

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DEJENERATİF RETİNAL GEN TEDAVİ
ÇALIŞMALARI İÇİN YENİ DENEY HAYVAN
MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Elif Özgecan ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DEJENERATİF RETİNAL GEN TEDAVİ
ÇALIŞMALARI İÇİN YENİ DENEY HAYVAN
MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Elif Özgecan ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 218S543).

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Tanıştığımız ilk günden itibaren bana inanıp fikir ve görüşlerime değer veren, hep dahası için teşvik edip, bilgi ve deneyimlerini esirgemedi paylaşarak bilimsel anlamda verimli bir yüksek lisans eğitimi geçirmemi sağlayan sayın danışman hocam Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na, her daim gerek bilimsel gerek manevi karşılıksız yardım ve desteği için sayın Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na,

Çalışmanın girişimsel hayvan deneylerini gerçekleştiren vitreo-retinal cerrah sayın Doç. Dr. Ahmet Burak BİLGİN'e, TÜBİTAK projemizdeki danışman hocam sayın Doç. Dr. Serdar CEYLANER'e, çalışmanın histolojik analizlerinde yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. C. İbrahim BAŞSORGUN'a

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki sevgili hocalarım ve asistan arkadaşlarıma,

Yalnızca tez sürecinde değil her daim destek ve sevgileri ile yanımda olan başta Gizem ŞEKER ve Fulya ERENDOR olmak üzere Gen ve Hücre Tedavi Merkezi asistanları Bahar AKKAYA, Zeynep Hilal DURKAYA ve Özlem YILMAZ'a

Tüm mesafelere rağmen yanımda oldukları için Ayşe Seda YAZGILI, Batuhan ATİK, Esra ÇETİN, Gizem YARTAŞ, Harun KULAK, Merve YİĞİT ve Zerina KURTOVIĆ'e,

Gerekli resmi işlemlerde sevgi ve sabırla verdikleri destekleri için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Her koşulda verdikleri emeği, güveni, desteği ve her an yanımda hissettiğim sevgileri için hayattaki en güzel şansım biricik aileme ve canım arkadaşım Dr. Şeyma ORÇAN'a

Sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Amaç: Kalıtsal retinopatiler, fotoreseptörlerin yapı ve fonksiyonunu bozan mutasyonların neden olduğu, retinal dejenerasyonla karakterize bir hastalıktır. Hastalığa sebebiyet veren mutasyonların çoğu rod hücrelerinde görülse de rod hücrelerinin kaybı zaman içerisinde koni hücrelerinin de dejenerasyonuna ve sonuçta körlüğe neden olur. Farklı hücre gruplarında görülebilen hastalıkla ilişkilendirilmiş mutasyonların tipi dejenerasyon sürecini etkilese de kalıtsal retinal distrofilerde görülen patoloji birbirine benzerdir. Bu bağlamda, kalıtsal retinal distrofilerin ortak hastalık patolojisini taklit eden yeni bir deney hayvan modelinin oluşturulması amaçlandı.

Yöntem ve Bulgular: Retinal dejenerasyonun indüklenmesi için hücrelerde hipoksi oluşturma etkileri ile bilinen kobalt klorür (CoCl_2) kullanıldı. Hastalık modelinin *in vitro* koşullarda oluşturulması amacıyla RPE ve mikroglia hücrelerine farklı dozlarda CoCl_2 uygulamasından sonra kimyasalın hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testleri ile analiz edildi. Hücrelerin hipoksik durumları ise HIF-1 α proteinine karşı yapılan western blot ve immünofloresan boyama yöntemleri ile belirlendi. Hastalık modelinin *in vivo* olarak da oluşturulması için Wistar sıçanlara dozları 5 – 500 nmol arasında değişen CoCl_2 çözeltisinin intravitreal enjeksiyonları yapıldı. Takip süresi sonunda kurban edilen sıçanlardaki retinal dejenerasyon, parafine gömülen göz dokularının hematoksilin ve eozin boyaması ile gösterildi. Fotoreseptörlerin dış segmentinde başlayıp, artan doz ve takip süresine bağlı olarak tüm retinal tabakalara yayılan progresif retinal dejenerasyon tespit edildi. Erken dönemlerde alınan göz dokularındaki TUNEL boyamada ise uygulamanın ilk 48 saatinde dış nükleer tabakada yoğun apoptotik hücrelere rastlandı.

Sonuç: CoCl_2 uygulamalarıyla kimyasal ajan indüklü, progresif retinal dejenerasyon *in vivo* deney modeli başarıyla oluşturuldu.

Anahtar Kelimeler: kobalt klorür, hipoksi, progresif retinal dejenerasyon

ABSTRACT

Objective: Hereditary retinopathies are characterized by retinal degeneration caused by genetic mutations that disrupt the structure and function of photoreceptors. Although most of the causative genes are located in the rod cells, rod cell deaths lead to the degeneration of cone cells and thus loss of vision. As photoreceptor degeneration mechanism and process are mainly governed by the type of mutation, the pathologies observed in the hereditary retinal dystrophy are similar. Thus, we aimed to develop a new experimental animal model of retinal degeneration manifesting a disease pathology which is common to all hereditary retinal dystrophies.

Methods and Results: A hypoxia mimicking agent, cobalt chloride, was used to induce retinal photoreceptor cell degeneration. To determine the potential toxicity of CoCl_2 on RPE and microglial cell lines, MTT assays were carried out using different concentration of CoCl_2 . To confirm the induction of hypoxia, the expression of the HIF-1 α was evaluated by western blotting and immunofluorescence staining following CoCl_2 treatment. Intravitreal injections of CoCl_2 were performed to establish an animal model of retinal degeneration in Wistar rats. Then hematoxylin and eosin staining was performed in paraffin embedded eye tissues to reveal retinal degeneration status of sacrificed animals. Progressive retinal degeneration was first spotted in the outer segment of the photoreceptors and then extended in to other retinal layers in time. Additionally, an extensive TUNEL positive apoptotic cell staining was observed in the outer nuclear layer within the first 48 hours following CoCl_2 injections.

Conclusion: A chemical agent-induced animal model of progressive retinal degeneration was successfully established by intravitreal administration of CoCl_2 in Wistar rats.

Key words: cobalt chloride, hypoxia, progressive retinal degeneration

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Göz Anatomisi ve Fizyolojisi	2
2.2. Retinitis Pigmentoza	2
2.3. Retinitis Pigmentoza'nın Moleküler Genetiği	3
2.4. RP Fotoresptör Dejenerasyon Mekanizması	4
2.5. Retinal Dejenerasyona Karşı Yeni Tedavi Stratejileri Geliştirmek	
İçin Kullanılabilecek Deney Hayvan Modelleri	6
3. GEREÇ ve YÖNTEM	8
3.1. <i>in vitro</i> Hastalık Modelinin Oluşturulması	8
3.2. Hücre Canlılık Testleri	8
3.3. Western Blot Yöntemiyle RPE ve Mikroglialarda CoCl ₂	
Uygulaması Sonrası HIF-1α Protein Miktarının Belirlenmesi	9
	iii

3.4. İmmünofloresan Yöntemiyle Retinal Hücrelerde ve Mikroglialarda	
CoCl ₂ Uygulaması Sonrası HIF-1 α Sentez Düzeyinin Belirlenmesi	10
3.5. Kimyasal Ajan İndüklü Dejeneratif Hastalık Modelinin <i>in vivo</i>	
Koşullarda Oluşturulması	10
3.6. Retinal Dokunun Histo-patolojik Analizi	11
3.7. Retinal Dejenerasyonun TUNEL Boyamayla Gösterilmesi	12
4. BULGULAR	14
4.1. Farklı CoCl ₂ Dozlarının ARPE-19 ve HMC-3 Hücre Canlılığı	
Üzerindeki Etkileri	14
4.2. RPE ve Mikroglia Hücrelerinde CoCl ₂ Uygulaması Sonrası HIF-1 α	
Sentez Düzeyinin Western Blot Yöntemiyle Gösterilmesi	17
4.3. CoCl ₂ Uygulaması Hipoksi Oluşturarak ARPE-19 ve HMC-3	
Hücrelerinde Dejenerasyona Sebebiyet Verdi	18
4.4. İntravitreal CoCl ₂ Enjeksiyonu Retinal Dejenerasyona Sebep Oldu	21
4.5. Retinal Dejenerasyonun TUNEL Analizi	38
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** İnsan gözü ve retinal hücre tabakalarının şematik görüntüsü 2
(Dias ve ark., 2018).
- Şekil 4.1.** CoCl₂ uygulaması almış ARPE-19 hücrelerinin 24(A), 48(B), 72(C), 15
ve 96.(D) saatlerde yapılan MTT test sonuçlarını gösteren grafikler
(One-way ANOVA, p****<0,0001).
- Şekil 4.2.** HMC-3 hücre hatlarında CoCl₂ uygulaması sonrası 24 (A), 48 (B) ve 16
72. (C) saatlerde yapılan MTT test analizlerini gösteren grafikler
(One-way ANOVA, p****<0,0001).
- Şekil 4.3** ARPE-19 hücrelerinin 48 saat CoCl₂ ile muamelesinin ardından 17
toplanan hücre lizatlarında HIF-1 α ve β -actin proteinlerinin western
blot ile tayini. Kullanılan dozlar şekil üzerinde nmol olarak
verilmiştir.
- Şekil 4.4** HMC-3 hücrelerinin 48 saat CoCl₂ ile muamelesinin ardından 18
toplanan hücre lizatlarında HIF-1 α ve β -actin proteinlerinin western
blot ile tayini. Kullanılan dozlar şekil üzerinde nmol olarak
verilmiştir.
- Şekil 4.5** ARPE-19 hücre hattında CoCl₂ uygulamasının 24 (A) ve 48 (B) saat 19
sonrasında yapılan immünofloresan boyama sonuçları. Dozlar şekil
üzerinde nmol olarak verilmiştir (büyütme oranı 20X).
- Şekil 4.6** HMC-3 hücre CoCl₂ uygulamasının 24 (A) ve 48 (B) saat 20
sonrasında immünofloresan boyama sonuçları. Dozlar şekil üzerinde
nmol olarak verilmiştir (büyütme oranı 20X).

Şekil 4.7	İntravitreal 1X PBS enjeksiyonu yapılmış deneklerin 2 hafta sonraki retinal tabakaların durumu. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))	22
Şekil 4.8	5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 5 nmol CoCl ₂ solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))	23
Şekil 4.9	5µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 15 nmol CoCl ₂ solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6µm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))	24
Şekil 4.10	5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 50 nmol CoCl ₂ solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))	25
Şekil 4.11	5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 150 nmol CoCl ₂ solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))	26
Şekil 4.12	5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 500 nmol CoCl ₂ solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6µm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))	27

- Şekil 4.13** 5 µl steril distile su içerisinde çözündürülmüş 50 nmol CoCl₂ 29
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))
- Şekil 4.14** 5 µl steril distile su içerisinde çözündürülmüş 100 nmol CoCl₂ 30
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))
- Şekil 4.15** 5 µl steril distile su içerisinde çözündürülmüş 150 nmol CoCl₂ 31
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))
- Şekil 4.16** 5 µl steril distile su içerisinde çözündürülmüş 50 nmol CoCl₂ 32
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 3 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))
- Şekil 4.17** 5 µl steril distile su içerisinde çözündürülmüş 100 nmol CoCl₂ 33
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 3 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))

- Şekil 4.18** 5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 150 nmol CoCl₂ 34
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 3 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))
- Şekil 4.19** 5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 50 nmol CoCl₂ 35
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 4 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))
- Şekil 4.20** 5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 100 nmol CoCl₂ 36
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 4 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))
- Şekil 4.21** 5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 150 nmol CoCl₂ 37
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 4 hafta sonra sakrifiye
edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan
kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X
(B – G))
- Şekil 4.22** 5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 50 nmol CoCl₂ 39
solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2, 3, 4 ve 7 gün sonra ve
1X PBS uygulamasından sonra (0) sakrifiye edilen sıçanların göz
dokularından 6 µm kalınlığında alınan kesitlerdeki TUNEL boyama
sonuçları. Apoptotik hücre çekirdekleri koyu kahverengi boyandı.
Metil yeşili zıt boyama için kullanıldı (Büyütme oranı 40X (A ve B)
ve 64X (C)).

SİMGELER ve KISALTMALAR

ARPE-19	: Adult Retinal Pigment Epithelium
BSA	: Bovine Serum Albumin
CoCl₂	: Kobalt Klorür
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride
dk	: Dakika
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DNT	: Dış Nükleer Tabaka
DPT	: Dış Pleksiform Tabaka
DS	: Dış Segment
ECL	: Enhanced Chemi-Luminescence
GHT	: Gangliyon Hücre Tabakası
HIF-1α	: Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HMC-3	: Human Microglia Cells-3
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H&E	: Hematoksilen ve Eozin
HRP	: Horse Radish Peroksidaz
IL – 1α	: İnterlökin 1 alfa
IL-1β	: İnterlökin 1 beta

IL-6	: İnterlökin altı
İNT	: İç Nükleer Tabaka
İPT	: İç Pleksiform Tabaka
İS	: İç Segment
kDa	: Kilodalton
ml	: Mililitre
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
NO	: Nitrik Oksit
NOS-2	: Nitrik Oksit Sentaz-2
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PBS-T	: Phosphate Buffer Saline – Tween 20
PFA	: Paraformaldehit
PVDF	: Polyvinylidene Difluoride
RCS	: Royal College of Surgens
rd	: retinal dejenerasyon
rds	: retinal dejenerasyon slow
ROS	: Reactive Oxygen Species
RP	: Retinitis Pigmentoza

RPE	: Retinal Pigment Epitelyum
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TdT	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling
v	: Volume
w	: Weight
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre

1. GİRİŞ

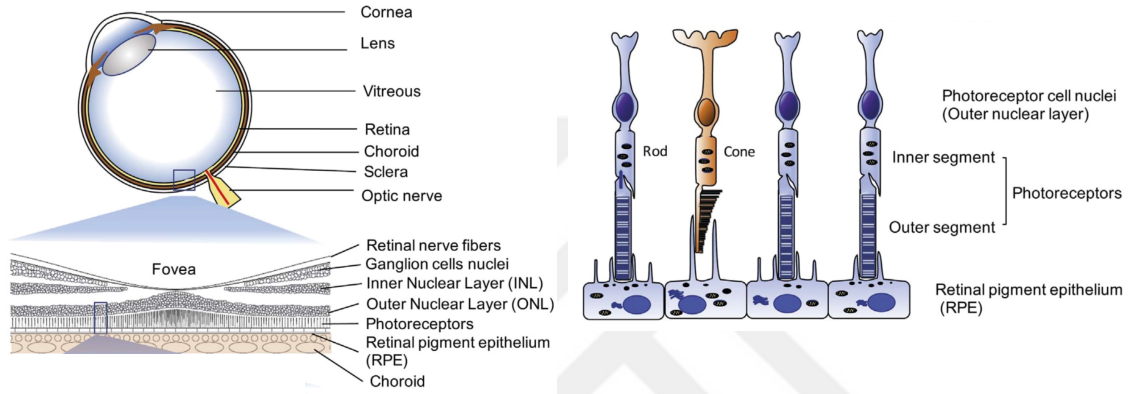
Retinal hücreler, görme işlevinin erken evrelerinden sorumlu, gözün ışığa duyarlı dokusunu oluşturan birbiriyle bağlantılı sinir hücreleridir. Kalıtsal retinal distrofi, retinanın yavaş ve ilerleyen dejenerasyonu ile karakterize, körlüğe neden olan bir hastalıktır. Sıklıkla fotoreseptörlerdeki (rod ve koniler), bazen de retinal pigment epitelyum hücrelerindeki (RPE) gen mutasyonları buna neden olur. Kalıtsal retinopatiler, genetik bozukluğun kalıtım şekli, görme kusuru ve hastalık progresyonu gibi durumlara göre sınıflandırılabilir. En sık görülen retinopati tipi retinitis pigmentozadır (RP). Yaygınlığı 1:4000 olan RP; dünya genelinde 2,5 milyon kişiyi etkileyen, rod ve koni hücrelerinin ilerleyen dejenerasyonu ile karakterize ve her iki gözde de körlükle sonuçlanan bir görme bozukluğudur. Farklı farmakolojik ajanlar (nörotrofik faktörler, antioksidanlar ve antiapoptotik ilaçlar) kullanarak yapılan tedavi girişimleri; tekrarlayan uygulamalar gerektirdiğinden ve hastalığa neden olan temel sebebi ortadan kaldırmaya yönelik olmadığından ancak sınırlı bir klinik etki gösterebilmektedir. Viral ve viral olmayan gen nakil vektörleri kullanarak genetik bozuklukları düzeltmeye yönelik gen tedavisi stratejileri, hastalığa sebebiyet veren geni susturarak veya değiştirerek hastalığa kesin çözüm imkânı sunar.

Çok çeşitli mutasyonların sebebiyet verdiği dejeneratif retinopatiler tedavi edilmesi zor hastalıklardır. Bu hastalıkların her birinin farklı biyokimyasal mekanizması veya nedeni olsa da retinal hücrelerin ölümüyle oluşan fonksiyonel bozukluk sonucu ortaya çıkan patolojik tablo genel olarak aynıdır. Fotoreseptörlerin özellikle de koni hücrelerinin korunmasına yönelik geliştirilen tedavi yaklaşımları, körlük tedavisinde çığır açma potansiyeline sahiptir. Fotoreseptörlerin dejenerasyon mekanizmasının aydınlatılması, bu konuda atılacak ilk adım olmalıdır. Olası gen tedavisi çalışmaları için her bir mutasyona özgü ayrı bir deney hayvan modeli kullanmak yerine; çeşitli mutasyonlar sonucu oluşan ortak hastalık patolojisini taklit eden yeni bir deney hayvan modelinin denenmesi, kullanılabilecek tedavi metodunun etki alanını genişletecektir. Bu nedenle projenin amacı, geliştirilebilecek gen tedavisi çalışmaları için ortak bir progresif retinal dejeneratif hastalık modelinin *in vivo* olarak oluşturulmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Göz Anatomisi ve Fizyolojisi

Göz, görüntüyü algılayıp işlemek üzere tasarlanmış karmaşık bir organdır. Ön kısmında konjenktiva, kornea, iris ve lens varken; arka kısmında vitreus sıvısı, nöral retina, retinal pigment epiteli (RPE), Bruch membranı, koroid ve sklera yer alır. Retinitis pigmentosa ve diğer retinal distrofilerde dejenerasyona uğrayan en önemli hücreler fotoreseptörler (rodlar ve koniler) ve RPE hücreleridir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: İnsan gözü ve retinal hücre tabakalarının şematik görüntüsü. (Dias ve ark., 2018).

Işığa duyarlı fotoreseptörler rodlar ve koniler olmak üzere iki farklı hücre grubudur. Kısıklı ışığa duyarlılığı sağlayan rodlar retinanın periferinde bulunurken, parlak ışıkla aktive olan koniler ise retinanın merkezinde yer alan makula bölgesine yerleşmiştir. Fotoreseptörler; iç segment, dış segment, hücre gövdesi ve sinaptik terminal bölgelerinden oluşmuştur. Dış segment, her bir fotoreseptörlerin RPE hücreleriyle direkt temasını sağlayan ışığa duyarlı bir organdır. Kan retinal bariyeri oluşturan tek katlı, hekzagonal hücrelerden oluşan RPE tabakası, fotoreseptör hücrelerinin beslenmesini sağlamanın yanında toksik ürünleri fagosit etmek ve retinayı fototoksik hasardan korumak gibi görevler üstlenmiştir.

2.2. Retinitis Pigmentoza

Retinitis pigmentosa (RP), fotoreseptör dejenerasyonu sonucu oluşan pigment birikimiyle karakterize bir hastalıktır. Çoğunlukla önce rod hücre dejenerasyonu,

sonrasında da koni hücre dejenerasyonu görülür (Hamel, 2006). Bu da iki hücre grubunun yaşamsal açıdan birbirine bağımlılığını gösterir. Rod hücreleri periferel retinada lokalize olduğundan, hastalarda tünel görüntü ile sonlanan periferel görüş alanında bir daralma söz konusudur (Cuenca ve ark., 2004). RP hastalığının 3 evresi vardır (Hartong ve ark., 2006). Başlangıçta ergenlik çağındaki çocuklarda rod hücrelerinde fonksiyon bozukluğu sonrasında apoptozis ve rod hücre kaybı nedeniyle gelişen gece körlüğü ortaya çıkar. Ara evrede, akşam üstü araba kullanma ve yürümeyi dahi zorlaştıran düzeyde bir gece körlüğü söz konusudur. Bu dönemde, göz dibi muayenesinde retinal atrofiyle beraber pigment birikimlerinin görülmesiyle klinik teşhis konulabilir. Hastalığın ileri evresinde hem periferel hem de merkezi görüntü kaybına bağlı olarak hastalarda gündüz görme bozukluğu da ortaya çıkar. Hastalığın ileri evre göz dibi muayenesinde, pigment birikimleri ve RPE atrofisi gözlemlenir. RP genelde oldukça yavaş ilerleyen bir hastalık olup, hastaların periferel görüntü alanında yıllık %2-13 daralma söz konusudur. Görme fonksiyon kaybında gen ve mutasyon tipinin etkisinin yanında diğer genetik ve çevresel faktörler de etkilidir (Hamel, 2006). RP çoğunlukla monogenik bir hastalık olmasına rağmen 3000'den fazla mutasyon, sendromik RP ile ilişkilendirilmiştir (Guadagni ve ark., 2015). RP'ye sebebiyet veren gen mutasyonlarının çoğunluğu rod hücrelerinde bulunmasına rağmen çok azı da RPE gibi diğer retinal hücrelerde de görülür.

2.3. Retinitis Pigmentoza'nın Moleküler Genetiği

RP, genetik ve fenotipik olarak heterojen bir hastalıktır. Klinik belirtiler gözle kısıtlı olsa da hastaların %20-30'unda sistematik problemler de gözlenebilir. Retinada sentezlenen ve retinaya özgün fonksiyonları kodlayan genlerdeki mutasyonlar, tipik RP'ye (sendromik olmayan) sebebiyet verirken, farklı doku ve hücrelerde görev yapan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, sendromik RP'ye neden olur (Verbakel ve ark., 2018). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda işitme duyusunu etkileyen Usher sendromu, obezite ve renal disfonksiyona sebep veren Bardet-Biedl sendromu gibi 30'dan fazla farklı sendromik RP vakaları bildirilmiştir (Weihbrecht ve ark., 2017). Hatta Bardet-Biedl sendromu gibi RP'nin sendromik formuna neden olan genlerin sendromik olmayan RP'yle karışabileceği belirlenmiştir (Nash ve ark., 2015). RP ve diğer kalıtsal retinal distrofiler arasındaki bu genetik örtüşme, klinik

bulguları farklı olsa da hastalık gelişiminde ortak genetik yolların ve temel mekanizmaların rol oynadığını göstermektedir. Dahası heterojenitesine rağmen bu genetik örtüşme; kalıtsal retinal distrofilere tedavi seçeneğini, klinik bulguları ve hastalığın patofizyolojisini anlamada; genetik yaklaşımların ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Genetik RP vakalarının %15-25'i otozomal dominant, %5-20'si otozomal resesif, %5-15'i X-bağımlı olsa da RP'nin %40-50'sinin genetik geçiş şekli halen bilinmemektedir (Verbakel ve ark., 2018).

2.4. RP Fotoresptör Dejenerasyon Mekanizması

RP, rod ve koni hücrelerin dejenerasyonu ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır. Hemen hemen bütün RP formlarında genetik mutasyon çoğunlukla rod hücrelerini etkilemesine rağmen, zamanla koni hücreleri de ölmektedir. Bu bağlamda, RP'ye bağlı ikincil sebeplerle koni hücrelerinin ölüm sebebi halen aydınlatılamamıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, 5 farklı koni hücre dejenerasyon mekanizması ileri sürülmüştür (Narayan ve ark., 2016). Trofik faktör teorisinde, rod hücrelerin, koni hücrelerinin sağlıklı kalması için yaşamsal faktörler salgıladığı ileri sürülmüştür. Rod hücrelerin zaman içerisinde kaybı, bu yaşamsal faktörlerin de ortadan kalkmasına neden olarak koni hücrelerin ölümüne yol açar. Sağlıklı bir retinada RPE hücreleri, bir taraftan parçalanmış dış segmentleri fagosite ederek ortadan kaldırırken, diğer taraftan da retinaya besin desteği ve oksijen sağlar. Bu faaliyetler, RPE hücreleri ile rod hücrelerinin çok sayıda yaptığı kontak sayesinde gerçekleşir. Buna bağlı olarak koni hücre açlık teorisinin temelinde; rod hücre kaybı kritik bir eşiğin üzerine çıktığında, RPE-koni dış segment interaksiyonlarının kaybı ile koni hücrelerine besin ve oksijen girişinin duracağı düşüncesi yatmaktadır. Rod kökenli toksin teorisinde ise; rod hücrelerinin ölürken toksik metabolitler salarak (glutamat gibi) koni hücrelerinin ölümüne sebebiyet verdiği ileri sürülmüştür. RP'de koni dejenerasyonuna neden olan dördüncü mekanizma olarak reaktif oksijen (ROS) üretim ve eliminasyon dengesizliği, yani oksidatif stres öne sürülmüştür (Shen ve ark., 2005). Dış retinaya giden oksijenin çoğu, fotoresptörlerin %95'ini oluşturan rod hücreleri tarafından kullanılır. Dış retinaya oksijen sağlayan koroid damarlarda otokontrol mekanizması olmadığından rod hücreleri öldüğünde, retinadaki oksijen seviyesi artar. Başka bir ifadeyle rod hücreleri dejenere oldukça, koni başına düşen

oksijen seviyesi yükselir. Yüksek oksijen koni hücrelerinde süperoksit radikallerinin oluşmasına sebebiyet verir (Usui ve ark., 2009). Süperoksit radikaller peroksinitrit oluşturarak lipitlere, proteinlere ve DNA'ya saldırır. Normalde fotoreseptör iç segmentleri süperoksit dismutazlar (SOD) gibi antioksidan yolaklarla ROS'ları temizler. Ek olarak, fotoreseptör dış segmenti okside proteinleri ve lipidleri günlük disk atımı ve yenilenmesi ile ortadan kaldırır. Ancak rod hücreleri dejenere olduğunda, koni hücreleri kendi antioksidan kapasitesini aşan, hücresel hasara yol açan bir ROS üretimiyle karşı karşıya kalır ve zamanla oksidatif strese yenik düşer.

Mikroglial aktivasyon, koni hücre dejenerasyonundaki beşinci ve en önemli nedenlerden biri olarak lanse edilmiştir (Gupta ve ark., 2003). Mikroglialar, merkezi sinir sisteminin bağışık yanıtı verebilen hücrelerinden biridir. Normal şartlar altında, hareketli uzantılar göndererek çevreyi sürekli izleyen hücrelerdir. Doku hasarı olduğunda aktive olarak hücresel kalıntıları temizlemek üzere hasarlı bölgeye göç eder. Ancak, retinada aşırı ve uzun süren mikroglial aktivasyonun, geri dönüşümü olmayan sinir kaybıyla karakterize kronik inflamasyona da sebebiyet verebildiği iddia edilmiştir (Karlstetter ve ark., 2010). Başlangıçta, mikroglial fonksiyonların merkezi sinir sistemi için yararlı olduğuna inanılırdı. Diğer taraftan, mikroglial aktivasyonun pek çok akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmesi zararlı yönlerinin de olabileceğini düşündürmüştür. Aktif mikrogliaların zararlı etkileri, proinflamatuvar tipe dönüşümüyle ortaya çıkar. Bu bağlamda, nörodejeneratif hastalıklarda çevresel toksinlere ek olarak ölen hücrelerden salınan sinyal molekülleri proinflamatuvar mikroglial yanıtı tetikler. Bunun sonucunda aktif mikroglialar hastalık bölgesine göç ederek, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve nitrik oksit sentaz 2 (NOS-2) gibi bir dizi proinflamatuvar sitokin salgılar. TNF- α hedef hücre üzerindeki reseptörlerine bağlanarak apoptotik yolakları aktive ederken, NOS-2 oksidatif stres oluşturarak hücre ölümüyle sonuçlanan kaspaz aktivasyonuna ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açar. RP'de, erken rod hücre dejenerasyonunun mikroglial aktivasyonu tetikleyerek koni hücrelerinin ölümüne sebep olduğu iddia edilmiştir (Narayan ve ark., 2016). RP hastalarında retinanın iç ve dış nükleer tabakasında ve subretinal boşlukta aktif mikrogliaların gözlemlenmesi bu hipotezi doğrular niteliktedir (Gupta ve ark., 2003).

Mikroglial aktivasyon ve fotoreseptör dejenerasyonu arasında nedensel bir ilişki de ortaya atılmıştır (Roque ve Caldwell, 1993). RP modeli olan Royal College of Surgeons (RCS) sıçanlarından alınan mikroglial hücrelerin immortalize koni fotoreseptör hattıyla birlikte kültürü, fotoreseptör hücrelerin apoptotik hücre ölümünde bir artışa yol açmıştır (Roque ve ark., 1999). Minosiklin isimli mikroglial aktivasyon inhibitörünün Rd10 farelerde kullanılması, mikroglia hücrelerinden proinflamatuvar sitokin salınımını engelleyerek rod fotoreseptör kaybını önlemiştir. Sonuç olarak, RP modellerinde gerçekleştirilen mikroglia aktivasyonu çalışmaları erken rod fotoreseptör hücre ölümüyle mikroglia aktivasyonu ilişkisini ortaya çıkardı.

2.5. Retinal Dejenerasyona Karşı Yeni Tedavi Stratejileri Geliştirmek İçin Kullanılabilecek Deney Hayvan Modelleri

Günümüzde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılabilecek retinal dejenerasyon deney hayvan modelleri mevcuttur (Kostic ve Arsenijevic, 2016). RP hayvan modellerinde erken dönemde retinal fotoreseptör dejenerasyonu ile beraber mikroglia aktivasyonu ve göçü gözlemlenmiştir (Zeiss ve Johnson, 2004). Otozomal resesif RP fare modellerinde, retinal dejenerasyon slow (rds) farelerde ve Royal College of Surgeons sıçanları (RCS) içeren kalıtsal retinal dejenerasyon sıçan modellerinde, aktif mikroglia hücrelerinin varlığı tespit edilmiştir (Jimenez ve ark., 1996). Aktif mikroglia hücreleri; glutamat taşıyıcıları ve sinir fonksiyonunu düzelteren antioksidan moleküller salgılayabilir. Ancak diğer taraftan aktif mikroglia hücreleri; yaşlanma, kimyasal hasar ve enfeksiyonların sebebiyet verdiği nörolojik hastalıklarda, nitrik oksit (NO) ve proinflamatuvar sitokinler (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 vb.) gibi nörotoksik ürünler de salgılayabilir. Retinal nörodejeneratif hastalıklarda kronik mikroglia aktivasyonu ve nöroinflamasyon ortak gözlemlenen bulgulardandır. RP’de rod hücrelerinin primer ölümü, mikroglia hücrelerinin aktivasyonuna ve hücre kalıntılarını ortadan kaldırmak amacıyla mikrogliaların dış retinaya göçüne neden olur. Bunu yaparken de NO gibi sitotoksik faktörler salgılayarak, bitişikteki koni hücrelerinin de tahribatına sebebiyet verir (Gupta ve ark., 2003). Retinal dejenerasyon modeli olarak iyi bilinen rd fareler, rod hücresine özgün fosfodiesteraz genindeki mutasyon sebebiyle, doğduktan sonra birkaç hafta

içinde, hızlı ve yoğun rod hücre kaybı sergiler. 2 ay içinde de koni hücre dejenerasyonu ve körlük görülür.

Hastalık patolojisi ve prognoz takibi için spontan retinal dejenerasyon hayvan modelleri de yıllarca kullanıldı. Retinal dejenerasyonun genetik yönü iyi araştırılmış olmasına rağmen, dejenerasyon işleminin çevre ve metabolik bağlantısı iyi bilinmemektedir. Fotoreseptörlerin kaybının bile kendi başına retinada metabolik değişimi tetikleyeceği aşıkardır. Bu bağlamda, ortamdaki oksijen seviyelerini kobalt klorür (CoCl_2) gibi hipoksiyi tetikleyen ajanlarla manipüle ederek, fotoreseptör dejenerasyon hızını kontrol etmenin mümkün olduğu ileri sürüldü. CoCl_2 , insan yaşamı için esansiyel olan B12 vitaminin yapıtaşı olsa da aşırı miktarı doku ve hücrelere toksik etki eder. Örneğin, yüksek doz kobalt klorür uygulaması retinal organ kültür modelinde sinir hücrelerinin tahribatına neden olmuştur (Kuehn ve ark., 2017). Kobalt klorürün kemirgen mikrogliya hücre hattında mikrogliyalı aktive ederek; $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 ve NO gibi sitokinlerin salınmasına sebebiyet verdiğinin tespit edilmesi, bu ajanın retinal dejenerasyon deney hayvan modeli geliştirilmesi amacıyla kullanılmasına yol açmıştır (Mou ve ark., 2012). Kobalt klorür indüklü mikrogliya aktivasyonunda, reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) de rol oynadığı bilinmektedir. Nitekim, kobalt klorürün intravitreal enjeksiyonuyla hem fare hem de sıçanlarda, retinanın dış nükleer tabakasını içeren yeni bir fotoreseptör dejenerasyon modeli başarıyla oluşturuldu (Hara ve ark., 2006). CoCl_2 enjeksiyonundan 2 hafta sonraki retinal morfolojinin, ilginç bir biçimde mutant rd fare retinasına çok benzer olduğu da gösterildi. Bu da fotoreseptör hücre dejenerasyonunun genetik yönüyle metabolik yönünün mekanizma açısından ortak yollarının olabileceği düşüncesini doğurdu. Sonuç olarak retinal genetik mutant dejeneratif hayvan modeli kullanmadan da kobalt klorür enjeksiyonuyla, deneklerde fotoreseptör dejenerasyonunun indüklenebileceği gösterildi. Kobalt klorürün, mikrogliyalardan NO, $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 gibi stokin üretimini tetiklemesi, onun aynı zamanda iyi bir mikrogliya aktivatörü olduğuna da işaret edebilir (Mou ve ark., 2012).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. *in vitro* Hastalık Modelinin Oluşturulması

Kimyasal indüklü dejeneratif retinal hastalık modelinin *in vitro* koşullarda oluşturulması için insan retinal pigment epitelyum (RPE) hücre hattı olan ARPE-19 (ATCC® CRL2302™) ve insan mikroglia hücre hattı olan HMC-3 hücreleri (ATCC® CRL3304™) kullanıldı. Kimyasal olarak, hücrelerde hipoksi oluşturma etkileri ile bilinen kobalt klorür (CoCl_2) tercih edildi. Uygulanacak CoCl_2 dozuna karar verebilmek için ise her iki hücre hattı da 10 μl steril distile su içerisinde çözündürülüp filtrelenmiş 5, 15, 50, 150, ve 500 nmol CoCl_2 (Kobalt Klorür, C8661-Sigma) solüsyonuna maruz bırakıldı. Uygulamanın ardından 24 saat aralıklarla yapılan MTT testi ile kimyasalın hücre canlılığı üzerindeki etkisine bakıldı.

3.2. Hücre Canlılık Testleri

Farklı dozlarda CoCl_2 uygulamasının ARPE-19 ve HMC-3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri MTT Hücre Büyüme Kiti (Millipore, CT02, MTT Cell Growth Assay kit) kullanılarak belirlendi. Kimyasal uygulamasından bir gün önce 96 kuyulu petrilere kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücreler belirlenen dozlardaki CoCl_2 solüsyona maruz bırakıldı. CoCl_2 solüsyonu kullanımdan hemen önce steril distile su içerisinde çözündürülüp filtrelenen stok solüsyonunun dilüe edilmesi ile hazırlandı. Yapılan uygulamanın ardından 24, 48, 72 ve 96. saatlerde MTT testi yapıldı. Hücreler kuyulara eklenen 10 μl MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solüsyonu ile 4 saat 37 °C’de inkübe edildi. 4 saat sonrasında durdurucu solüsyon olarak 100 μl DMSO (Dimetil sülfoksit) (Sigma-D2650) eklenerek oluşan renk 540 – 690 nm referans aralığında absorbans ölçümü ile Thermo Multiskan Spektrum cihazı kullanılarak tayin edildi. Canlı hücreler metabolik aktiviteleri sayesinde MTT substratını formazana dönüştürme yeteneğine sahip olduğundan, daha yüksek canlılık olan kuyularda daha yüksek absorbans ölçümü beklendi. Bu doğrultuda kobalt klorürün farklı dozlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi test edilmiş oldu.

3.3. Western Blot Yöntemiyle RPE ve Mikroglialarda CoCl₂ Uygulaması Sonrası HIF-1 α Sentez Düzeyinin Belirlenmesi

Hücre canlılık testlerinin ardından hipoksi belirteci olan hipoksi indükleyici faktör 1 alfa (HIF-1 α) protein tayini için western blot analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 6 kuyulu kültür kaplarına 50x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde ARPE-19 ve HMC-3 hücreleri ekildi. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonrası hücre besiyeri, belirlenen dozlarda CoCl₂ içeren taze besiyeri ile değiştirildi. CoCl₂ uygulamasından 48 saat sonra her bir kuyu, besiyerleri uzaklaştırılarak soğuk 1X PBS ile yıkandı. Hücreler, üzerlerine proteaz inhibitör kokteyli (P8340- Sigma Aldrich) içeren Triton-X Liziz tamponu eklenerek toplandı. Vortekslenen lizatlar 20 dk buz üzerinde bekletildikten sonra 12.000 g'de 4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar ayrı deney tüplerine hücre lizatı olarak ayrıldı. Lizatlardaki protein miktarı Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi kullanılarak BSA standartlarına karşı gerçekleştirildi. Miktarları belirlenen örnekler aynı hacimdeki -SDS, bromfenol blue ve 0,5 β -merkaptoetanol içeren- SDS yükleme tamponu ile karıştırılarak 95°C'de 5 dk bekletildikten sonra %10'luk poliakrilamid SDS-PAGE jele yüklendi. Örnekler toplama jelinde 40 voltta yürütüldükten sonra voltaj 120 volta çıkarılarak yürütme işlemi tamamlandı. İşlemin tamamlanmasının ardından jeldeki proteinler Semi-Dry Transfer yöntemi kullanılarak BioRad Trans-Blot SD cihazı ile PVDF (BioRad 162-0177) membrana transfer edildi. Transfer sandviçi cihaz üzerinde hazırlanmadan önce aynı boyutlarda hazırlanan jel ve membran, tris base, glisin ve metanol içeren transfer tamponunda 15 dk süreyle yıkandı. Ardından cihaz üzerinde sırası ile transfer tamponunda ıslatılmış filtre kâğıdı, PVDF membran, yürütülen jel ve aynı tamponda ıslatılmış filtre kâğıdından oluşan transfer sandviçi hazırlandı. Transfer 15 voltta 1 saat süreyle gerçekleştirildi. Transfer sonrası membran 1X PBS-T içerisinde 2 defa 15 dk süreyle yıkandı. Yıkama sonrası protein bloklama için membran %1 BSA solüsyonu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra solüsyon uzaklaştırılarak yıkama yapılmadan membran %1 BSA içerisinde önerilen dilüsyonda hazırlanmış primer antikor (Anti-HIF-1 α antikoru (Abcam, ab1)) ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. Primer antikor ile inkübasyonun ardından membran 2 defa 15 dk süre ile yıkandıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında primer antikora uygun olarak seçilmiş HRP-konjuge sekonder antikor

(Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719)) ile muamele edildi. Sekonder antikorla işaretlemenin ardından 2 kez 15 dk süre ile yıkanan membran ECL solüsyonu (BioRad 170-5061) kullanılarak görüntülendi.

3.4. İmmüno Floresan Yöntemiyle Retinal Hücrelerde ve Mikroglialarda CoCl₂ Uygulaması Sonrası HIF-1 α Sentez Düzeyinin Belirlenmesi

CoCl₂ ile *in vitro* ortamda hipoksi durumunun başarıyla indüklenebildiğini göstermek için ARPE-19 ve HMC-3 hücrelerine farklı dozlarda CoCl₂ uygulaması yapıldıktan sonra aktive olan hipoksi indükleyici faktör 1 alfa (HIF-1 α) protein varlığı immüno floresan yöntemiyle belirlendi. Bunun için CoCl₂ uygulamasından bir gün önce, her iki hücre hattı da steril 24 kuyulu kültür kaplarına her bir kuyu 10⁵ hücre içerecek şekilde ekildi. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonrası hücre besiyeri, belirlenen dozlarda CoCl₂ içeren taze besiyeri ile değiştirildi. CoCl₂ uygulamasını takiben 24, 48, ve 72. saatlerde hücrelerde immüno floresan boyama gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında %4'lük PFA (2g PFA, 50 ml PBS) ile 20 dk fikse edilen hücreler 15 dk permeabilizasyon solüsyonu (20 ml PBS, 20 μ l Tween 20), sonrasında ise 1 saat bloklama tamponu (%1 BSA) içerisinde bırakıldı. Hücreler, primer (Anti-HIF-1 α antikor, Abcam, ab1) ve sekonder (Alexa Fluor Plus 555 goat anti-mouse IgG, Invitrogen, A32727) antikorlarla karanlıkta inkübe edildi. Hücrelerde çekirdek görüntülenmesi amacıyla 6 dk DAPI boyaması gerçekleştirildikten sonra örnekler uygun filtreler kullanılarak Olympus IX-81 floresan mikroskopunda görüntülendi.

3.5. Kimyasal Ajan İndüklü Dejeneratif Hastalık Modelinin *in vivo* Koşullarda Oluşturulması

Kimyasal ajan indüklü dejeneratif retinal hastalık modelinin *in vivo* ortamda oluşturulması amacıyla Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden 12 haftalık erkek outbred Wistar sıçanlar tedarik edildi. Deney grubu hayvanlarına uygulama yapılacak kimyasalın dozunun belirlenmesi için 5 μ l steril distile su içerisinde çözülmüş 5, 15, 50, 150, ve 500 nmol CoCl₂ çözeltisinin intravitreal enjeksiyonu gerçekleştirildi. Kontrol olarak kullanılan sıçanlara ise aynı hacimde 1X PBS enjeksiyonu yapıldı. Bu işlem için, genel anestezi ketamin-ksilazin kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyonu ile

gerçekleştirilirken, topikal anestezi ise göze bir damla proparakain hidroklorür (Alcaine) uygulaması ile yapıldı. Hayvanlar pron pozisyondayken %0,5 fenilefrin hidroklorid (Mydfrin damla), %0,5 tropikamid (Tropamid %0,5) ve %1 siklopentolat hidroklorür damla ile pupil dilatasyonu sağlandı. Sıçanların göz dibi görüntülenmesinin sağlanabilmesi için bir damla %2 hidroksil propilmetil selüloz (Aurovisc) kullanıldı. Kornea, nazal bölgede pupil kenarının mediyalinden, 30-gauge hipodermik iğne (BD Microlance, ABD) ile delinerek iğnenin ön kamaraya ilerlemesi sağlandıktan sonra intravitreal ilacın geri kaçmasını engellemek için ön kamaraya %2 hidroksil propilmetil selüloz (Aurovisc) enjekte edildi. Daha sonra 33-gauge iğnenin, Hamilton şırıngası (Hamilton Model 705 RN SYR 50 ul PN 7637-01) ile korneal giriş yerinden girilmesi sağlandıktan sonra iris ve lens travmasından kaçınılarak lensin mediyali ve irisin lateralinden geçip arka kamaraya ulaşıldı. İğne, vitre boşluğuna, retina yüzeyine doğru ilerletilip iğne ucu enjeksiyon bölgesine ulaşınca 5 µl CoCl_2 solüsyonu (kontrol hayvanı için 1X PBS) yavaşça enjekte edildi ve hayvanlar aynı pozisyonda yaklaşık 30 sn bekletildi. Tüm bu işlemler ZEISS Discovery V8 Stereo Mikroskop altında vitreo-retinal cerrah tarafından gerçekleştirildi. İşlemlerin tamamlanmasını takiben hayvanların anesteziden çıkıp stabil duruma gelmeleri beklendi. Bu hayvanlar, sakrifiye edilecekleri zamana kadar rutin olarak takip edildi.

3.6 Retinal Dokunun Histo-patolojik Analizi

in vivo hastalık modelinin oluşturulmasında kullanılacak uygun dozun belirlenmesi için farklı dozlarda CoCl_2 uygulaması yapılan hayvanlar 2 haftalık takip süresi sonunda sakrifiye edildi. Dokuların daha hızlı ve düzgün bir şekilde fiksasyonunun sağlanabilmesi için sakrifikasyon işlemi perfüzyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Bunun için; genel anestezi altındaki hayvanların sol ventriküllerine iris makasıyla kesik atıldı ve 15 gauge'lık künt uçlu perfüzyon kanülü ile aorta ilerlendi. Kanül, geriye kaçmanın engellenmesi amacıyla klemple sabitlendi. Sol ventriküle basınç yapılarak şişmesi sağlanan sağ artriya da iris makası ile bir kesik atılarak deney hayvanı perfüzyon işlemine hazır hale getirildi. Öncelikle kanülle yaklaşık 20 ml'lik 37°C 1X PBS solüsyonu hızlı ve sabit bir basınçla enjekte edildi. Solüsyonun tüm vasküler sistemi dolaşarak kanı vücuttan başarılı bir şekilde uzaklaştırdığını takip

etmek için karaciğerdeki renk değişimine bakıldı. Solüsyonun bitmesine yakın, hava kabarcığı oluşmasından kaçınılarak 50 ml 37°C %4'lük PFA solüsyonu enjekte edildi. İşlemin başarısı için önemli bir gösterge olan fiksasyon titremelerinin saniyeler içinde başlaması takip edildi. Perfüzyon işleminin ardından steril, açılı forsepsler yardımıyla optik sinirin gözün arkasından sıkıca kavranması ve dairesel hareketlerle büzülmesi sağlanarak göz küreleri çıkarıldı. Takip işleminden önce her bir gözün korneasına kesik atıldı ve 5 µl Davidson solüsyonu 30 gauge'lık süper insülin enjektörü (BD Microlance, ABD) ile enjekte edildi. Davidson solüsyonu lensi yumuşatmak amacıyla tercih edildi ve 30 ml %95 etil alkol, 20 ml %10'luk nötral formalin tamponu, 10 ml glasiyel asetik asit ve 30 ml distile su karıştırılarak elde edildi. Davidson solüsyonunda +4°C'de bir gece boyunca fikse edilen gözler fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1X PBS ile 3 kere 5 dk yıkandıktan sonra dehidrasyon için 10 dk %50 etil alkol, 10 dk %70 etil alkol, 2 kere 10 dk %95 etil alkol ve 2 kere 10 dk %100 etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 3 kere 5 dk ksilen serilerinden geçirilen göz dokuları birer saat boyunca 60°C'de 3 farklı parafin serisiyle muamele edilerek parafine gömme işlemleri tamamlandı. Parafine gömülü dokulardan mikrotom cihazı (THERMO Shandon Finesse 325) kullanılarak 6 µm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen & eozin (H&E) boyamaları gerçekleştirilerek retinal dokuların histolojik analizleri yapıldı.

3.7. Retinal Dejenerasyonun TUNEL Boyamayla Gösterilmesi

Hastalık modelinin oluşturulmasında retinal dejenerasyon için en uygun doz seçildikten sonra, 5 µl steril distile su içerisinde çözdürülen 50 nmol CoCl₂ ve kontrol olarak 1X PBS enjeksiyonu yapılan sıçanlar belirli takip süreleri sonunda (0, 2, 3, 4 ve 7. gün) kurban edildi. Kurban olmasının ardından alınan göz dokuları daha önce bahsedilen metoda uygun şekilde takip edilerek parafine gömüldü ve 6 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlerde, hipoksiye bağlı gerçekleşen apoptotik hücre ölümlerinin belirlenmesi amacıyla ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Saptama Kiti (Sigma-Aldrich, S7101) kullanılarak TUNEL boyama yapıldı. Öncelikle deparafinize ve dehidre edilen dokular, hücrelerin geçirgenliğini arttırmak amacıyla 1X PBS içinde çözdürülen Proteinaz K (Sigma-Aldrich, p6556) (20 µg/ml) ile oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Daha sonra dokular %3 H₂O₂ ile

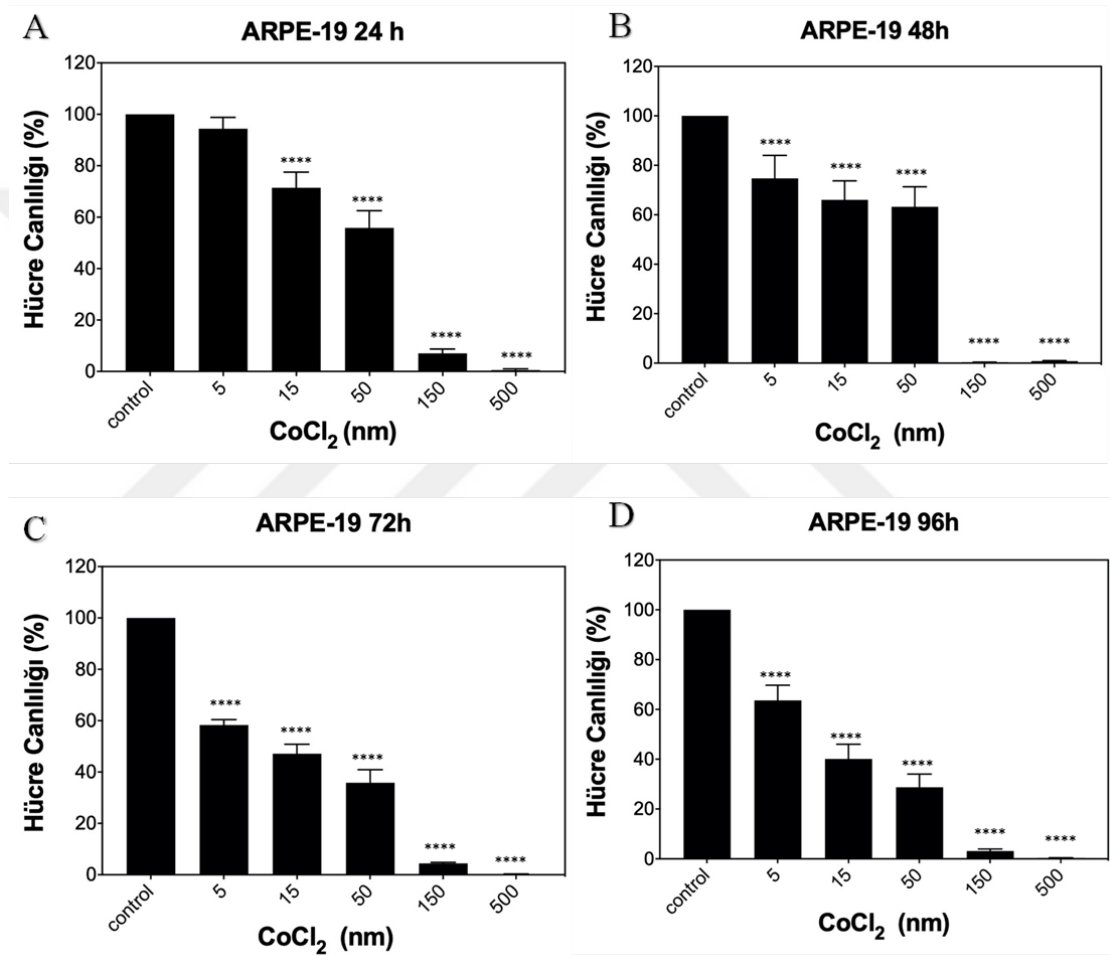
5 dk muamele edilerek endojen peroksidaz aktivitesinin bloklanması sağlandı ve dengeleme tamponunda yaklaşık 40 sn bekletildi. Sonrasında dokulara, reaksiyon tamponuyla birlikte TdT enzimi (7:3 oranında) uygulanarak DNA kırıklarının etiketlenmesi sağlandı. Nemli ortamda 1 saatlik inkübasyonun ardından dokular, enzim aktivitesinin durdurulması için durdurma/yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından preparatlar anti-digoxigenin-peroksidaz ile 30 dk inkübasyona bırakıldı ve DAB (147 µl DAB solüsyonu, 3 µl DAB substratı) ile 5 dk muamele edildi. Sonrasında dokular çekirdek boyaması amacıyla 10 dk boyunca 0,1M sodyum asetat ile hazırlanan %0,5 (w/v) metil yeşili (Sigma Aldrich, 323829) içerisinde bekletildi. Son olarak, her birinde 30 sn olacak şekilde 3 farklı %100 N-bütanol serisinden ve hemen ardından 2'şer dk 3 farklı ksilen serisinden geçirildi ve entellan ile kapatılarak Olympus IX-81 mikroskobuyla görüntüldü.

4. BULGULAR

4.1. Farklı CoCl_2 Dozlarının ARPE-19 ve HMC-3 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Dejeneratif retinal hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere deney hayvan modelinin oluşturulması amacıyla planlanmış projemizde ilk aşamada hastalık modelinin *in vitro* ortamda oluşturulması amaçlandı. Bu doğrultuda kullanılmak üzere insan retinal pigment epitelyum (RPE) hücre hattı (ARPE-19) tercih edilerek gerekli dejenerasyon kimyasal indüklü olarak kobalt klorür (CoCl_2) ile oluşturuldu. Farklı dozlarda CoCl_2 solüsyonunun ARPE-19 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkileri MTT testleri ile belirlendi. Hücreler 10 μl içerisinde 5, 15, 50, 150, ve 500 nmol olacak şekilde kullanımdan hemen önce hazırlanan CoCl_2 solüsyonuyla 24, 48, 72 ve 96 saatlik uygulamaya tâbi tutuldu.

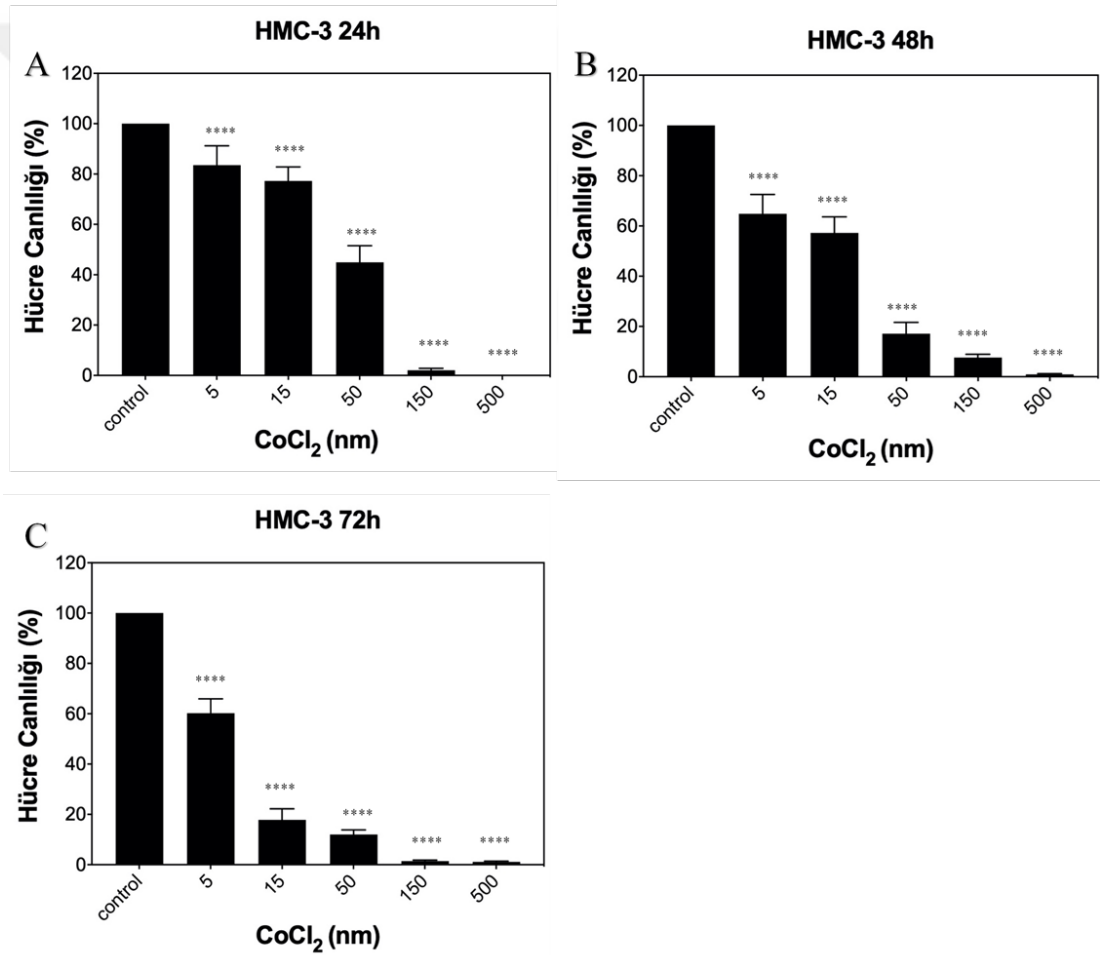
Test sonucu alınan kolorimetrik sonuçların analizlerine göre ARPE-19 hücre hattında 150 ve 500 nmol uygulamaları çok şiddetli etki gösterip ilk 24 saatte hücrelerin %90'ından fazlasını öldürürken, 50 nmol CoCl_2 uygulaması alan hücrelerde 48 saat içerisinde %50'lik bir hücre kaybı tespit edildi. Bununla beraber düşük doz 5 nmol CoCl_2 uygulaması ise 96 saatlik uygulamada hücre canlılığının ancak %40'ını etkileyebildi. Sonuç olarak CoCl_2 dozu ve inkübasyon süresi arttıkça retinal hücre ölüm oranlarının da arttığı belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: CoCl_2 uygulaması almış ARPE-19 hücrelerinin 24(A), 48(B), 72(C), ve 96.(D) saatlerde yapılan MTT test sonuçlarını gösteren grafikler (One-way ANOVA, $p^{****}<0,0001$).

Retinal dejeneratif hastalıklardaki hasarın oluşmasına dair teorilerden biri mikrogliya hücre aktivasyonudur. Özelleşmiş makrofaj hücresi olan mikroglialar, retinal katman hücrelerinde meydana gelen hasara karşılık hücre ölüm mekanizmasını tetikleyici sitokinler salgılayarak hasarın daha da artmasına sebebiyet verirler. Retinal hücre

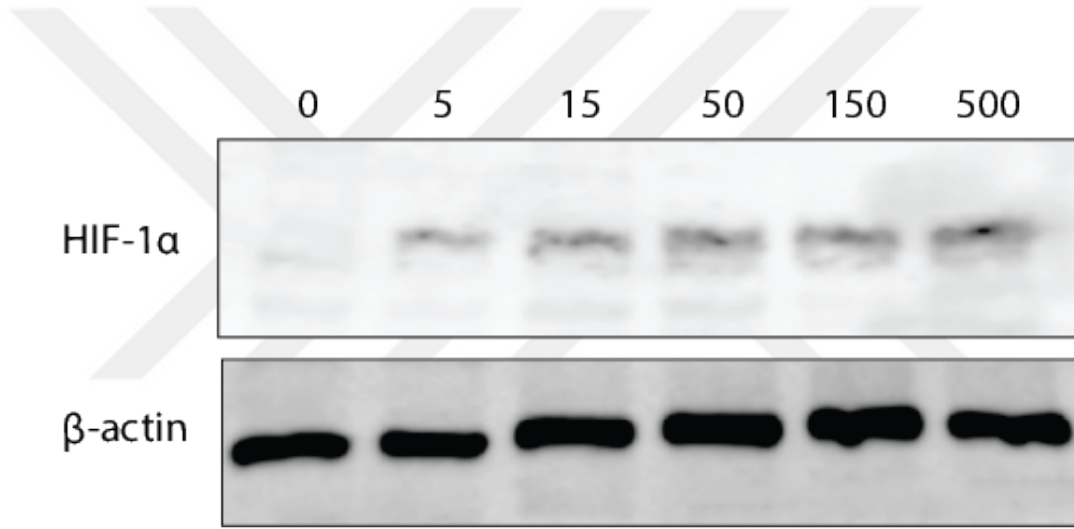
hasarındaki yeri bilinen mikroglia hücrelerinin model oluşturmada kullanılan CoCl_2 uygulamasından ne derece etkilendiğini araştırmak için ARPE-19 hücrelerinde yapılan CoCl_2 denemeleri insan mikroglia hücre hattı olan HMC-3 hücrelerinde de gerçekleştirildi. 24, 48, ve 72 saatlik uygulamalar sonrası yapılan MTT testlerinin analizlerinde artan doz ve uygulama süresiyle doğru orantılı olarak artan hücre ölüm miktarları tespit edildi (Şekil 4.2). 50 nmol CoCl_2 uygulaması alan HMC-3 hücre hattında 24 saat içerisinde %50'den fazla bir hücre kaybı belirlendi. ARPE-19 hücreleri ile HMC-3 hücreleri *in vitro* koşullarda karşılaştırıldığı zaman mikroglia hücrelerinin CoCl_2 kimyasal uygulamasına karşı düşük dozlarda bile daha hassas olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.2: HMC-3 hücre hatlarında CoCl_2 uygulaması sonrası 24 (A), 48 (B) ve 72. (C) saatlerde yapılan MTT test analizlerini gösteren grafikler (One-way ANOVA, $p^{****}<0,0001$).

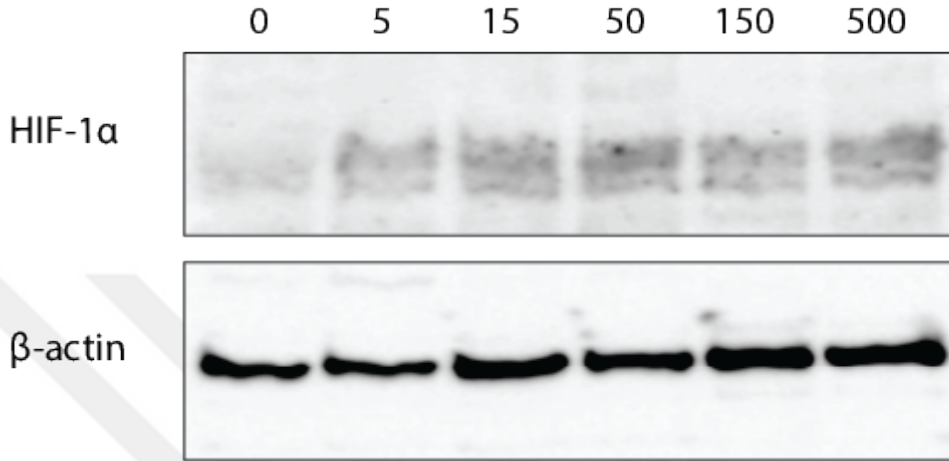
4.2. RPE ve Mikroglia Hücrelerinde CoCl₂ Uygulaması Sonrası HIF-1 α Sentez Düzeyinin Western Blot Yöntemiyle Gösterilmesi

Farklı dozlardaki CoCl₂ uygulamasının RPE ve mikroglia hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testleriyle belirlendikten sonra, hücre ölüm mekanizmasının hipoksi sebepli olup olmadığının araştırılması amacıyla western blot yöntemi ile hipoksi belirteci olan HIF-1 α protein tayini yapıldı. Bunun için 48 saat boyunca 5, 15, 50, 150, ve 500 nmol CoCl₂ uygulamasına maruz kalan RPE ve mikroglia hücrelerinden toplanan lizatlar kullanıldı. ARPE-19 hücrelerinde yapılan western blot sonuçlarında uygulama almamış hücrelerde bant oluşumu gözlenmezken uygulama almış hücre lizatlarında 95 kDa dolaylarında HIF-1 α proteinine rastlandı (Şekil 4.3). Aynı membran üzerinde yıkama yapılarak β -actin işaretlemesi de yapıldı.



Şekil 4.3: ARPE-19 hücrelerinin 48 saat CoCl₂ ile muamelesinin ardından toplanan hücre lizatlarında HIF-1 α ve β -actin proteinlerinin western blot ile tayini. Kullanılan dozlar şekil üzerinde nmol olarak verilmiştir.

48 saatlik 5, 15, 50, 150, ve 500 nmol CoCl₂ uygulaması yapılmış HMC-3 hücre lizatlarında yapılan western blot sonuçlarında uygulama almamış hücrelerde bant oluşumu gözlenmezken uygulama almış hücre lizatlarında 95 kDa dolaylarında HIF-1 α proteinine rastlandı (Şekil 4.4). Aynı membran üzerinde yıkama yapılarak β -actin işaretlemesi de yapıldı.

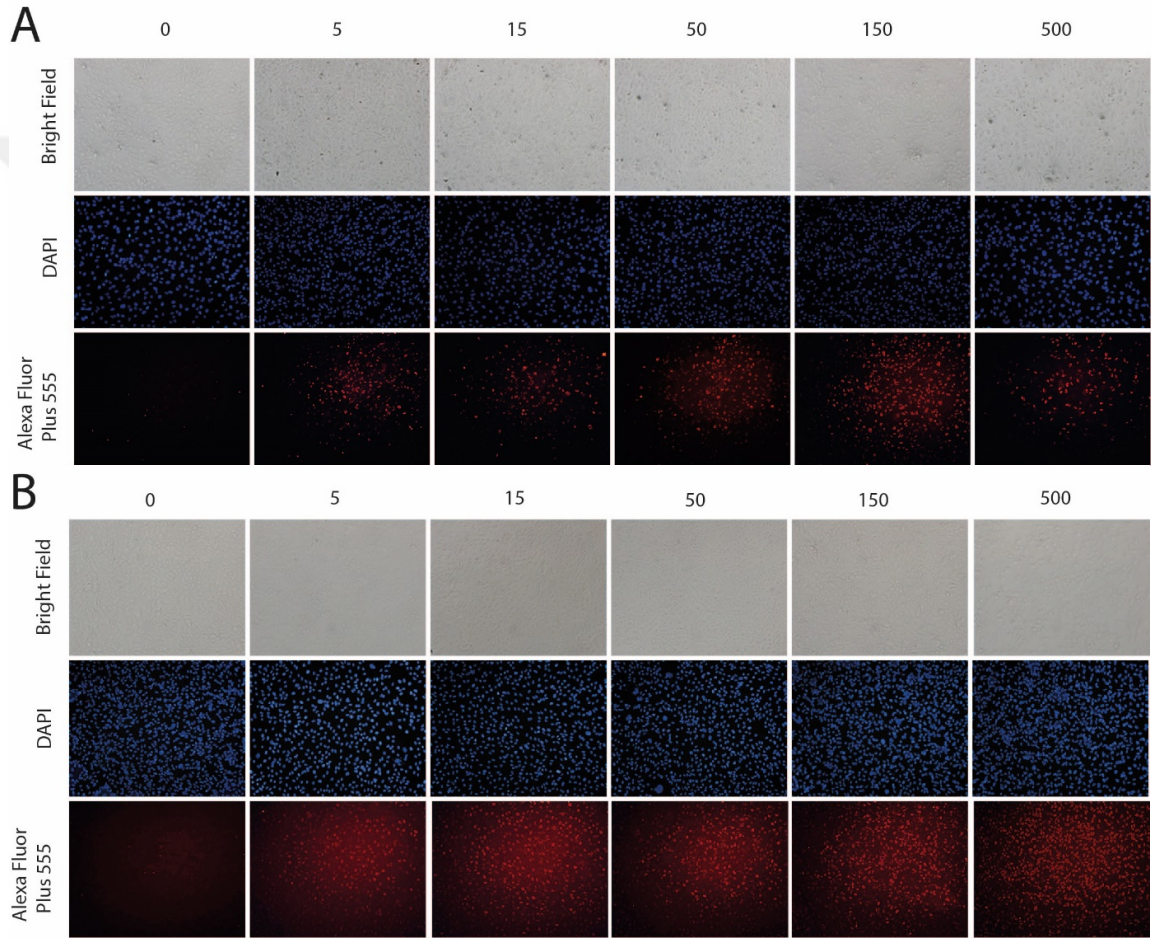


Şekil 4.4: HMC-3 hücrelerinin 48 saat CoCl₂ ile muamelesinin ardından toplanan hücre lizatlarında HIF-1 α ve β -actin proteinlerinin western blot ile tayini. Kullanılan dozlar şekil üzerinde nmol olarak verilmiştir.

4.3. CoCl₂ Uygulaması Hipoksi Oluşturarak ARPE-19 ve HMC-3 Hücrelerinde Dejenerasyona Sebebiyet Verdi

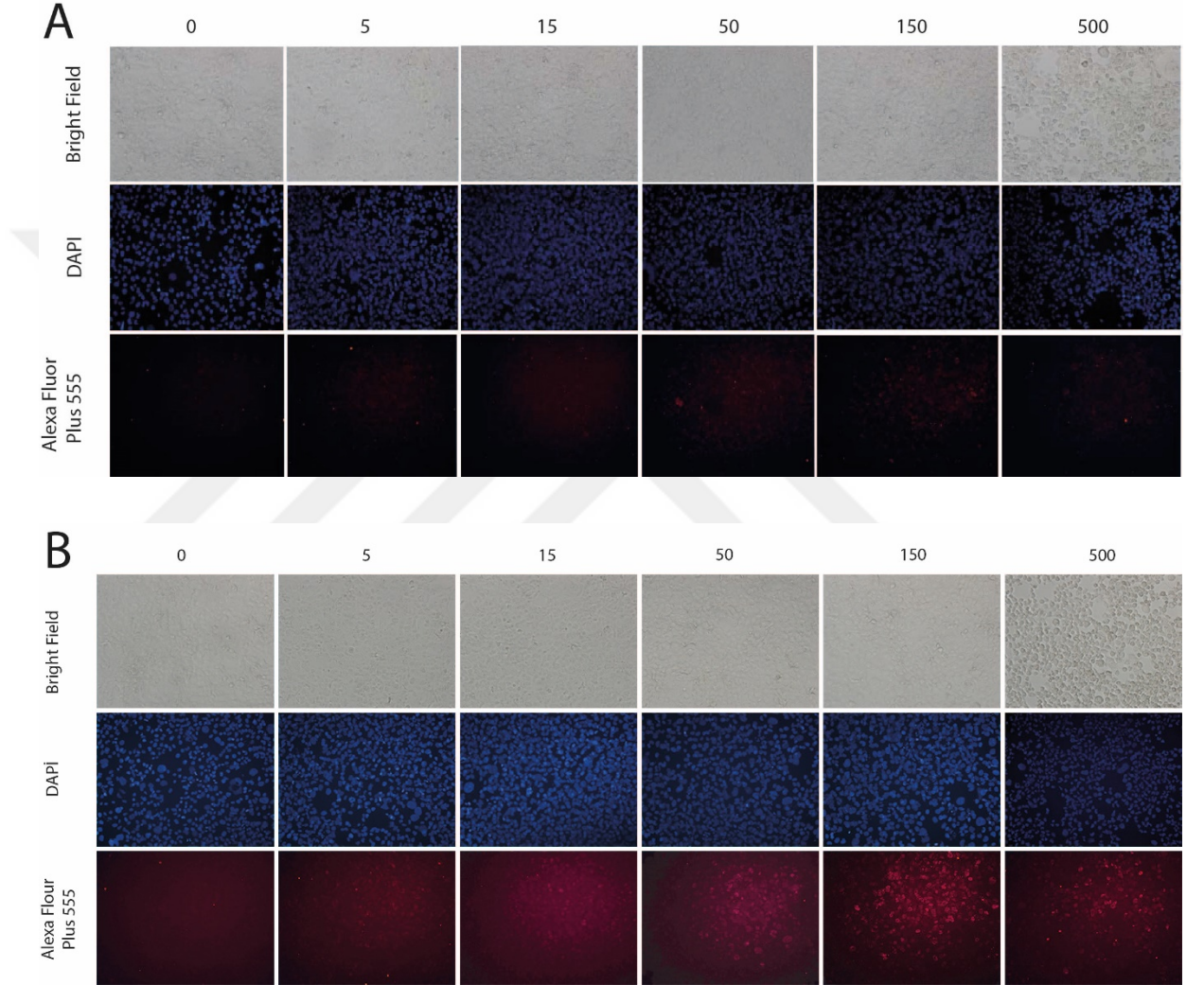
Western blot deney sonuçlarımızda, HIF-1 α proteininin stabil bir protein olmaması ve hücredeki miktarının çok az olması sebebiyle düşük yoğunlukta bantlar elde edildi. HIF-1 α , hücrelerin oksijene ulaşımı olduğu an kısa sürede degrade olmaya başlayan bir proteindir. Bu sebeple hücre içerisindeki proteinleri daha çabuk fikse ederek görüntüleme imkânı sunan immünofloresan boyama ile de western blot deneyinde alınan sonuçları teyit etmek istedik. Bunun için ARPE-19 ve HMC-3 hücre hatları 24 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10⁵ hücre olacak şekilde ekilerek 5, 15, 50, 150, ve 500 nmol miktarlarında steril distile su içerisinde çözülmüş CoCl₂ solüsyonu ile muamele edildi. CoCl₂ uygulamasını takiben 24 ve 48. saatlerde primer HIF-1 α antikoru (Anti-HIF-1 α (ab1)) ve sekonder antikorla

(Alexa Fluor Plus 555 goat anti-mouse IgG, Invitrogen, A32727) immünofloresan boyama yapıldı. Hücrelerde çekirdek görüntülenmesi amacıyla DAPI boyaması gerçekleştirildikten sonra örnekler uygun filtreler kullanılarak Olympus IX-81 floresan mikroskobunda 20X objektif büyütmesi ile görüntülendi. ARPE-19 hücrelerinde yapılan immünofloresan boyama sonuçlarında 24 ve 48 saatlik uygulama sonrası uygulama almamış hücrelerde ışına gözlenmezken, uygulama almış hücrelerde artan CoCl_2 dozları ve uygulama süresi ile birlikte artan HIF-1 α protein boyaması gözlemlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: ARPE-19 hücre hattında CoCl_2 uygulamasının 24 (A) ve 48 (B) saat sonrasında yapılan immünofloresan boyama sonuçları. Dozlar şekil üzerinde nmol olarak verilmiştir (büyütme oranı 20X).

HMC-3 hücrelerinde yapılan immüno Floresan boyama sonuçlarında 24 ve 48 saatlik uygulama sonrası uygulama almamış hücrelerde boyama gözlenmezken yüksek doz CoCl_2 muamelesi sonrası özellikle 48 saat sonrasında artan HIF-1 α protein miktarı gözlemlendi (Şekil 4.6). Yüksek doz (150 ve 500 nmol) CoCl_2 uygulaması almış HMC-3 hücrelerinde hem 24 saat hem de 48 saat ardından artan hücre ölümüne bağlı olarak DAPI ile boyanan hücre sayısında da bir azalma gözlemlendi.

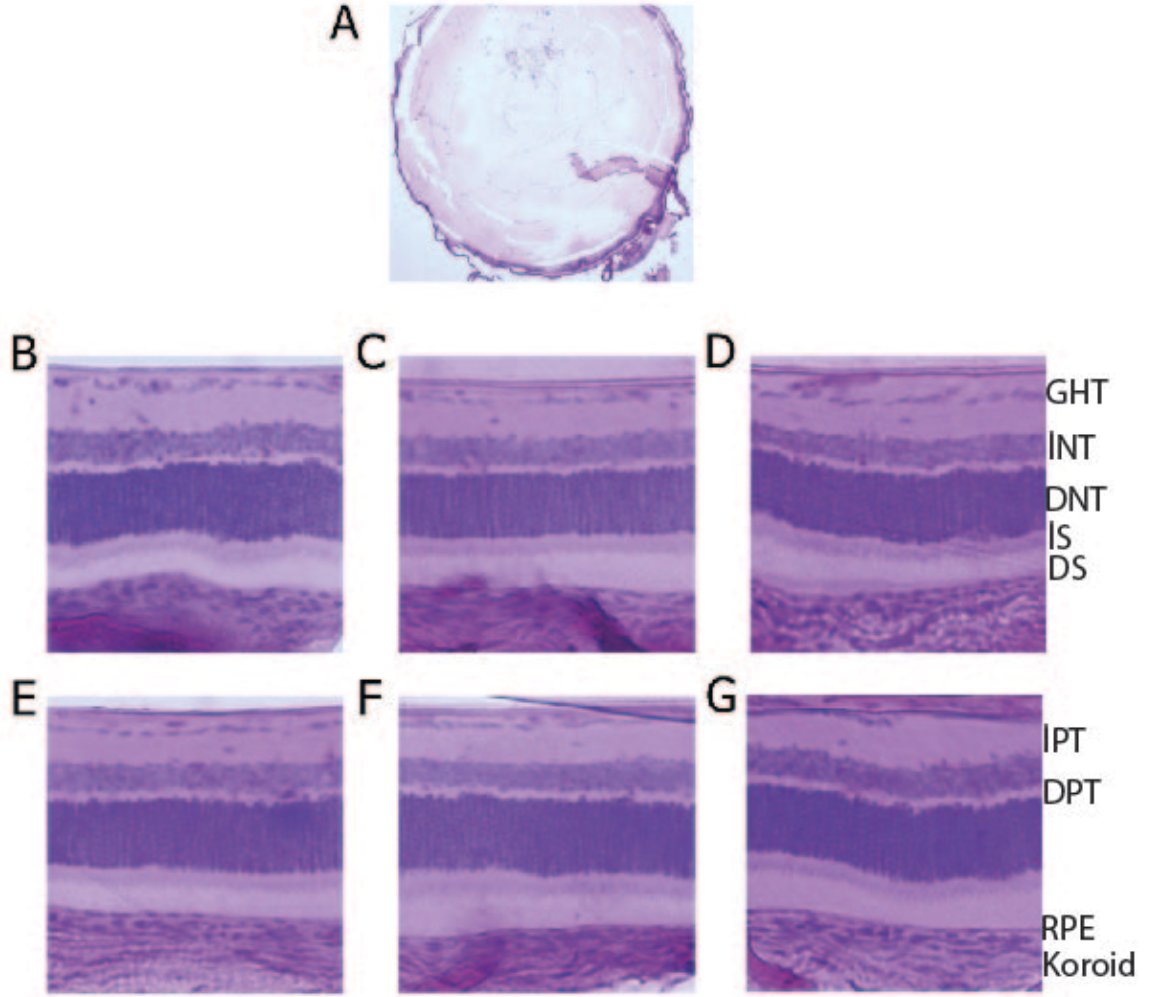


Şekil 4.6: HMC-3 hücre CoCl_2 uygulamasının 24 (A) ve 48 (B) saat sonrasında immüno Floresan boyama sonuçları. Dozlar şekil üzerinde nmol olarak verilmiştir (büyütme oranı 20X).

4.4. İntravitreal CoCl₂ Enjeksiyonu Retinal Dejenerasyona Sebep Oldu

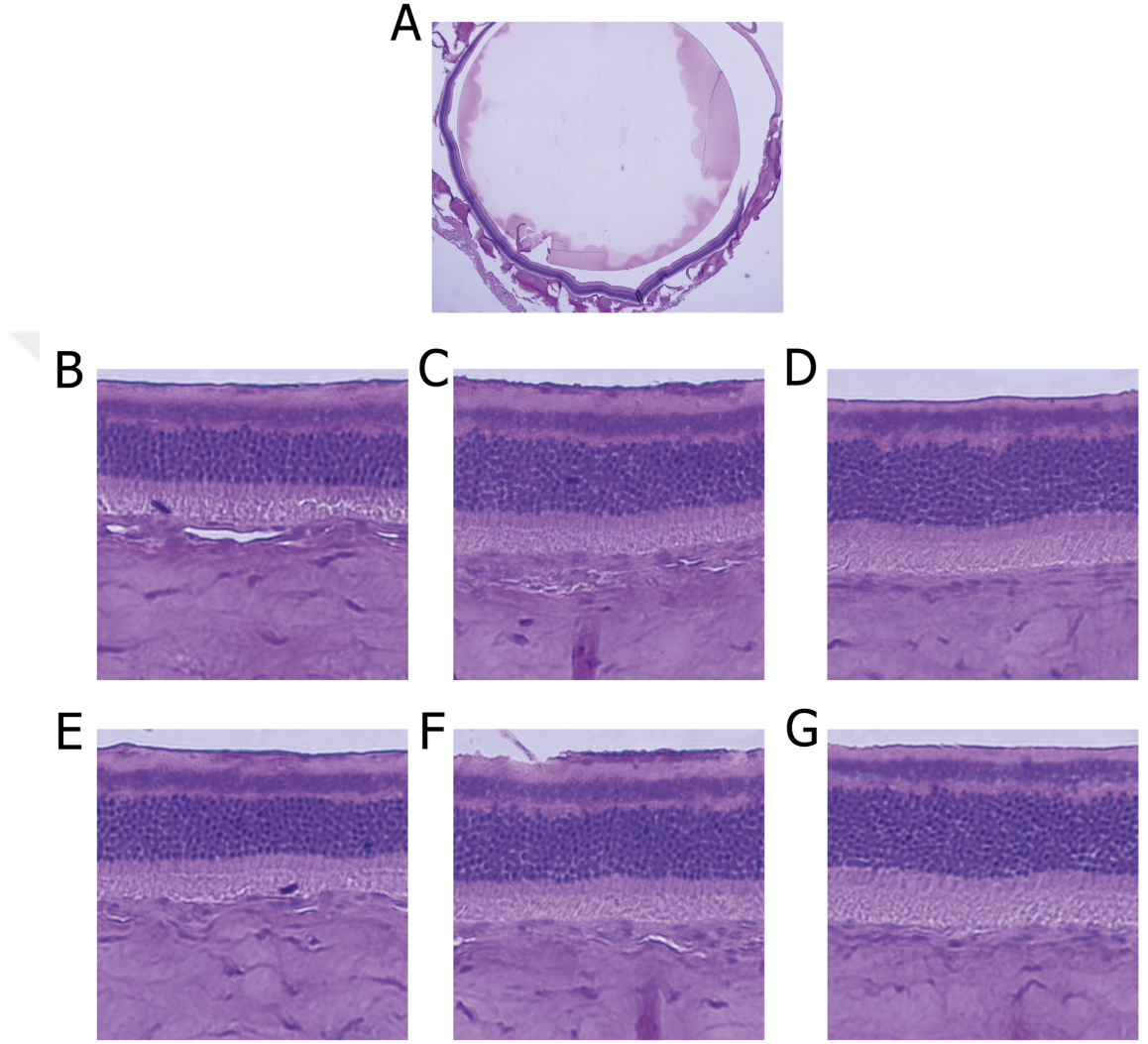
in vitro olarak oluşturulan kimyasal ajan indüklü retinal dejeneratif hastalık modelinin *in vivo* ortamda da oluşturulması amacıyla Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden alınan 12 haftalık erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Deney grubu hayvanlarına 5 µl steril distile su içerisinde çözülmüş 5, 15, 50, 150 ve 500 nmol CoCl₂ çözeltisinin intravitreal enjeksiyonu gerçekleştirildi (n=6). Kontrol olarak kullanılan sıçanlara ise aynı hacimde 1X PBS enjeksiyonu yapıldı. Yapılan enjeksiyonların ardından sıçanlar 2 hafta rutin olarak takip edildi. 2 hafta sonunda sakrifiye edilen sıçanların göz dokuları Davidson solüsyonunda +4°C'de bir gece boyunca fikse edilerek takip edildi ve parafine gömüldü. Parafine gömülen dokulardan 6 µm kalınlığında alınan kesitlerde hematoksilin & eozin (H&E) boyamaları gerçekleştirilerek retinal dokuların histolojik analizleri yapıldı.

İntravitreal 1X PBS enjeksiyonu yapılmış deneklerin kesitlerinde retinal tabakalar - Retinal Pigment Epitelyum (RPE), Dış Segment (DS), İç Segment (İS), Dış Nükleer Tabaka (DNT), Dış Pleksiform Tabaka (DPT), İç Nükleer Tabaka (İNT), İç Pleksiform Tabaka (İPT), Gangliyon Hücre Tabakası (GHT)- bir bütün olarak görülmektedir (Şekil 4.7).



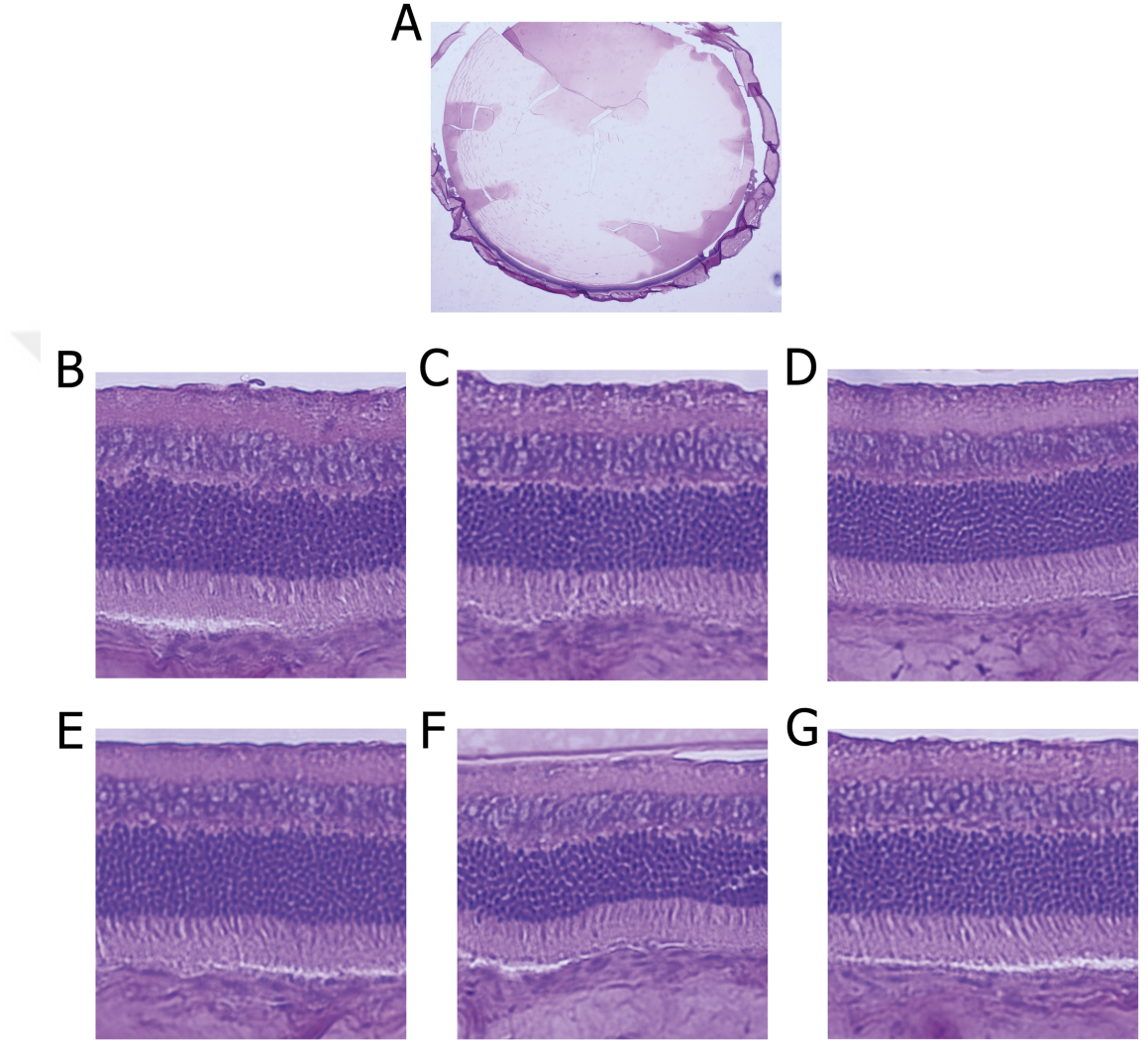
Şekil 4.7: İntravitreal 1X PBS enjeksiyonu yapılmış deneklerin 2 hafta sonraki retinal tabakaların durumu. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

5 nmol CoCl_2 uygulaması almış sıçan kesitlerinde rod ve koni hücrelerinin beslenmesinden sorumlu RPE hücrelerinde ve fotoreseptörlerin dış katmanında (dış segment) hafif şiddetli dejenerasyon olduğu buna bağlı olarak retinanın yer yer RPE katmanından ayrılmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.8 – B, E ve F paneli).



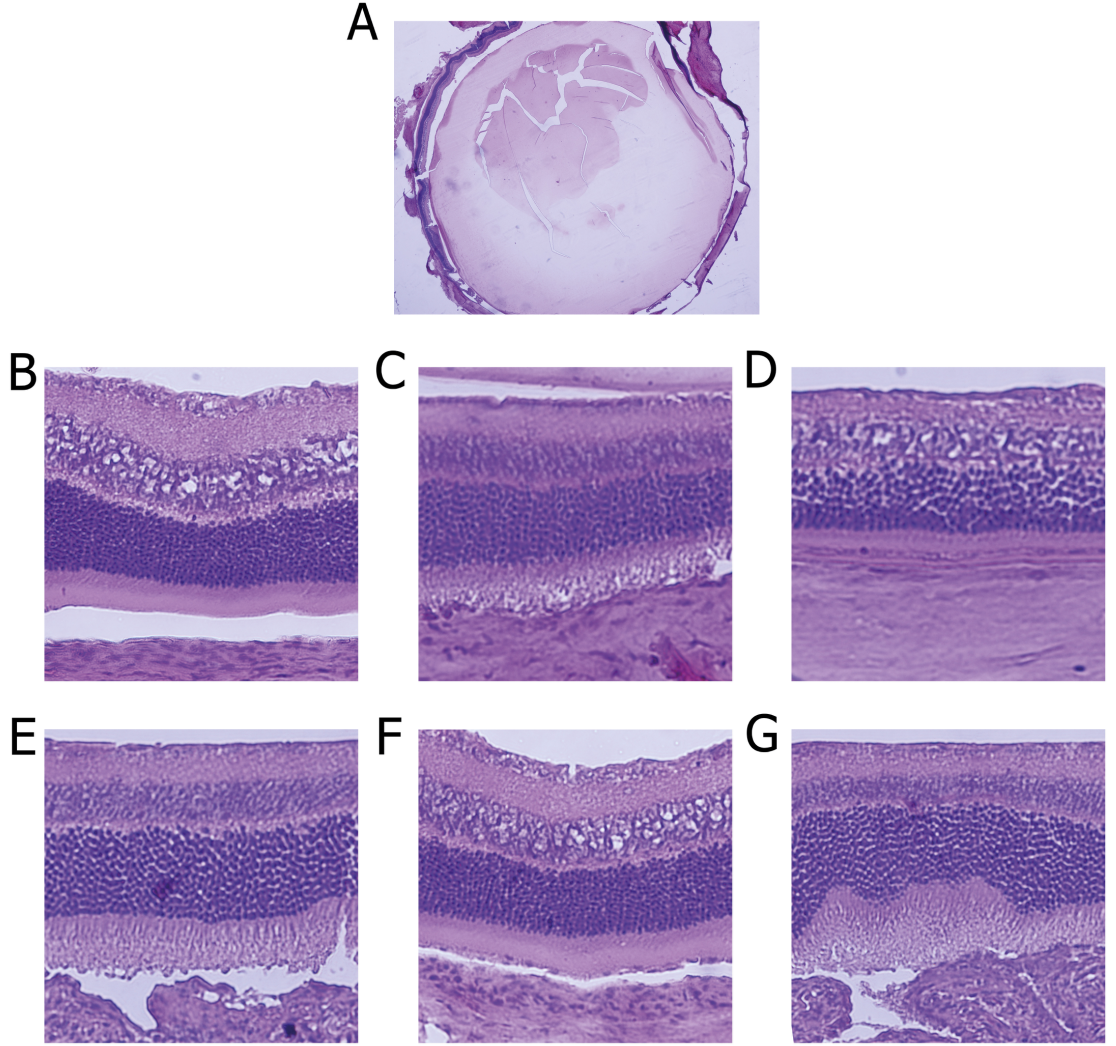
Şekil 4.8: 5 μl steril distile su içerisinde çözündürülmüş 5 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

15 nmol CoCl_2 uygulaması almış sıçanların göz dokularındaki çekirdek boyamalarına bakıldığında 5 nmol dozda başlayan RPE ve dış segment hasarı sonucu retinal dokunun RPE den ayrılmasının bu dozda artarak devam ettiği görüldü (Şekil 4.9 – B, E, F ve G paneli).



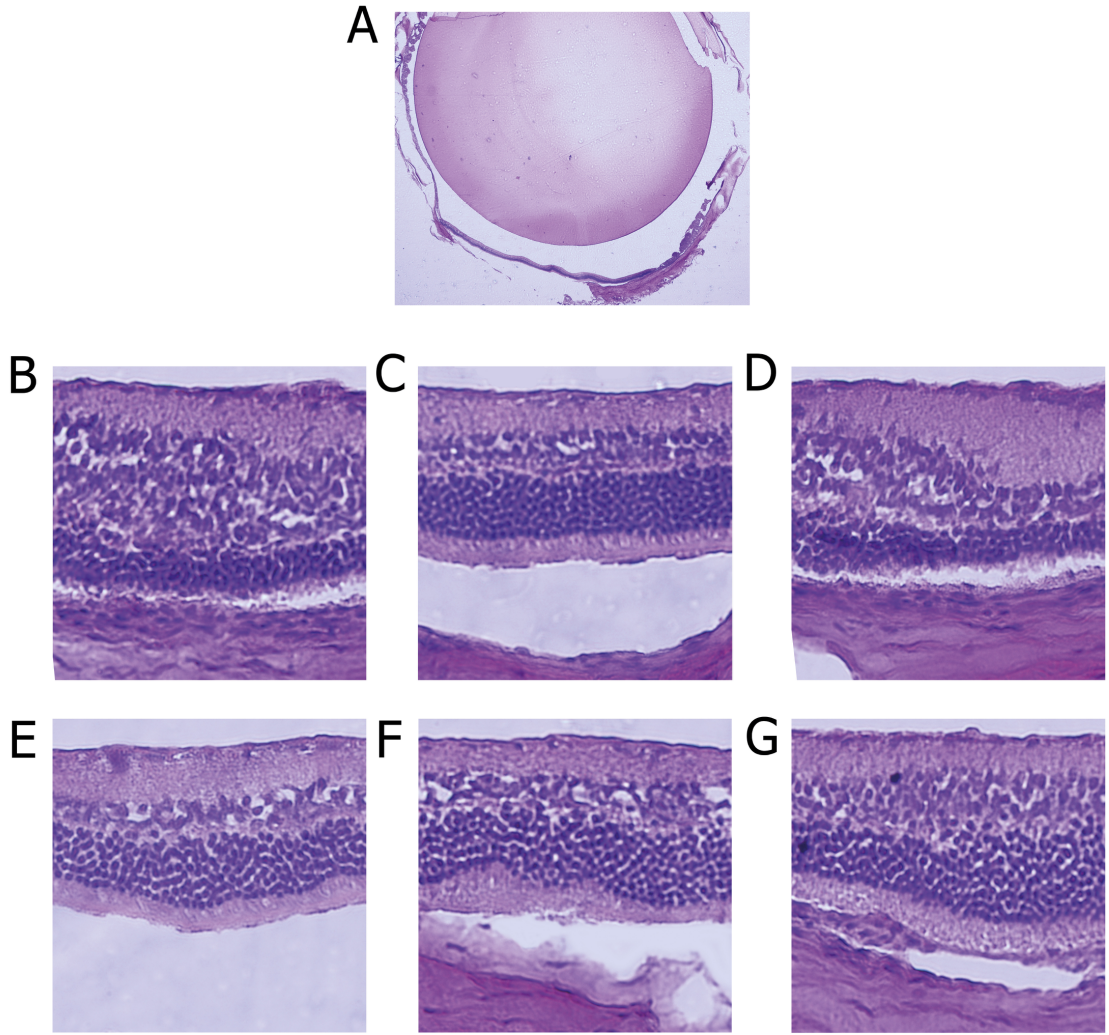
Şekil 4.9: 5µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 15 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6µm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

Üçüncü doz olan 50 nmol CoCl_2 almış sıçanların göz kesitlerindeki H&E boyama sonuçları incelendiğinde rod ve koni hücre çekirdeklerinin bulunduğu dış nükleer tabakaya doğru ilerleyen, fotoreseptörlerin dış ve iç segmentlerinde bariz bir hasar ve iç nükleer tabakada da yer yer dejeneratif bozuklukların olduğu tespit edildi. Dış ve iç segmentte oluşan hasar artık bariz bir şekilde fotoreseptör tabakasının RPE katmanından ayrılmasına neden oldu (Şekil 4.10 – B, E, F ve G Paneli).



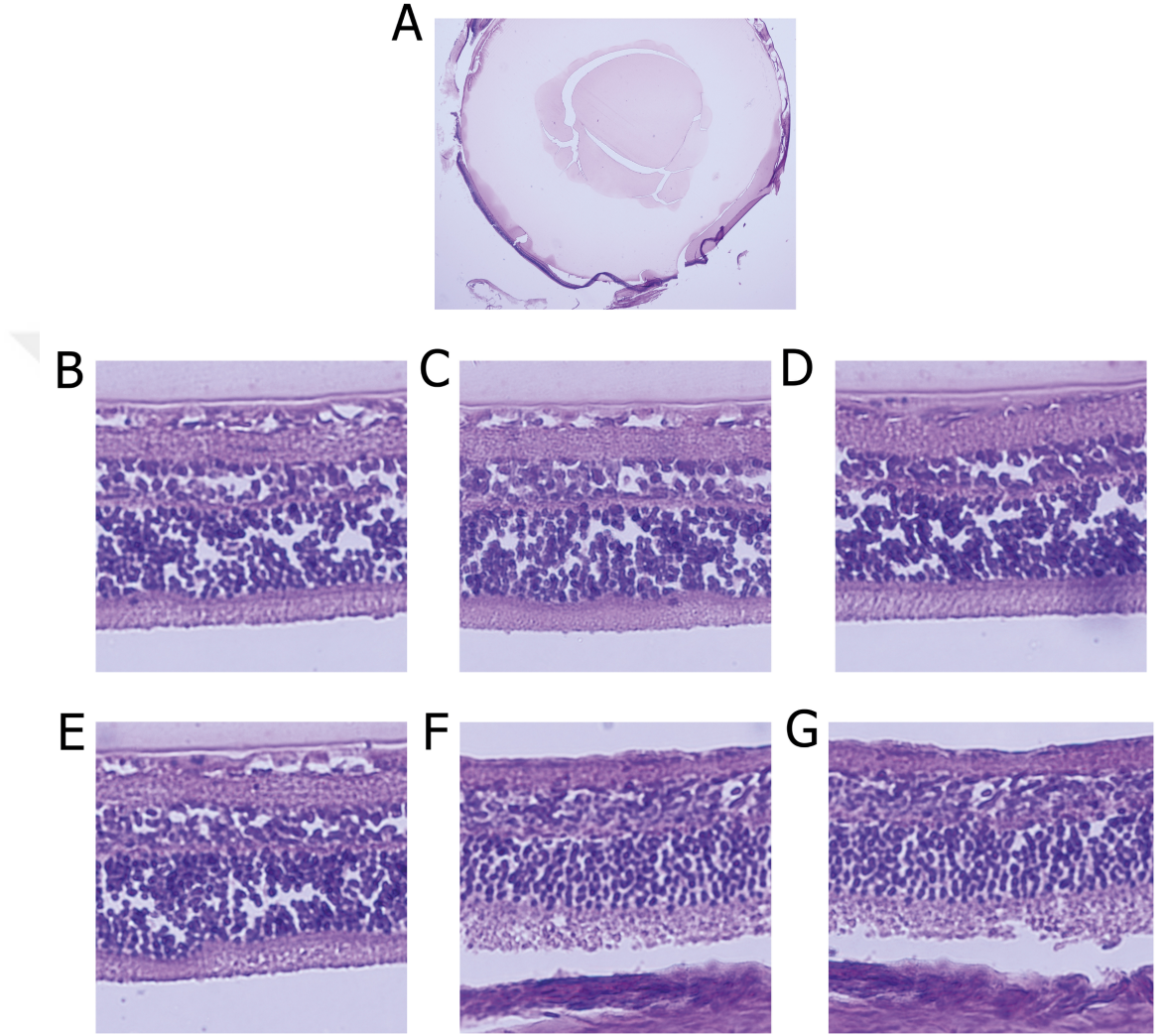
Şekil 4.10: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 50 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

150 nmol CoCl_2 enjeksiyonu yapılmış sıçanların göz dokularındaki H&E boyama sonuçlarına bakıldığında fotoreseptör dejenerasyonuna ek olarak dış pleksiform tabakanın neredeyse tamamen kaybolarak dış ve iç nükleer tabakanın iç içe geçmiş olduğu belirlendi. İç ve dış nükleer tabakalarda da bariz incelmeler ve bir önceki doza oranla dejenerasyonun artarak devam ettiği görüldü (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 150 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

En yüksek doz olan 500 nmol CoCl_2 almış hayvanların göz dokularında dejenerasyonun tüm katmanlarda şiddetli bir şekilde olduğu, katmanlardaki hücre kayıplarıyla incelmeler olduğu belirlendi. Dış pleksiform tabaka iyice gözden kaybolarak iç ve dış nükleer tabaka neredeyse birleşti (Şekil 4.12).

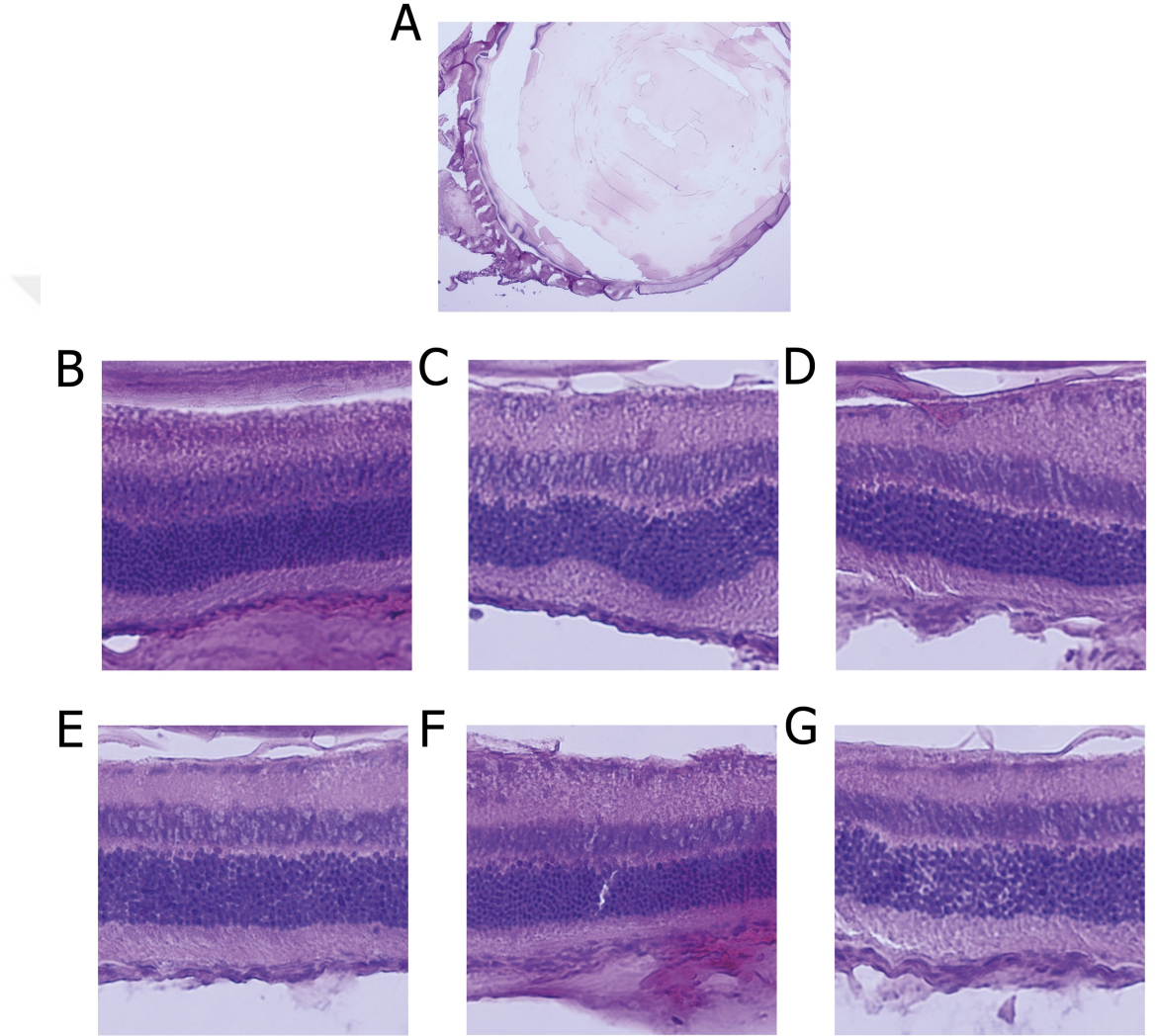


Şekil 4.12: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 500 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

Farklı dozlarda uygulama almış ve 2 hafta takip edilmiş sıçan retinal dokularında yapılan histolojik analizler sonrası uygun hastalık modelini oluşturmak için doz optimizasyonuna devam edilerek 50, 100 ve 150 nmol CoCl₂ uygulaması tekrar edildi. Doz belirlemesinin yanında bu dozlardaki hasarın zamana bağlı değişiminin de gözlemlenebilmesi için sıçanlar uygulama aldıktan sonra 2, 3 ve 4 hafta süreyle takip edildi. Sıçanlardan alınan göz dokularında H&E boyaması ile histolojik analizler yapıldı (n =6).

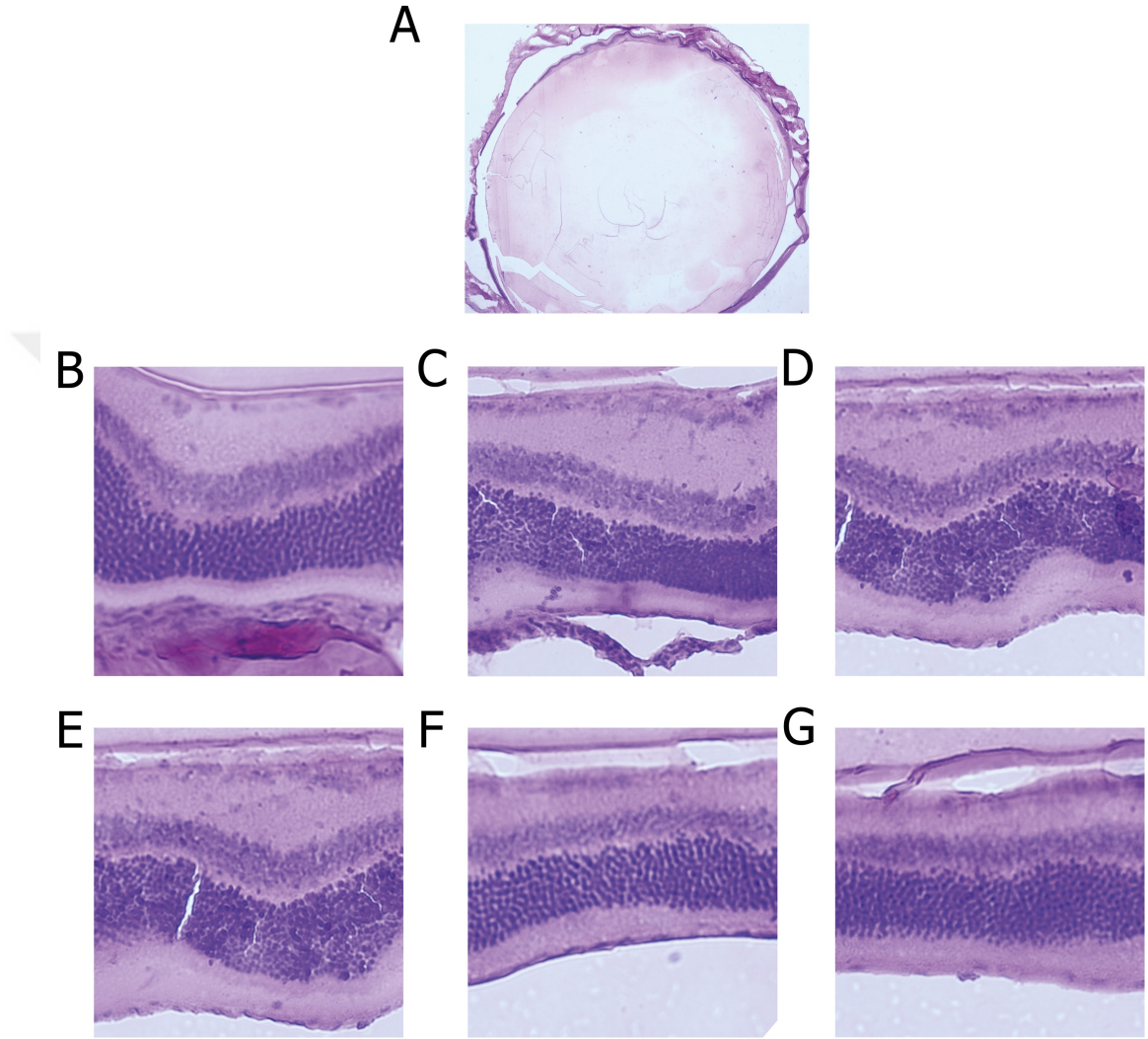


50 nmol CoCl_2 uygulamasından 2 hafta sonra sıçanların retinal dokuları incelendiğinde fotoreseptörlerin iç ve dış segmentinde bariz bir dejenerasyon, iç ve dış nükleer tabakalarında da kısmî hasar gözlendi. Fotoreseptör ve RPE katmanlarının yer yer koroid yapıdan ayrıldığı tespit edildi (Şekil 4.13 – Panel C, D, E ve G).



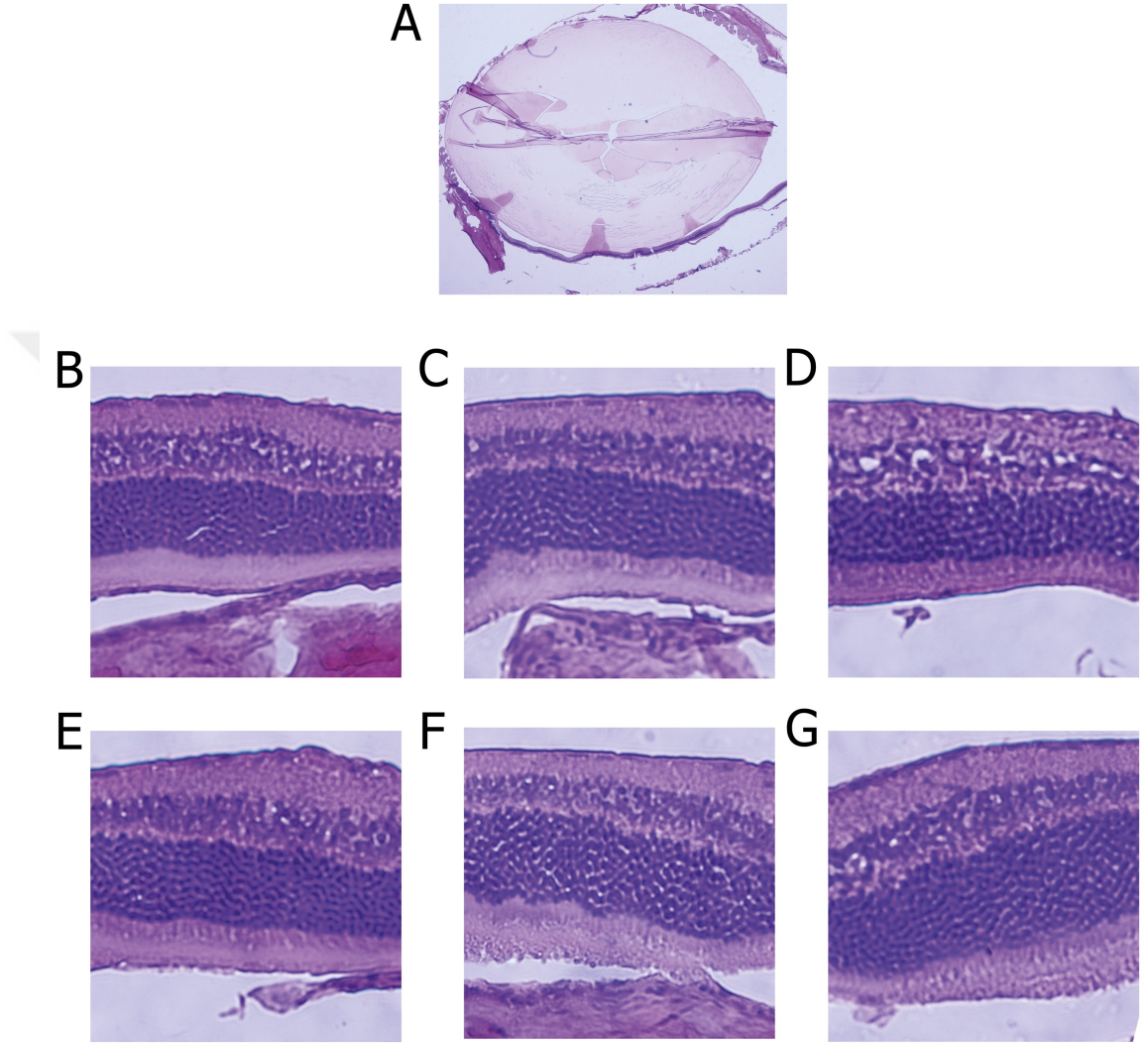
Şekil 4.13: 5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 50 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

Ara doz olarak denenen 100 nmol CoCl_2 almış sıçanların 2 hafta sonunda retinal dokularındaki H&E boyama sonuçlarına bakıldığında, fotoreseptör hasarından dolayı iç ve dış segment sınırlarının kaybolduğu, dış ve iç nükleer tabakalarındaki incelmelerin artarak devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.14 – Panel D – G).



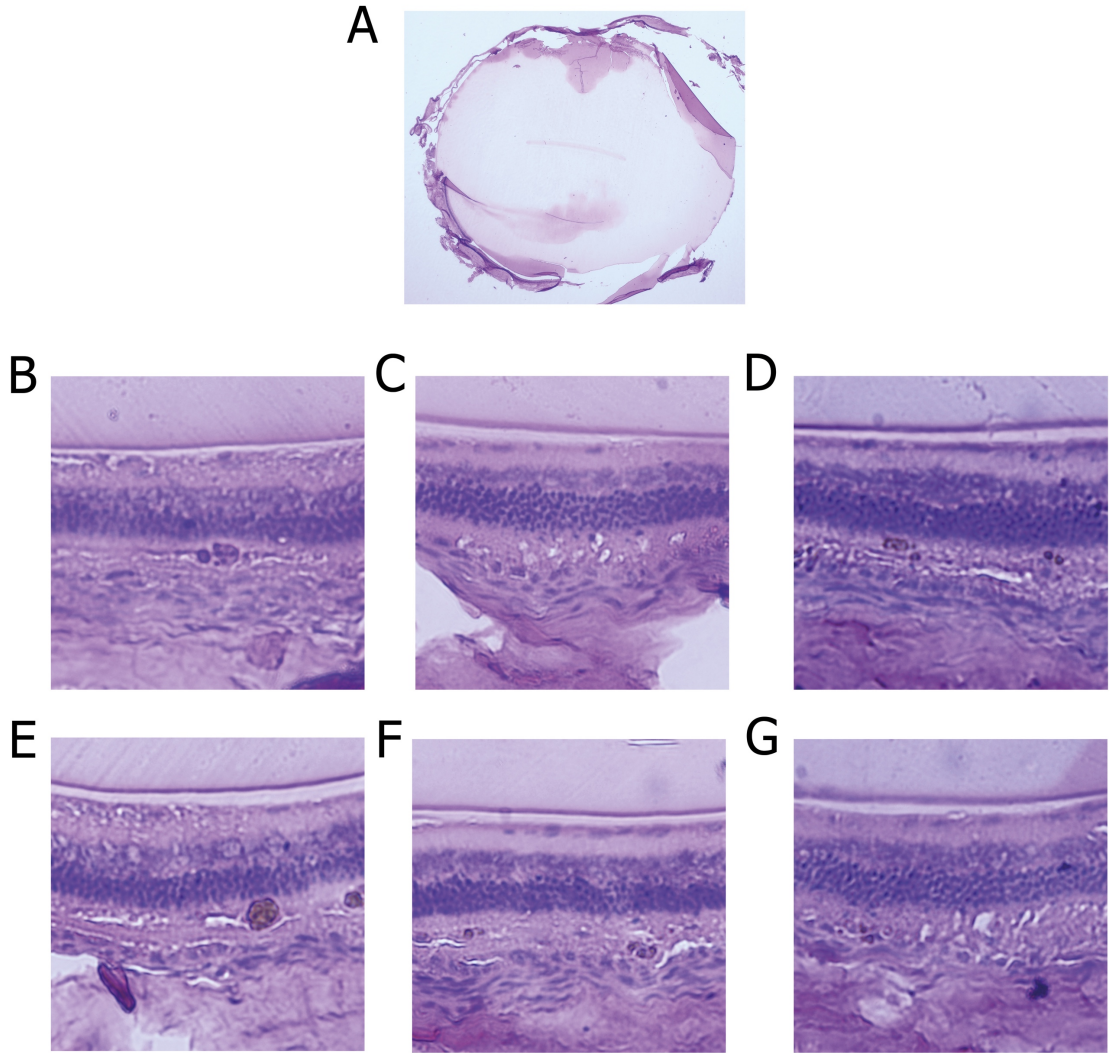
Şekil 4.14: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 100 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

2 haftalık 150 nmol CoCl_2 uygulama sonrasında ise hemen hemen tüm retinal katmanların hasar aldığı görüldü. Katmanlarda hücre kaybına bağlı incelmeler gözlenirken, özellikle dış pleksiform tabakasının incelerek dejenerasyona uğradığı ve iç ve dış nükleer katmanların iç içe geçtiği belirlendi (Şekil 4.15 – Panel C, D ve G).



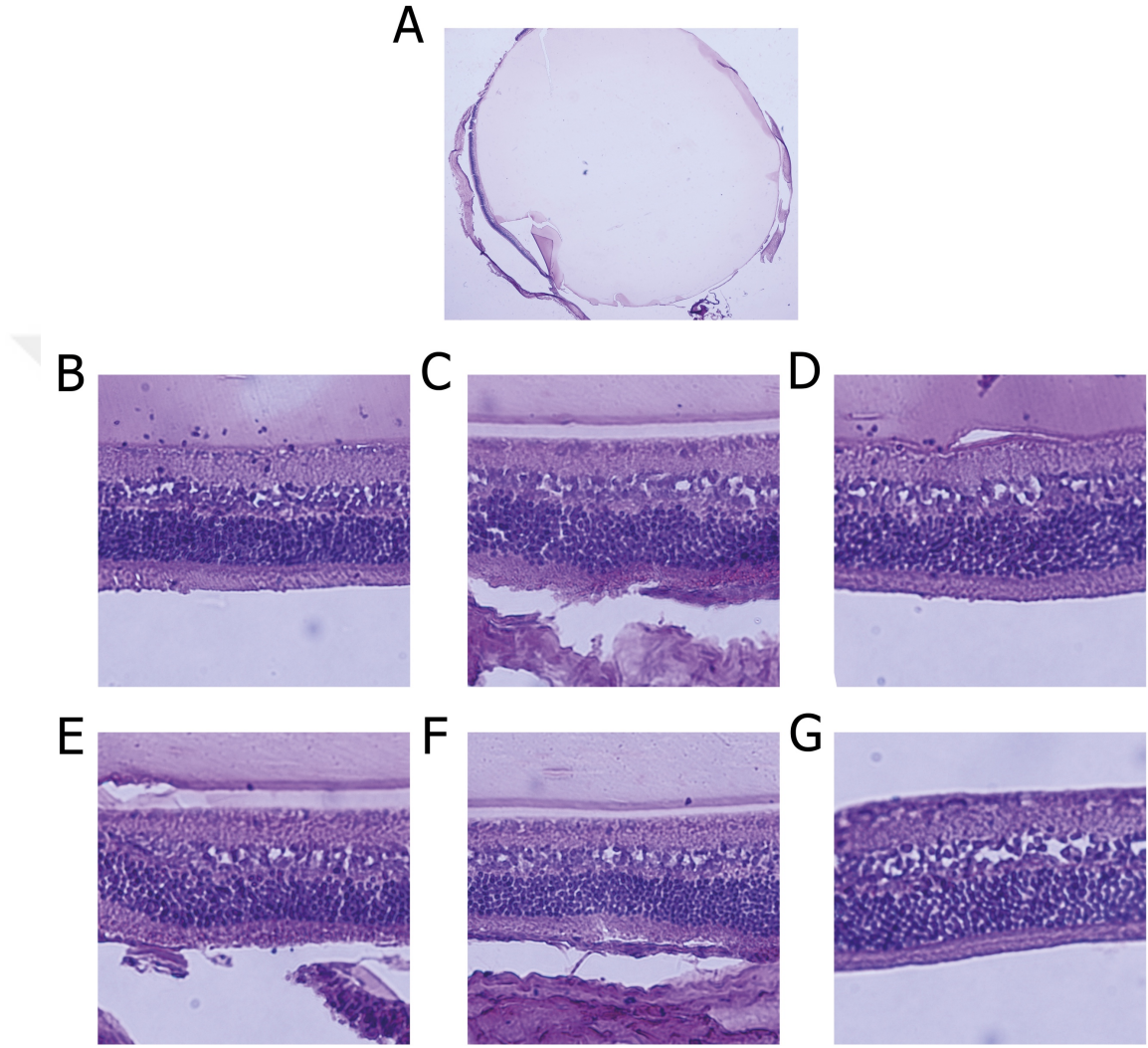
Şekil 4.15: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 150 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

50 nmol CoCl_2 uygulamasının ardından 3 hafta takip edilen sıçanların göz dokularında yapılan H&E boyamalarına bakıldığında, artan dejenerasyona bağlı olarak dış pleksiform tabakasının kaybolup, dış ve iç nükleer tabakaların incelerek birbirine geçtiği ve tek bir tabakaymış gibi görüldüğü tespit edildi. Ayrıca fotoreseptör dış ve iç segmentinin tamamen belirsizleştiği görüldü (Şekil 4.16).



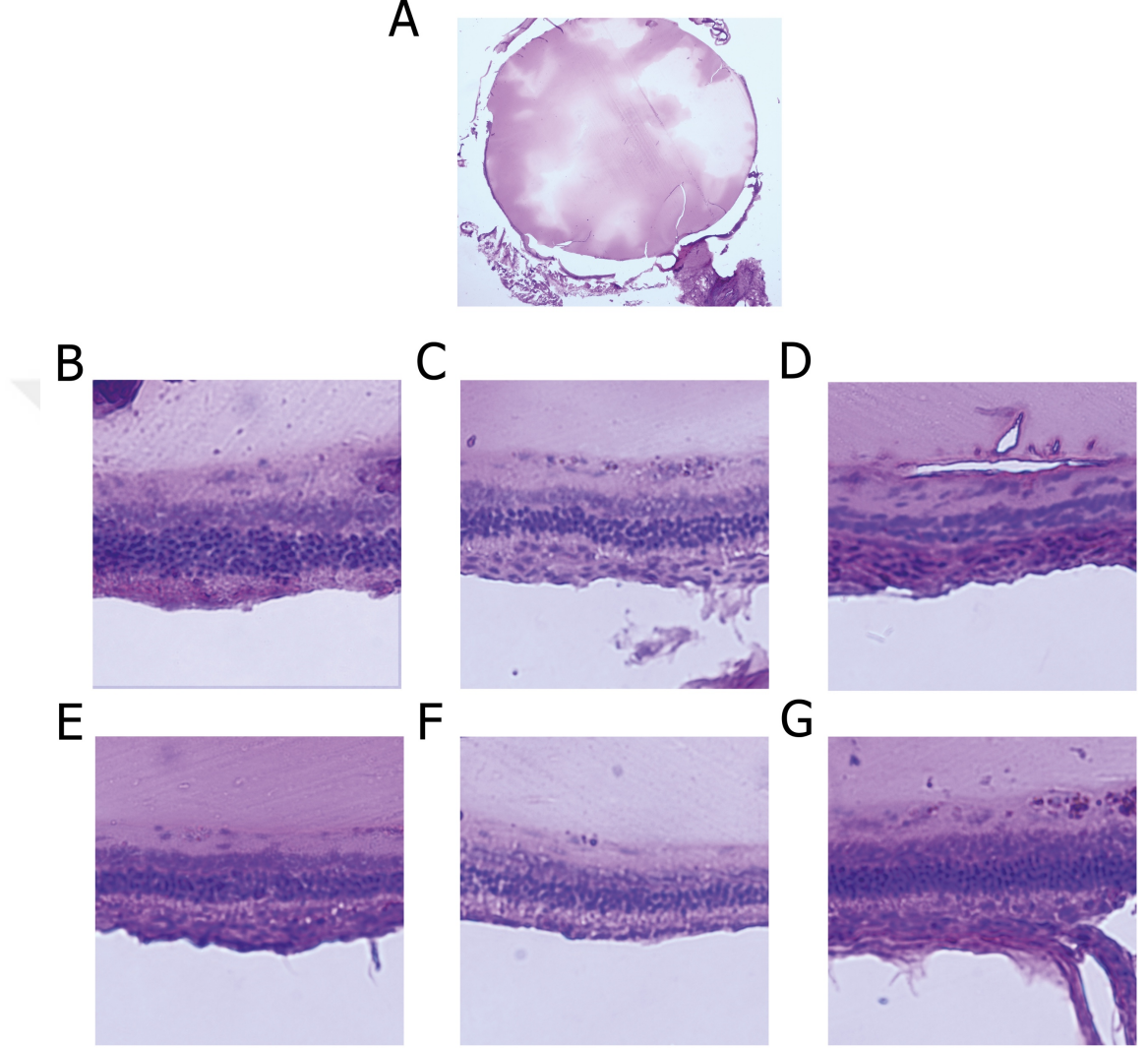
Şekil 4.16: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 50 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 3 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

100 nmol CoCl_2 almış sıçanların 3 hafta sonundaki göz kesitlerindeki H&E boyama sonuçlarına göre (Şekil 4.17) 2. haftada başlayan hasarın şiddetlenerek devam ettiği, fotoreseptörlerin iç ve dış segmentindeki dejenerasyona ek olarak iç ve dış nükleer tabakalarda bulunan hücre yoğunluğunda bariz bir azalma tespit edildi.



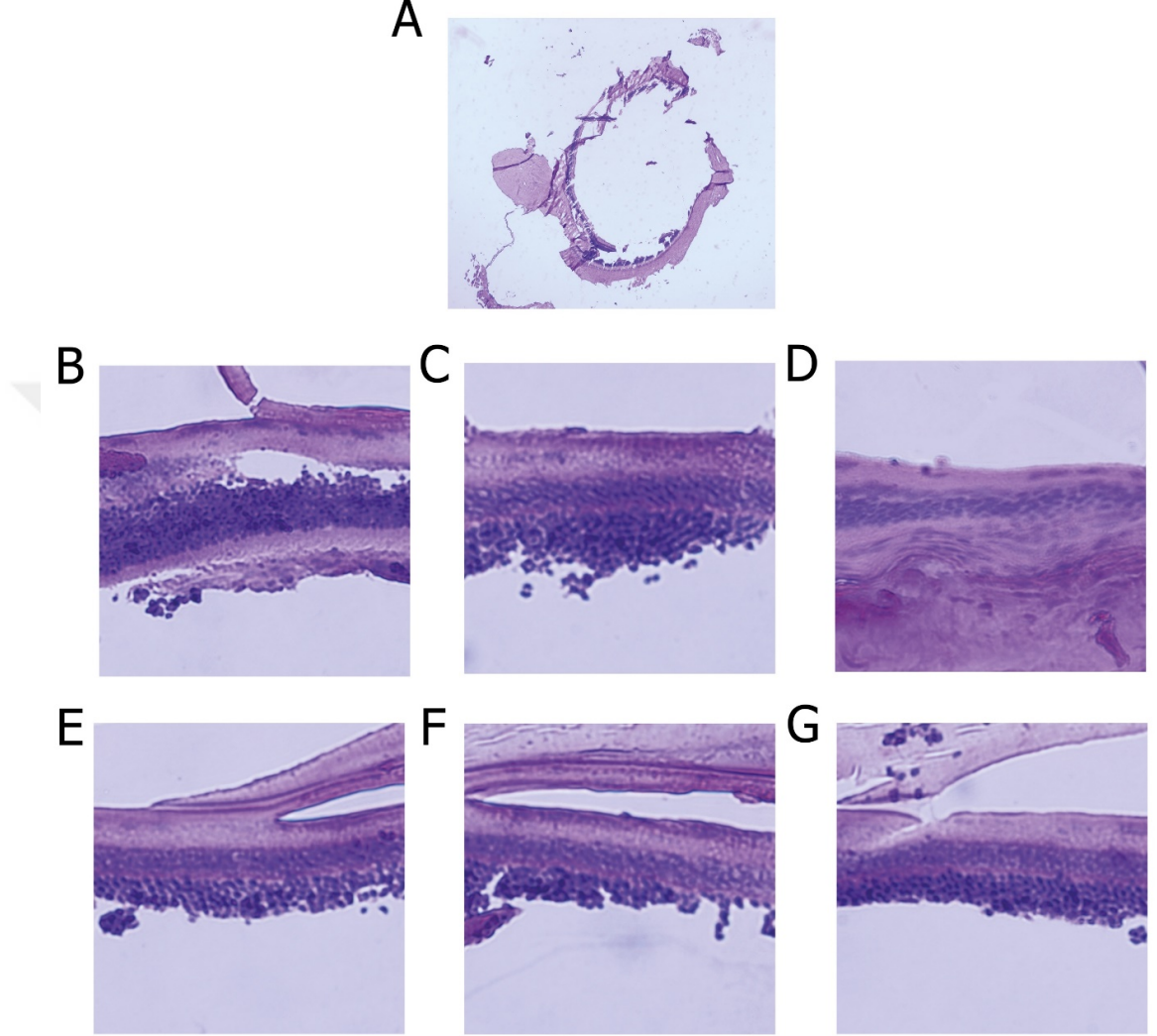
Şekil 4.17: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 100 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 3 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

150 nmol CoCl_2 uygulamasından 3 hafta sonraki retinal boyamalara bakıldığında retinal dejenerasyonun artarak devam ettiği, fotoreseptör dış ve i segmentinin ise yok olduğu görüldü (şekil 4.18).



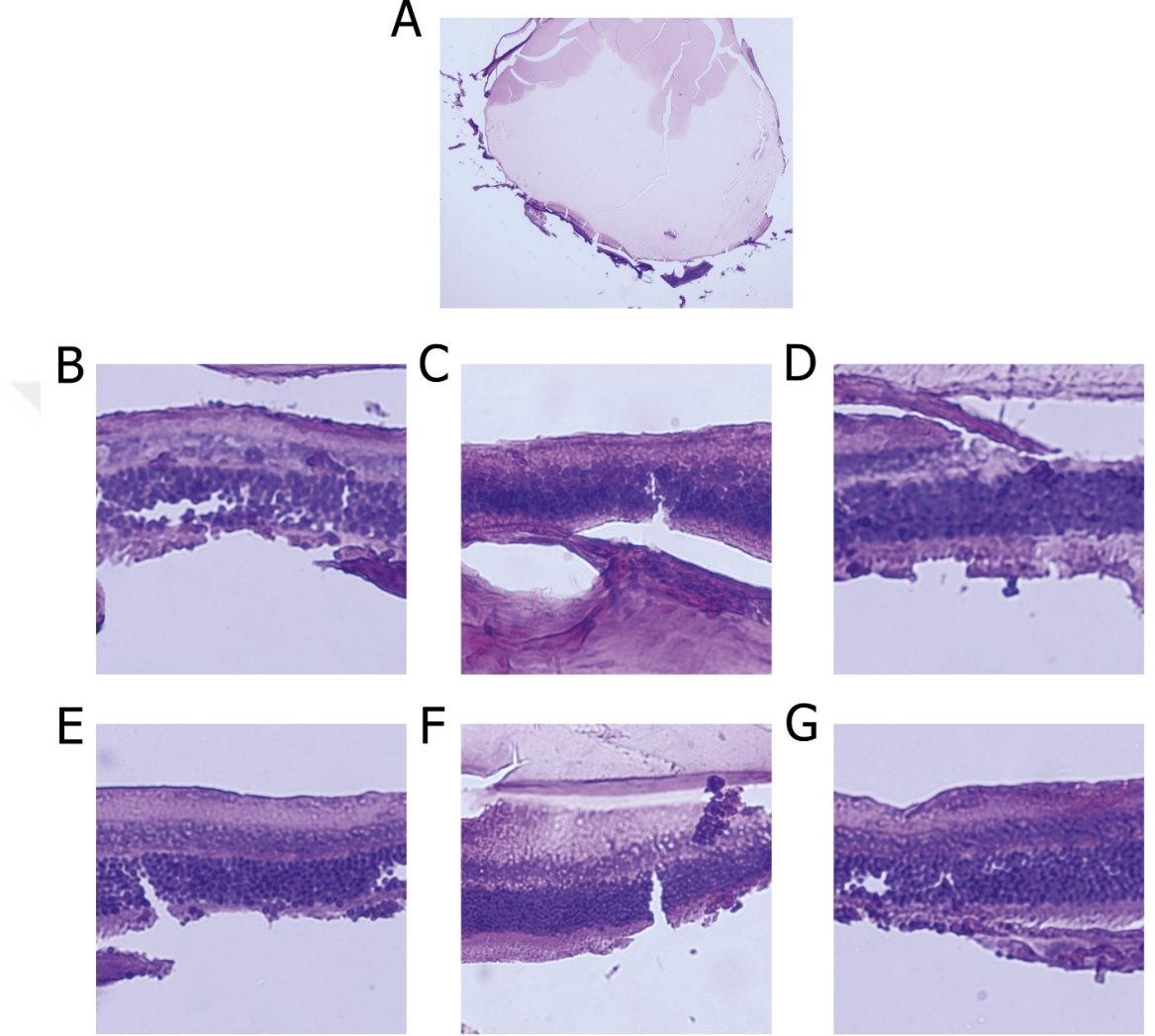
şekil 4.18: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 150 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 3 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

50 nmol CoCl_2 uygulamasından 4 hafta sonra yapılan H&E boyama sonuçlarına göre (Şekil 4.19) retinanın her bir katmanının hasar aldığı, özellikle fotoreseptör tabakasının parçalandığı tespit edildi.



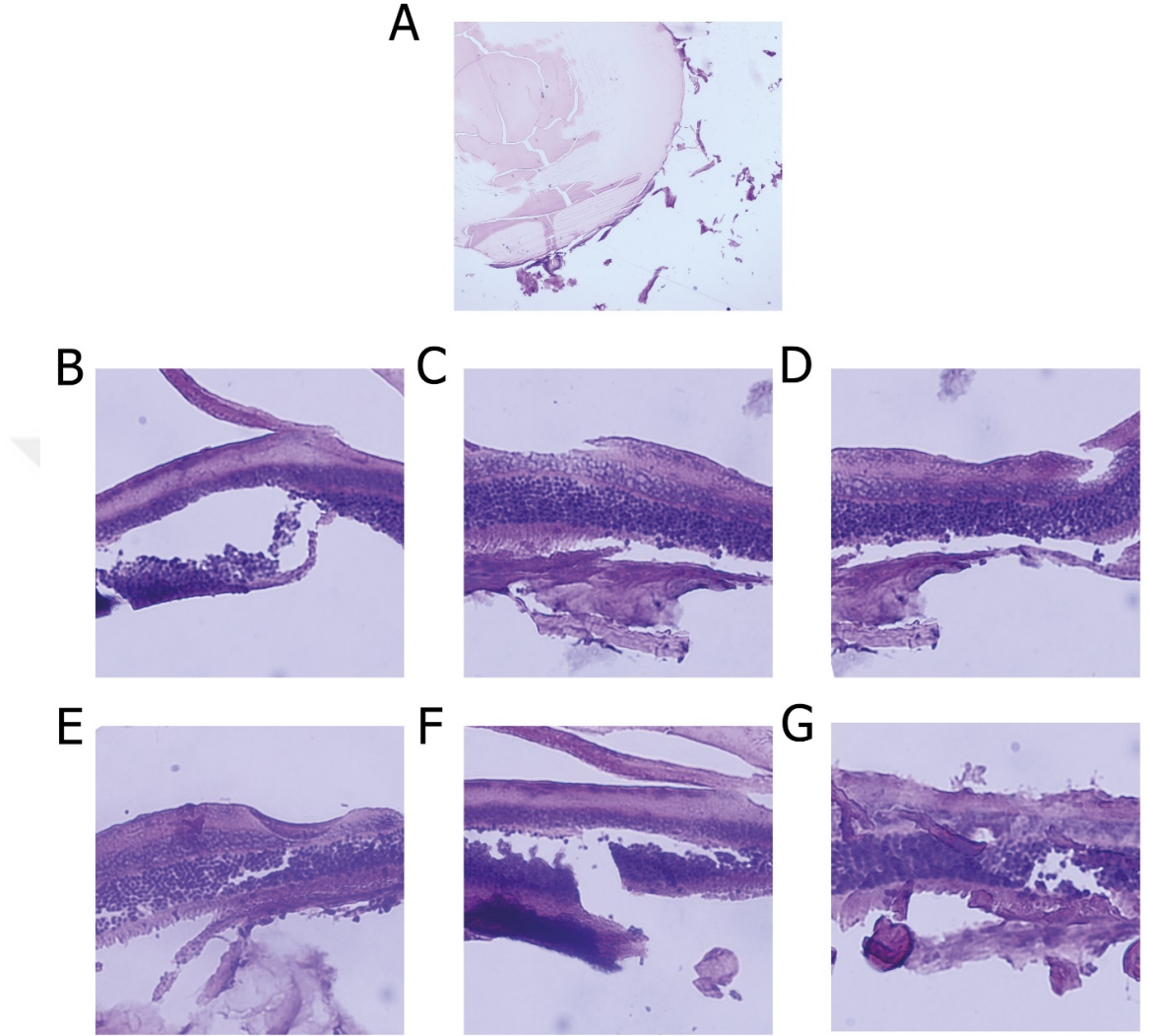
Şekil 4.19: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 50 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 4 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

Yapılan histolojik analizlerde 100 nmol CoCl_2 uygulamasının 4 hafta sonunda, retinal katmanlarda parçalanmalara sebebiyet vererek retina bütünlüğünü bozduğu tespit edildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 100 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 4 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

150 nmol CoCl_2 uygulamasından 4 hafta sonra retinal dokular incelendiğinde, tüm katmanlarda şiddetli bir dejenerasyon gözlemlendi (Şekil 4.21).

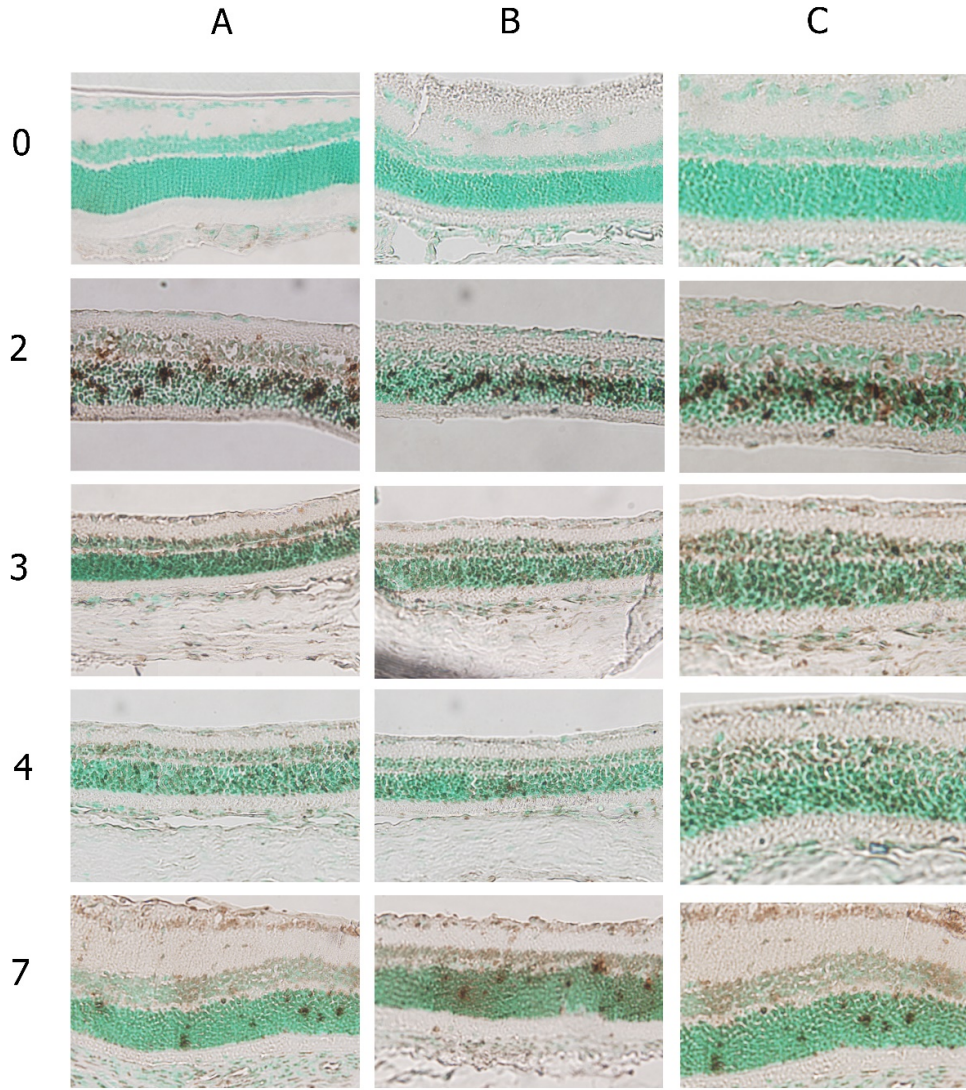


Şekil 4.21: 5 μl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 150 nmol CoCl_2 solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 4 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 μm kalınlığında alınan kesitlerdeki H&E boyama sonuçları. (Büyütme oranı 4X (A) ve 40X (B – G))

4.5. Retinal Dejenerasyonunun TUNEL analizi

50 nmol CoCl₂ uygulaması sonrası retinada gerçekleşen hücre ölüm mekanizmasını aydınlatabilmek için sıçanlar belirli takip süreleri sonunda (0, 2, 3, 4 ve 7. gün) sakrifiye edilerek retinal kesitlerde TUNEL boyama yapıldı. Boyama sonuçları kontrolle kıyaslandığında (0 gün 1X PBS almış), 50 nmol CoCl₂ uygulamasının 2. günde hücreleri belirgin bir şekilde apoptoza yönlendirdiği ve apoptotik hücre ölümlerinin fotoreseptörlerde (dış nükleer tabakada) yoğunlaştığı tespit edildi. İlerleyen günlerde apoptotik hücre sayılarının giderek azaldığı (3 ve 4. gün) ve daha çok iç nükleer ve gangliyon hücre tabakalarında yoğunlaştığı gözlemlendi. 7. güne gelindiğinde ise dış ve iç nükleer tabakada az da olsa yer yer kümelenmiş apoptotik hücrelerin varlığına rastlandı (Şekil 4.22).





Şekil 4.22: 5 µl steril distile su içerisinde çözdürülmüş 50 nmol CoCl₂ solüsyonunun intravitreal enjeksiyonundan 2, 3, 4 ve 7 gün sonra ve 1X PBS uygulamasından sonra (0) sakrifiye edilen sıçanların göz dokularından 6 µm kalınlığında alınan kesitlerdeki TUNEL boyama sonuçları. Apoptotik hücre çekirdekleri koyu kahverengi boyandı. Metil yeşili zıt boyama için kullanıldı (Büyütme oranı 40X (A ve B) ve 64X (C)).

5. TARTIŞMA

Fotoreseptörlerde yapı ve fonksiyon bozukluğuna neden olan çeşitli genetik mutasyonlar sonucu gelişen retinal distrofiler, ilerleyen dönemlerde körlükle sonuçlanmaktadır. Hastalığa sebep olan mutasyonlar, fotoreseptörler ve retinal pigment epitelyum hücreleri (RPE) gibi farklı hücre gruplarında, çeşitli genler üzerinde görülür. En sık rastlanan retinopati tipi (yaygınlığı 1:4000) retinitis pigmentozada (RP) bile 70 farklı gende 3000'den fazla mutasyonun varlığı bilinmektedir. Bu durum, hastalığın gen nakli ile tedavisi için her bir mutasyona özgü farklı deney hayvan modellerini ve farklı gen nakillerini gerektirir. Ancak çok çeşitli dejenerasyon yollarına rağmen hastalık sürecinde gelişen patolojik tablo genel olarak aynıdır. Bu bağlamda, farklı mutasyonların neden olduğu ortak hastalık patolojisini taklit eden yeni bir deney hayvan modelinin oluşturulması, geliştirilebilecek olası gen terapisi çalışmalarında kolaylık sağlayacaktır. Bu sebeple çalışmamızda tek bir gen mutasyonuna özgü değil, çok sayıda mutasyonun sebebiyet verdiği ortak hastalık patolojisine yönelik bir deney hayvan modelinin oluşturulması amaçlandı. Kimyasal indüklü dejenerasyonun oluşturulması için hücrelerde hipoksi oluşturma etkileri ile bilinen CoCl_2 tercih edildi. Uygulanacak doza karar verebilmek için ise düşük dozdan yüksek doza doğru çeşitli dozlar denendi. *in vitro* CoCl_2 uygulamasının sonuçlarının tayini için insan retinal pigment epitelyum (RPE) hücre hattı olan ARPE-19 hücreleri tercih edildi. Yapılan farklı doz uygulamaları sonucunda CoCl_2 dozu ve inkübasyon süresi arttıkça retinal hücre ölüm oranlarının da arttığı belirlendi.

RP deney hayvan modeli olarak tercih edilen retinal dejenerasyon (rd) fare ve Royal College of Surgeons (RCS) sıçanlarda aktif mikroglia hücrelerinin varlığı retinal distrofilerdeki dejenerasyonun sebeplerinden birinin mikroglial aktivasyon olduğunu gösterdi (Roque ve ark., 1999; Zeiss ve Johnson, 2004). Bu sebeple mikroglia hücrelerinin model oluşturmada kullanılacak CoCl_2 uygulamasından ne derece etkilendiğini araştırmak için ARPE-19 hücrelerinde yapılan CoCl_2 denemeleri insan mikroglia hücre hattı HMC-3 hücrelerinde de gerçekleştirildi. Uygulama sonrası yapılan MTT testlerinin analizlerinde mikroglia hücrelerinin CoCl_2 uygulamasına

karşı düşük dozlarda bile RPE hücrelerine kıyasla *in vitro* koşullarda daha hassas olduğu gözlemlendi.

Farklı dozlarda uygulama almış RPE ve mikroglia hücrelerinden toplanan lizatlarda hücre ölüm mekanizması olan hipoksinin indüklenip indüklenmediğinin kontrolü olarak HIF-1 α proteininin western blot ile tayini yapıldı. HIF-1 α , ortamdaki oksijen miktarının azalmasıyla birlikte açığa çıkan ve hücrelerin oksijene erişimi ile dakikalar içerisinde degrede olabilen hücrede az miktarda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu sebeple western yükleme kontrolü olan β -actin protein miktarıyla karşılaştırıldığında daha düşük yoğunlukta bant oluşumu gözlemlendi. Western blot sonuçlarına bakıldığında uygulama almamış hücrelerde bant oluşumu gözlenmezken uygulama almış hücre lizatlarında 95 kDa dolaylarında HIF-1 α proteinine rastlandı.

Western blot deney sonucunda alınan bant yoğunluklarının düşük olması sebebiyle proteinleri çok daha çabuk fikse ederek görüntüleme imkânı sunan immüno Floresan boyama ile de CoCl₂ uygulaması almış RPE ve mikroglia hücrelerinde HIF-1 α protein tayini yapıldı. 24 ve 48 saatlik uygulamaya maruz kalan ARPE-19 hücrelerinde artan doz ve artan uygulama süresi ile birlikte artan HIF-1 α protein boyaması gözlemlendi. HMC-3 hücrelerindeki sonuçlara bakıldığında ise yüksek doz (150 ve 500 nmol) CoCl₂ muamelesi sonrası özellikle 48 saat sonrasında artan HIF-1 α protein miktarı gözlemlendi. Yapılan MTT testlerinin analizlerinde HMC-3 hücreleri RPE hücrelerine kıyasla CoCl₂ uygulamasına karşı daha hassas olduğu belirlenmişti. Yapılan çekirdek boyamalarına bakıldığında da artan dozlarda azalan DAPI boyaması ile bu sonuçlar desteklenmiş oldu.

in vitro hastalık modellemesi sonrasında *in vivo* hayvan modelinin Wistar sıçanlarda oluşturulması amacıyla intravitreal yolla 5 μ l steril distile su içerisinde çözündürülmüş 5, 15, 50, 150 ve 500 nmol CoCl₂ enjeksiyonları yapıldı. Sıçanlar 2 haftalık takibin sonrasında sakrifiye edildi ve alınan göz dokularında histolojik analizler yapıldı. Alınan göz dokuları Davidson solüsyonu içerisinde fikse edilerek parafine gömüldü. Davidson solüsyonu dokuların işlenmesi sırasında lensin normalden daha yumuşak olmasını sağlaması ve kesit alımını dolayısı ile retinal dokuların gözlenmesini kolaylaştırmak için tercih edildi. Toplanan göz dokularından 6 μ m kalınlığında

kesitler alınarak H&E boyaması ile hücre morfolojileri incelendi. 1X PBS enjeksiyonu yapılan sıçanların göz kesitlerinde retinal dokular hasarsız ve bir bütün halinde görülürken, CoCl₂ uygulaması yapılmış sıçanların dokularında fotoreseptörlerin dış segmentinde başlayarak artan dozla birlikte şiddetlenerek tüm tabakalara yayılan retinal dejenerasyon tespit edildi. İç ve dış segmentte meydana gelen hasara bağlı olarak retina yer yer RPE katmanından ayrıldı. Yüksek dozlarda (150 ve 500 nmol) ise dış pleksiform tabakanın neredeyse kaybolarak iç ve dış nükleer tabakalarının iç içe geçtiği gözlemlendi.

in vivo hastalık modelinde intravitreal kimyasal ajan enjeksiyonu ile progresif retinal dejenerasyonun gösterilmesi amaçlandı. Bu amaçla çok geniş aralıkta denenmiş dozlar arasından orta şiddette hasar vermiş 50 ve 150 nmol dozlarına 100 nmol dozu da eklenerek CoCl₂ uygulaması tekrar edildi. İleri dönemlerdeki dejenerasyonun gözlemlenebilmesi için sıçanlar uygulama aldıktan sonra 2, 3 ve 4 hafta süreyle takip edildi. Yapılan histolojik analizler sonrasında artan uygulama süresine bağlı olarak fotoreseptör dejenerasyonunun da artarak tüm retinal katmanlara yayıldığı tespit edildi. 500 nmol gibi yüksek CoCl₂ dozunun şiddetli dejenerasyona sebep olması için 2 hafta yeterli olurken aynı hasarın 50 nmol CoCl₂ ile oluşturulması neredeyse 4 hafta sürdü. Bu sonuçlar seçilecek olan CoCl₂ dozun yanında uygulama süresinin de ne kadar önemli olduğunu gösterir nitelikteydi.

CoCl₂ uygulamasıyla retinal tabakalarda gerçekleşen hücre ölümlerinin mekanizmasının apoptozis olup olmadığının araştırılması için intravitreal CoCl₂ enjeksiyonlarının ardından 2, 3, 4 ve 7 gün takip edilen sıçanların göz kesitlerinde TUNEL boyama gerçekleştirildi. 50 nmol CoCl₂ uygulamasının, 2. günde hücreleri belirgin bir şekilde apoptoza yönlendirdiği ve apoptotik hücre boyamalarının dış nükleer tabakada yoğunlaştığı tespit edildi. İlerleyen günlerde ise dış nükleer tabakadaki apoptotik hücrelerin azaldığı, iç nükleer ve gangliyon hücre tabakalarındaki boyamaların arttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, *in vitro* CoCl₂ uygulamalarının retinal hücrelerde hipoksiyi indükleyerek dejenerasyona neden olduğu belirlendi. Wistar sıçanlarda yapılan intravitreal CoCl₂ enjeksiyonlarıyla da fotoreseptör hücrelerinin apoptozu ile

başlayarak tüm tabakalara yayılan progresif retinal dejenerasyon oluşturulmuş oldu. Retinitis pigmentosa gibi kalıtsal retinal disrofilerde belirlenmiş çok sayıda farklı (70 gende 3000'den fazla) mutasyon bulunsa da hastalık süresince gelişen ortak patoloji, yavaş ve ilerleyen retinal dejenerasyon olarak görülmektedir. Projemizde elde edilen sonuçlara bakıldığında, intravitreal CoCl_2 uygulamalarıyla kalıtsal retinopatilerin ortak patolojisini taklit edebilen, kimyasal ajan indüklü yeni bir dejeneratif retinal hastalık deney hayvan modelinin geliştirildiği görülmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çeşitli hücre gruplarında meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan retinal dejenerasyon ile karakterize retinitis pigmentosa (RP) için bilinen 70 gen ve 3000'den fazla mutasyon mevcuttur. Retinitis pigmentosa gen nakli ile tedavi edilmek istendiğinde bu genetik heterojenite hedef gen seçimini zorlaştırmaktadır. Seçilecek her bir mutasyon için farklı bir gen tedavisi planı beraberinde o mutasyona özgü deney hayvan modelinin de oluşturulmasını gerektirir. 3000'den fazla mutasyon düşünüldüğünde bu durum maliyet ve zaman açısından pratikte çok da uygulanabilir görülmemektedir. Bilinen çeşitli mutasyonlara rağmen hastalık sürecinde gelişen patolojik tablo genel olarak aynıdır. Bu bağlamda, farklı mutasyonların neden olduğu ortak hastalık patolojisini taklit eden yeni bir deney hayvan modelinin oluşturulması, geliştirilebilecek olası gen terapisi çalışmalarına olanak sağlayacaktır. Bu amaç çerçevesinde geliştirilen projemizde Wistar sıçanlara intravitreal kobalt klorür enjeksiyonları yapıldı. Enjeksiyonlar sonrası takip edilen sıçanların retinal dokularında, fotoreseptörlerde başlayıp zamanla tüm tabakalara yayılan progresif retinal dejenerasyon tespit edildi. Oluşturulan yeni deney hayvan modeliyle, tek bir mutasyonun gen replasmanı ile düzeltilmesi yerine, mutasyonun neden olduğu patolojinin düzeltilmesine veya hastalık gelişiminin engellenmesine yönelik çalışmalara olanak sağlanacaktır. Bu açıdan bakıldığında, geliştirilebilecek gen tedavi stratejilerinin çok daha fazla sayıda hastada uygulanabilir olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Cuenca, N., Pinilla, I., Sauve, Y., Lu, B., Wang, S., Lund, R. D. 2004. "Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina." *Neuroscience*, 127(2), 301-317.

Dias, M. F., Joo, K., Kemp, J. A., Fialho, S. L., da Silva Cunha, A., Jr., Woo, S. J., Kwon, Y. J. 2018. "Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives." *Prog Retin Eye Res*, 63, 107-131.

Guadagni, V., Novelli, E., Piano, I., Gargini, C., Strettoi, E. 2015. "Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective." *Prog Retin Eye Res*, 48, 62-81.

Gupta, N., Brown, K. E., Milam, A. H. 2003. "Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration." *Exp Eye Res*, 76(4), 463-471.

Hamel, C. 2006. "Retinitis pigmentosa." *Orphanet J Rare Dis*, 1, 40.

Hara, A., Niwa, M., Aoki, H., Kumada, M., Kunisada, T., Oyama, T., Yamamoto, T., Kozawa, O., Mori, H. 2006. "A new model of retinal photoreceptor cell degeneration induced by a chemical hypoxia-mimicking agent, cobalt chloride." *Brain Res*, 1109(1), 192-200.

Hartong, D. T., Berson, E. L., Dryja, T. P. 2006. "Retinitis pigmentosa." *Lancet*, 368(9549), 1795-1809.

Jimenez, A. J., Garcia-Fernandez, J. M., Gonzalez, B., Foster, R. G. 1996. "The spatio-temporal pattern of photoreceptor degeneration in the aged rd/rd mouse retina." *Cell Tissue Res*, 284(2), 193-202.

Karlstetter, M., Ebert, S., Langmann, T. 2010. "Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models." *Immunobiology*, 215(9-10), 685-691.

Kostic, C., Arsenijevic, Y. 2016. "Animal modelling for inherited central vision loss." *J Pathol*, 238(2), 300-310.

Kuehn, S., Hurst, J., Rensinghoff, F., Tsai, T., Grauthoff, S., Satgunarajah, Y., Dick, H. B., Schnichels, S., Joachim, S. C. 2017. "Degenerative effects of cobalt-chloride treatment on neurons and microglia in a porcine retina organ culture model." *Exp Eye Res*, 155, 107-120.

Mou, Y. H., Yang, J. Y., Cui, N., Wang, J. M., Hou, Y., Song, S., Wu, C. F. 2012. "Effects of cobalt chloride on nitric oxide and cytokines/chemokines production in microglia." *Int Immunopharmacol*, 13(1), 120-125.

Narayan, D. S., Wood, J. P., Chidlow, G., Casson, R. J. 2016. "A review of the mechanisms of cone degeneration in retinitis pigmentosa." *Acta Ophthalmol*, 94(8), 748-754.

Nash, B. M., Wright, D. C., Grigg, J. R., Bennetts, B., Jamieson, R. V. 2015. "Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy." *Transl Pediatr*, 4(2), 139-163.

Roque, R. S., Caldwell, R. B. 1993. "Isolation and culture of retinal microglia." *Curr Eye Res*, 12(3), 285-290.

Roque, R. S., Rosales, A. A., Jingjing, L., Agarwal, N., Al-Ubaidi, M. R. 1999. "Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro." *Brain Res*, 836(1-2), 110-119.

Shen, J., Yang, X., Dong, A., Petters, R. M., Peng, Y. W., Wong, F., Campochiaro, P. A. 2005. "Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa." *J Cell Physiol*, 203(3), 457-464.

Usui, S., Oveson, B. C., Lee, S. Y., Jo, Y. J., Yoshida, T., Miki, A., Miki, K., Iwase, T., Lu, L., Campochiaro, P. A. 2009. "NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa." *J Neurochem*, 110(3), 1028-1037.

Verbakel, S. K., van Huet, R. A. C., Boon, C. J. F., den Hollander, A. I., Collin, R. W. J., Klaver, C. C. W., Hoyng, C. B., Roepman, R., Klevering, B. J. 2018. "Non-syndromic retinitis pigmentosa." *Prog Retin Eye Res*.

Weihbrecht, K., Goar, W. A., Pak, T., Garrison, J. E., DeLuca, A. P., Stone, E. M., Scheetz, T. E., Sheffield, V. C. 2017. "Keeping an Eye on Bardet-Biedl Syndrome: A Comprehensive Review of the Role of Bardet-Biedl Syndrome Genes in the Eye." *Med Res Arch*, 5(9).

Zeiss, C. J., Johnson, E. A. 2004. "Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(3), 971-976.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif Özgecan	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Soyadı	ŞAHİN	Tel No	+90 (505) 262 37 68
Doğum Tarihi	25.02.1993	e-posta	elifozgecansahin@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Konya Dolapoğlu Anadolu Lisesi	2011
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2017-Ocak
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖK-DİL/ Sağlık Bilimleri	91

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Pankreasa Yönlendirilmiş Lentiviral Vektörlerle İnsülin Gen Naklinin Terapötik Etkinliğinin Diyabetik Deney Hayvan Modellerinde Belirlenmesi	TÜBİTAK	2016-2019
Lentivirus aracılı Vazoaktif İntestinal Peptid gen naklinin retinal dejeneratif hastalık modelindeki potansiyel terapötik etkinliği	TÜBİTAK	2019-2022

Yayınlar ve Bildiriler:

Erendor F., **Sahin E.O.**, Sanlioglu A.D., Balci M.K., Griffith T., Sanlioglu S., “Lentiviral gene therapy vectors encoding VIP suppressed diabetes-related inflammation and augmented pancreatic beta-cell proliferation in STZ-induced diabetes”, GENE THERAPY, GT-2020-00098R, In Press.

Sahin E.O., Erendor F., Bilgin A.B., Ceylaner S., Sanlioğlu S., “New gene therapy modalities targeting oxidative stress and microglial activation are needed for effective treatment of retinitis pigmentosa”, ESGCT XXVII Anniversary Congress, Barcelona, İSPANYA, 22 – 25 Ekim 2019, pp.P320

Erendor F., **Sahin E.O.**, Balci M. K., Sanlioglu S., “LentiVIP delivery suppresses systemic inflammation which results in beneficial outcome in Type 1 Diabetes”, ESGCT XXVII Anniversary Congress, Barcelona, İSPANYA, 22 – 25 Ekim 2019, pp.P059

Eksi Y.E., Erendor F., **Sahin E.O.**, Balci M.K., Sanlioglu S., “Lentivirus mediated insulin promoter directed insulin gene expression is effective in suppressing postprandial glucose excursions in Type 1 diabetes”, ESGCT XXVII Anniversary Congress, Barcelona, İSPANYA, 22 – 25 Ekim 2019, pp.P463

Erendor F., **Sahin E.O.**, Balci M. K., Sanlioglu S., “LentiVİP Gen Nakli Tip 1 Diyabetik Deneklerde Sistemik Enflamasyonu Baskılayarak Kan Şekerini Düşürdü” XVI. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Bodrum, TÜRKİYE 27 – 30 Ekim 2019, ss.P052

Sahin E.O., Erendor F., Bilgin A.B., Ceylaner S., Sanlioğlu S., “Retinitis Pigmentoza Gen Tedavi Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Lentiviral Vektörlerin Geliştirilmesi ve Testi”, XVI. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Bodrum, TÜRKİYE 27 – 30 Ekim 2019, ss.P053

Sahin E.O., Erendor F., Balci M.K., Sanlioğlu S., “Generation of a Novel Gene Therapy Vector Encoding Beta-Cell-Specific Insulin for Diabetes Treatment”, American Diabetes Association’s 78th Scientific Sessions, Orlando, Florida, 22 – 26 Haziran 2018, pp.1780

Sahin E.O., Erendor F., Balci M.K., Sanlioğlu S., "Generation of a beta cell specific insulin gene therapy vector for diabetes", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, ALMANYA, 17 – 21 Ekim 2017, pp.P341

Erendor F., **Sahin E.O.**, Balci M.K., Sanlioğlu S., "Generation of a lentiviral vector encoding vasoactive intestinal peptide for type 1 diabetes", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, ALMANYA, 17 – 21 Ekim 2017, pp.P152

Sahin E.O., Erendor F., Balci M.K., Sanlioğlu S., "Multiple low-dose streptozotocin injections induced diabetes in Wistar rats characterised by insulitis and hyperglycaemia useful for gene transfer studies", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, ALMANYA, 17 – 21 Ekim 2017, pp.P113

Sahin E.O., Erendor F., Balci M.K., Sanlioğlu S., "Diyabet hastalığına karşı kullanılmak üzere beta hücre spesifik gen tedavi vektörünün oluşturulması", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, TÜRKİYE, 26 – 29 Ekim 2017, ss.P-008

Sahin E.O., Erendor F., Balci M.K., Sanlioğlu S., "Antidiyabetik gen nakil çalışmalarında kullanılmak üzere çoklu düşük doz Streptozotosin uygulamasıyla otoimmünitenin indüklendiği Wistar sıçan modelinin geliştirilmesi", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, TÜRKİYE, 26 – 29 Ekim 2017, ss.PS-007

Erendor F., **Sahin E.O.**, Balci M.K., Sanlioğlu S., "Tip 1 diyabet için vazoaktif intestinal peptidi kodlayan lentiviral vektörün geliştirilmesi. ", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, TÜRKİYE, 26 – 29 Ekim 2017, ss.PS-014