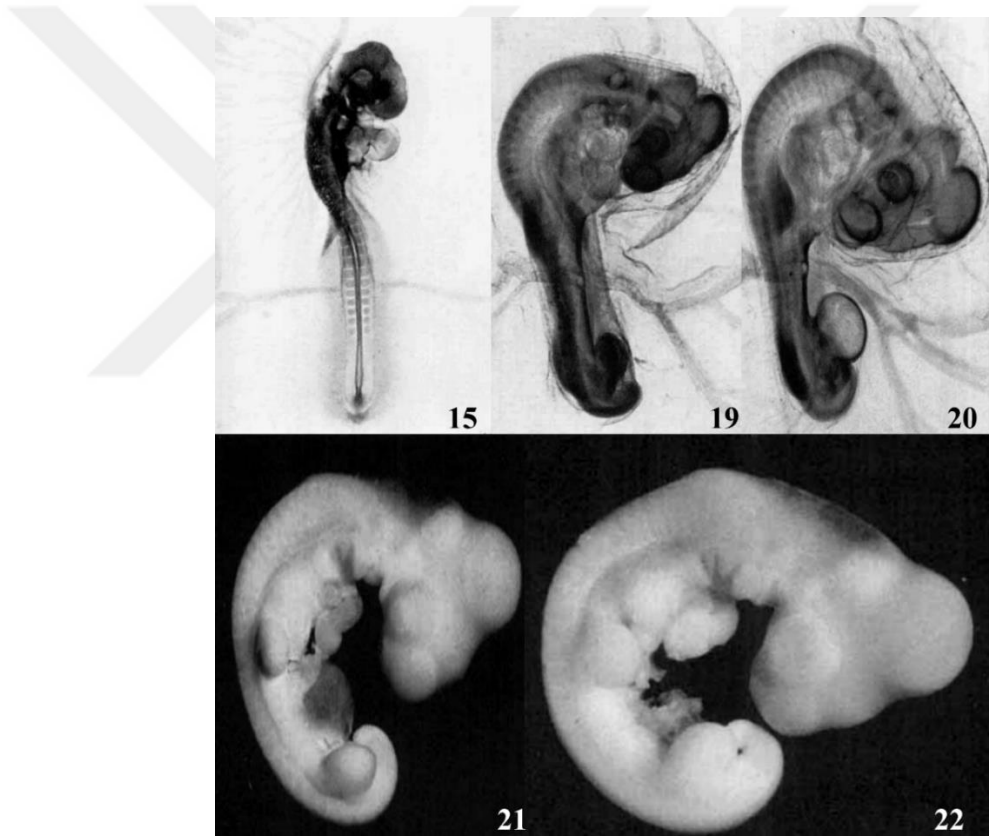
Evre 15 (50-55 saat): Optik çukur tamamen oluşur. İris bölgesinde farklı iki çift kontur bulunur (Resim 2.9).

Evre 19 (68-72 saat): Gözlerde pigmentasyon henüz belirgin değildir (Resim 2.9).

Evre 20 (70-72 saat): Göz pigmenti soluk gri bir renk almıştır (Resim 2.9).

Evre 21 (3. gün): Göz pigmenti rengi soluk gri olarak görülmeye devam eder (Resim 2.9).

Evre 22 (3.5. gün): Göz pigmentasyonu belirgin hale gelmiştir (Resim 2.9).

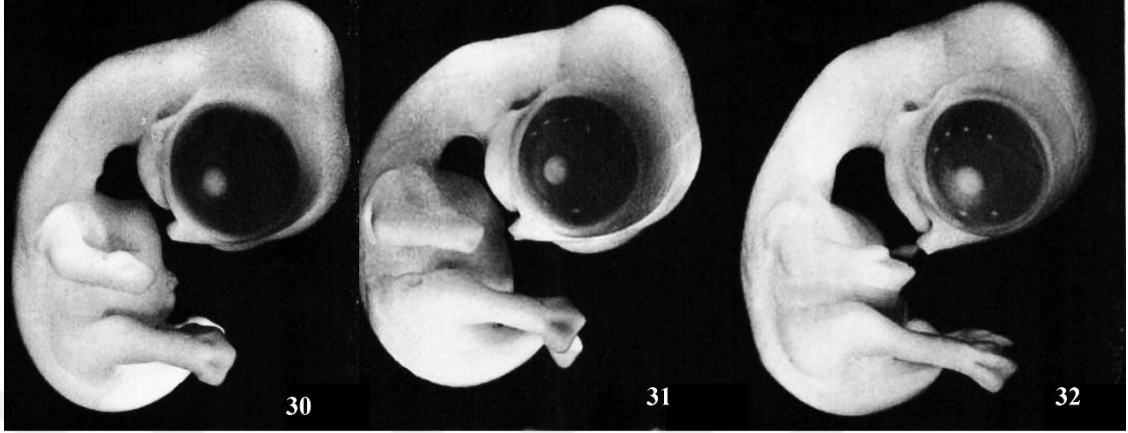


Resim 2.9: 15, 19, 20, 21 ve 22. evrelerde civiv embriyoları (Hamburger ve Hamilton, 1951).

Evre 30 (6.5. gün): Fissura choroidea'nın her iki tarafında birer tane skleral papilla görülür hale gelmiştir. Bazen net olmayıp belirsiz olabilir (Resim 2.10).

Evre 31 (7. gün): 4 tanesi fissura choroidea'nın yanında dorsal tarafta, 2 tanesi bunların karşı tarafında olmak üzere 6 adet skleral papilla belirgin hale gelmiştir (Resim 2.10).

Evre 32 (7.5. gün): Sırtta ve ventral tarafta birer grup olmak üzere 6 ila 8 adet skleral papilla görülmektedir (Resim 2.10).

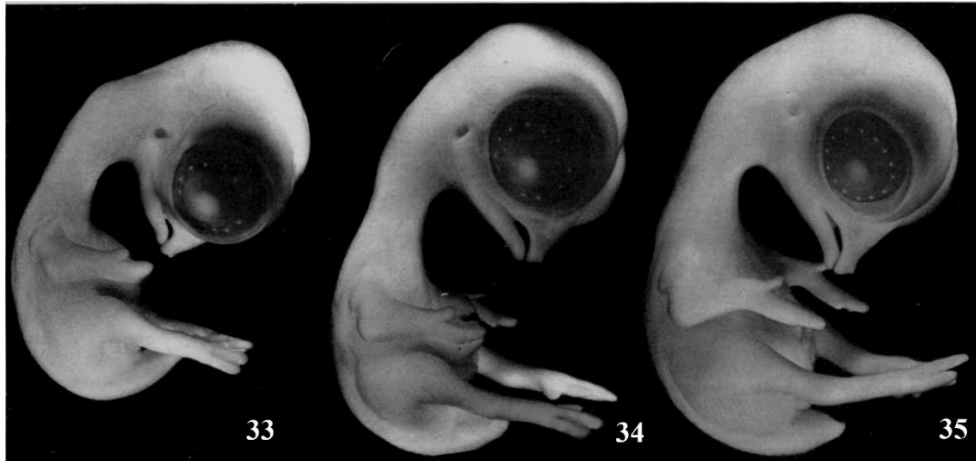


Resim 2.10: 30, 31 ve 32. evrelerde civiv embriyoları (Hamburger ve Hamilton, 1951).

Evre 33 (7.5-8. gün): 13 adet skleral papilla görölür hale gelmiştir (Resim 2.11).

Evre 34 (8. gün): Skleral papilla sayısı 13-14'a ulaşmıştır. Niktitatif membran (üçüncü göz kapağı), gözün dış kenarı (göz kapağı) ile skleral papilla arasında yarıya kadar uzanır (Resim 2.11).

Evre 35 (8.-9. gün): Niktitatif membran dikkat çekici bir şekilde büyümüş ve skleral papilla'ya yaklaşmıştır. Göz kapakları (Niktitatif membran dışında) gagaya doğru uzamıştır. Göz kapaklarının çevresi elipsoidale hale gelmiştir (Resim 2.11).



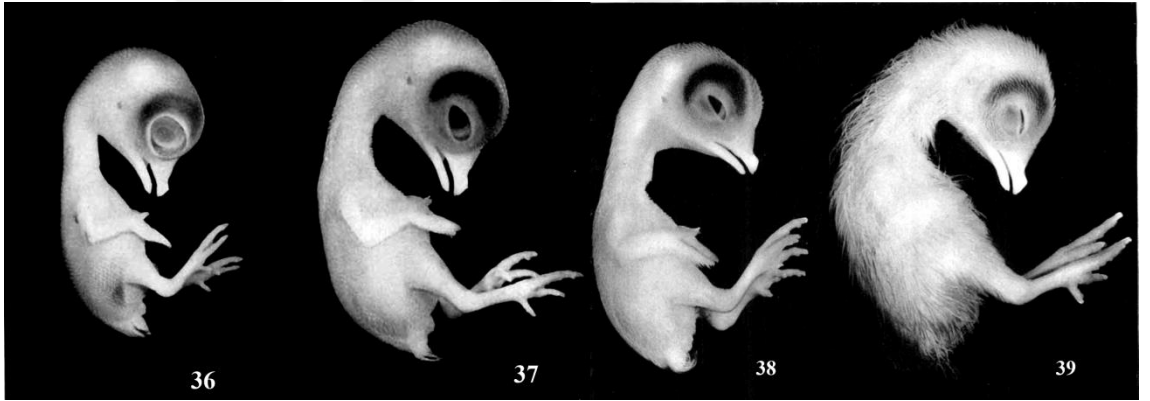
Resim 2.11: 33, 34 ve 35. evrelerde civiv embriyoları (Hamburger ve Hamilton, 1951).

Evre 36 (10. gün): Niktitatif membran sclera'yı kaplar papilla ve cornea'ya yaklaşır. Alt göz kapağı cornea seviyesine kadar büyümüştür. Kapakların çevresi elips şeklini almıştır (Resim 2.12).

Evre 37 (11. gün): Niktitatif membran cornea'nın ön kenarına kadar büyümüştür. Üst kapak cornea'nın dorsal kenarına ulaşmıştır. Alt göz kapağı cornea'nın üçte birini kaplamıştır. Göz kapaklarının çevresi daralmış ve ventral olarak düzleşmiş, bikonveks olarak görülür (Resim 2.12).

Evre 38 (12. gün): Alt göz kapağı cornea'nın üçte iki ila dörtte üçünü kaplar. Göz kapakları arasındaki açıklık azalmıştır (Resim 2.12).

Evre 39 (13. gün): Göz kapakları arasındaki açıklık ince bir çizgi şekline gelmiştir (Resim 2.12).



Resim 2.12: 36, 37, 38 ve 39. evrelende civciv embriyoları (Hamburger ve Hamilton, 1951).

Evre 43 (17. gün): Bu evre çalışmamızdaki embriyoların yumurtalardan çıkarılıp lens örneklerinin diseke edildiği evredir. Bu evrede embriyo gelişimi tamamlamaya çok yakındır (Hamburger ve Hamilton, 1951), (Resim 2.13).



Resim 2.13: 43. evrede civciv embriyosu (Hamburger ve Hamilton, 1951).

2.6. Kuluçka Koşulları

Günümüzde inkübatörler ile uygun koşullarda embriyo gelişimi sağlanabilmektedir. Yumurta içinde embriyo gelişiminin başlayabilmesi ve gelişimin sağlıklı bir şekilde tamamlanabilmesi için uygun çevre koşulları gereklidir. Kuluçka döneminin başarılı bir şekilde tamamlanması için inkübatörlerde olması gereken dört önemli faktör vardır. Bunlar; sıcaklık, nem, havalandırma ve çevirmedir (Şenköylü 2001).

2.6.1. Sıcaklık

Döllenmiş yumurtalar uygun sıcaklıktaki kuluçka makinesine yerleştirildikten sonra embriyo gelişimi devam eder. Gelişen embriyo, çevre ısısına hassas olduğundan kuluçka döneminde sıcaklık en kritik faktördür. Optimum gelişim sıcaklığı bütün yumurtalar için aynı değildir. Yumurtalar farklı özelliklerde sahip oldukları için genellikle 37.5-37.7°C arasındaki ortalama inkübasyon sıcaklığı uygulanır. Bu uygun sıcaklık şartlarının üzerinde veya altında bulunan koşullarda da embriyo gelişebilir, fakat sağlıklı embriyolar oluşmaz (Şenköylü 2001).

Civciv embriyosu poikilotermiktir. Bu yüzden yumurta ve çevresindeki sıcaklığın kontrolü, embriyo için kritik öneme sahiptir (Van ve ark., 2005). Kuluçkanın 11. günden önceki erken dönemde, buharlaşmanın vücut sıcaklığını düşürmesi nedeniyle embriyo sıcaklığı kuluçka makinesinin sıcaklığından daha düşüktür. Ancak kuluçka döneminin

ileri aşamalarında, embriyonun metabolik ısısı artar ve bu duruma bağlı olarak embriyo sıcaklığı makine sıcaklığından daha yüksek değerlere ulaşabilir (French 1997).

2.6.2. Nem

Embriyonun sağlıklı gelişimi için yumurtanın içerdiği suyun bir miktarının buharlaşmış olması gerekir. Eğer yumurta içeriği çok çabuk buharlaşırsa civciv normalden küçük, yeterli bir hızda buharlaşmazsa civciv daha iri olur. Su kaybını kontrol edebilmek için yumurtayı çevreleyen havanın nemini kontrol etmek gerekir. İnkübatörde nem oranının %60-70 olmalıdır (Aksoy 1999; Şenköylü 2001).

2.6.3. Havalandırma

Embriyo solunumunun sağlanması için inkübatörün iyi bir havalandırma sistemine sahip olması gerekir. İnkübasyonun ilk haftalarında, embriyolar karbondioksit karşı çok duyarlıdırlar. Bu nedenle karbondioksit oranının %0,1-0,4 arasında olması gerekir. Gelişmekte olan embriyo, sabit bir oksijen düzeyine, karbondioksit ve suyun atılmasına ihtiyaç duyar. Kabuktaki porlar aracılığıyla yumurta içine oksijen alınır ve yine bu porlardan karbondioksit dışarı atılır. Bu sirkülasyon sonucunda embriyo, gelişimi için gerekli olan temiz havayı almış olur. Kuluçka makinesindeki havalandırma yöntemi ile oksijen miktarının normal seviyelerde tutulması sağlanmış olur. Oksijen karbondioksit oranı yaklaşık olarak %0,5'tir. Makine içindeki karbondioksit oranının %1,5-2'yi geçmesi sonucu embriyo ölümleri meydana gelebilir. Kuluçkanın kritik dönemlerinde meydana gelen hipoksi, civciv embriyosunun gelişimini etkilemekte ve bazı anomalilere neden olabilmektedir. Civciv embriyolarının kardiyovasküler sistemi oldukça hassastır. Embriyoların kuluçka esnasında hipoksiye maruz kalmaları, embriyoların yumurtadan çıktıkları dönemde de asites oluşumuna açık hale getirebilmektedir. Ancak, kuluçka makinesindeki 21. günde, karbondioksit oranının %0,54'ten yüksek olması, yumurtadan çıkmak için civcivleri uyarak faydalı yönde etki edebilir (Aksoy 1994; De Smit ve ark., 2006).

2.6.4. Çevirme (Rotasyon)

Gelişen embriyonun kabuk membranlarına yapışmasını engellemek için yumurtaların inkübasyon süresi boyunca düzenli olarak çevrilmesi gerekir. Yumurtalar inkübatör

içinde künt uçları yukarı ve sivri uçları aşağı gelecek şekilde yerleştirilmelidir. Böylece embriyonun baş kısmı künt uçta ve hava odacığına yakın olarak gelişmiş olur. Başlangıçta yumurtaların uzun eksenini düşey ile 45° açı yapacak şekildedir. 90° çevrilmeye yumurta diğer tarafa 45° eğik duruma gelir. Çevirme üç saatte bir veya en az günde beş kez olmalıdır (Şenköylü 2001).

2.7. Cıvciv Embriyosu ile Çalışmanın Avantajları

Cıvciv embriyo modelinin avantajları ve son dönemde hızlı bir şekilde ilerleyen bilimsel gelişmeler; bu modelin hücre biyolojisi, deneysel kanser, embriyonik gelişim ve ilaç geliştirme ile ilgili çalışmalarda kullanım oranının artmasına sebep olmaktadır (Rashidi ve Sottile, 2009). Cıvciv embriyo modeli ile çalışmanın avantajları;

- 1) Yumurtalar, yıl boyunca kolayca temin edilebilir ve ucuzdur (Timmer ve ark., 2001).
- 2) Cıvciv embriyosu gelişim aşamaları çoğu embriyolog, özellikle de Malpighi, Lillie, Huxley ve Hamburger ve Hamilton tarafından ayrıntılı bir şekilde rapor edilmiştir. Ayrıca, çok sayıda yumurta istenen aşamada embriyolar elde etmek için tek seferde inkübe edilebilir (Belecky-adams ve ark., 2008).
- 3) Ucuz ve temini kolay aletlerle yumurtalar açılabilir ve embriyolar ortaya çıkarılabilir Göz dahil olmak üzere manipülasyonlar için birçok dokuya kolayca erişilebilir. (Belecky-adams ve ark., 2008).
- 4) Cıvciv embriyosuna bir stereomikroskop altında manipülasyon ve enjeksiyonlar için erişilebilir. Embriyo invaziv olmayan yöntemlerle gözlemlenebilir (McGrew ve ark., 2004).
- 5) Cıvciv modeli tek başına veya farklı büyüme faktörleri ile kombinasyon halinde kullanılan biyomateryal özelliklerin analizine uygundur (Rashidi ve Sottile, 2009).
- 6) Cıvciv embriyoları kimyasal bileşiklere karşı oldukça duyarlıdır ve erken dönem insan embriyolarına benzerlikleri nedeniyle, fetal programlama ve gelişimsel biyoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılabilir (Chen ve ark., 2014).

7) Gözün embriyonik gelişim dönemi süresi kısadır ve kuluçka dönemi sonunda göz gelişimi tamamlanır. Cıvciv embriyosu gözleri oldukça büyüktür. Fazla miktarda doku varlığı, göz ile ilgili çeşitli çalışmalarda avantaj sağlayabilir (Belecky-adams ve ark., 2008) Cıvciv lens'inin yapısı ve gelişimi, insan lensiyle yüksek derecede benzerlikler gösterir (Li ve ark., 2021).

2.8. Cıvciv Embriyo Modelinde Steroid Kaynaklı Katarakt Oluşumu

Literatürde fare, rat, tavşan, köpek, zebra balığı, buzağı, cıvciv gibi farklı deney hayvan modelleri, kataraktın etyopatogenezi incelemek ve katarakt oluşumunu önleyici terapötikleri araştırmak için kullanılmıştır (Shui ve ark., 1996; Chennamaneni ve ark., 2014; Srinivasarao ve ark., 2019) Steroid kaynaklı kataraktın araştırılmasında cıvciv embriyo modeli kullanılan en köklü hayvan modellerinden biridir (Nishigori ve ark., 1983).

Cıvciv embriolarında steroid uygulamasının farklı dozlarının katarakt oluşumu üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada HC dozları 0.25 ve 0.50 μmol olarak belirlenmiştir. HC korioallantoik zar (CAM) ve hava kesesi (AS) olmak üzere iki farklı bölgeye uygulanmıştır. HC enjeksiyonu cıvciv embriolarının gelişiminin 15. gününde, embrioların gözlerinin disseke edilip katarakt derecelendirmesi ise 17. günde yapılmıştır. Çalışma sonucunda; kontrol gruplarında yer alan lenslerde opaklık gelişmediği, HC uygulanan gruplarda ise farklı derecelerde lens opaklığının gözlemlendiği rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda ortalama lens opaklığı derecelerinin, kontrol gruplarına kıyasla HC gruplarında anlamlı derecede yüksek olduğu, steroid ile indüklenen cıvciv embriyo katarakt modelinde, katarakt oluşumu için HC'nin her iki dozunun (0.25 μmol /yumurta veya 0.50 μmol /yumurta) da katarakt oluşumunu indüklemeye etkili olduğu bildirilmiştir (Duman ve ark., 2018).

Cıvciv embriyo modelinde HC uygulanması sonrası 9. günden 17. güne kadar katarakt oluşumunu inceleyen bir çalışmada; 9. ve 11. günlerde katarakt oluşmadığı, 13. günde dördüncü evre, 15. günde ise beşinci evre katarakt oluştuğu rapor edilmiştir. HC uygulamasının 15. günde yapılıp, 17. günde lens değerlendirilmesi yapıldığında katarakt oluşturma açısından en yüksek etkinin sağlandığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 1995).

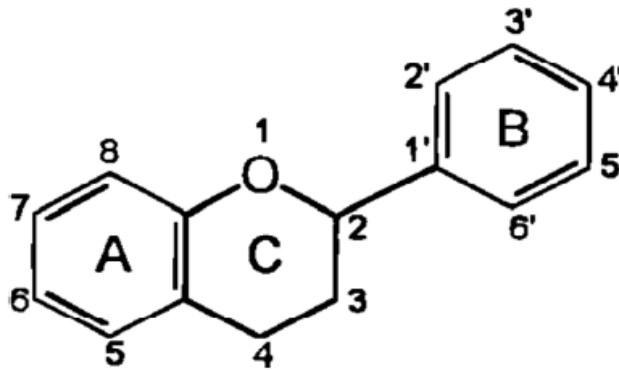
Nishigori ve ark. (2004) civciv embriyo modelinde, döllenmiş yumurtaya HC enjeksiyonundan sonraki 20 saat içinde lens çekirdeğinin çevresinde beyaz bir halka oluştuğunu ve enjeksiyondan sonraki 48 saat içinde lens çekirdeğinin opaklaştığını bildirmişlerdir (Nishigori ve ark., 2004).

2.9. Flavonoidler

Bitkilerde bulunan fenoller genellikle flavonoidler, fenolik asitler, ligninler, sinamik asitler, stilbenler ve biflavonoidler olarak adlandırılır. Bu adlandırma içerdikleri karbon atomlarının sayısına göre yapılmıştır. Flavonoidler kimyasal yapıları ve biyolojik fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda, fenol grupları içerisinde önemli bir yere sahiptir (Robards 1999).

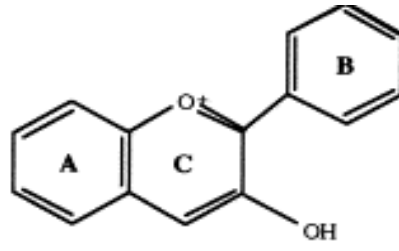
Flavonoidler, polifenollerin bir alt sınıfı olup bitki pigmentleri olarak bilinmektedir. Bitkilere verdikleri renk, lezzet gibi özellikleri ve bitkiler üzerindeki fizyolojik etkileri flavonoidlerin bilinen özellikleridir. Flavonoidler, her biri en az bir hidroksil taşıyan ve bir karbon köprüsü ile bağlanan iki veya daha fazla halka içermesiyle karakterizedir (Ross ve Kasum, 2002; Spencer 2003),(Şekil 2.1).

Flavonoidler genellikle bitkilerde glikolize olmuş formlar olarak bulunur. Yaprak, çiçek ve meyvelerde mavi, kırmızı ve turuncu tonlarının oluşmasını sağlar. Çeşitli sebze ve meyvelerin yanı sıra tohum, yemiş, tahıl, baharat, kırmızı şarap, bira, çay gibi içeceklerde de bulunur. Temel flavonoid yapıları, A, B ve C olarak etiketlenmiş üç halka (C₆-C₃-C₆) halinde düzenlenmiş 15 karbon atomundan oluşan flavan çekirdeğidir (Pietta 2000).

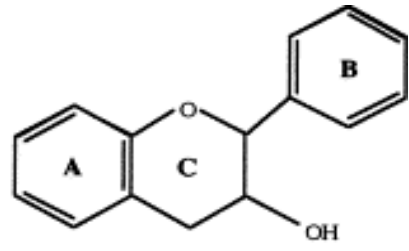


Şekil 2.1: Flavonoidlerin genel yapısı (Pietta 2000).

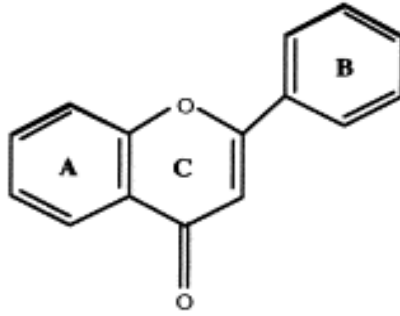
Flavonoidlerin, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin plazma seviyelerini düşürme, trombosit agregasyonunu engelleme, serbest radikalleri temizleme ve hücre çoğalmasını azaltma gibi biyolojik aktiviteleri vardır. Bu aktiviteleri ile antiinflamatuvar, antioksidan, antihepatoksik, antiviral, vaskülokoruyucu ve spazmolitik gibi çeşitli biyolojik özellikler gösterirler. Ayrıca flavonoidlerin kalp damar hastalıkları ve kanser oluşumunu önlemede etkili olduğu belirtilmiştir (Rusznayk ve Szent-Gyorgyi, 1936; Chen ve ark., 1996). Flavonoidlerin sahip oldukları bu fizyolojik etkiler, flavonoidler üzerine olan ilgiyi arttırmıştır. Özellikle antioksidan ve serbest radikalleri temizleme özellikleri son yıllarda araştırmacıların daha da dikkatini çekmiştir. Flavonoidlerin antosiyanidinler, kateşinler, flavonlar, flavonoller, flovononlar ve isoflovonlar olmak üzere altı alt sınıfı bulunur (Hollman ve Arts, 2000; Pietta 2000; Zanolli ve ark., 2000; Woodman ve Chan, 2004; Montoro ve ark., 2005), (Şekil 2.2).



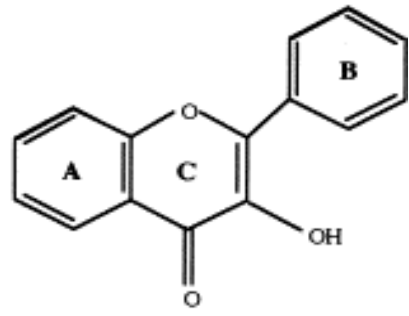
ANTHOCYANIDINS



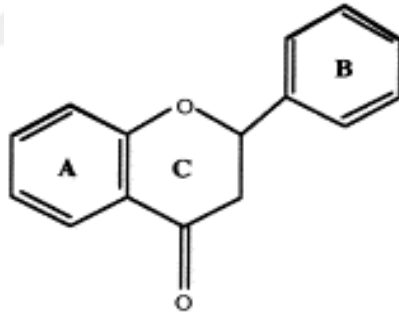
CATECHINS



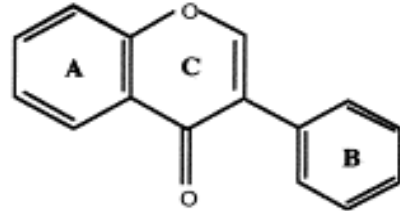
FLAVONES



FLAVONOLS



FLAVANONES



ISOFLAVONES

Şekil 2.2: Flavonoidlerin ana sınıfları (Aherne ve O'Brien, 2002).

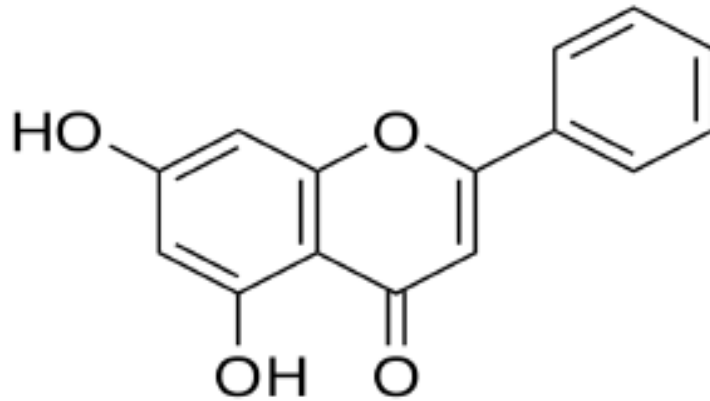
2.10. Chrysin

Chrysin, flavonlar alt grubuna ait olup, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan ve besin takviyesi olarak da kullanılan doğal bir flavonoiddir. Özellikle bal ve propolis olmak üzere çilek, üzüm, brokoli, kereviz, kızcık, marul, zeytin, soğan ve maydanoz gibi birçok bitki içeriğinde yüksek oranda bulunmaktadır. Chrysin (5,7-dihidroksiflavon) tutku çiçeklerinden *Passiflora caerulea*, *Passiflora incarnata* ve *Oroksilum indicum*'dan da elde edilir (Kedika ve ark., 2016).

2.10.1. Chrysin'in Yapısı

Chrysin, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry) tarafından 5,7-dihidroxy-2-phenyl-4-chromenone olarak isimlendirilmiş olup $C_{15}H_{10}O_4$ olarak formüle edilmiştir (Şekil 2.3). Yapı itibarıyla katı bir maddedir. Molekül ağırlığı 254,24 dalton'dur. Chrysin de diğer flavonlarda olduğu gibi C halkasında C2-C3 arasında çift bağ bulunur ve C-3'te oksijen yoktur (Kedika ve ark., 2016).

Chrysin yapısında iki benzen halkası (A ve B) ve bir oksijen barındıran heterosiklik halkadan oluşur. Bu yapısal sınıflandırmaya göre, chrysin flavon sınıfına girer. Ayrıca beşinci ve yedinci karbon atomlarında –OH grupları içerir. Diğer flavonoidlerin aksine, chrysin, B halkasında herhangi bir oksijenasyonu paylaşmaz. Esas olarak, halka-A oksijenasyonundaki çeşitlilik, wogonin, baicalein ve oroxylin A gibi çeşitli chrysin türevlerinden sorumludur (Naz ve ark., 2019).



Şekil 2.3: Chrysin'in kimyasal yapısı (Nabavi ve ark., 2015).

2.10.2. Chrysin'in Etki Mekanizması

Literatürde yapılan çalışmalar, chrysin'in antiinflamatuvar, antidiyabetik, antibakteriyel, antialerjik, antikanser ve antioksidan etkileri ile birden fazla biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Lapitot ve ark., 2002; O'Leary ve ark., 2004; Karthikeyan ve ark., 2013). Bununla birlikte chrysin, apigenin, baicalein ve skutellarein gibi diğer bazı flavonlarla birlikte azot fiksasyonunda ve kimyasal savunmada önemli biyolojik roller oynar. Chrysin, tüm bu farmakolojik özellikleri sebebiyle son yıllarda yapılan araştırmalarda popüler hale gelmiştir. Chrysin'in antiinflamatuvar ve antitoksik gibi

biyolojik aktiviteleri, B ve C halkalarında oksijenlenme olmaması ile ilişkilidir (Kedika ve ark., 2016; Naz ve ark., 2019).

2.10.2.1. Antikanser Etkisi

Literatürde chrysin uygulamasının, makrofajların, sitotoksik lenfositlerin ve immün sistem hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırdığı, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği rapor edilmiştir (Celińska-Janowicz ve ark., 2018). Chrysin uygulaması, karsinogenez sırasında oksidan ve antioksidan durumunun dengesini düzenleyen lipid peroksidasyonu ve antioksidanların durumunu iyileştirmiştir (Karthikeyan ve ark., 2013). Yukarıda saymış olduğumuz özellikleri ve antitümör etki sergilemesine olanak sağlayan uygun kimyasal bağları nedeniyle, chrysin kanser araştırmalarında önemli bir bileşik haline gelmiştir (Birth ve ark., 1996).

2.10.2.2. Antiinflamatuvar Etkisi

Literatürde Chrysin'in antiinflamatuvar etkilerinin, inflamatuvar sitokin regülasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Chrysin, makrofajları NF-κB yolu üzerinden aktive ederek IFN-γ ve TNF-α gibi inflamatuvar sitokin üretimini inhibe etmektedir (Ha ve ark., 2010; Ciftci ve Özdemir, 2011). Chrysin'in antiinflamatuvar mekanizması, iNOS ve COX-2 üretimini azaltan NF-κB'nin bir antagonisti olmasına dayanır (O'Leary ve ark., 2004; Bae ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011; Xiao ve ark., 2014). Çeşitli çalışmalar, chrysin'in antioksidan ve radikal temizleyici etkilere sahip olduğunu ve kronik böbrek hastalığında iltihaplanmayı ve fibrozu azalttığını göstermiştir (Chiu ve ark., 2013).

2.10.2.3. Kardiovasküler Hastalıklar Üzerindeki Etkisi

Ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı, kardiyak hipertrofi, kardiyomiopatiler ve konjestif kalp yetmezliği gibi çeşitli kardiovasküler hastalıkların (CVD) oluşmasında oksidatif stres, inflamasyon, dislipidemi, vasküler endotel hücre disfonksiyonu ve vasküler hücrelerin çoğalması gibi çeşitli mekanizmalar rol oynar. (Farkhondeh ve ark., 2019). Literatürde yapılan çeşitli çalışmalarda, doğal antioksidanların oksidatif stresi azaltarak CVD'leri iyileştirebileceği belirtilmiştir (Samarghandian ve ark., 2003; Samarghandian ve ark., 2017). Bu bağlamda chrysin'in

antioksidan özellikleri ve kardiyovasküler problemler üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Mantawy ve ark., 2014; Patel ve ark., 2016). Chrysin'in kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki antioksidan etkisi 5. ve 7. aromatik halkaların konumu ile ilgilidir (Sharma ve ark., 2019). Chrysin kan lipid profilini iyileştirir, endotelial nitrik oksidin biyoyararlanımını artırarak vasküler fonksiyonu düzenler. Chrysin, vasküler inflamasyonu azaltarak ateroskleroz gelişimini önler. Chrysin'in antiinflamatuvar etkileri, nükleer transkripsiyonel faktör-kB sinyal yolu üzerindeki inhibitör etkisi ile ilişkili olabilir. Ayrıca vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve trombogenezi önler. Chrysin, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için doğal bir ajan olarak etkilidir (Farkhondeh ve ark., 2019). En etkili kemoterapötik ilaçlardan biri olan doksorubisin (DOX) kullanımına bağlı kardiyotoksikite oluşumu ve chrysin'in koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada; chrysin alımının oksidatif stres riskini ve DOX'un sebep olduğu apoptotik etkiyi önemli ölçüde azalttığı, sonuç olarak akut kardiyotoksikiteye karşı koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Mantawy ve ark., 2014).

2.10.2.4. Antidiyabetik Etkisi

Diabetes mellitus (DM), glikoz metabolizmasının yanı sıra vücudun genel fizyolojisini bozan metabolik bir bozukluktur. (Naz ve ark., 2019). Artan oksidatif stres DM patogeneğinde önemli bir rol oynar. Anormal derecede yüksek serbest radikal seviyeleri ve antioksidan savunma mekanizmalarının aynı anda azalması hücrel organellerin ve enzimlerin zarar görmesine, lipid peroksidasyonunun artmasına ve insülin direncinin gelişmesine neden olabilir. Oksidatif stresin bu sonuçları DM komplikasyonlarının gelişimini teşvik edebilir (Maritim ve ark., 2003).

Deneyisel diyabet modelinde; Chrysin'in tip-2 diyabetik Wistar albino ratlarda insülin sinyali transdüksiyonunun aktivasyonu yoluyla glisemik kontrolü iyileştirdiği ve glut4 proteinlerinin yanı sıra kan şekeri, serum insülin, lipid profili ve insülin sinyal moleküllerinin değişen seviyelerini de normalleştirdiği bildirilmiştir (Satyanarayana ve ark., 2015).

Streptozotosin kaynaklı diyabetik ratlar üzerinde Chrysin'in antidiyabetik etkisinin incelendiği başka bir çalışmada; chrysin'in, Bcl-2 ekspresyonunun artması, Bax ve

kaspaz-3'ün ekspresyonlarının azalması ile karakterize olan apoptotik süreci azalttığı bildirilmiştir. Benzer şekilde chrysin'in çok sayıda enzim sisteminin ekspresyonundaki değişiklikleri normalleştirdiği ve peroksidasyonu azalttığı ve böylece nitrooksidatif stresi inhibe ettiği gösterilmiştir (Rani ve ark., 2016).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Öncelikle çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvuruldu ve 26.08.2020 tarihli 49533702 sayılı Etik Kurul izni alındı. Ayrıca bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi (AFSÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 20.LİS.001 numaralı proje ile desteklendi. Çalışmanın her aşamasında yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmanın deney aşaması ve morfolojik analizleri, AFSÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Anatomi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışmanın TAS, TOS, GSH, MDA, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerlerinin analizi AFSÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda, histolojik preparatlarda TUNNEL boyama yöntemi ile apoptoz değerlendirilmesi ise AFSÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.1. Deney Hayvanları

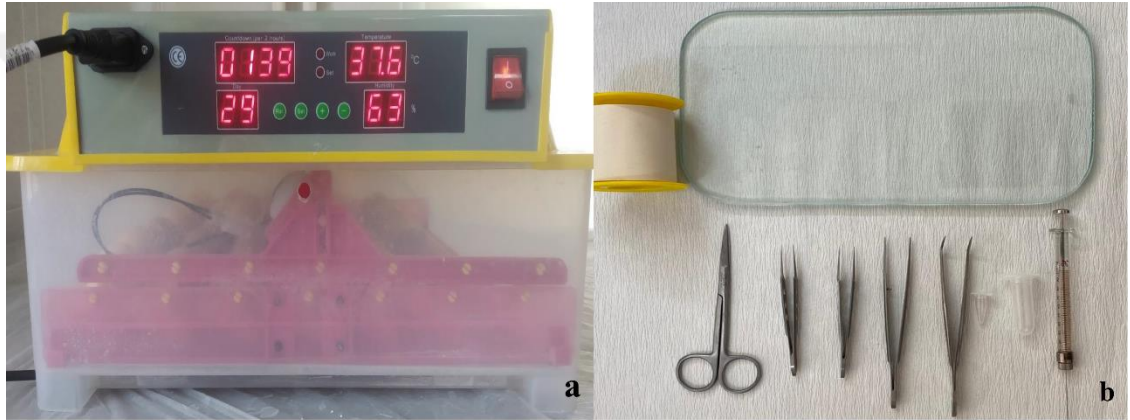
Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 60 ± 5 gr olan 150 adet döllenmiş SPF yumurta kullanıldı. SPF yumurtalar İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi. Yumurtalar sivri uçları aşağıya gelecek şekilde inkübatöre yerleştirildi. Kuluçkaya koyuldukları gün 0. gün olarak kabul edildi.



Resim 3.1: 0 günlük fertil SPF (Specific Patogen Free) yumurtalar.

3.2. Laboratuvar Koşulları

Çalışmanın deney aşamasında AFSÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan inkübatör kullanıldı. İnkübatör 37°C sıcaklıkta %70 bağıl nemde olacak şekilde ayarlandı. İnkübatör dışında kullanılan malzemeler; 150 adet 0 günlük, White Leghorn cinsi, fertil, 60±5 gr ağırlığında SPF yumurta, büyük cam, penset, forceps, Hamilton mikroenjektörü, flaster, makas, eppendorf tüpleri, Stemi 1000/2000/2000-C marka Stereo Mikroskop ve Olympus CX21 marka ışık mikroskobu şeklindedir.



Resim 3.2: a) Çalışmada kullanılan inkübatör, b) Çalışmada kullanılan materyaller

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Yumurtaların inkübatöre koyuldukları gün 0. gün olarak kabul edildi. İnkübasyonun 15. gününde katarakt oluşturulacak gruplardaki yumurtalara HC enjeksiyonu yapıldı. HC uygulaması sonrası 3. saatte, HC uygulanan yumurtalar arasından rastgele seçim yapılarak, 4 adet deney grubu (HC ve HC+chrysin grupları) oluşturuldu. HC uygulaması yapılmayan yumurtalar arasından rastgele seçim yapılarak kontrol ve mısır yağı grupları belirlendi. 150 adet döllenmiş SPF yumurta, her grupta 25 adet olmak üzere 6 gruba ayrıldı.



Resim 3.3: 15. günde grupların oluşturulması ve yumurtaların inkübatöre yerleştirilmesi.

Kontrol Grubu:

Bu gruptaki yumurtalar 15 gün süre ile uygun koşullarda inkübe edildi. 15. günde yumurtalar inkübatörden çıkarıldı ve her bir yumurtaya 0.1 ml hacminde serum fizyolojik (SF) Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile uygulandı. Yumurtalar daha sonra tekrar kuluçka makinesine yerleştirildi. 48 saat sonra (inkübasyonun 17. günü) inkübasyon sonlandırıldı ve yumurtalar açılarak, embriyolar disseke edilip, dış ortama alındı.

HC Grubu:

Bu gruptaki yumurtalar 15 gün süre ile uygun koşullarda inkübe edildi. 15. günde yumurtalar inkübatörden çıkarıldı ve her bir yumurtaya 0.1 ml hacminde HC (100 μ L içinde 0.5 milimol) Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile enjekte edildi. Daha sonra tekrar kuluçka makinesine yerleştirildi. İnkübasyonun 17. günü yumurtalar açılarak, embriyolar disseke edilip, dış ortama alındı.

Mısır Yağı Grubu:

Bu gruptaki yumurtalar 15 gün süre ile uygun koşullarda inkübe edildi. 15. günde yumurtalar inkübatörden çıkarıldı ve her bir yumurtaya 0.1 ml hacminde mısır yağı Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile uygulandı. Yumurtalar daha sonra tekrar kuluçka

makinesine yerleştirildi. İnkübasyonun 17. gününde yumurtalar açılarak, embriyolar disseke edildi.

HC ve 25 Mg/ Kg Chrysin Verilen Grup:

Bu gruptaki yumurtalar 15 gün süre ile uygun koşullarda inkübe edildi. 15. günde yumurtalar inkübatörden çıkarıldı ve her bir yumurtaya 0.1 ml hacminde HC (100 mikroL içinde 0.5 milimol) Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile enjekte edilerek, yumurtalar tekrardan inkübatöre yerleştirildi. HC enjeksiyonunu takiben, üç saat sonra %0.01'lik dimetil sülfoksitte (DMSO) çözünüp mısır yağı ile seyreltilen chrysin, 100 µL içinde 25 mg/kg olacak şekilde Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile enjekte edildikere, yumurtalar tekrardan inkübatöre konuldu. İnkübasyonun 17. günü yumurtalar açılarak, embriyolar disseke edilip, dış ortama alındı.

HC ve 50 Mg/ Kg Chrysin Verilen Grup:

Bu gruptaki yumurtalar 15 gün süre ile uygun koşullarda inkübe edildi. Yumurtalara 15. günde 0.1 ml hacminde HC (100 µL içinde 0.5 milimol) Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile enjekte edildi. HC enjeksiyonunu takiben, üç saat sonra %0.01'lik DMSO'da çözünüp mısır yağı ile seyreltilen chrysin, 100 µL içinde 50 mg/kg olacak şekilde Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile uygulandı. İnkübasyonun 17. günü yumurtalar açılarak, embriyolar disseke edildi.

HC ve 100 Mg/ Kg Chrysin Verilen Grup:

Bu gruptaki yumurtalar 15 gün süre ile uygun koşullarda inkübe edildi. Yumurtalara 15. günde 0.1 ml hacminde HC (100 µL içinde 0.5 milimol) Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile enjekte edildi. HC enjeksiyonunu takiben, üç saat sonra %0.01'lik DMSO'da çözünüp mısır yağı ile seyreltilen chrysin, 100 µL içinde 100 mg/ kg olacak şekilde Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile uygulandı. İnkübasyonun 17. günü yumurtalar açılarak, embriyolar disseke edilip, dış ortama alındı.

Tablo 3.1: Deney gruplarının dağılımı.

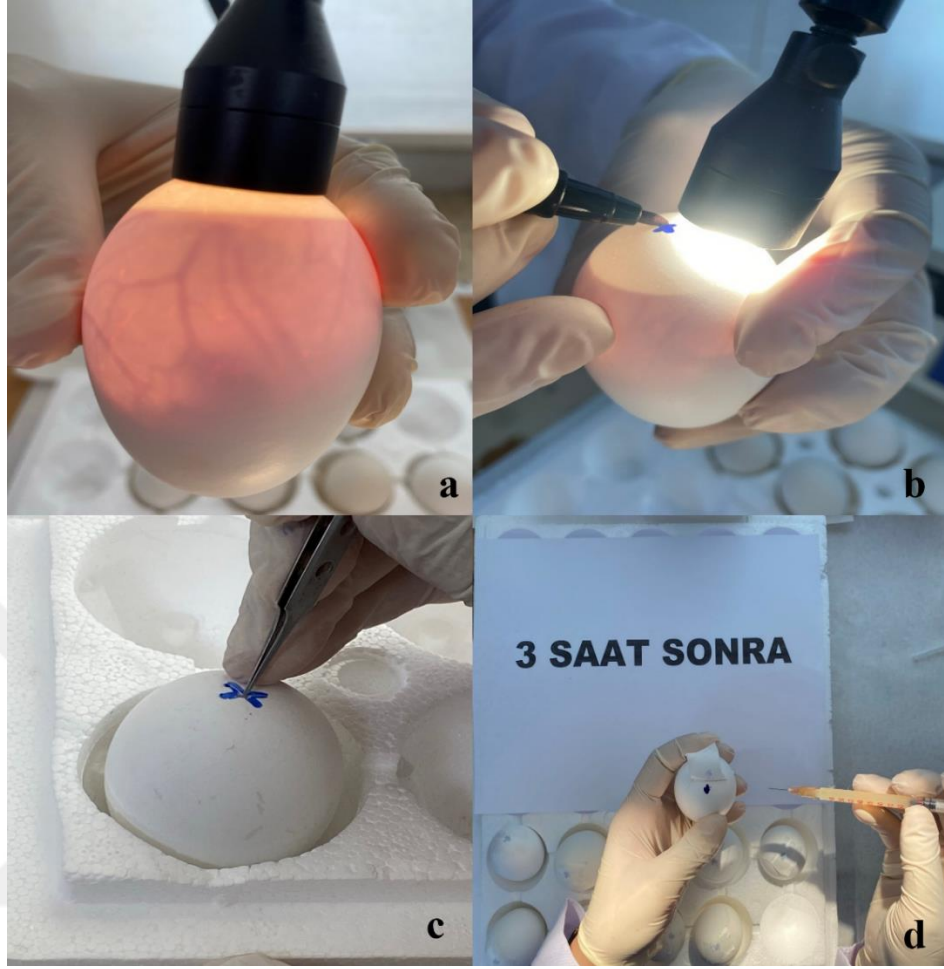
Gruplar	Verilen madde miktarı	Verilme şekli	Verilme miktarı	Verilme sıklığı	Verilme günü
Kontrol	SF (100 µL)	Air sac	0.1 ml	1 kez	15.GÜN
Mısır yağı	100 µL	Air sac	0.1 ml	1 kez	15.GÜN
HC	HC (100 µL içinde 0.50 mikromol)	Air sac	0.1 ml	1 kez	15.GÜN
HC+ Chrysin	HC (100 µL içinde 0.50 mikromol) + Chrysin (100 µL içinde 25 mg/kg)	Air sac	0.2 ml	1 kez	15.GÜN
HC + Chrysin	HC (100 µL içinde 0.50 mikromol) + Chrysin (100 µL içinde 50 mg/kg)	Air sac	0.2 ml	1 kez	15.GÜN
HC + Chrysin	HC (100 µL içinde 0.50 mikromol) + Chrysin (100 µL içinde 100 mg/kg)	Air sac	0.2 ml	1 kez	15.GÜN

3.4. Deney Aşamaları

3.4.1. Cıvciv Embriyolarına HC ve Antioksidan Madde (Chrysin) Enjeksiyonu

İnkübasyonun 15. gününde yumurtalar kuluçka makinesinden çıkarıldı, yumurta kabuğu batikon ve %70 etanol kullanılarak steril hale getirildi. Işık altında yumurtanın hava kesesi bulundu ve kalem ile bölge işaretlendi. Bu işaretin olduğu bölgeden yumurta kabuğu delinerek yaklaşık 3-5 mm yarıçaplı pencereler açılıp, buradan Hamilton ve/veya insülin enjektörü ile daha önce hazırlanmış olan HC; HC grubuna, düşük doz, orta doz ve yüksek doz HC+chrysin gruplarına enjekte edildi. Kontrol ve mısır yağı gruplarına ise aynı yöntemle SF ve mısır yağı uygulaması yapıldı (Resim 3.4). Yumurtalarda açılan delikler steril drape ile kapatılarak kuluçka makinesine tekrar yerleştirildi.

HC enjeksiyonundan üç saat sonra yumurtalar tekrar dış ortama alındı ve tedavi gruplarına (HC+Chrysin gruplarına) chrysin tablo 3.1’de gösterilen dozlarda daha önceden açılmış olan pencerelerden enjekte edildi. Tüm enjeksiyonlar sonrasında yumurtalardaki pencereler steril drape ile tekrar kapatıldı ve yumurtalar gruplar şeklinde kuluçka makinesine 48 saat daha kalmak üzere yerleştirildi.



Resim 3.4: 15. günde civciv embriyolarına HC ve chrysin enjeksiyonu aşamaları;

- a) Işık altında yumurtanın hava kesesinin belirlenmesi
- b) Hava kesesine denk gelen üst noktanın işaretlenmesi
- c) İşaretlenen noktadan delik açılması
- d) HC enjeksiyonunu takiben 3 saat sonra yumurtaya chrysin enjeksiyonu

3.4.2. Civciv Embriyolarının Elde Edilmesi ve İncelenmesi

İnkübasyonun 17. gününde tüm yumurtalar gruplar şeklinde cihazdan alınıp kabukları kırıldı ve embriyolar yumurtadan çıkarıldı. Stereomikroskop altında embriyoların bulbus oculi'leri disseke edildi (Resim 3.5, 3.6).

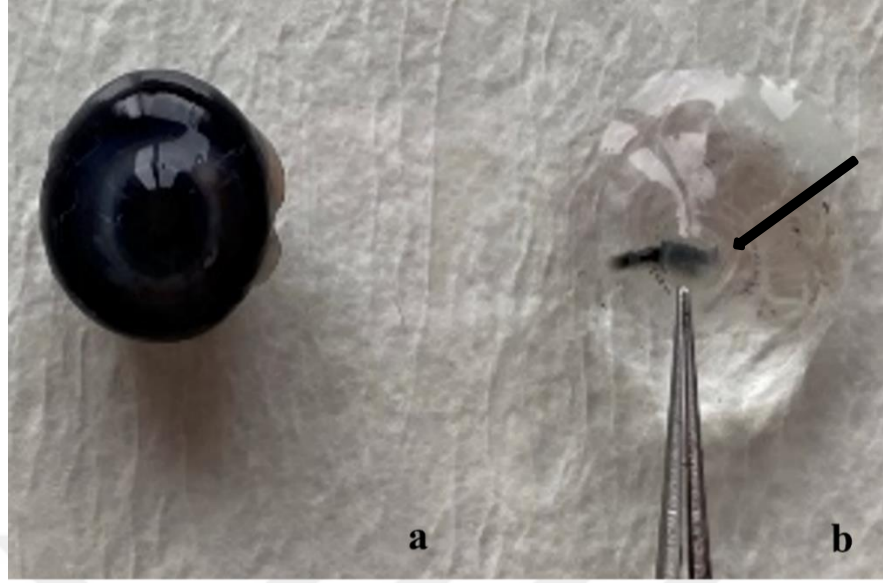
Her grupta 9 embriyonun lensi katarakt derecelendirilmesi ve 8 embriyonun lensi biyokimyasal analizler için bulbus oculi'den disseke edilirken, geri kalan 7 embriyonun bulbus oculileri bütün olarak histolojik doku takibi için önceden hazırlamış olduğumuz fiksatif içine alındı. Her grupta bir embriyo gelişim geriliği gösterdiği veya diseksiyon sırasında lensleri zarar gördüğü için çalışma dışı bırakıldı (Resim 3.7).

Morfolojik analiz için ayrılan lensler stereo ve ışık mikroskopları altında incelendi ve fotoğrafları çekildi. Tüm gruplarda bulunan embriyoların ayrı ayrı katarakt dereceleri belirlendi. Biyokimyasal analizleri AFSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapılacak olan lens örnekleri eppendorflere konularak -20 °C saklandı.



Resim 3.5: Embriyoların yumurtalardan çıkarılması ve bulbus oculi diseksiyonu.

- a) Yumurta kabuğunun kırılarak embriyonun çıkarılması
- b) Yumurtadan 17. günde çıkarılmış embriyo
- c) Embriyodan bulbus oculi diseksiyonu
- d) Bulbus oculi'leri çıkarılmış embriyo



Resim 3.6: a) Cıvciv embriyosuna ait bulbus oculi, b) Cıvciv embriyosuna ait lens.



Resim 3.7: 17. günde yumurtadan çıkarılan ve gelişim geriliği gösteren embriyolar.

3.4.3. Katarakt Derecelendirmesinin Yapılması

17. günde (HC enjeksiyonundan 48 saat sonra) tüm cıvciv embriyoları gruplar şeklinde yumurtadan çıkarıldı. Daha sonra rastgele seçilen 8 embriyonun lensleri, diseksiyon mikroskobu altında corneal limbus kesisi ile bulbus oculi'den disseke edildi. Her bir embriyoya ait lenslerin ışık mikroskobu altında katarakt derecelendirilmesi yapıldı. Derecelendirme literatür ile uyumlu bir şekilde 5 dereceli bir puanlama sistemi kullanılarak gerçekleştirildi; 1: lens opaklığı yok; 2: lens çekirdeğinin çevresinde soluk beyaz halka; 3: lens çekirdeğinin çevresinde berrak beyaz halka; 4: lens çekirdeğinin

opaklığı, çekirdeğin merkezine yayılmıyor; 5: çekirdeğin merkezine yayılan lens çekirdeğinin opaklığı (Lee ve ark., 1995; Ishikawa ve ark., 2015).

3.5. Biyokimyasal Analiz

Biyokimyasal analizler için bir embriyodan alınan iki lens tek bir numune olarak kabul edildi. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında çalışılmak üzere ayrılan lensler öncelikle tartıldı. Tartım sonrası 0,1 M pH: 7,4 fosfat tamponundan ilave edilerek Ultra Turrax (IKA Works, USA) marka homojenizatörle buz içerisinde 24,000 devir/dk da bir dakika homojenize edildi. Homojenatlara daha sonra Dr. Hielscher (Germany) marka sonikatörle 20,000 cycle/sec olacak şekilde bir dakika ultrasonikasyon gerçekleştirildi. Ardından homojenatlar 10,000 g'de 15 dk santrifüj edilerek supernatant ayrılmasına müteakip, çalışılincaya kadar -20 derecede saklandı. Lens örneklerinden GSH, MDA, TAS ve TOS seviyeleri ile oksidan ve antioksidan düzeyleri belirlendi. Aynı zamanda apoptotik marker olan kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyelerinin analizi için de uygun elisa kitleri kullanılarak biyokimyasal analiz gerçekleştirildi.

3.5.1. Lens Homojenatının Hazırlanması

Alınan lens örnekleri üzerine 0.1 M pH:7.4 fosfat tamponundan 300 µl 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 süpernatant ayrıldı.



Resim 3.8: a) Lenslerin sonikatörle ultrasonikasyonu, b) Homojenatların 10.000 g santrifüj edilmesi.

3.5.2. Ölçümler

Doku homojenatından GSH düzeyleri BT-Lab marka (BT-Lab, Zhejiang, China) Chicken Glutathione Elisa Kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar nmol/lens olarak verildi. Doku homojenatından TAS, TOS, MDA, kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri AFG Bioscience (1818 Skokie Boulevard, Northbrook, IL 60062, USA) marka elisa kitleri kullanılarak çalışıldı. Sonuçlar MDA için $\mu\text{mol/Lens}$, TAS için U/Lens, TOS için pg/Lens, kaspaz-3 ve kaspaz-9 için ng/Lens olarak verildi. Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA).

3.6. Histolojik Doku Takibi

Disseksiyon sonrası çıkarılan embriyolara ait gözler histolojik doku takibi için önceden hazırlamış olduğumuz fiksatif içine oda sıcaklığında 30 dk bekletilmek üzere konuldu. Bu fiksatif glasiyal asetik asit, formaldehit, SF ve %75 etanol solüsyonlarının sırasıyla 1:2:7:10 oranlarında karıştırılmasıyla elde edildi. Göz küresi yüzeyi sertleştğinde, göz kürelerine arka kamaradan fiksatif enjekte edildi ve 2 saat fiksatif içinde bekletildi. Göz örnekleri keskin bir bıçak veya iğne ucu kullanılarak üst ve alt bölümlerden delindi ve ardından 2 saat oda sıcaklığında tekrar fikse edildi. Daha sonra göz örnekleri %10 nötral formalin içinde fiksasyona bırakıldı. Fikse edilen dokular otomatik doku takip cihazında (Leica TP1050) rutin histolojik doku takibine alındı ve parafin içerisine sagittal olarak gömülerek parafin bloklar elde edildi. Bu bloklardan 4-5 μm kalınlığında kesitler pozitif

şarjlı lamalar üstüne alındı ve apoptotik hücreleri gözlemlemek amacıyla TUNEL boyamasına tabi tutuldu.

3.6.1. Tunel Boyama

İmmunohistokimyasal boyama (TUNEL) için aşağıdaki basamaklar gerçekleştirildi;

1. Örnekler deparafinize edildi ve 5 dk PBS'te yıkandı
2. Örnekler taze hazırlanmış Proteinase K (20 µg/mL) ile 15 dakika muamele edildi.
3. Örnekler 2x 2 dk dH₂O'da yıkandı.
4. PBS içinde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile oda sıcaklığında 5 dakika süreyle endojen preoksidaz blokajı yapıldı.
5. Örnekler 2 x 5 dk. PBS ile yıkandı.
6. Ardından dengeleme tamponu uygulandı.
 - Kesitin etrafındaki fazla sıvı hafifçe çekildi
 - Örneğin üzerine 75 µL Equilibration Buffer uygulandı.
 - Oda sıcaklığında en az 10 saniye inkübe edildi.
7. Kesitlerin üzerine 55 µL TdT Enzyme damlatıldı.
8. 37 ° C' de nemli bir etüv içerisinde 1 saat inkübe edildi.
9. Durdurma/Yıkama Tamponu Uygulandı. 15 saniye çalkalandı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. İstenen sayıda örneği işlemek için yeterli miktarda Anti-Dıgoxıgnenin Conjugate çıkarılıp, oda sıcaklığında ısıtıldı.
 - Anti- Digoksigenin Konjugatı uygulandı. Kesitler 3x1 dk PBS ile yıkandı.
 - Fazla sıvı hafifçe çekildi ve etrafı dikkatlice kurutuldu.
 - Herbir kesite 65 µL Anti-Dıgoxıgnenin Conjugate uygulandı
 - Oda sıcaklığında 30 dakika nemli bir odada inkübe edildi.

11. 4x2 dk PBS ile yıkandı.

12. Kesitler yıkanırken Peroxıdase Substrate hazırlandı.

13. Örnekleri tamamen kaplayacak kadar Peroxıdase Substrate uygulandı ($75 \mu\text{L}/5 \text{ cm}^2$).

- Oda sıcaklığında 3 ila 6 dakika boyunca beklendi.
- Optimum boyama süresini belirlemek için mikroskop altındaki slayta bakarak renk gelişimi izlendi.

14. 3x1 dk dH₂O su ile yıkandı

15. Oda sıcaklığında 10 dakika boyunca metil yeşili ile zıt boyama yapıldı.

16. Saf alkolde 10 dip yapıldı ardından Xyleneden geçirilerek kapatma solüsyonuyla kapatıldı.

3.6.2. Histolojik Görüntü Analizi

Her bir embriyodan alınan göz dokularından elde edilen kesitlerde, lensin bulunduğu alan ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E600) altında değerlendirildi. Değerlendirmeler yapılırken Nikon NIS Elements 4.2 Görüntü Analiz programı kullanıldı ve koyu kahverengi boyanan hücreler pozitif olarak kabul edildi. Her bir embriyoya ait lenslerde en az 300 hücre sayılarak apoptotik oran (TUNEL pozitif hücre sayısı/Toplam hücre) elde edildi ve istatistiksel olarak analiz edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Tüm bulguların analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 25.0 programı kullanılarak yapıldı. Katarakt seviyeleri, protein içerikleri (TAS, TOS, MDA, GSH) ve apoptoz skorları parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi. Post-hoc test olarak Dunn testi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ($M \pm SD$) şeklinde gösterildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 150 SPF yumurta kullanıldı. Her grupta 25'er adet yumurta olacak şekilde 6 çalışma grubu belirlendi. Gruplarda yer alan 9 embriyoya ait bulbus oculi'lerden lens örnekleri diseke edilerek stereomikroskop altında incelendi, fotoğrafları çekildi ve katarakt dereceleri belirlendi. Her grupta geriye kalan embriyolardan 8 tanesinin lensleri biyokimyasal analiz yapılmak üzere, 7 tanesine ait bulbus oculi'ler ise bütünlüğü korunacak şekilde histolojik parametrelerin değerlendirilmesi için ayrıldı. Her grupta bir embriyo gelişim geriliği gösterdiği veya manüplasyon sırasında lensleri zarar gördüğü için çalışma dışı bırakıldı.

4.1. Katarakt Derecelerine Ait Bulgular

Çalışmamızda her grupta 9 embriyoya ait lens örnekleri bulbus oculi'lerden diseke edilerek çıkarıldı ve her bir lens çifti katarakt derecenlendirmesi için ayrıldı. Derecelendirme literatürde daha önce kullanılan sınıflandırma referans alınarak yapıldı. 5 kademeli katarakt derecelendirme ölçeği kullanıldı.

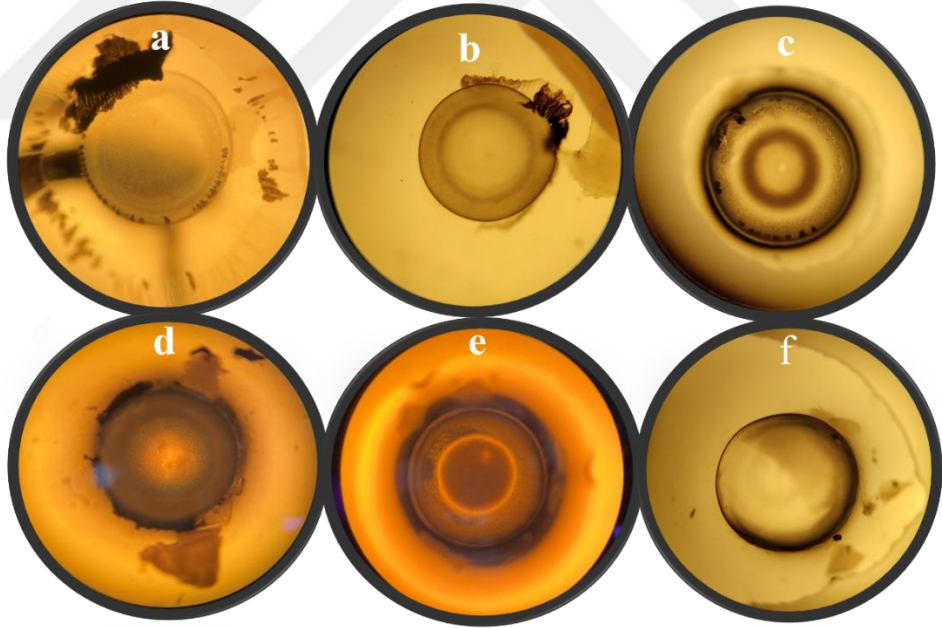
Elde edilen verilere göre kontrol ve mısır yağı verilen grupta yer alan embriyolara ait lensler için ortalama katarakt derecesi 1 olarak tespit edildi. İncelenen lenslerde opaklığa rastlanmadı (Resim 4.1, Tablo 4.1, Grafik 4.1).

Sadece HC uygulaması yapılan gruptaki embriyolara ait lensler incelendiğinde; bir embriyoda 2., dört embriyoda 3., iki embriyoda 4. ve iki embriyoda 5. derece katarakt gözlemlendi. HC grubunda ortalama katarakt derecesi 3.5 olarak belirlendi ve kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$), (Resim 4.2, Tablo 4.1, Grafik 4.1).

HC uygulaması sonrası düşük doz chrysin ile tedavi edilen grupta yer alan embriyolara ait lenslerin; bir tanesinde 2., altı tanesinde 3. ve iki tanesinde 4. derece katarakt gözlemlendi. Düşük doz chrysin grubunda ortalama katarakt derecesi 3.1 olarak hesaplandı. Düşük doz chrysin grubu ile kontrol grubu katarakt derecesi yönünden karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0.05$), düşük doz grubu ile HC verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$), (Resim 4.3, Tablo 4.1, Grafik 4.1).

Orta doz chrysin verilen gruptaki embriyolara ait lensler katarakt dereceleri yönünden değerlendirildiğinde; HC grubuna kıyasla katarakt derecelerinin azaldığı belirlendi. Grupta yer alan embriyolara ait lenslerin; bir tanesinde 1., dört tanesinde 2. ve dört tanesinde 3. derece katarakt gözlemlendi ve ortalama katarakt derecesi 2.3 olarak hesaplandı. Katarakt derecesi yönünden; orta doz chrysin grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, HC grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p<0.05$), (Resim 4.4, Tablo 4.1, Grafik 4.1).

HC uygulaması sonrası yüksek doz chrysin ile tedavi edilen grupta ortalama katarakt derecesi 1,5 olarak hesaplandı. Gruptaki embriyolara ait lenslerin dört tanesinde 1., beş tanesinde 2. derece katarakt tespit edildi. Katarakt derecesi yönünden; yüksek doz chrysin grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmezken, HC grubu ile yüksek doz chrysin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi ($p<0.05$), (Resim 4.5, Tablo 4.1, Grafik 4.1).



Resim 4.1: Graplara ait katarakt derecelerine ait görseller;

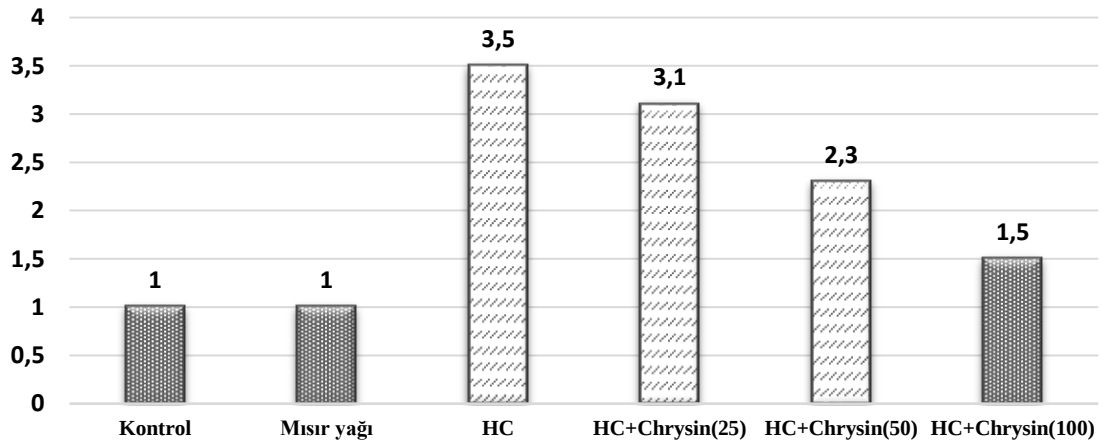
a: Kontrol grubuna ait 1. derece katarakt görseli
c: Orta doz grubuna ait 3. derece katarakt görseli
e: HC grubuna ait 5. derece katarakt görseli

b: Yüksek doz grubuna ait 2. derece katarakt görseli
d: Düşük doz grubuna ait 4. derece katarakt görseli
f: Yüksek doz grubuna ait 1. derece katarakt görseli

Tablo 4.1: Tüm gruplardaki lenslerin katarakt dereceleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum.

Grup	N	KATARAKT DERECELERİ							
		1	2	3	4	5	Ortalama	Min.	Max.
Kontrol	9	9	0	0	0	0	1	1	1
Mısır yağı	9	9	0	0	0	0	1	1	1
HC	9	0	1	4	2	2	3.5	2	5
25 mg/kg Chrysin	9	0	1	6	2	0	3.1	2	4
50 mg/kg Chrysin	9	1	4	4	0	0	2.3	1	3
100 mg/kg Chrysin	9	4	5	0	0	0	1.5	1	2

Grafik 4.1: Tüm gruplara ait lenslerdeki katarakt dereceleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayan gruplar koyu renkle gösterilmiştir.



4.2. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

4.2.1. GSH Düzeyine Ait Bulgular

Çalışmamızda her gruptan sekiz embriyoya ait lens örnekleri biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi için ayrıldı. Her bir embriyoya ait iki lens tek numune olarak kabul edildi. Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda kontrol grubunda ortalama GSH düzeyi 7.57 nmol/lens olarak belirlenirken, sadece mısır yağı verilen grupta ise 7.24 nmol/lens olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmedi ($p>0.05$). Sadece HC uygulanan grupta, kontrol ve mısır yağı gruplarına kıyasla GSH değeri azaldı ve ortalama GSH değeri 5.93 nmol/lens olarak hesaplandı. Kontrol ve mısır yağı grupları ile HC verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). HC'ye ilaveten chrysin verilen tedavi gruplarında ise düşük doz grubundan yüksek doz grubuna doğru ortalama GSH düzeyleri sırası ile 6.04, 6.91 ve 7.22 nmol/lens olarak belirlendi. Uygulanan chrysin doz oranına bağlı olarak HC uygulaması ile azalan GSH seviyesinin tedavi gruplarında arttığı gözlemlendi. Tedavi gruplarından elde edilen veriler HC grubu ile karşılaştırıldığında; orta doz ve yüksek doz chrysin grupları için aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0.05$), düşük doz chrysin grubu ile HC grubu arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Ayrıca chrysin verilen gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında düşük doz ile yüksek doz chrysin grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0.05$), orta ve yüksek doz chrysin grupları arasında fark anlamlı bulunmadı ($p>0.05$), (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Tablo 4.2: Tüm gruplara ait GSH (nmol/lens) düzeyleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum, GSH: Glutatyon.

Grup	N	GSH			p*
		Ortalama±SS	Min.	Max.	
Kontrol	8	7.57±0.88 ^{c,d}	6.61	8.94	p<0.05
Mısır yağı	8	7.24±1.36 ^{c,d}	5.04	8.69	
HC	8	5.93±0.35 ^{a,b,e,f}	5.54	6.54	
25 mg/kg Chrysin	8	6.04±0.81 ^{a,b,f}	4.58	7.21	
50 mg/kg Chrysin	8	6.91±0.85 ^c	5.19	7.78	
100 mg/kg Chrysin	8	7.22±1.02 ^{c,d}	5.92	8.91	

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: Mısır yağı grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıdır.

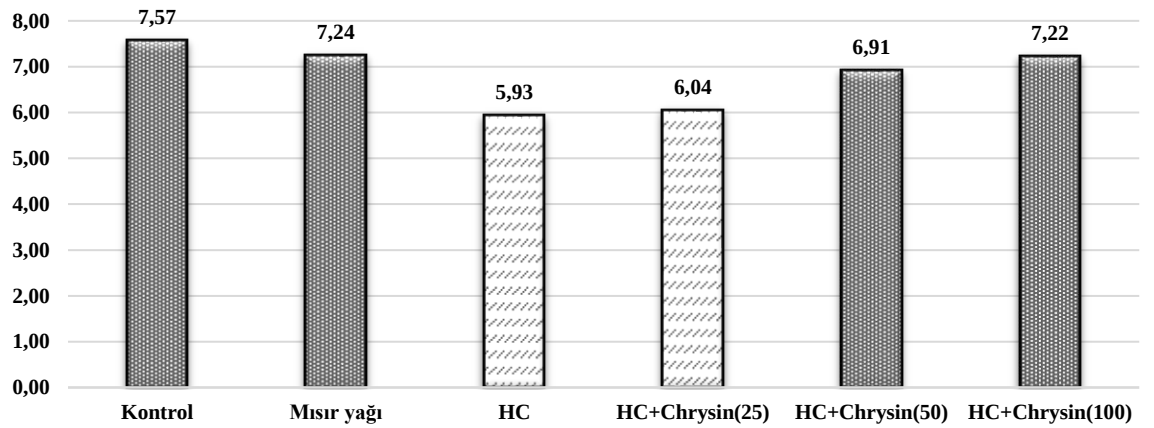
c: HC grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: Düşük doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e: Orta doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

f: Yüksek doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Grafik 4.2: Tüm gruplara ait lenslerdeki GSH (nmol/lens) düzeyleri grafiği. GSH: glutatyon; HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayan gruplar koyu renkle gösterilmiştir.



4.2.2. MDA Düzeyine Ait Bulgular

Çalışmamızda; 8 embriyoya ait lens örneklerinde yapılan biyokimyasal analizler sonucunda kontrol grubunda ortalama MDA düzeyi $4.07 \mu\text{mol/lens}$ olarak, sadece mısır yağı verilen grupta ise $4.32 \mu\text{mol/lens}$ olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmedi ($p>0.05$). Sadece HC verilen grupta, kontrol ve mısır yağı grubuna kıyasla ortalama MDA düzeyi yüksekti ve $9.47 \mu\text{mol/lens}$ olarak hesaplandı. Kontrol ve mısır yağı grupları ile HC verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Chrysin verilen tedavi gruplarında verilen doz oranına bağlı olarak HC uygulaması ile artan MDA seviyesi kademeli olarak azaldı, düşük doz grubundan yüksek doz chrysin uygulanan gruba doğru değerler sırasıyla 6.68, 5.67 ve $4.52 \mu\text{mol/lens}$ olarak hesaplandı. Elde edilen veriler gruplar arasında karşılaştırıldığında; HC grubu ile düşük doz arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$), HC grubu ile orta ve yüksek doz chrysin grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Chrysin verilen tedavi grupları ise kendi içinde istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; gruplardan düşük doz ile yüksek doz grupları arasındaki fark anlamlı bulunurken ($p<0.05$), orta ve yüksek doz chrysin grupları arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0.05$), (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

Tablo 4.3: Tüm gruplara ait MDA ($\mu\text{mol/lens}$) düzeyleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum, MDA: Malondialdehid.

Grup	N	MDA			P
		Ortalama $\pm$ SS	Min.	Max.	
Kontrol	8	4,07 $\pm$ 0,64 ^{c,d,e}	2.95	4.92	p<0.05
Mısır yağı	8	4,32 $\pm$ 0,42 ^{c,d,e}	3.81	4.87	
HC	8	9,47 $\pm$ 1,17 ^{a,b,e,f}	7.66	11.39	
25 mg/kg Chrysin	8	6,68 $\pm$ 0,66 ^{a,b,f}	5.84	7.66	
50 mg/kg Chrysin	8	5,67 $\pm$ 0,45 ^{a,b,c}	5.08	6.34	
100 mg/kg Chrysin	8	4,52 $\pm$ 0,43 ^{c,d,e}	3.99	5.16	

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: Mısır yağı grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıdır.

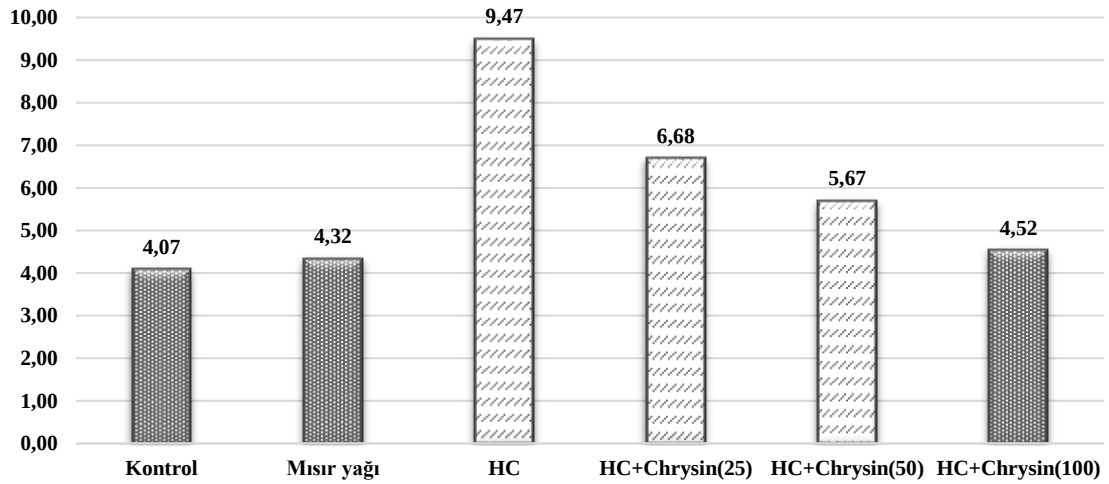
c: HC grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: Düşük doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e: Orta doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

f: Yüksek doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Grafik 4.3: Tüm gruplara ait lenslerdeki MDA ($\mu\text{mol/lens}$) düzeyleri grafiği. MDA: Malondialdehid; HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayan gruplar koyu renkle gösterilmiştir.



4.2.3. TAS Düzeyine Ait Bulgular

Gruplardaki 8 embriyoya ait lens materyallerinin biyokimyasal analizleri sonucunda; kontrol grubunda ortalama TAS değeri 13.13 U/lens olarak belirlenirken, sadece mısır yağı verilen grupta ise 12.52 U/lens olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmedi ($p>0.05$). Sadece HC uygulanan grupta, kontrol ve mısır yağı gruplarına kıyasla TAS düzeyi düşüktü ve ortalama TAS düzeyi 9,62 U/lens olarak tespit edildi. Kontrol ve mısır yağı grupları ile sadece HC verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Chrysin verilen tedavi gruplarında ise düşük doz grubundan yüksek doz grubuna doğru ortalama TAS düzeyleri sırası ile 11.50, 11.57 ve 12.39 U/lens olarak tespit edildi. HC grubunda azalan TAS seviyesinin, chrysin uygulamasına bağlı olarak arttığı ve HC grubu ile karşılaştırıldığında düşük, orta ve yüksek doz chrysin grupları ile HC grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Ayrıca chrysin verilen gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında; TAS düzeyleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$), (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

Tablo 4.4: Tüm gruplara ait TAS (U/lens) düzeyleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum; TAS: Total antioksidan seviyesi.

Grup	N	TAS			P
		Ortalama±SS	Min.	Max.	
Kontrol	8	13.13±2.53 ^c	11.3	16.87	p<0.05
Mısır yağı	8	12.52±1.6 ^c	10.13	14.66	
HC	8	9.62±1.27 ^{a,b,d,e,f}	7.05	10.91	
25 mg/kg Chrysin	8	11.50±1.34 ^c	10.52	13.58	
50 mg/kg Chrysin	8	11.57±0.74 ^c	10.66	12.51	
100 mg/kg Chrysin	8	12.39±1.13 ^c	10.52	13.58	

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: Mısır yağı grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıdır.

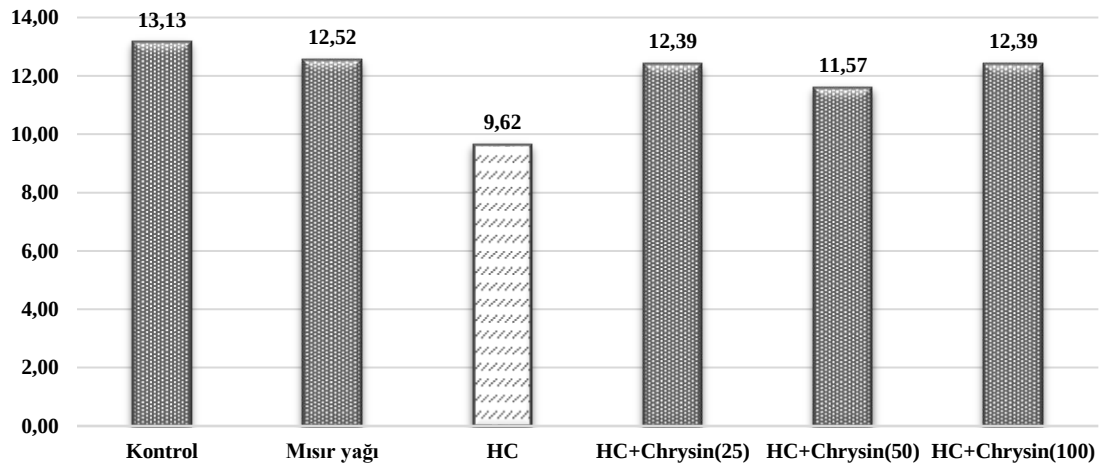
c: HC grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: Düşük doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e: Orta doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

f: Yüksek doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Grafik 4.4: Tüm gruplara ait lenslerdeki TAS (U/lens) düzeyleri grafiği. TAS: Total antioksidan seviyesi; HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayan gruplar koyu renkle gösterilmiştir.



4.2.4. TOS Düzeyine Ait Bulgular

8 embriyoya ait lens örneklerinin biyokimyasal analizler sonucunda kontrol grubunda ortalama TOS düzeyi 170.89 pg/lens olarak belirlenirken, sadece mısır yağı verilen grupta ise 186.82 pg/lens olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmedi ($p>0.05$). Sadece HC uygulanan grupta, kontrol ve mısır yağı gruplarına kıyasla TOS düzeyi arttı ve ortalama TOS değeri 252.34 pg/lens olarak bulundu. Kontrol ve mısır yağı grupları ile sadece HC verilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0.05$). Chrysin verilen tedavi gruplarında ise düşük doz grubundan yüksek doz grubuna doğru ortalama TOS düzeylerinin azaldığı ve HC grubu ile karşılaştırıldığında; düşük doz chrysin grubu ile HC grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilirken, orta ve yüksek doz chrysin grupları ile HC grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Chrysin verilen tedavi grupları ise kendi içinde istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; düşük doz ile yüksek doz grupları arasındaki fark anlamlı bulunurken ($p<0.05$), orta ve yüksek doz ile düşük ve orta doz chrysin grupları arasındaki farklar anlamlı bulunmadı ($p>0.05$), (Tablo 4.5, Grafik 4.5).

Tablo 4.5: Tüm gruplara ait TOS (pg/lens) düzeyleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum; TOS: Total oksidan seviyesi.

Grup	N	TOS			P
		Ortalama±SS	Min.	Max.	
Kontrol	8	170.89±33.68 ^{c,d,e}	132.47	214.83	p<0.05
Mısır yağı	8	186.82±7.63 ^{c,d,e}	178.5	197.5	
HC	8	252.34±12.98 ^{a,b,e,f}	239.03	271.67	
25 mg/kg Chrysin	8	237.15±5.6 ^{a,b,f}	230.83	245.17	
50 mg/kg Chrysin	8	219.43±14.02 ^{a,b,c}	200.5	239.83	
100 mg/kg Chrysin	8	200.03±17.15 ^{c,d}	173.33	217.18	

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: Mısır yağı grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıdır.

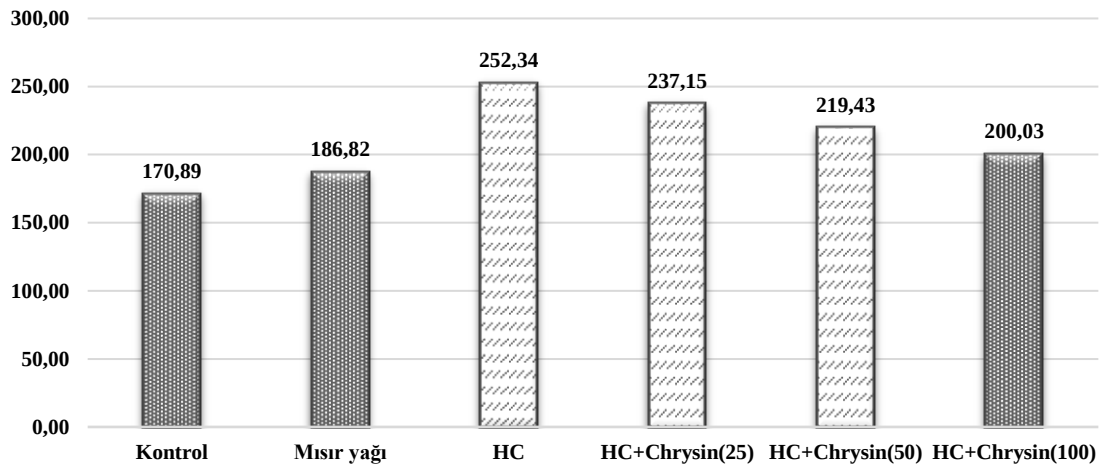
c: HC grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: Düşük doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e: Orta doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

f: Yüksek doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Grafik 4.5: Tüm gruplara ait lenslerdeki TOS (pg/lens) düzeyleri grafiği. TOS: Total oksidan seviyesi; HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayan gruplar koyu renkle gösterilmiştir.



4.2.5. Kaspaz 3 Düzeyine Ait Bulgular

Gruplardaki 8 embriyoya ait lens materyallerinin biyokimyasal analizleri sonucunda; kontrol grubunda ortalama kaspaz 3 düzeyi 9.01 ng/lens olarak belirlenirken, sadece mısır yağı verilen grupta ise 9.80 ng/lens olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi ($p>0.05$). Sadece HC uygulanan grupta, kontrol ve mısır yağı gruplarına kıyasla kaspaz 3 düzeyi arttı ve ortalama kaspaz 3 değeri 13.81 ng/lens olarak bulundu. Kontrol ve mısır yağı grupları ile sadece HC verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). HC uygulaması ile artan kaspaz 3 düzeyleri, chrysin verilen tedavi gruplarında; düşük doz grubundan yüksek doz grubuna doğru orantılı olarak azaldı. HC grubu ile karşılaştırıldığında; düşük doz chrysin grubu ile HC grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken, orta ve yüksek doz chrysin grupları ile HC grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Ayrıca düşük doz chrysin grubu ile yüksek doz chrysin grubu arasında anlamlı fark gözlemlenirken ($p<0.05$), orta doz chrysin grubu ile yüksek doz chrysin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi ($p>0.05$), (Tablo 4.6, Grafik 4.6).

Tablo 4.6: Tüm gruplara ait kaspaz 3 (ng/lens) düzeyleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum.

Grup	N	KASPAZ 3			
		Ortalama±SS	Min.	Max.	P
Kontrol	8	9.01±1.74 ^{c,d}	7.05	11.66	p<0.05
Mısır yağı	8	9.8±0.85 ^{d,c}	8.2	10.96	
HC	8	13.81±2.24 ^{a,b,d,e}	10.99	17	
25 mg/kg Chrysin	8	12.5±2.44 ^{a,b,f}	10.18	17.35	
50 mg/kg Chrysin	8	10.67±1.09 ^c	9.32	12.55	
100 mg/kg Chrysin	8	9.69±0.98 ^{c,d}	8.2	11.15	

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: Mısır yağı grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıdır.

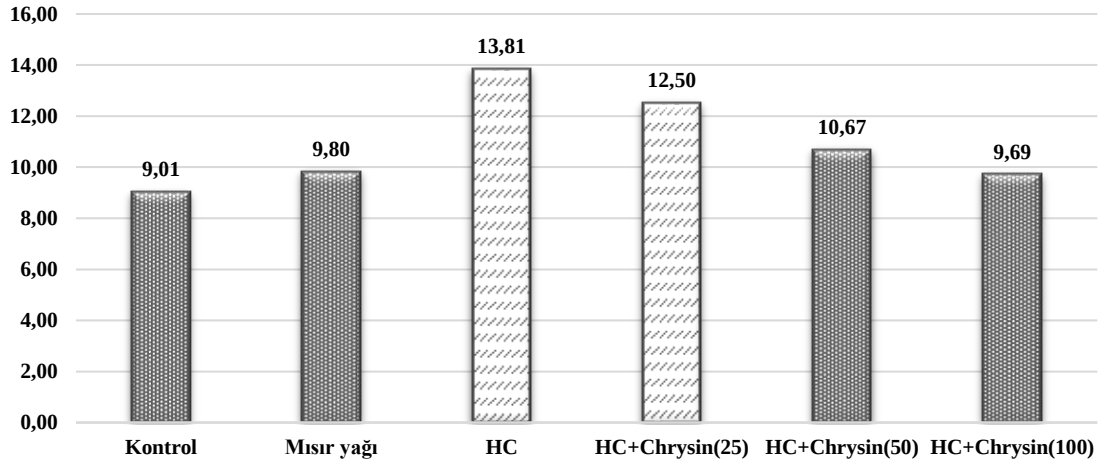
c: HC grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: Düşük doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e: Orta doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

f: Yüksek doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Grafik 4.6: Tüm gruplara ait lenslerdeki kaspaz 3 (ng/lens) düzeyleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayan gruplar koyu renkle gösterilmiştir.



4.2.6. Kaspaz 9 Düzeyine Ait Bulgular

Gruplardaki 8 embriyoya ait lens materyallerinin biyokimyasal analizleri sonucunda; kontrol grubunda ortalama kaspaz 9 düzeyi 29.33 ng/lens olarak belirlenirken, sadece mısır yağı verilen grupta ise 29.56 ng/lens olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Sadece HC uygulanan grupta, kontrol ve mısır yağı gruplarına kıyasla kaspaz 9 düzeyinin arttığı ve ortalama kaspaz 9 düzeyinin 39.71 ng/lens olduğu belirlendi. Kontrol ve mısır yağı grupları ile sadece HC verilen grup arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Chrysin verilen tedavi gruplarında ise en düşük kaspaz 9 düzeyi (29.72 ± 3.62 ng/lens) yüksek doz chrysin grubunda belirlenirken, chrysin gruplarında düşük dozdan yüksek doza doğru ortalama kaspaz 9 düzeylerinin azaldığı belirlendi. HC grubu ile istatistiksel karşılaştırma yapıldığında; düşük doz chrysin grubu ile HC grubu arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0.05$), orta ve yüksek doz chrysin grupları ile HC grubu arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Chrysin verilen tedavi grupları ise kendi içinde istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; düşük doz ile orta ve yüksek doz grupları arasındaki fark anlamlı bulunurken ($p<0.05$), orta ve yüksek doz chrysin grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$), (Tablo 4.7, Grafik 4.7).

Tablo 4.7: Tüm gruplara ait kaspaz 9 (ng/lens) düzeyleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum.

Grup	N	KASPAZ 9			
		Ortalama±SS	Min.	Max.	P
Kontrol	8	29.33±4.35 ^{c,d}	20.93	33.5	p<0.05
Mısır yağı	8	29.56±1.53 ^{c,d}	27.73	31.92	
HC	8	39.71±8.75 ^{a,b,e,f}	33.3	58.72	
25 mg/kg Chrysin	8	35.61±4.44 ^{a,b,e,f}	31.63	43.92	
50 mg/kg Chrysin	8	31±2.14 ^{c,d}	28.12	34.67	
100 mg/kg Chrysin	8	29.72±3.62 ^{c,d}	24.32	33.73	

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: Mısır yağı grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıdır.

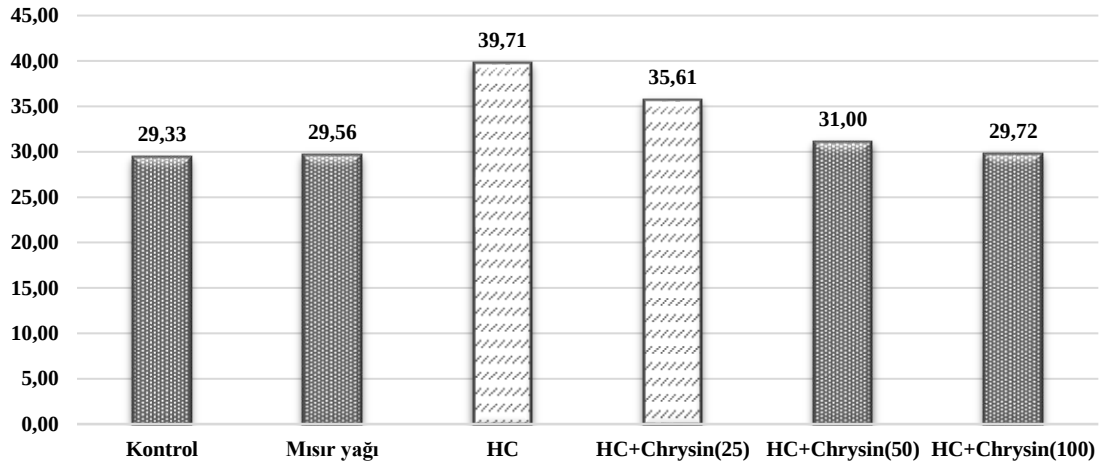
c: HC grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d: Düşük doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e: Orta doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

f: Yüksek doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Grafik 4.7: Tüm gruplara ait lenslerdeki kaspaz 9 (ng/lens) düzeyleri. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayan gruplar koyu renkle gösterilmiştir.



4.3. Immunohistokimyasal Boyama (TUNEL) Yöntemine Ait Bulgular

Çalışmamızda toplam yedi embriyoya ait bulbus oculi'ler bütünlüğü bozulmadan histolojik parametrelerin değerlendirilmesi için ayrıldı. Ayrılan bulbus oculi'lerde histolojik doku takibi uygun histolojik prosedürde yapıldı, embriyolardan alınan göz dokularından elde edilen kesitlerde lensin bulunduğu alan ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Koyu kahverengi boyanan hücreler apoptotik-pozitif olarak kabul edildi. Her bir embriyoya ait lenslerde en az 300 hücre sayılarak apoptotik oran (TUNEL pozitif hücre sayısı/Toplam hücre) elde edildi. Bu verilere göre apoptotik oran kontrol grubunda 25.57 bulunurken, sadece mısır yağı verilen grupta 33.14 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0.05$). HC grubunda ise apoptotik oranın kontrol ve mısır yağı grubuna kıyasla arttığı (apoptotik oran 46.71) belirlendi. HC grubu, kontrol ve mısır yağı gruplarıyla karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi ($p<0.05$). Chrysin verilen tedavi gruplarında doz oranıyla ters orantılı olarak apoptotik oranda azalmanın meydana geldiği ve en düşük apoptotik oranın yüksek doz chrysin grubunda görüldüğü belirlendi. Düşük ve orta doz chrysin grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlemlenirken ($p<0.05$), yüksek doz chrysin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$), (Tablo 4.8, Grafik 4.8).

Tablo 4.8: Tüm gruplarda TUNEL (TUNEL pozitif hücre sayısı/Toplam hücre) yöntemine ait bulgular. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum.

Grup	N	TUNEL			P
		Ortalama±SS	Min.	Max.	
Kontrol	7	25,57 ^{c,d,e}	19	35	p<0.05
Mısır yağı	7	33,14 ^{c,d}	25	41	
HC	7	46,71 ^{a,b,e,f}	42	52	
25 mg/kg Chrysin	7	44,71 ^{a,b,f}	38	53	
50 mg/kg Chrysin	7	36,86 ^{a,c}	23	45	
100 mg/kg Chrysin	7	34 ^{c,d}	27	41	

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b: Mısır yağı grubuyla karşılaştırıldığında anlamlıdır.

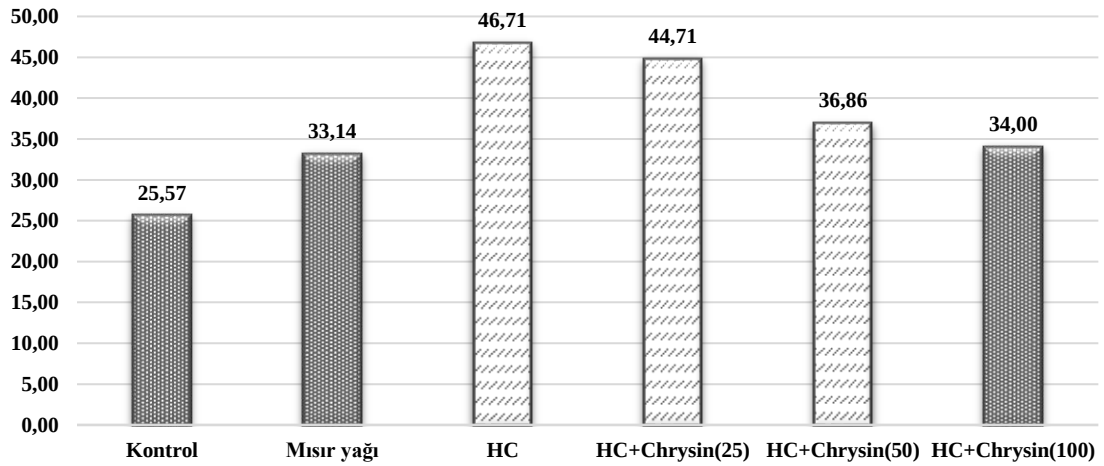
c: HC grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

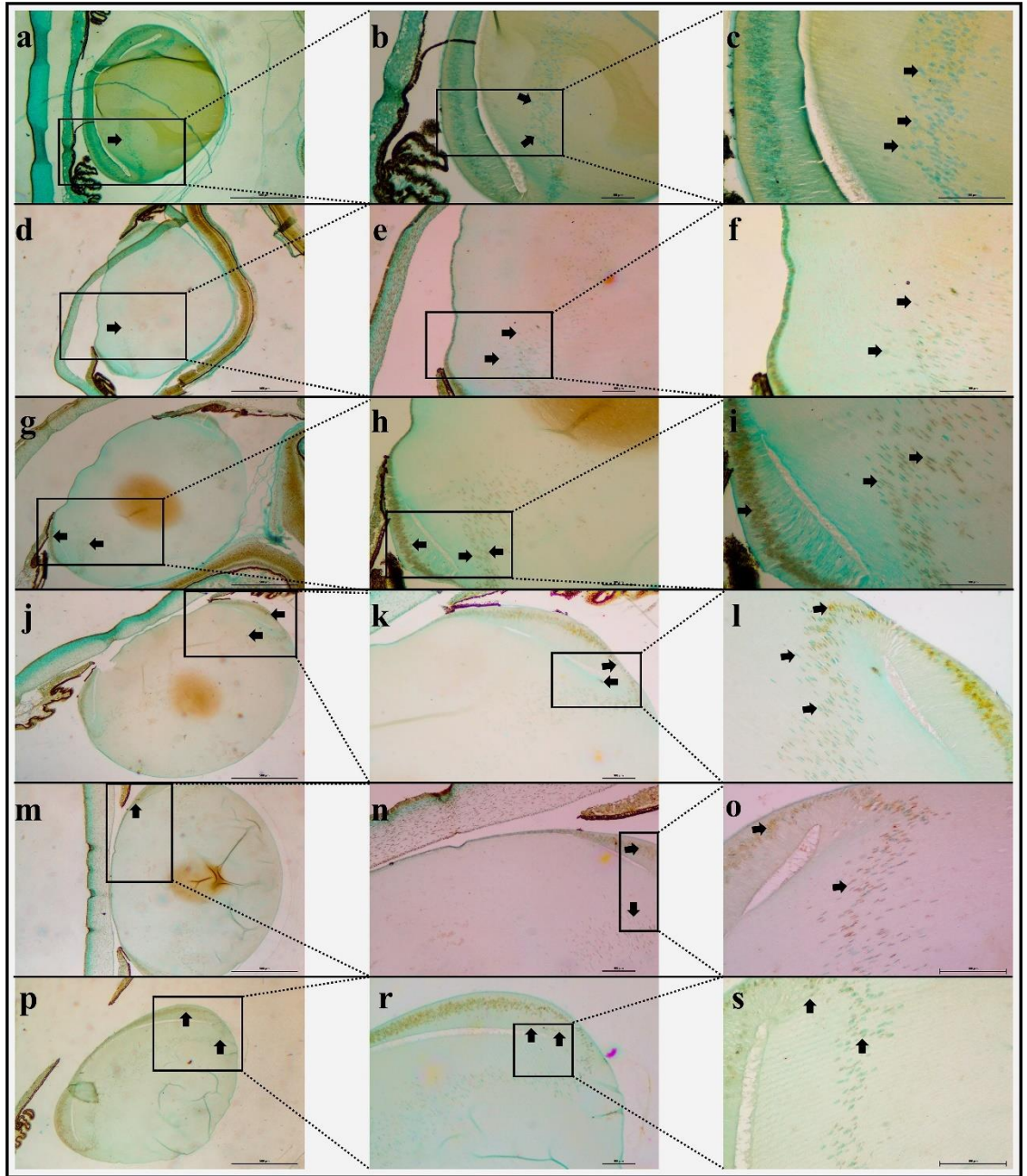
d: Düşük doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e: Orta doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

f: Yüksek doz chrysin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Grafik 4.8: Tüm gruplarda TUNEL sonuçlarının (TUNEL pozitif hücre sayısı/Toplam hücre) grafiği. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayan gruplar koyu renkle gösterilmiştir.





Resim 4.2: Tüm gruplara ait lens TUNEL boyamaları. Okla gösterilen yerler lenslerde apoptotik-pozitif boyanan hücreleri göstermektedir. HC: Hidrokortizon hemisüksinat sodyum.

- a, b, c)** Kontrol grubu (sırasıyla X4, X10, X20 büyütme oranları)
d, e, f) Mısır yağı grubu (sırasıyla X4, X10, X20 büyütme oranları)
g, h, i) HC grubu (sırasıyla X4, X10, X20 büyütme oranları)
j, k, l) Düşük doz chrysin grubu (sırasıyla X4, X10, X20 büyütme oranları)
m, n, o) Orta doz chrysin grubu (sırasıyla X4, X10, X20 büyütme oranları)
p, r, s) Yüksek doz chrysin grubu (sırasıyla X4, X10, X20 büyütme oranları)

5. TARTIŞMA

Kortikosteroidler otoimmün, nörolojik, romatolojik, dermatolojik ve nefrolojik bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli klinik durumlarda kullanılan etkili antiinflamatuvar ilaçlardır (Wan ve ark., 2012). Kortikosteroidlerin tedavi edici klinik etkilerine rağmen, özellikle uzun süreli ve yüksek dozlarda kullanımı ciddi komplikasyonların oluşmasına neden olabilmektedir (Liu ve ark., 2013). Yüksek dozda ve uzun süreli kortikosteroid kullanımı sonrası meydana gelen komplikasyonlardan biri de kataraktır (Black ve ark., 1960). Katarakt, göz merceğinin bulanıklaşması ve görme keskinliğinin azalmasıdır (McCarty 2002). Katarakt, gelişen teknolojiye rağmen görme bozukluğunun dünya çapında önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Duman ve ark., 2018).

Kataraktın etyopatogenezini incelemek amacıyla literatürde fare, rat, tavşan, köpek gibi farklı deneysel hayvan modelleri kullanılmıştır (Shui ve ark., 1996; Bayley ve Read, 2018; Dave ve ark., 2021; Okuno ve ark., 2021). Cıvciv embriyosu katarakt modeli son yıllarda, katarakt oluşumunu ve antioksidan törapatiklerin katarakt önleyici mekanizmalarını araştırmak için sık kullanılan yöntemlerden biridir (Ishikawa ve ark., 2015). Yumurtaların kolay temin edilebilmesi, embriyo gözlerinin manipulasyonlar için büyük ve kolay erişilebilir olması, gözün embriyonik gelişim süresinin kısa olması cıvciv embriyosu ile çalışmanın avantajları arasında sayılabilir (Timmer ve ark., 2001; Belecky-adams ve ark., 2008). Biz de çalışmamızda bu avantajları göz önüne alarak, chrysin'in katarakt üzerindeki antioksidan etkisini araştırmak için cıvciv embriyo katarakt modelini kullandık.

Yaptığımız literatür taramasında; deneysel cıvciv embriyo katarakt modeli oluşturmak için HC'nin kullanıldığını ve HC'nin embriyoların gelişiminin çeşitli dönemlerinde ve farklı dozlarda verildiğini belirledik. Duman ve ark. (2018), yaptıkları çalışmalarında; cıvciv embriyolarında katarakt oluşumunu indüklemek için 0.25 ve 0.50 μmol olmak üzere iki farklı dozda HC uygulaması yapmışlardır. Çalışmalarında ayrıca HC'yi CAM ve AS olmak üzere iki farklı bölgeye uygulamışlardır. HC enjeksiyonunu cıvciv embriyolarının gelişiminin 15. gününde gerçekleştirmiş ve 17. günde embriyoların gözlerini disseke ederek katarakt derecelendirmesi yapmışlardır. Çalışmalarının sonucunda; kontrol gruplarında yer alan lenslerin hiçbirinde opaklık gelişmediğini, HC uygulanan gruplarda ise farklı derecelerde lens opaklığının gözlemlendiğini rapor

etmişlerdir. Hava kesesine 0,50 μ mol HC uygulaması sonrası embriyoların %70'den fazlası, 0.25 μ mol HC uygulaması sonrası ise embriyoların %60'dan fazlası için üzerinde lens opaklık derecesi sergilemiştir. Korioallantoik zar yöntemiyle HC uygulaması sonrası ise 0.50 μ mol HC uygulanan gruptaki embriyoların %80'i, 0,25 μ mol HC uygulananların ise %70'i için üzerinde lens opaklık derecesi göstermiştir. Çalışmalarının sonucunda ortalama lens opaklığı derecelerinin, kontrol gruplarına kıyasla HC gruplarında anlamlı derecede yüksek olduğunu, steroid ile indüklenen civciv embriyo katarakt modelinde katarakt oluşumu için 0.25 μ mol/yumurta veya 0.50 μ mol/yumurta HC'nin her iki dozunun da etkin bir şekilde kullanılabilir olduğunu, uygulama yöntemleri arasında ise her iki yöntemin de benzer etkinliğe sahip olmasına rağmen, daha kolay ve daha az invaziv işlem olması nedeniyle AS'ye enjeksiyonunun daha uygun olacağını belirtmişlerdir (Duman ve ark., 2018). Literatürde Nishigori ve ark. (1987), 15 günlük civciv embriyolarına tek bir doz HC (0.25 μ mol) uygulandığında ilk 24 saat boyunca kortikal ve nükleer bölgeler arasında opak bir halka ortaya çıktığını ve 48 saat sonunda nükleer bölgenin opak haline geldiğini bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada ayrıca HC uygulamasından 96 saat sonra opaklığın azaldığını tespit etmişlerdir (Nishigori ve ark., 1987). Lee ve ark. (1995), civciv embriyolarında 9. günden 17. güne kadar farklı gelişim evrelerindeki embriyolarda HC enjeksiyonu sonrası katarakt gelişimini değerlendirmiş, çalışmaları sonucunda 9. gün ve 11. günde uygulanan HC'nin katarakt indükleyici etkisinin olmadığını, lenslerin tümünün katarakt derecesinin evre 1 (lens opaklığı yok) olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında embriyo gelişiminin 13. gününde uygulanan HC'nin nükleer bölgede opaklığa neden olduğunu ve lenslerin %63'ünde evre 4 ve 5 katarakt derecelerinin görüldüğünü rapor etmişlerdir. 15. günde uygulanan HC'nin ise katarakt oluşturması bakımından en güçlü etkiye sahip olduğunu ve lenslerin yaklaşık %90'ının evre 4 ve 5 katarakt derecesini sergilediğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında ayrıca; HC uygulaması ile katarakt indüksiyonunun en etkili olduğu dönemin civciv embriyosu gelişiminin 15. gününde gerçekleştiğini, 17. günde lensin incelenmesi ile en yüksek katarakt insidansına ulaşıldığı sonucuna varmışlardır (Lee ve ark., 1995). Kosano ve Nishigori (2002), 15 günlük civciv embriyolarını farklı steroid türleri ile 48 saat inkübe etmiş ve deney sonucunda embriyolara ait lensleri incelemiştir. Deney için; androjen olarak testosteron, östrojen olarak estradiol, mineralokortikoid olarak aldosteron, glukokortikoid olarak deksametazon ve hidrokortizonu seçmişlerdir. Çalışmalarındaki tüm steroidler, biyolojik aktivitelerinden bağımsız olarak lenslerin şeffaflığının

kaybolmasına neden olmuştur. Ayrıca, organ kültür sisteminde lensleri 48 saat süreyle etken maddelerle inkübe ettiklerinde, lenslerdeki nükleer bölge, civciv embriyo lenslerine benzer şekilde opak hale gelmiştir. Çalışmalarında uygulanan hidrokortizon dozunu 0.25 µmol olarak belirlemişler ve hidrokortizon uygulaması sonrası 48 saat içinde lenslerinin çoğunun opak hale geldiğini rapor etmişlerdir (Kosano ve Nishigori, 2002). Ishikawa ve ark. (2015), Vurmaz ve ark. (2019), yaptıkları çalışmalarda civciv embriyolarına 0.50 µmol HC uygulamışlar ve çalışma sonucunda HC grubunda yer alan embriyoların lenslerinde 3. ve 5. derece katarakt meydana geldiğini bildirmişlerdir (Ishikawa ve ark., 2015; Vurmaz ve ark., 2019). Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda; çalışmamızda steroid kaynaklı katarakt modeli oluşturmak için planlanan HC enjeksiyonunu embriyoların gelişiminin 15. gününde, lenslerdeki katarakt derecelendirmesini ise HC uygulamasından 48 saat sonra 17. günde gerçekleştirdik. Aynı zamanda literatür ile uyumlu olarak HC dozunu 0.50 µmol olarak belirledik. Çalışmamız sonucunda sadece HC uygulanan grupta tüm embriyolarda katarakt gelişti ve ortalama katarakt derecesi 3.5 olarak belirlendi ve sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermekteydi (Lee ve ark., 1995; Ishikawa ve ark. 2015; Duman ve ark. 2018; Vurmaz ve ark. 2019).

Literatürde katarakt oluşumunun önlenmesinde flavonların antioksidan etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur (Hankinson ve ark., 1992; Mares-Perlman ve ark., 1994; Jacques ve ark., 1997; Simon ve Hudes, 1999; Gale ve ark., 2001; Vurmaz ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2021). Zhang ve ark. (2021), diyabetik katarakt üzerine yaptıkları çalışmalarında; uyguladıkları hindistan cevizi suyunun in vivo olarak diyabetik ratlarda lens opasite indeksini, in vitro olarak da lens epitel hücrelerinde apoptoz oranını azalttığını bildirmişlerdir. Hindistan cevizi suyu ile tedavide hem in vivo hem de in vitro deneylerde düşük MDA seviyesi, yüksek SOD ve GSH-Px aktiviteleri tespit etmişlerdir. Antioksidan olarak uyguladıkları maddenin lenslerdeki kataraktı önleyici etkisini oksidatif stresin azalması ile açıklamışlardır (Zhang ve ark., 2021). Vurmaz ve ark. (2019), civciv embriyolarında steroid kaynaklı katarakt modelinde piperine'nin etkisini inceledikleri çalışmalarında; steroidin lens dokularında GSH ve TAS düzeylerinde azalmaya, TOS ve MDA düzeylerinde artmaya neden olarak oksidatif stresi arttırdığını, piperin'in ise antioksidan sistemi düzenleyerek kataraktı tedavi ettiğini bildirmişlerdir (Vurmaz ve ark., 2019).

Flavon alt grubuna ait bir flavonoid olan chrysin antioksidan özellikleri yanında birçok yararlı fizyolojik etkiye sahiptir (Mani ve Natesan, 2018; Naz ve ark., 2019). Bu etkiler arasında antiinflamatuvar, antidiyabetik, antibakteriyel, antialerjik ve antikanserojenik özellikler sayılabilir (Lapitot ve ark., 2002; O'Leary ve ark., 2004; Karthikeyan ve ark., 2013). Literatürde çeşitli göz hastalıkları üzerinde chrysin'in antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile bağlantılı olumlu etkileri rapor edilmiştir (Kang ve ark., 2016; Song ve ark., 2016; Sundararajan ve ark., 2016; Meng ve ark., 2017; Wojnar ve ark., 2020). Chrysin'in deneysel otoimmün üveit üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, 24 gün boyunca intragastric olarak farelere uygulanan chrysin'in (25 mg/kg) hem makrofaj infiltrasyonu ve retinada indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu etkili bir şekilde inhibe ederek, hem de retinada interferon- γ , interlökin (IL)-17A, IL-6, IL-1 β ve tümör nekroz faktörü- α ekspresyonunu azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (Meng ve ark., 2017). Song ve ark. (2016), chrysin'in ratlarda choroidal neovaskülarizasyon (CNV) üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında; chrysin'in lazerle indüklenen CNV'yi inhibe ettiğini, HIF-1 α ve VEGF ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Elde ettikleri bulgular ışığında; chrysin'in neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonunu (AMD) ve diğer CNV ile ilişkili hastalıkları önleyici bir ajan olarak kullanılmaya aday bir flavonid olduğunu rapor etmişlerdir (Song ve ark., 2016).

Çok sayıda insan epidemiyolojik ve deneysel hayvan çalışması tarafından elde edilen verilerde oksidatif stresin katarakt oluşumunda önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Truscott 2005). ROS üretimi ve endojen antioksidan düzeylerindeki azalmanın katarakt oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir (Wu ve Leske 2000; Ho ve ark., 2010). Oksidatif stres; hidroksil radikalleri, süperoksit anyonları, H₂O₂, peroksil radikalleri ve singlet oksijen dahil olmak üzere ROS konsantrasyonlarının fizyolojik değerlerin üzerinde hücre içi artması olarak tanımlanır (Watanabe ve ark., 2000; Tolba ve ark., 2017; Siegfried ve Shui 2019). Oksidatif stres antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengesizlik olup, çeşitli hastalıkların etyopatogenezinde yer alan ve hasara yol açan önemli bir etkidir. Vücut, artan serbest radikaller ve ROS üretiminin zararlı etkilerini engelleyebilmek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan antioksidatif sisteme sahiptir (Pisoschi ve Pop, 2015). Antioksidan savunma sistemleri, serbest radikallerin aşırı üretiminin zararlı etkilerini önler, ancak serbest radikal üretim miktarı antioksidan savunma sisteminde yer alan antioksidanların düzeylerini aştığında

oksidatif stres ortaya çıkar (Jin ve ark., 2013). Bununla birlikte, endojen antioksidanlar oksidanları nötralize etmek için yetersiz olduğunda, metabolizmanın antioksidatif yeteneklerini arttırmak için eksojen antioksidanlar verilerek oksidatif stresin zararlı etkileri engellenebilir (Obrosova ve ark., 2010). Oksidatif stresin kataraktogenezi indüklemeye önemli bir faktör olduğunun kanıtlanması, birçok araştırmacıyı çeşitli hayvan modelleri kullanarak katarakt üzerinde eksojen antioksidanların engelleyici etkisini araştırmaya yönlendirmiştir. Literatürde civciv embriyolarında HC kaynaklı katarakta karşı piperine, astaksantin, betain ve e-vitamini gibi çeşitli antioksidanların antikataraktojenik etkisi araştırılmıştır (Ishikawa ve ark., 2015; Duman ve ark., 2019; Vurmaz ve ark., 2019; Vurmaz ve ark., 2021). Piperine'in civciv embriyolarında steroid kaynaklı katarakt üzerindeki antioksidan etkisinin incelendiği çalışmada, sadece HC uygulanan grupta yer alan embriyolardan iki tanesinde 3. derece, dört tanesinde 5. derece katarakt tespit edilmiştir. Buna karşılık tedavi amaçlı çeşitli dozlarda uygulanan piperine gruplarında, katarakt dereceleri azalmış ve piperine'in antioksidan özelliğinden dolayı kataraktı engellediği rapor edilmiştir (Vurmaz ve ark., 2019). Başka bir çalışmada; astaksantin'in civciv embriyosu lenslerindeki HC kaynaklı katarakt üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve benzer şekilde HC uygulaması ile artan katarakt derecelerinin astaksantin uygulaması ile azaldığı bildirilmiştir (Ishikawa ve ark., 2015).

Literatürde chrysin ve çeşitli göz hastalıkları ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen chrysin'in katarakt üzerindeki etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Chrysin'in katarakt üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar ratlar üzerinde yapılmıştır (Sundararajan ve ark., 2016; Wojnar ve ark., 2020). Sundararajan ve ark., (2016) yaptıkları çalışmada; Wistar ratların lenslerini selenit ve/veya chrysin ile inkübe etmiş, lenslerdeki selenit kaynaklı katarakt oluşumu üzerine chrysin'in antioksidan etkisini değerlendirmiştir. Çalışmalarında katarakt derecelendirmesini; opaklaşmanın yokluğu (0), hafif opaklaşma (+), tüm lensi içeren dağınık opaklaşmanın varlığı (++) ve tüm lensi içeren net bir opaklaşma varlığı (+++) prosedürünü uygulayarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda kontrol grubunda yer alan lenslerde opaklaşma gözlemlenmediğini, sodyum selenitle inkübe edilen lenslerin tamamında +++ evresiyle uyumlu olan katarakt derecelerinin oluştuğunu, chrysin ile kültür sistemine alınan lenslerde ise opaklık derecelerinin azaldığını ve 0, +, ++ evreleriyle uyumlu olan katarakt derecelerinin gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda chrysin'in,

sodyum selenit içeren rat lenslerinde katarakt oluşumunu önlediğini bildirmişlerdir (Sundararajan ve ark., 2016).

Araştırdığımız kadarıyla civciv embriyosunda chrysin'in katarakt üzerindeki etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Literatür bilgisi ışığında çalışmamızda civciv embriyo modelinde chrysin'in HC kaynaklı katarakt üzerindeki antioksidan etkileri incelenmeye değer bulunmuştur. Chrysin ve çeşitli göz hastalıkları ile ilgili çalışmalarda, chrysin'in etkili olduğu dozlar göz önünde bulundurulduğunda (Meng ve ark., 2017; Wojnar ve ark., 2020) çalışmamızda uygulanan chrysin dozları literatürle uyumlu olacak şekilde 25, 50 ve 100 mg/kg olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda chrysin'in, civciv embriyo modelinde HC kaynaklı katarakt üzerindeki antioksidan etkisi araştırılmış ve sadece HC uygulanan grupta yer alan embriyoların %88'den fazlası için üzerinde lens opaklık derecesi sergilemiş olup, HC grubunda ortalama katarakt derecesi 3.5 olarak belirlenmiştir. Chrysin ile tedavi edilen gruplarda uygulanan doz miktarı ile ters orantılı olarak katarakt dereceleri azalmış olup, düşük dozdan yüksek doza doğru sırasıyla ortalama katarakt dereceleri 3.1, 2.3 ve 1.5 olarak bulunmuştur. Katarakt üzerinde çeşitli antioksidanların (Ishikawa ve ark., 2015; Vurmaz ve ark., 2019; Vurmaz ve ark., 2021) ve chrysin'in etkilerinin araştırıldığı (Sundararajan ve ark., 2016; Wojnar ve ark., 2020) yukarıda bahsettiğimiz çalışmaların sonuçlarıyla bizim çalışmamızın sonuçları paralellik göstermekte olup, katarakt derecesi tedavi gruplarında azalmıştır. Ancak çalışmalarda farklı antioksidanların etkisinin araştırılmış olmasının, chrysin'in antikatarojenik etkisinin araştırıldığı çalışmanın ratlar üzerinde yapılmış olmasının ve katarakt derecelendirmelerinde çalışmamızda kullanılan sınıflandırmadan farklı metodolojinin uygulanmasının, literatür ve çalışmamızdaki katarakt dereceleri arasındaki sayısal farklılıkların sebebi olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda HC ve/veya chrysin uygulamalarının, antioksidan-oksidan mekanizmadaki değişiklikleri gösteren ve biyokimyasal parametreler olan GSH, MDA, TAS ve TOS düzeyleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. GSH, hücrelerde sentezlenen düşük molekül ağırlıklı bir antioksidandır. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde, ROS'un uzaklaştırılmasında, DNA ile protein sentezleri ve sinyal iletimi dahil olmak üzere birçok hücre metabolik aktivitede rol oynar (Meister ve Anderson, 1983; Wu ve ark., 2004). TAS genel antioksidatif durumu belirlerken, TOS oksidasyon durumunu belirlemek için kullanılır (Jin ve ark., 2013). MDA ise lipid peroksidasyonu sırasında yüksek oranda

üretilen, oksidatif stresin bir ölçüsü olarak tanımlanmaktadır (Ayala ve ark., 2014; Sies ve Jones, 2020). Tüm bu parametreler lenslerdeki antioksidan-oksidan arasındaki dengeyi incelemek açısından önemlidir. Literatürde, katarakt çalışmalarında yukarıda bahsettiğimiz biyokimyasal parametreleri değerlendiren ve çeşitli antioksidanların etkinliğini araştıran çalışmalar mevcuttur (Gupta ve ark., 2003; Ishikawa ve ark., 2015; Nakazawa ve ark., 2015; Sundararajan ve ark., 2016;). Nakazawa ve ark. (2015), ratlarda yaptıkları çalışmalarında doğal bir flavonoid olan hesperetin'in selenit kaynaklı katarakt üzerindeki etkisini araştırmıştır. Hesperetin uygulamasının antioksidan düzeyleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için lenslerdeki GSH düzeylerini ölçmüşlerdir. Çalışmalarının sonucunda selenit uygulaması ile katarakt oluşan rat lenslerinde azalmış olan GSH düzeylerinin, hesperetin uygulaması ile normale döndüğünü ve kontrol grubuna yaklaştığını bildirmişlerdir (Nakazawa ve ark., 2015). Başka bir çalışmada selenit kaynaklı katarakt üzerinde antioksidan madde olan likopen'in etkisi araştırılmıştır. Selenit uygulaması ile ratların lenslerinde kontrol grubuna kıyasla katarakt insidansının arttığını, GSH düzeyinin azaldığını ve MDA düzeyinin ise arttığını bildirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda likopen uygulaması ile katarakt derecelerinin, GSH ve MDA düzeylerinin kontrol grubuna daha yakın hale geldiğini rapor etmişlerdir (Gupta ve ark., 2003).

Duman ve Vurmaz (2018), civciv embriyolarında yaptıkları çalışmalarında, HC uygulaması sonrası tüm lenslerde katarakt oluşumunu incelemiş ve ayrıca tüm lens ve karaciğer dokularında TAS, TOS ve GSH düzeylerini ölçmüşlerdir. Çalışmalarının sonucunda kontrol grubu (GSH: 252.91 $\mu\text{mol/L}$; TAS: 9.16 μmol ; TOS: 7.49 nmol) ile karşılaştırıldığında sadece HC uygulanan grupta yer alan embriyoların lenslerinde GSH ve TAS düzeylerinde (GSH: 173.66 $\mu\text{mol/L}$, TAS: 8.43 μmol) azalma olduğunu, TOS düzeylerinde (8.02 nmol) ise artış olduğunu bildirmişlerdir (Duman ve Vurmaz, 2018).

Vurmaz ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada civciv embriyolarında glukokortikoid kaynaklı katarakt modeli üzerinde E vitamininin antioksidan etkilerini araştırmıştır. Çalışmaları kapsamında inkübasyonun 15. gününde HC ve E vitamini enjeksiyonlarını yaparak, 17. günde embriyolardan lensleri disseke etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda TAS düzeylerinde sadece HC uygulanan grupta kontrol grubuyla (1.4 mmol/lens) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, TOS düzeylerinde ise artma tespit etmişlerdir. Uygulanan E vitamini dozlarına bağlı olarak, azalan TAS düzeylerinin

arttığını, TOS düzeylerinin ise azaldığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak E vitamininin HC'nin neden olduğu katarakta karşı etkili bir antioksidan madde olduğunu rapor etmişlerdir (Vurmaz ve ark., 2021).

Civciv embriyolarında yapılan başka bir çalışmada, HC kaynaklı katarakt üzerinde askorbik asit 2-O-alfa-glukozidin (AA-2G), askorbik asit (AsA) ve askorbik asit 2-O-fosfat (AA-2P)'in oksidatif hasara karşı önleyici etkiler araştırılmıştır. Lenslerdeki GSH düzeyleri Ellman's metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Sadece HC uygulanan gruptaki lenslerde GSH düzeyleri (1.59 $\mu\text{mol/g lens}$) önemli ölçüde azalmıştır. GSH düzeyleri AA-2G, AsA ve AA-2P'nin uygulamalarına bağlı olarak arttırmasına rağmen en etkili sonuç AA-2G uygulanan grupta (2.04 $\mu\text{mol/g lens}$) gözlemlenmiştir (Nagata ve ark., 1994).

İn vitro olarak; selenit kaynaklı katarakt indüklenen rat lensleri üzerinde chrysin'in antioksidan etkisinin incelendiği çalışmada; selenit uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla düşük düzeyde GSH ve daha yüksek düzeyde MDA seviyelerinin olduğu, chrysin uygulanan tedavi gruplarında ise lenslerdeki ortalama GSH düzeylerinin arttığı ve artmış olan MDA düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir (Sundararajan ve ark., 2016).

Katarakt oluşumunu HC (Nagata ve ark., 1994; Duman ve Vurmaz, 2018) veya selenit kaynaklı (Gupta ve ark., 2003; Nakazawa ve ark., 2015; Sundararajan ve ark., 2016) indükleyen çalışmaların sonuçlarıyla paralel olarak bizim çalışmamızda da sadece HC uygulanan civciv embriyolarının lenslerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GSH ve TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($P \leq 0.05$, Tablo 4.2, Tablo 4.4), MDA ve TOS düzeylerinde ise anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($P \leq 0.05$, Tablo 4.3, Tablo 4.5). Çalışmamızda HC uygulamasının, civciv embriyo lenslerindeki antioksidan-oksidan dengeyi bozduğu, sonuç olarak da antioksidan dengedeki bozulmanın oksidatif stresi artırdığı ve katarakt oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir. Chrysin ile tedavi edilen gruplarda ise; HC uygulaması ile azalan GSH ve TAS düzeylerinin arttığı ($P \leq 0.05$, Tablo 4.2, Tablo 4.4), artmış olan MDA ve TOS düzeylerinin ise azaldığı ($P \leq 0.05$, Tablo 4.3, Tablo 4.5) ve bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler uygulanan chrysin'in doz miktarına bağlı olarak değişmektedir. Biyokimyasal sonuçlarımız chrysin'in antioksidan etki sergilediğini ve bu etkinin lens opaklığını baskıladığını göstermektedir. Özellikle yüksek doz (100 mg/kg) chrysin uygulaması

biyokimyasal parametreler üzerinde antioksidan dengeyi düzenleyici özellik sergileyerek, HC kaynaklı cıvıv embriyo katarakt modelinde anlamlı bir antikatarakt etki göstermiştir. Katarakt ve antioksidan uygulaması içeren literatürdeki araştırmalar ve çalışmamız biyokimyasal parametrelerdeki sonuçlar yönünden birbirine paralellik göstermesine rağmen; sayısal verilerdeki farklılıkların kullanılan model, ölçüm metotları, ölçüm yapılan organ, uygulanan antioksidan çeşitleri ve dozlarından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Apoptoz; embriyogenez ve doku homeostazı gibi normal fizyolojik durumlarda veya iskemi, toksisite ve neoplazik değişiklikler gibi patolojik durumlarda ortaya çıkan, organizmaya pozitif veya negatif yönde etki edebilen bir süreçtir. Aşırı apoptozis iskemik hasara ve nörodejeneratif hastalıklara yol açabilirken, kanser veya otoimmün hastalıklar gibi durumlar yetersiz apoptozdan kaynaklanmaktadır (Wolf ve Green, 1999). Apoptoz retinoblastom, glokom, katarakt, retina dekolmanı, keratokonus ve bazı göz hastalıklarının patogeneğinde rol oynamaktadır (Wilson 1999).

Lens epitel hücreleri ömür boyu çoğalmakta ve lens fibrillerine dönüşmektedir. Lens fibrillerinin organeli olmaması nedeniyle, metabolik artıklarının uzaklaştırılması ve oksidanlara karşı korunması lens epitel hücreleri tarafından sağlanmaktadır. İlerleyen yaşla birlikte lens epitel hücrelerinin sayısında azalma gerçekleşmektedir. UV ışınlarına fazla maruziyet, oksidatiflerin artması ve benzeri etkenler lens epitel hücrelerinde hasar meydana getirmektedir. Lens epitel hücrelerindeki bu hasarın apoptoza bağlı olduğu ve bu hücrelerde gelişen apoptozun önlenmesinin katarakt gelişimini engelleyebileceği öngörülmektedir (Harocopos ve ark., 1998).

Çalışmamızda katarakt derecelendirmesi ve antioksidan-oksidan parametrelerin yanı sıra biyokimyasal olarak lenslerdeki kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri de değerlendirilmiştir. Biyokimyasal ve genetik alanında yapılan çalışmalar, apoptotik sürecin çeşitli aşamalarında kaspazların önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Kaspazlar, sistein-aspartik-proteazlardır. Kaspaz proteaz ailesinin üyeleri, apoptozun başlatılmasında ve devam ettirilmesinde önemli roller oynamaktadır. Kaspazlar 3 gruba ayrılır; birinci grup sinyale tepki olarak ilk etkinleştirilen başlatıcı kaspazlar (initiator kaspaz, kaspaz 2, 8, 9 ve 10), ikinci grup apoptozun yıkım aşamasını gerçekleştiren cellat kaspazlar (efektör kaspazlar, kaspaz 3, 6 ve 7) ve üçüncü grup ise inflamatuvar kaspazlardır (kaspaz

1,4,5,11,12,13,14). Kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. 100 farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olurlar. DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Wolf ve Green, 1999; Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004).

Apoptoz iki yolla gerçekleşir;

I- İntrinsik (Mitokondriyal) yol

II- Ekstrinsik yol

Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksi şeklindedir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenlerdir (iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon). Her 2 sinyal yolunda da kaspazlar görev almakla beraber; kaspaz 9, intrinsik apoptozu tetikleyen başlatıcı kaspazdır. Apoptoz süreci kaspaz 3 yolağına geldiğinde hücre ölümü geri dönüşü olmayan bir noktaya gelmiş demektir. (Jacobson ve ark., 1997; Kroemer ve ark., 2007; Galluzzi ve ark., 2012; An ve ark., 2020; Boice ve Bouchier-Hayes 2020;).

Literatürde katarakt oluşumuna bağlı apoptozda rol oynayan kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeylerini ve çeşitli antioksidanların apoptoz sürecindeki kaspazlar üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur. (Tamada ve ark., 2000; Wang ve ark., 2015; Sundararajan ve ark., 2016; Cao ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2022). Cao ve ark. (2018), yaptıkları deneysel çalışmalarında; curcumin'in antikataraktojenik mekanizmalarını in vivo ve in vitro olarak araştırmışlardır. İn vivo çalışmalarında; sodyum selenit ile katarakt gelişimini indükledikleri grupta ratların lenslerinin şeffaflığını kaybettiğini, curcumin+sodyum selenit uyguladıkları grupta ise rat lenslerinin şeffaflığını kaybetmediğini ve curcumin uygulamasının katarakta karşı koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. İnsan lens epitel hücrelerinde yaptıkları in vitro çalışmada; H_2O_2 (katarakt indükleyici) uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla kaspaz 3 mRNA ekspresyon değerlerinin arttığını, hücre canlılığının azaldığını ve apoptotik hücrelerin yüzdesinin arttığını bildirmişlerdir.

Curcumin + H₂O₂ ile tedavi edilen grupta ise kaspaz 3 mRNA ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir. Sonuç olarak curcumin'in hücre içi ROS konsantrasyonunu azaltabileceğini ve apoptozla ilişkili genlerin düzenlenmesi yoluyla da oksidatif hasarı inhibe edebileceğini öne sürmüşlerdir (Cao ve ark., 2018).

İnsan lens epitel hücre hattı (HLEC) kullanılarak yapılan bir in vitro çalışmada, HLEC'ler farklı yoğunluklarda ve sürelerde Ultraviyole B (UVB) ışınlarına maruz bırakılarak katarakt oluşumu indüklenmiştir. Çalışmada, UVB ışınlaması sonrası HLEC'lerde kaspaz 3 düzeyindeki değişimi araştırmak için Western Blot analizi yapılmış ve kaspaz 3 düzeylerinin UVB ışınlamasına maruz kalma süresi ile doğru orantılı olarak 2-5 kat arttığı bildirilmiştir (Ji ve ark., 2015).

Andersson ve ark. (2003), in vitro olarak kültüre edilen insan lens epitel hücrelerinin, staurosporin'e (apoptozu indüklemek için kullandıkları ajan) karşı kaspaz 3 aktivasyonu ile yanıt verme yeteneği araştırmışlardır. Staurosporin ile inkübe edilen insan lensi epitel hücrelerinde, kaspaz 3 aktivitesinin staurosporin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artış sergilediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında katarakt cerrahisi sonrası aldıkları insan lens kapsülotomi örneklerinin, 24 saat boyunca 1000 nM staurosporin'e maruz bırakıldığında benzer sonuçlar sergilediğini bildirmişlerdir (Andersson ve ark., 2003).

Yao ve ark. (2007), insan lens epitel (HLE) hücrelerinde oksidatif strese bağlı oluşan apoptoza karşı partenolit'in koruyucu etkisini inceledikleri çalışmalarında; HLE hücrelerine H₂O₂ (katarakt indükleyici) uygulamış ve HLE hücre hattında oksidatif stresin neden olduğu apoptozda efektör kaspaz 3 ve başlatıcı kaspaz 9'un düzeylerini araştırmışlardır. Çalışmalarında farklı konsantrasyonlardaki partenolit'in, HLE hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonu üzerindeki etkisini ölçmek için kaspaz kolorimetrik aktivite tahlil kiti kullanmışlar ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50 µM H₂O₂ ile tedavi edilen HLE hücrelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinde önemli bir artış tespit etmişlerdir (H₂O₂ ve kontrol grubu sırasıyla 0.94±0.08 -0.09±0.02, 0.74±0.07 - 0.10±0.02) . H₂O₂ ve 10, 20 ve 50 µM partenolit ile tedavi edilen HLE hücrelerinde kaspaz 3 aktivitelerini sırasıyla 0.84±0.04, 0.44±0.09 ve 0.17±0.03 olarak ve kaspaz 9 aktivitelerini ise 0.68±0.08, 0.45±0.06 ve 0.20±0.04, olarak belirlemişler ve partenolit'in, H₂O₂ ile muamele edilmiş HLE hücrelerinde kaspaz 3 ve

kaspaz 9'un aktivasyonunu doza bağılı bir şekilde önemli ölçüde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (Yao ve ark., 2007).

Wistar rat lenslerinin selenit ve/veya chrysin ile inkübe edildiği in vitro bir çalışmada; apoptozda rol oynayan kaspaz 3 ve 9'un Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) analizi ile mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Çalışmalarının sonucunda; her iki yöntemde de lenslerdeki kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyelerinin sadece selenit uygulanan grupta (katarakt grubu), (sırasıyla %98.7 ve %85.5), kontrol grubuna (%71.8 ve %66.1) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğunu, bununla birlikte chrysin ve selenit'in aynı anda uygulandığı grupta ise bu değerlerin anlamlı derecede azaldığını (%83.4 ve %69.7) ve kontrol grubuna yaklaştığını bildirmişlerdir (Sundararajan ve ark., 2016).

Yukarıda bilgisi verilen araştırmalara benzer şekilde çalışmamızda da apoptoz belirteçlerinden olan kaspaz 3 ve kaspaz 9'un ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Çalışmamızda sadece HC uygulanan grupta kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde artmış ve ortalama kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri sırasıyla 13.81 ve 39.71 ng/lens olarak hesaplanmıştır. Farklı dozlarda chrysin (25, 50, 100 mg/kg) ile tedavi edilen gruplarda ise dozla ters orantılı olarak kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri azalmış olup, özellikle yüksek doz chrysin uygulanan grupta kaspaz 3 ve 9 değerleri sırasıyla 9.69 ve 29.72 ng/lens olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar; HC uygulamasının lens epitelyal hücrelerinde kaspaz yollarını aktive ederek apoptoza neden olduğunu ve tedavi edici antioksidan olarak uyguladığımız chrysin'in kaspaz 3 ve 9 ile ilgili yolları inhibe ederek apoptoz oranını azalttığını düşündürmektedir. Apoptozun göstergesi olan kaspaz 3 ve kaspaz 9 proteinlerinin düzeyleri literatürle uyumlu olarak (Ji ve ark., 2015; Sundararajan ve ark., 2016; Cao ve ark., 2018;) HC uygulamasına bağlı katarakt gelişen grupta artmakta, chrysin uygulanan gruplarda ise azalmaktadır. Ancak çalışmamızdaki kaspaz 3 ve kaspaz 9 sayısal değerleri ile literatürdeki çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında çalışmalar arası gözlenen sayısal farklılıkların kullanılan model, ölçüm metotları ve uygulanan tedavi edici/katarakt indükleyici madde farklılıkları nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz.

Omurgalılar sınıfındaki canlıların lensleri damarsız olup, ön bölgesinde tek katlı epitel hücre tabakası bulunmaktadır (Bloemendal 1981). Bu tek tabakalı lens epitel hücreleri,

lens'in homeostazını ve şeffaflığını korumak için gereklidir (Sies 1997). Normal şartlar altında, lens epitel hücreleri uzun ömürlüdür ancak oksidatif stres, UVB, diyabet gibi bazı faktörler, lens'in homeostazının bozulmasına ve lenste opaklaşma meydana gelmesine neden olabilmektedir. Daha önce yapılan hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda, oksidatif stres ve UV gibi farklı birçok etkenin lens epitel hücrelerinde apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olabileceği ve apoptozun da katarakt oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir (Li ve ark., 1995; Garner ve ark., 2000; Zou ve ark., 2002). Katarakt oluşumunda apoptozu saptamak için normal insan materyallerinin kullanılması etik açıdan bazı zorluklar içermesi nedeniyle, araştırmacılar apoptoz ve kataraktogenez arasındaki ilişkiyi incelemek için değişik hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmalarını tercih etmektedir. Katarakt etiolojisinde apoptozun rolünü araştırmak için yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda H₂O₂, UVB, selenit, HC gibi katarakt indükleyici ajanlar kullanılmıştır (Spector ve Garner, 1981; Li ve ark., 1995; Li ve Spector, 1996; Tamada ve ark., 2000; Takamura ve ark., 2003; Sundararajan ve ark., 2016).

Apoptoz süreci kompleks bir mekanizmaya sahip olup, bu sürece bağlı olarak hücrelerde birçok metabolik, fizyolojik ve biyokimyasal değişimler gerçekleşir. Hücreler küçülerek kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı kısmen erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır. Hücre içeriklerini içine alan ve membranla çevrili veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan apoptotik cisim olarak adlandırılan tomurcuklar oluşur. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Cohen 1993). Apoptoz sırasında meydana gelen bu değişimleri incelemek için literatürde Hematoksilen-eozin boyama, Giemsa boyama, Floresan mikroskopi, Elektronmikroskopi, Anneksin V yöntemi, M30 yöntemi ve TUNEL yöntemi gibi birçok farklı metot kullanılmaktadır.

Yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan TUNEL yöntemi, Terminal deoksinükleotidil Transferaz Biotin-dUTP Nick End Labeling sözcüklerinin kısaltmasıdır. Bu yöntem DNA iplikçik kırılmalarını enzimatik olarak etiketleyerek endonükleaz bölünme ürünlerini test etmek için kullanılır (Kressel ve Groscurth, 1994; Elmore 2007). Çalışmamızda da uygulandığı gibi literatürde katarakt oluşumunu indükleyen apoptozun histolojik olarak TUNEL testiyle belirlendiği çalışmalar mevcuttur (Tamada ve ark., 2000; Takamura ve ark., 2003).

Li ve ark. (1995), sağlıklı kişilerden (kontrol grubu) ve katarakt hastalarından cerrahi operasyon sırasında alınan lens kapsülü epitel hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında; katarakt grubunda lens epitel hücrelerindeki apoptotik oranı %4.4-41.8 arasında belirlerken, aynı yaşlardaki kontrol grubunda ise çok az derecede apoptoz gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında rat lensi organ kültüründe H₂O₂ ile oksidatif stres indükleyerek katarakt oluşumunu ve lens epitel hücrelerinde apoptozu incelemişlerdir. 24 saat süre ile H₂O₂ ile kültüre edilen grupta neredeyse tüm hücrelerin apoptoza uğradığını rapor etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, lens epitel hücre apoptozunun oksidatif stres tarafından tetiklenebileceğini ve ayrıca indüklenmiş lens epitel hücre apoptozunun katarakt oluşumunu başlatıcı bir mekanizma olabileceğini bildirmişlerdir (Li ve ark., 1995).

Li ve Spector, (1996) yaptıkları çalışmada rat lens epitel hücrelerinde (LEC) UVB ışınına bağlı oluşan apoptoz değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında LEC'leri inkübe etmiş ve uygulanan UVB süresine göre DNA fragmentasyonu ve terminal deoksiribonükleotid transferaz'ı değerlendirerek hücrelerdeki apoptozis oranını belirlemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda UVB ışınına maruziyet süresi arttıkça lens epitel hücrelerindeki apoptozun arttığını (5. saatte %55.5, 11. saatte %85.5, 17. saatte %95) bununla birlikte hücre ölümüyle orantılı olarak lenste opaklık oluştuğunu ve 24. saat sonunda da tüm lens epitel hücrelerinde (%100) apoptoz geliştiğini bildirilmiştir (Li ve Spector, 1996).

Takamura ve ark. (2003), diyabet kaynaklı katarakt gelişimi araştırdıkları çalışmalarında; Sprague-Dawley ratlara galaktoz takviyeli diyet uygulayarak katarakt oluşumunu indüklemişler ve LEC'lerde apoptozu araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda galaktoz verilmeden önce yapılan ölçümlerde, lens epitel hücrelerinde TUNEL-pozitif hücrelerin tespit edilmediğini, galaktoz takviyesini takiben 24 saat sonra, LEC'lerin çoğunun mikroskopik olarak normal olmasına rağmen, TUNEL-pozitif hücrelerin gözlemlendiğini, TUNEL-pozitif hücrelerin toplam hücrelere yüzdesinin kademeli olarak arttığını ve beşinci günde TUNEL-pozitif hücre sayısının en yüksek düzeye ulaştığını (TUNEL pozitif hücrelerin yüzdesi 1. gün %0.26, 3. gün %1.02, 5. gün %2.78 ve 7. gün %2.20) rapor etmişlerdir (Takamura ve ark., 2003).

Tamada ve ark. (2000), ratlardan alınan lens epitel hücrelerinde selenit kaynaklı katarakt oluşumunda TUNEL testi ile apoptozun rolünü değerlendirmiştir. Çalışmalarının sonucunda kontrol grubunda yer alan ratların lens epitel hücrelerinde 5 gün boyunca çok az TUNEL boyaması olduğunu, buna karşılık selenit enjeksiyonundan sonraki 1., 2., 3. ve 4. günlerde pozitif boyanan hücre sayısında güne bağlı olarak artış meydana geldiğini gözlemlemişlerdir (Tamada ve ark., 2000).

Çeşitli deneysel hayvan modellerinde birçok flavanoid kökenli antioksidanın antiapoptotik özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir; bunlar arasında quersetin, beta-karoten, asetil-L-karnitin ve Nerium oleander yapraklarının özü sayılabilir (Marchionatti ve de Talamoni, 2009; Peng ve ark., 2010; Elanchezhian ve ark., 2010; Benson ve ark., 2015).

Araştırdığımız kadarıyla literatürde flavon grubuna ait bir flavanoid olan chrysin'in antikatarojenik etkilerini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma mevcut olup (Sundararajan ve ark., 2016; Wojnar ve ark., 2020; Patil ve ark., 2016), bu çalışmalar arasında yalnız bir tanesinde chrysin'in katarakt gelişimi sürecindeki apoptoz üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada chrysin'in antiapoptotik etkileri apoptotik kaskad proteinlerinin (kaspaz 3,8 ve 9 vb.) ekspresyon düzeyleri üzerinden değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda; chrysin'in apoptotik kaskad aktivasyonunu azaltarak veya bloke ederek kaspaz bağlantılı hücre ölmünü engellediği ve bunun sonucu olarak da chrysin'in selenitle indüklenen lenslerde lentiküler hücrelerdeki apoptoza karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (Sundararajan ve ark., 2016).

Literatürde çeşitli ajanlarla katarakt oluşumunun indüklendiği çalışmalara benzer şekilde (Li ve ark., 1995; Li ve Spector, 1996; Tamada ve ark., 2000; Takamura ve ark., 2003) çalışmamızda HC uygulanan gruplarda katarakt oluşumunun gözlemlendiği ve apoptotik hücrelerin HC uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. TUNEL incelemesinin sonuçlarına göre çalışmamızda; kontrol grubunda apoptotik oran 25.57 olarak tespit edilirken, sadece HC uygulanan grupta apoptotik oran 46.71 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler, çeşitli faktörlerin neden olduğu lens epitel hücre apoptozunun, katarakt gelişimi sırasında kritik bir rol üstelenebileceğini düşündürmektedir. HC+chrysin gruplarında ise; uygulanan chrysin'in doz oranıyla ters orantılı olarak apoptotik oranda azalma meydana gelmiş ve düşük dozdan yüksek doza doğru apoptotik

oranın sırasıyla 44.71, 36.86 ve 34 olarak belirlenmiştir. Katarakt ve chrysin'in tedavi edici etkisini antiapoptotik yollar üzerinden değerlendiren çalışmaya benzer şekilde (Sundararajan ve ark., 2016), çalışmamızda da chrysin uygulamasının antioksidan etki sergileyerek apoptozu ve buna bağlı katarakt gelişimini azalttığını belirledik. Çalışmamızın TUNEL incelemesine ait veriler literatür ile paralellik göstermesine rağmen; sayısal farklılıkların, çalışmalarda kullanılan farklı metot, etken madde ve farklı deneysel model kullanımından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak;

0.50 μ mol/yumurta HC dozu uygulaması, civciv embriyolarında yüksek düzeyde lens opaklaşmasına neden olurken, biyokimyasal parametrelerin (GSH, TAS, TOS, MDA, kaspaz 3 ve kaspaz 9) ve apoptoz ile ilgili histolojik verilerin (TUNEL sonuçları) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmesine sebep olmuş ve katarakt indükleyici etki göstermiştir.

Farklı dozlarda chrysin uygulaması (25, 50 ve 100 mg/kg) ise civciv embriyolarında HC ile indüklenen katarakt derecelerini azaltmış, biyokimyasal parametreleri kontrol grubunun sonuçlarına benzer şekilde normal değerlere yaklaştırmış ve histolojik olarak antiapoptotik etki sergilemiştir. Bu bulgular chrysin'in katarakt oluşumunu önleyen potansiyel bir antioksidan ajan olarak gösterilmesi açısından önemlidir.

Literatürde chrysin'in antibakteriyel, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antialerjik, antikanserojenik ve antioksidan gibi özelliklerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Ancak araştırdığımız kadarıyla chrysin'in civciv embriyolarında oluşturulan deneysel katarakt modeli üzerinde antioksidan etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda; civciv embriyolarında indüklenen katarakt üzerinde chrysin'in antioksidan etkisini göstermek açısından çalışmamızın literatüre ışık tutabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte civciv embriyo modelinde yapılan bu çalışmanın sonuçlarının mevcut haliyle insanlara uyarlanması mümkün olmayacağının farkında olarak daha kapsamlı araştırmaların yapılması kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

- Adams, J. M., Cory, S. (2001) 'Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family'. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 61-66.
- Adrain, C., Martin, S. J. (2001) 'The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas'. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 390-397.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M. (2002) 'Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism'. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- Aksoy T. (1999). *Tavuk Yetiştiriciliği*. 3.baskı. Ankara, Şahin Matbaa.
- An, H. K., Chung, K. M., Park, H., Hong, J., Gim, J. E., Choi, H. et al. (2020) 'CASP9 (caspase 9) is essential for autophagosome maturation through regulation of mitochondrial homeostasis'. *Autophagy*, 16(9), 1598-1617.
- Andersson, M., Honarvar, A., Sjöstrand, J., Peterson, A., Karlsson, J. O. (2003) 'Decreased caspase-3 activity in human lens epithelium from posterior subcapsular cataracts'. *Experimental Eye Research*, 76(2), 175-182.
- Arıncı K., Elhan A. (2006). *Anatomi 1 ve 2. Cilt*. Ankara, Güneş Kitabevi Ltd. Şti.
- Arifoğlu Y. (2019). *Her Yönüyle Anatomi*. 2. baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri.
- Artuner, B. (1972). *Travmatik Kataraktlar*. Turk Oftalmoloji Gazetesi, 2: 45-46.
- Asbell, P. A., Dualan, I., Mindel, J., Brocks, D., Ahmad, M., Epstein, S. (2005) 'Age-related cataract'. *Lancet*, 365(9459), 599-609.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014) 'Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal'. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 360438.
- Aydın O'Dwyer P., Aydın Akova Y. (2015). *Temel Göz Hastalıkları*. 3. baskı. Güneş Tıp Kitabevleri.
- Bae, Y., Lee, S., Kim, S. H. (2011) 'Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B'. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(1), 56-64.
- Bayley, K. D., Read, R. A. (2018) 'Sub-Tenon's anesthesia for canine cataract surgery'. *Veterinary ophthalmology*, 21(6), 601-611.
- Bayraktar Cantürk, Ş. (2008). *Senil Kataraktı Olan Hastalarda Operasyon Öncesi ve Sonrası Görme İşlevi Değerlendirilmesi*. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul.
- Belecky-adams, T., Haynes, T., Wilson, J., Rio-Tsonis, K. (2008) 'The Chick as a Model for Retina Development and Regeneration'. *Biology*, 102-119.
- Belhan, S., Çomaklı, S., Küçükler, S., Gülyüz, F., Yıldırım, S., Yener, Z. (2019) 'Effect of chrysin on methotrexate-induced testicular damage in rats'. *Andrologia*, 51(1), e13145.
- Benson, K. F., Newman, R. A., Jensen, G. S. (2015) 'Antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and skin regenerative properties of an Aloe vera-based extract of Nerium

oleander leaves (nae-8(®)). *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 8, 239–248.

Bhat, S. P. (2001) 'The ocular lens epithelium'. *Bioscience Reports*, 21(4), 537–563.

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, 166–171.

Bloemendal H. (1991) 'Proctor lecture. Disorganization of membranes and abnormal intermediate filament assembly lead to cataract'. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(3), 445–455.

Birt, D. F., Pelling, J. C., Nair, S., Lepley, D. (1996) 'Diet intervention for modifying cancer risk'. *Progress in Clinical and Biological Research*, 395, 223–234.

Boice, A., Bouchier-Hayes, L. (2020) 'Targeting apoptotic caspases in cancer'. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1867(6), 118688.

Cao, J., Wang, T., Wang, M. (2018) 'Investigation of the anti-cataractogenic mechanisms of curcumin through in vivo and in vitro studies'. *BMC ophthalmology*, 18(1), 48.

Celińska-Janowicz, K., Zaręba, I., Lazarek, U., Teul, J., Tomczyk, M., Pałka, J. et al. (2018) 'Constituents of Propolis: Chrysin, Caffeic Acid, p-Coumaric Acid, and Ferulic Acid Induce PRODH/POX-Dependent Apoptosis in Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell (CAL-27)'. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 336.

Chen, Y., Wang, G., Wang, X., Ma, Z., Chen, P., Chuai, M. et al. (2014) 'Effects of high salt-exposure on the development of retina and lens in 5.5-day chick embryo'. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(3): 804–817.

Chennamaneni, S. R., Bohner, A., Bernhisel, A., Ambati, B. K. (2014) 'Pharmacokinetics and efficacy of Bioerodible Dexamethasone implant in Concanavalin A-induced uveitic cataract rabbit model'. *Pharmaceutical Research*, 31(11), 3179–3190.

Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., Wang, J. (1996) 'Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups'. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79(2), 157–163.

Chiu, C. C., Huang, Y. T., Wang, Y. C., Chang, Y. C., Ching, Y. H., Chen, H. H. et al. (2013) 'Pretreatment with lipopolysaccharide ameliorates Pseudomonas exotoxin A-induced hepatotoxicity in rats'. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35, 296–303.

Cohen, J. J. (1993) 'Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function'. *Chest*, 103(2), 99S–101S.

Ciftci, O., Ozdemir, I. (2011) 'Protective effects of quercetin and chrysin against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induced oxidative stress, body wasting and altered cytokine productions in rats'. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(3), 504–508.

Dave, A., Craig, J. E., Alamein, M., Skrzypiec, K., Beltz, J., Pfaff, A. et al. (2021) 'Genotype, Age, Genetic Background, and Sex Influence Epha2-Related Cataract Development in Mice'. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62(12), 3.

- De Smit, L., Bruggeman, V., Tona, J.K., Debonne, M., Onagbesan, O., Arckens, L. et al. (2006) 'Embryonic developmental plasticity of the chick: Increased during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth'. *Comp Biochem Physiol Part A*; 145:166-175.
- Duman, R., Vurmaz, A. (2018) 'Role of innate immunity and oxidative stress in steroid-induced cataracts in developing chick embryos'. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 37(3), 281–285.
- Duman, R., Ertekin, T., Vurmaz, A., Köken, T., Bilir, A. (2018) 'Comparison of the Efficacy of Different Hydrocortisone-Induced Cataract Models in Developing Chick Embryos'. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 21(3): 1–7
- Duman, R., Ertekin, T., Duman, R., Vurmaz, A., Çetinkaya, E., Güzel, H. (2019) 'Anticataractogenic effect of betaine in chick embryo hydrocortisone-induced cataract model'. *The Indian Journal of Medical Research*, 150(4), 407–411.
- Drake R. L, Vogl W., Mitchell A.W.M. (2018). *Tıp Fakültesi Öğrencileri için Gray's Anatomi*: 3. baskı. Meserret Cumhuri, Beliz Taşcıoğlu, Selçuk Tunalı, Ankara, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.
- Elanchezhian, R., Sakthivel, M., Geraldine, P., Thomas, P. A. (2010) 'Regulatory effect of acetyl-L-carnitine on expression of lenticular antioxidant and apoptotic genes in selenite-induced cataract'. *Chemico-Biological Interactions*, 184(3), 346–351.
- Elmore S. (2007) 'Apoptosis: a review of programmed cell death'. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Bafandeh, F. (2019) 'The Cardiovascular Protective Effects of Chrysin: A Narrative Review on Experimental Researches'. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 17(1), 17–27.
- Francis, P. J. (2001). *Clinical and Genetic Heterogeneity of Human Cataract*. University of London, University College London (United Kingdom).
- French, N. A. (1997) 'Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size'. *Poultry science*, 76(1), 124-133.
- Gale, C. R., Hall, N. F., Phillips, D. I., Martyn, C. N. (2001) 'Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract'. *Ophthalmology*, 108(11), 1992–1998.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V. et al. (2012) 'Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012'. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107–120.
- Garner, B., Davies, M. J., Truscott, R. J. (2000) 'Formation of hydroxyl radicals in the human lens is related to the severity of nuclear cataract'. *Experimental Eye Research*, 70(1), 81–88.
- Gartner L.P, Hiatt J.L. (2013). *Renkli Histoloji Atlası*. 4. baskı. Attila Dağdeviren, F. Seveda Mütfüoğlu, Gülten Karabay, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri.
- Guidotti T. L. (2011). *Global occupational health*. Oxford University Press.
- Gupta, S. K., Trivedi, D., Srivastava, S., Joshi, S., Halder, N., Verma, S. D. (2003) 'Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in

vitro and in vivo study.’ *Nutrition*, 19(9), 794–799.

Gökmen Kavak, D. (2021). *Katarakt cerrahisinin yaşam kalitesi ve maliyet sonuçlarının değerlendirilmesi*. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Gözoğlu S. H. (2006). *Mikroinsizyonel katarakt cerrahisi ile lens ekstraksiyonu ve arka kamara göz içi lensi yerleştirilmesi sonrası postoperatif sonuçların incelenmesi*. Uzmanlık Tezi, T.C. Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Kliniği.

Grzybowski, A., Ascaso, F. J. (2014) ‘Sushruta in 600 B.C. introduced extraocular expulsion of lens material.’ *Acta Ophthalmologica*, 92(2), 194–197.

Gupta, VB., Rajagopala, M., Ravishankar, B. (2014) ‘Etiopathogenesis of cataract: an appraisal’. *Indian J Ophthalmol*; 62(2):103-110.

Hamburger, V., Hamilton, H. (1951) ‘A series of normal stages in the development of the chick embryo’. *Journal of Morphology*; 88(1):49–92.

Hankinson, S. E., Stampfer, M. J., Seddon, J. M., Colditz, G. A., Rosner, B., Speizer, F. et al. (1992) ‘Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study’. *BMJ*, 305(6849), 335–339.

Harocopos, G. J., Alvares, K. M., Kolker, A. E., Beebe, D. C. (1998) ‘Human age-related cataract and lens epithelial cell death’. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(13), 2696–2706.

Ho, M. C., Peng, Y. J., Chen, S. J., Chiou, S. H. (2010) ‘Senile cataracts and oxidative stress’. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics*, 1(1), 17-21.

Hollman, P. C. H., Arts, I. C. W. (2000) ‘Flavonols, flavones and flavanols–nature, occurrence and dietary burden’. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1081-1093.

<https://tarihdergi.com/gozbilimin-tarihsel-gelisimi/>, Erişim tarihi: 15 Mart 2022.

Hubbell, A. A. (1904) ‘Samuel Sharp, the First Surgeon to make the Corneal Incision in Cataract Extraction with a Single Knife: A Biographical and Historical Sketch’. *Medical Library and Historical Journal*, 2(4), 1–268.

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), 535–540.

Jacques, P. F., Taylor, A., Hankinson, S. E., Willett, W. C., Mahnken, B., Lee, Y. et al. (1997) ‘Long-term vitamin C supplement use and prevalence of early age-related lens opacities’. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66(4), 911–916.

Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C. (1997) ‘Programmed cell death in animal development’. *Cell*, 88(3), 347-354.

Ji, Y., Cai, L., Zheng, T., Ye, H., Rong, X., Rao, J. et al. (2015) ‘The mechanism of UVB irradiation induced-apoptosis in cataract’. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 401(1-2), 87–95.

Jin, C. Q., Dong, H. X., Cheng, P. P., Zhou, J. W., Zheng, B. Y., Liu, F. (2013) ‘Antioxidant status and oxidative stress in patients with chronic ITP’. *Scandinavian Journal of Immunology*, 77(6), 482–487.

- Junqueira LC, Carneiro J. (2006). *Temel Histoloji*. Yener Aytekin, Seyhun Solakoğlu, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Kang, M. K., Park, S. H., Kim, Y. H., Lee, E. J., Antika, L. D., Kim, D. Y. et al. (2016) 'Dietary Compound Chrysin Inhibits Retinal Neovascularization with Abnormal Capillaries in db/db Mice'. *Nutrients*, 8(12), 782.
- Karel, F., Işıkcılık, Y., Takmaz, T. (1997) 'Lens Metabolizması ve Katarakt Gelişim Mekanizmaları'. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol*, 6(1):50-6,
- Karthikeyan, S., Srinivasan, R., Wani, S. A., Manoharan, S. (2013) 'Chemopreventive potential of chrysin in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis'. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(1), 46.
- Kedika, B., Thotla, K., Noole, V., Chepyala, K.R. (2016) 'Research Progress of Chrysin derivatives with potential biological activities'. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(8): 1210-1222
- 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, 161–168.
- Krag, S., Andreassen, T. T. (2003) 'Mechanical properties of the human lens capsule'. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22(6), 749–767.
- Kressel, M., Groscurth, P. (1994) 'Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA'. *Cell and Tissue Research*, 278(3), 549–556.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007) 'Mitochondrial membrane permeabilization in cell death'. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163.
- Lapidot, T., Walker, M. D., Kanner, J. (2002) 'Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7220–7225.
- Schoenwolf G.C., Bleyl S.B., Brauer P.R., Francis-West P.H. (2009). *Larsen's human embryology* (4th ed.). New York, Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Lee, J. W., Iwatsuru, M., Nishigori, H. (1995) 'Glucocorticoid-induced cataract of developing chick embryo as a screening model for anticataract agents'. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 11(4), 533–541.
- Li, R., Zang, A., Zhang, L., Zhang, H., Zhao, L., Qi, Z. et al. (2014) 'Chrysin ameliorates diabetes-associated cognitive deficits in Wistar rats'. *Neurological Science*, 35(10), 1527–1532.
- Li, Z., Gu, S., Quan, Y., Varadaraj, K., Jiang, J. X. (2021) 'Development of a potent embryonic chick lens model for studying congenital cataracts in vivo'. *Communications Biology*, 4(1), 325.
- Li, W. C., Spector, A. (1996) 'Lens epithelial cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract.' *Free Radical Biology & Medicine*, 20(3), 301–311.

- Li, W. C., Kuszak, J. R., Dunn, K., Wang, R. R., Ma, W., Wang, G. M. et al. (1995) 'Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals'. *The Journal of Cell Biology*, 130(1), 169–181.
- Liu, D., Ahmet, A., Ward, L., Krishnamoorthy, P., Mandelcorn, E. D., Leigh, R. et al. (2013) 'A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy'. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, 9(1), 30.
- Lushchak, V. I. (2014) 'Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification'. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
- Marchionatti, A. M., de Talamoni, N. T. (2009) 'Antioxidant and antiapoptotic properties of quercetin prevent oxidative stress caused by menadione in chick intestine'. *Bone*, 6(45), S157.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., Watkins, J. B., 3rd (2003) 'Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review'. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 24–38.
- Mani, R., Natesan, V. (2018) 'Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action'. *Phytochemistry*, 145, 187–196.
- Mantawy, E. M., El-Bakly, W. M., Esmat, A., Badr, A. M., El-Demerdash, E. (2014) 'Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis'. *European Journal of Pharmacology*, 728, 107–118.
- Mares-Perlman, J. A., Klein, B. E., Klein, R., Ritter, L. L. (1994) 'Relation between lens opacities and vitamin and mineral supplement use'. *Ophthalmology*, 101(2), 315–325.
- McCarty, C. A. (2002) 'Cataract in the 21st century: Lessons from previous epidemiologic research'. *Clinical and Experimental Optometry*, 85(2), ss. 91–96.
- Mcgeady T. A., Quinn P. J., Fitzpatrick E. S., Fitzpatrick E. S., Ryan M. T. (2011). *Veteriner Embriyoloji*. İlhami ÇELİK, Yasemin ÖZNURLU, Medipres Yayıncılık.
- McGrew, M., Sherman, A., Ellard, F., Lilico, S., Gilhooley, H., Kingsman, A. et al. (2004) 'Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors'. *EMBO Reports*; 5(7): 728–733.
- Meister, A., Anderson, M. E. (1983) 'Glutathione'. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711–760.
- Meng, X., Fang, S., Zhang, Z., Wang, Y., You, C., Zhang, J., Yan, H. (2017) 'Preventive effect of chrysin on experimental autoimmune uveitis triggered by injection of human IRBP peptide 1-20 in mice'. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(8), 702–711.
- Moore K.M., Persaud T.V.N. (2002). *İnsan Embriyolojisi*. 6. baskı. Mehmet Yıldırım, İmer Okar, Hakkı Dalçık, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., De Tommasi, N. (2005) 'Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species'. *Food Chemistry*, 92(2), 349–355.
- Nabavi, S. F., Braid, N., Habtemariam, S., Orhan, I. E., Daglia, M., Manayi, A. et al. (2015) 'Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine.' *Neurochemistry International*, 90, 224–231.
- Nagata, M., Hikida, M., Mibu, H., Muto, N., Yamamoto, I. (1994) 'Effect of ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside on hydrocortisone-induced cataract formation in developing

chick embryos: II. Influence on glutathione and lipid peroxide contents in the lens'. *Journal of Ocular Pharmacology*, 10(3), 537–542.

Nakazawa, Y., Oka, M., Bando, M., Takehana, M. (2015) 'Hesperetin prevents selenite-induced cataract in rats'. *Molecular Vision*, 21, 804–810.

Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I. E., Shariati, M. A., Iahtisham-Ul-Haq, IqraYasmin, Shahbaz, M. et al. (2019) 'Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties'. *Life Sciences*, 235, 116797.

Nishigori, H., Lee, J. W., Iwatsuru, M. (1983) 'An animal model for cataract research: cataract formation in developing chick embryo by glucocorticoid'. *Experimental Eye Research*, 36(4), 617–621.

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), 3027–3033.

Nishigori, H., Lee, J. W., Yamauchi, Y., Maruyama, K., Iwatsuru, M. (1987) 'Analysis of glucose levels during glucocorticoid-induced cataract formation in chick embryos'. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 28(1), 168–174.

Okuno, T., Kojima, M., Yamaguchi-Sekino, S., Ishiba, Y., Suzuki, Y., Sliney, D. H. (2021) 'Cataract Formation by Near-infrared Radiation in Rabbits'. *Photochemistry and Photobiology*, 97(2), 372–376.

O'Leary, K.A., De Pascual-Tereasa, S., Needs, P.W., Bao, Y.P., O'Brien, N.M., Williamson, G. (2004) 'Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription'. *Mutation Research*, 551(1-2), 245–254.

Patel, R. V., Mistry, B., Syed, R., Rathi, A. K., Lee, Y. J., Sung, J. S. et al. (2016) 'Chrysin-piperazine conjugates as antioxidant and anticancer agents'. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 166–177.

Paulsen F., Waschke J. (2013). *Sobotta Atlas of Human Anatomy*, Vol. 3, English: Head, Neck and Neuroanatomy. Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH.

Pau H. (2006) 'Cortical and subcapsular cataracts: significance of physical forces'. *Ophthalmologica*, 220(1), 1–5.

Peng, H. C., Chen, J. R., Chen, Y. L., Yang, S. C., Yang, S. S. (2010) 'beta-Carotene exhibits antioxidant and anti-apoptotic properties to prevent ethanol-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes'. *Phytotherapy Research*, 24(2), S183–S189.

Pietta, P. G. (2000) 'Flavonoids as antioxidants'. *Journal of Natural Products*, 63(7), pp. 1035–1042.

Pisoschi, A. M., Pop, A. (2015) 'The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review'. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.

Rani, N., Bharti, S., Bhatia, J., Nag, T. C., Ray, R., Arya, D. S. (2016) 'Chrysin, a PPAR- γ agonist improves myocardial injury in diabetic rats through inhibiting AGE-RAGE mediated oxidative stress and inflammation'. *Chemico-Biological Interactions*, 250, 59–67.

Rashidi, H., Sottile, V. (2009) 'The chick embryo: Hatching a model for contemporary biomedical research'. *BioEssays*, 31(4): 459–465.

- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) 'Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits'. *Food Chemistry*, 66 (4), 401-436.
- Ross, J. A., Kasum, C. M. (2002) 'Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety', *Annual Review of Nutrition*, 22, pp. 19–34.
- Rusznayak, SP., Szent-Gyorgyi, A. (1936) 'Vitamin P: flavonols as vitamins'. *Nature*, 138,27.
- Sadler T.W. (1990). *Langman's Medical Embryology*. 6th ed. William- Wilkins, Baltimore, United States
- Samarghandian, S., Ohata, H., Yamauchi, N., Shibasaki, T. (2003) 'Corticotropin-releasing factor as well as opioid and dopamine are involved in tail-pinch-induced food intake of rats'. *Neuroscience*, 116(2), 519–524.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T. (2017) 'Catechin Treatment Ameliorates Diabetes and Its Complications in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats'. *Dose-response*, 15(1).
- Satyanarayana, K., Sravanthi, K., Shaker, I. A., Ponnulakshmi, R., Selvaraj, J. (2015) 'Role of chrysin on expression of insulin signaling molecules'. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 6(4), 248–258.
- Saunders, J. W. (1947) 'The proximo-distal sequence of origin of wing parts and the role of the ectoderm.' *The Anatomical Record*; 99(4): 567.
- Sharma, P., Kumari, A., Gulati, A., Krishnamurthy, S., Hemalatha, S. (2019) 'Chrysin isolated from *Pyrus pashia* fruit ameliorates convulsions in experimental animals'. *Nutritional Neuroscience*, 22(8), 569–577.
- Snell R. S., Lemp M. A. (2012). *Clinical Anatomy of the Eye*. 2nd edn.
- Shui, Y. B., Kojima, M., Sasaki, K. (1996) 'A new steroid-induced cataract model in the rat: long-term prednisolone applications with a minimum of X-irradiation'. *Ophthalmic Research*, 28 (2), 92–101.
- Siegfried, C. J., Shui, Y. B. (2019) 'Intraocular Oxygen and Antioxidant Status: New Insights on the Effect of Vitrectomy and Glaucoma Pathogenesis'. *American Journal of Ophthalmology*, 203, 12–25.
- Sies H. (1997) 'Oxidative stress: oxidants and antioxidants'. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.
- Sies, H., Jones, D. P. (2020) 'Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents'. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(7), 363–383.
- Simon, J. A., Hudes, E. S. (1999) 'Serum ascorbic acid and other correlates of self-reported cataract among older Americans'. *Journal of Clinical Epidemiology*, 52(12), 1207–1211.
- Song, J. H., Kim, Y. H., Lee, S. C., Kim, M. H., Lee, J. H. (2016) 'Inhibitory Effect of Chrysin (5,7-Dihydroxyflavone) on Experimental Choroidal Neovascularization in Rats'. *Ophthalmic Research*, 56(1), 49–55.
- Spector, A., Garner, W. H. (1981) 'Hydrogen peroxide and human cataract'. *Experimental Eye Research*, 33(6), 673–681.

- Spencer J. P. (2003) 'Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract'. *The Journal of Nutrition*, 133(10), 3255S–3261S.
- Srinivasarao, D. A., Reddy, S. S., Reddy, G. B., Katti, D. S. (2019) 'Spatio-temporal control on the delivery of triamcinolone acetonide using polymeric nanoparticles reduces steroid induced cataract'. *International Journal of Pharmaceutics*, 568, 118474.
- Stern, C. D. (2005) 'The chick; a great model system becomes even greater'. *Developmental Cell*, 8(1), 9–17.
- Sundararajan, M., Thomas, P. A., Teresa, P. A., Anbukkarasi, M., Geraldine, P. (2016) 'Regulatory effect of chrysin on expression of lenticular calcium transporters, calpains, and apoptotic-cascade components in selenite-induced cataract'. *Molecular Vision*, 22, 401–423.
- Şeftalioglu A. (1998) *Genel & Özel İnsan Embriyolojisi*. 3. baskı. Tıp Teknik Yayıncılık.
- Şenköylü N. (2001). *Modern Tavuk Üretimi*. 3. Baskı. İstanbul, Anadolu Matbaa
- 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), 51–57.
- Tamada, Y., Fukiage, C., Nakamura, Y., Azuma, M., Kim, Y. H., Shearer, T. R. (2000) 'Evidence for apoptosis in the selenite rat model of cataract'. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(2), 300–306.
- Taylor, H. R., West, S. K. (1989) 'The clinical grading of lens opacities'. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*, 17(1), 81–86.
- Timmer, J., Johnson, J., Niswander, L. (2001) 'The use of in ovo electroporation for the rapid analysis of neural-specific murine enhancers'. *Genesis*, 29(3): 123–132.
- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. (1998) 'Caspases: enemies within'. *Science*, 281(5381), 1312–1316.
- Tolba, M. F., El-Serafi, A. T., Omar, H. A. (2017) 'Caffeic acid phenethyl ester protects against glucocorticoid-induced osteoporosis in vivo: Impact on oxidative stress and RANKL/OPG signals'. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 324, 26–35.
- Truscott, R. J. (2005) 'Age-related nuclear cataract-oxidation is the key'. *Experimental Eye Research*, 80(5), 709–725.
- Turno-Kręcicka, A., Grzybowski, A., Misiuk-Hojło, M., Patryn, E., Czajor, K., Nita, M. (2016) 'Ocular changes induced by drugs commonly used in dermatology'. *Clinics in Dermatology*, 34(2), 129–137.
- Ugboaja, O. C., Bielory, L., Bielory, B. P., Ehiorobo, E. S. (2012) 'Antioxidant vitamins, minerals and cataract: current opinion'. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(5), 517–522.
- Unur E, Ülger H, Ekinci N. (2014). *Anatomi*. Kayseri, Kuvılcım Kitapevi
- Utlü, B. (2017). *Kataraktlı Hastaların Lens Ön Kapsül Materyalinde Aquaporin – 1 (aqp-1) ve Pigment Epitel Kaynaklı Faktör (Pdedf) Düzeylerinin Araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum.
- Woodman, O. L., Chan, E. C. H. (2004) 'Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31(11), pp.

786–790.

Van Brecht, A., Hens, H., Lemaire, J. L., Aerts, J. M., Degraeve, P., Berckmans, D. (2005) ‘Quantification of the heat exchange of chicken eggs’. *Poultry Science*, 84(3), 353–361.

Varma, S. D., Kovtun, S., Hegde, K. R. (2011) ‘Role of ultraviolet irradiation and oxidative stress in cataract formation-medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists’. *Eye and Contact Lens*, 37(4), ss. 233–245.

Varma, S. D. (1991) ‘Scientific basis for medical therapy of cataracts by antioxidants’. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1), 335S–345S.

Velpandian, T., Nirmal, J., Gupta, P., Vijayakumar, A. R., Ghose, S. (2010) ‘Evaluation of calcium dobesilate for its anti-cataract potential in experimental animal models’. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 32(3), 171–179.

Vurmaz, A., Duman, R., Sabaner, M. C., Ertekin, T., Bilir, A. (2019) ‘Antioxidant effects of piperine in in-vivo chick embryo cataract model induced by steroids’. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 38(2), 182–189.

Vurmaz, A., Ertekin, A., Sabaner, M. C., Atay, E., Bozkurt, E., Bilir, A. (2021) ‘Effects of vitamin E in a glucocorticoid induced cataract model in chicken embryos’. *Biotechnic & Histochemistry*, 96(6), 431–438.

Wan, E. S., Qiu, W., Baccarelli, A., Carey, V. J., Bacherman, H., Rennard, S. I. et al. (2012) ‘Systemic steroid exposure is associated with differential methylation in chronic obstructive pulmonary disease’. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(12), 1248–1255.

Wang, H. M., Li, G. X., Zheng, H. S., Wu, X. Z. (2015) ‘Protective effect of resveratrol on lens epithelial cell apoptosis in diabetic cataract rat’. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(2), 153–156.

Waschke J., Böckers T.M., Paulsen F. (2016). *Sobotta Anatomi Konu Kitabı*. (Sargon, M. F. Çev.) Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri.

Watanabe, H., Kosano, H., Nishigori, H. (2000) ‘Steroid-induced short term diabetes in chick embryo: reversible effects of insulin on metabolic changes and cataract formation’. *Investigative ophthalmology & Visual Science*, 41(7), 1846–1852.

Wilson, S. E. (1999) ‘Stimulus-specific and cell type-specific cascades: emerging principles relating to control of apoptosis in the eye’. *Experimental Eye Research*, 69(3), 255–266.

Wolf, B. B., Green, D. R. (1999) ‘Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases’. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20049–20052.

Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D. (2004) ‘Glutathione metabolism and its implications for health’. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489–492.

Wu, S. Y., Leske, M. C. (2000) ‘Antioxidants and cataract formation: a summary review’. *International Ophthalmology Clinics*, 40(4), 71–81.

- Wojnar, W., Zych, M., Borymski, S., Kaczmarczyk-Sedlak, I. (2020) 'Chrysin Reduces Oxidative Stress but Does Not Affect Polyol Pathway in the Lenses of Type 1 Diabetic Rats'. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(2), 160.
- Xiao, J., Zhai, H., Yao, Y., Wang, C., Jiang, W., Zhang, C. et al. (2014) 'Chrysin attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing immuno-inflammatory responses.' *Neurosci*, 262, 156e164.
- Yao, H., Tang, X., Shao, X., Feng, L., Wu, N., Yao, K. (2007) 'Parthenolide protects human lens epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis via inhibition of activation of caspase-3 and caspase-9'. *Cell Research*, 17(6), 565–571.
- Yaşar, Ö. (2005). *Katarakt hastalarında kapsül içi yerleştirilen thinoptx ve acrysof göz içi lenslerinin görsel ve refraktif sonuçlarının, kontrast duyarlılık değişikliklerinin, arka kapsül opasifikasyonu insidenslerinin karşılaştırılması*. Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Prof. Dr. N. Reşat Belgeler Beyoğlu Göz Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- Young RW. (1991). *Age-related cataract*. New York: Oxford University Press
- Zanoli, P., Avallone, R., Baraldi, M. (2000) 'Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin'. *Fitoterapia*, 71 (1), S117–S123.
- Zhang, R., Wei, Y., Zhang, S., Li, H., Li, J., Ma, B. et al. (2022) 'Inhibitory effect of Idelalisib on selenite-induced cataract in Sprague Dawley rat pups'. *Current Eye Research*, 47(3), 365–371.
- Zhang, X., Peng, L., Dai, Y., Xie, Q., Wu, P., Chen, M. et al. (2021) 'Anti-cataract effects of coconut water in vivo and in vitro'. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112032.
- Zou, M. H., Shi, C., Cohen, R. A. (2002) 'High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H (2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells'. *Diabetes*, 51(1), 198–203.