

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**



**SIÇANLARDA N-METİL-N-NİTROZÜRE
İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL RETİNA
DEJENERASYONUNDA MİNOSİKLİNİN
ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Burak KARABULUT

2018

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ

Patoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ



Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ



Prof. Dr. Enver BEYTUT



Prof. Dr. Hayati YÜKSEL



Prof. Dr. Yesari ERÖKSÜZ



Prof. Dr. Necati TİMURKAAN





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmamı gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı: Burak KARABULUT

Tarih: 10.07.2018

İmza:

Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ

Patoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama yardımlarından dolayı başta danışman hocam Prof. Dr. Hatice Eröksüz ve Prof. Dr. Yesari Eröksüz olmak üzere; Patoloji Anabilim Dalından, Prof. Dr. Necati Timurkaan' a, Doç Dr. Aydın Çevik' e, Öğr. Görevlisi Şevket Soylu' ya ve Arş. Gör. Canan Akdeniz İncili' ye, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Aydın Girgin' e, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalından Doç. Dr. Cemal Orhan' a, Viroloji Anabilim Dalından Arş. Gör. Hasan Abaylı' ya, Genetik Anabilim Dalından Dr. Önder Otlu' ya, Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. İbrahim Hanifi Özercan' a, Veteriner Hekim Selçuk Başer' e, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Mehmet Gül ve Arş. Gör. Semir Gül' e, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM) personellerine ve bu çalışmayı 1160850 numaralı proje ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu; Tarım, Ormanlık ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubuna en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xv
KISALTMALAR LİSTESİ	xvii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Retinanın Hücrel Organizasyonu.....	7
3.1.1. Pigmentli Epitel Hücreleri.....	7
3.1.2. Fotreseptör Hücreler.....	8
3.1.3. İnternöron Hücreler.....	11
3.1.4. Gangliyon Hücreler.....	11
3.1.5. Glial Hücreler.....	12
3.2. Retinanın Histolojik Katmanları	13
3.2.1. Bruch's Membran.....	13
3.2.2. Retinal Pigmentli Epitel (RPE) Hücreleri Katmanı	14
3.2.3. Fotreseptör Katmanı (FK).....	14
3.2.4. Dış Sınırlayıcı Membran (DSM).....	15
3.2.5. Dış Nükleer Katman (DNK)	15
3.2.6. Dış Pleksiform Katman (DPK)	15
3.2.7. İç Nükleer Katman (İNK)	15
3.2.8. İç Pleksiform Katman (İPK)	16
3.2.9. Gangliyon Hücreleri Katmanı (GHK).....	16
3.2.10. Sinir İplikleri Katmanı	16
3.3. Retinitis Pigmentoza (RP).....	17
3.4. N- Metil- N- Nitrozüre (MNU).....	19
3.5. Minosiklin	22
3.6. N-Metil-N-Nitrozüre İle Oluşturulan Retinal Dejenerasyon Modeli.....	22

3.7. N-Metil-N-Nitrozüre İle Oluşturulan Retinal Dejenerasyonun Moleküler Mekanizması	25
3.7.1. Hatalı DNA Ürünleri Birikimi	25
3.7.2. Poly (ADP-riboz) Polimeraz (PARP) Aktivasyonu	25
3.7.3. Transkripsiyon Faktörleri.....	26
3.7.4. Bcl-2 (B-cell lymphoma) Ailesi.....	27
3.7.5. Kaspaz Aktivasyonu.....	27
3.7.6. Kalsiyum Artışı ve Kalpain Aktivasyonu	28
3.7.7. Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS)	28
4. GEREÇ VE YÖNTEM	30
4.1. Hayvan Deneyi.....	30
4.1.1. Hayvanların Gruplandırılması.....	30
4.1.2. N- Metil- N- Nitrozüre Solüsyonunun Hazırlanması.....	31
4.1.3. Minosiklin Solüsyonunun Hazırlanması	32
4.1.4. Hayvanlara Enjeksiyonların Yapılması.....	32
4.1.5. Periyodik Ötenaziler ve Göz Örneklerinin Elde Edilmesi	33
4.1.6. Davidson's Çözeltisinin Hazırlanması.....	34
4.1.7. Gluteraldehit Solüsyonunun Hazırlanması	34
4.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	34
4.2.1. Doku Kesitlerinin Alınması	35
4.2.2. Hematoksilen-Eozin Boyama, İnceleme ve Ölçümler	35
4.2.3. TUNEL Yöntemi.....	38
4.2.4. İmmunohistokimyasal Yöntemler	39
4.2.4.1. İmmunperoksidaz Yöntemi.....	39
4.2.4.2. İndirek İmmunflorasan Yöntemi.....	41
4.2.4.3. İmmunohistokimyasal Parametreler.....	42
4.2.5. Elektron Mikroskopik İnceleme.....	43
4.2.6. İstatistiksel Analiz.....	44
5. BULGULAR	45
5.1. Klinik Bulgular	45
5.2. Histopatolojik Bulgular	45
5.2.1. Onikinci Saat Bulguları.....	45

5.2.2. Yirmidördüncü Saat Bulguları	48
5.2.3. Kırksekizinci Saat Bulguları	51
5.2.4. Yetmişikinci Saat Bulguları	55
5.2.5. Yedinci Gün Bulguları	61
5.3. TUNEL Bulguları.....	73
5.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	79
5.4.1. Onikinci Saat Bulguları.....	79
5.4.1.1. Rodopsin	79
5.4.1.2. Red/Green Opsin (Uzun ve Orta Dalga Boyu Hassas Opsin).....	81
5.4.1.3. Blue Opsin (Kısa Dalga Boyu Hassas Opsin).....	83
5.4.1.4. 8-Hidroksil-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG).....	83
5.4.1.5. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA).....	85
5.4.1.6. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	85
5.4.1.7. Bcl-2 Associated X Protein (Bax).....	86
5.4.1.8. B-cell Lymphoma-2 (Bcl-2).....	87
5.4.1.9. Kaspaz-3.....	87
5.4.1.10. Kaspaz-6.....	88
5.4.2. Yirmidördüncü Saat Bulguları	89
5.4.2.1. Rodopsin	89
5.4.2.2. Red/Green Opsin.....	90
5.4.2.3. Blue Opsin.....	91
5.4.2.4. 8-OHdG.....	91
5.4.2.5. PCNA	93
5.4.2.6. GFAP	93
5.4.2.7. Bax	93
5.4.2.8. Bcl-2.....	94
5.4.2.9. Kaspaz-3.....	94
5.4.2.10. Kaspaz-6.....	95
5.4.3. Kırksekizinci Saat Bulguları	96
5.4.3.1. Rodopsin	96
5.4.3.2. Red/Green Opsin.....	98
5.4.3.3. Blue Opsin.....	98

5.4.3.4. 8-OHdG.....	99
5.4.3.5. PCNA.....	99
5.4.3.6. GFAP.....	102
5.4.3.7. Bax.....	104
5.4.3.8. Bcl-2.....	105
5.4.3.9. Kaspaz-3.....	105
5.4.3.10. Kaspaz-6.....	106
5.4.4. Yetmişikinci Saat Bulguları.....	107
5.4.4.1. Rodopsin.....	107
5.4.4.2. Red/Green Opsin.....	109
5.4.4.3. Blue Opsin.....	109
5.4.4.4. 8-OHdG.....	110
5.4.4.5. PCNA.....	110
5.4.4.6. GFAP.....	113
5.4.4.7. Bax.....	115
5.4.4.8. Bcl-2.....	115
5.4.4.9. Kaspaz-3.....	115
5.4.4.10. Kaspaz-6.....	116
5.4.5. Yedinci Gün Bulguları.....	116
5.4.5.1. Rodopsin.....	116
5.4.5.2. Red/Green Opsin.....	118
5.4.5.3. Blue Opsin.....	119
5.4.5.4. 8-OHdG.....	119
5.4.5.5. PCNA.....	119
5.4.5.6. GFAP.....	120
5.4.5.7. Bax.....	121
5.4.5.8. Bcl-2.....	122
5.4.5.9. Kaspaz-3.....	122
5.4.5.10. Kaspaz-6.....	122
5.5. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	132
6. TARTIŞMA.....	143
7. KAYNAKLAR.....	164

8. ÖZGEÇMİŞ	173
9. YAYINLAR	174



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: A: Çubuk ve koni reseptörlerin genel yapısı, B: Çubuk reseptörün dış segmentinin genel yapısı.....	10
Şekil 2: Gözün normal histo-anatomik yapısı	13
Şekil 3: Retinanın katmanları.	17
Şekil 4: Retinanın histolojik yapısı, şematik	17
Şekil 5: Retinal katmanların ölçümleri, μm	36
Şekil 6: Sentral retinada fotoreseptör katmanı ve dış nükleer katmanın ölçüm noktaları (μm)	37
Şekil 7: Perifer retinada fotoreseptör katmanı ve dış nükleer katmanın ölçüm noktaları (μm).	37
Şekil 8: Onikinci saat retinal katman ölçüm ortalamaları (μm).	46
Şekil 9: Onikinci saat, sentral retina (40X).	47
Şekil 10: Yirmidördüncü saat retinal katman ölçümleri (μm).....	49
Şekil 11: Yirmidördüncü saat, sentral retina (40X).....	50
Şekil 12: Kırksekizinci saat retinal katman ölçümleri (μm).....	52
Şekil 13: Kırksekizinci saatte DDM grubu (40X).	53
Şekil 14: Kırksekizinci saate ait perifer retina görüntüleri (40X).	53
Şekil 15: Kırksekizinci saat, sentral retina, deney gruplarının tümünde, DNK ve FK da incelme, DNK da şiddetli karyoreksis ve FK da hipereozinoofili görülmektedir (40X).	54
Şekil 16: Yetmişikinci saat retinal katman ölçümleri (μm).....	56
Şekil 17: Yetmişikinci saat ODM grubu.	57
Şekil 18: Yetmişikinci saat, ODM grubu, sentralden perifere gidildikçe DNK ve FK da görülen normalleşme.....	57
Şekil 19: Yetmişikinci saat, optik sinire yakın bölgelerde DNK ve FK daki genel görünüm	58
Şekil 20: Yetmişikinci saat, ODM grubu iki farklı hayvana ait perifer retina görüntüleri (40X).	59
Şekil 21: Yetmişikinci saat, sentral retina, deney gruplarının tümünde, DNK ve FK da ileri derecede incelme, (40X).....	60
Şekil 22: Yedinci gün retinal katman ölçümleri (μm).....	62
Şekil 23: Yedinci gün, DDM grubu, DNK ve FK neredeyse tamamen gözden silinmiş durumda.....	63
Şekil 24: Yedinci gün, MNU grubu, sentralden perifere gidildikçe DNK da görülen normalleşme.....	63
Şekil 25: Yedinci gün, sentral retina, deney gruplarının tümünde, DNK ve FK gözden silinmiş durumda (40X).	64
Şekil 26: Sıçanlarda N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin sentral (A) ve perifer (B) dış nükleer katman kalınlıkları üzerine etkileri.	69

Şekil 27: Sıçanlarda N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin sentral (A) ve perifer (B) fotoreseptör katman kalınlıkları üzerine etkileri.....	70
Şekil 28: MNU ve DDM gruplarının sentral retinalarının zamana bağlı olarak değişimleri (40X).....	71
Şekil 29: ODM ve YDM gruplarının sentral retinalarının zamana bağlı olarak değişimleri (40X).....	72
Şekil 30: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin retinada apoptotik indeks üzerine etkileri.....	75
Şekil 31: Onikinci ve 24. saatlerde kontrol grubu ve deney gruplarında TUNEL boyama görüntüleri (40X).	76
Şekil 32: Kırksekizinci ve 72. saatlerde kontrol grubu ve deney gruplarında TUNEL boyama görüntüleri (40X).	77
Şekil 33: Yedinci günde kontrol grubu ve deney gruplarında TUNEL boyama görüntüleri (40X).	78
Şekil 34: Kırksekizinci saatte YDM grubunda sentralden-perifere (1-8) gidildikçe azalan TUNEL pozitifliği (40X).....	78
Şekil 35: Onikinci saat rodopsin İP (A, C) ve İF (B, D) boyama.....	80
Şekil 36: Onikinci saat red/green opsin, kontrol grubu, İP (A) ve İF (B) boyamalarında sentral retinanın genel görünümü (40X).	82
Şekil 37: Onikinci saatte 8-OHdG, İP (A, B) ve İF (C) boyamalarında kontrol grubu (A) ve MNU grubu (B, C) hayvanların sentral retinalarının genel görünümü, (40X).....	84
Şekil 38: Kontrol grubunda 12. saat GFAP, İP (A) ve İF (B) boyamalarında, optik sinir ve GHK' nda (oklar) pozitif boyanmalar.....	85
Şekil 39: Onikinci saat, YDM grubu, Bax, İP boyama	86
Şekil 40: Onikinci saat, ODM grubu, kaspaz-3 İP boyama.....	87
Şekil 41: Onikinci saat, ODM grubu, kaspaz-6, İP boyama, DNK ve FK da pozitiflikler (oklar) (40X).	88
Şekil 42: Yirmidördüncü saat, kontrol grubu, rodopsin İP (A) ve İF (B) boyamaları 10X).	89
Şekil 43: Yirmidördüncü saat red/green opsin, İP boyamada kontrol grubu (A) ve MNU grubunun (B) sentral retinalarının genel görünümü (40X).....	90
Şekil 44: Yirmidördüncü saat 8-OHdG İP ve İF boyamaları.	92
Şekil 45: Yirmidördüncü saat, DDM grubu, bax, İP boyama	94
Şekil 46: Yirmidördüncü saat, MNU grubu, kaspaz-3, İP boyama.	95
Şekil 47: Yirmidördüncü saat, MNU grubu, kaspaz-6, İP boyama.	96
Şekil 48: Kırksekizinci saat rodopsin, İP ve İF boyamaları.	97
Şekil 49: Kırksekizinci saat, YDM grubu, red/green opsin, İP boyama.....	98
Şekil 50: Kırksekizinci saat, ODM grubu, 8-OHdG, İP boyama.	99
Şekil 51: Kırksekizinci saat PCNA, İP ve İF boyamaları.....	101
Şekil 52: Kırksekizinci saat GFAP, İP ve İF boyamaları	103
Şekil 53: Kırksekizinci saat, ODM grubu, bax, İP boyama.	104

Şekil 54: Kırksekizinci saat, MNU grubu, bax, İP boyama.	105
Şekil 55: Kırksekizinci saat, DDM grubu, kaspaz-3, İP boyama.	106
Şekil 56: Kırksekizinci saat, DDM grubu, kaspaz-6, İP boyama.	107
Şekil 57: Yetmişikinci saat rodopsin, İP ve İF boyamaları; YDM grubu (40X).	108
Şekil 58: Yetmişikinci saat, ODM grubu, red/green opsin, İP boyama (40X)... ..	109
Şekil 59: Yetmişikinci saat, PCNA, İP ve İF boyamaları (40X).	111
Şekil 60: Yetmişikinci saat, MNU grubu, PCNA, İP (A) ve İF (B) boyamaları (40X).	112
Şekil 61: Yetmişikinci saat, DDM grubu, PCNA, İP boyama (10X).	113
Şekil 62: Yetmişikinci saat GFAP, İP ve İF boyamaları (40X).	114
Şekil 63: Yedinci gün rodopsin, İP ve İF boyamaları (40X).	117
Şekil 64: Yedinci gün, DDM grubu, red/green opsin, İP boyama.	118
Şekil 65: Yedinci gün, PCNA, İP boyama.	120
Şekil 66: Yedinci gün, GFAP, İP boyama; DDM grubu.	121
Şekil 67: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak Rodopsin seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).	123
Şekil 68: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak Red/Green opsin seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).	124
Şekil 69: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak 8-OHdG seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).	125
Şekil 70: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak PCNA seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).	126
Şekil 71: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak GFAP seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).	127
Şekil 72: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak Bax seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).	128
Şekil 73: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak Bcl-2 seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).	129
Şekil 74: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan	

minosiklinin zamana bağılı olarak Kaspaz-3 seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).....	130
Şekil 75: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağılı olarak Kaspaz-6 seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).....	131
Şekil 76: Kontrol grubunda çubuk ve koni reseptörlerin iç (I) ve dış (O) segmentlerinin normal görünümü.....	133
Şekil 77: Kontrol grubunda çubuk ve koni reseptörlerin çekirdeklerinin (N) normal görünümü.....	134
Şekil 78: Kontrol grubunda bipolar (B), amakrin (A) ve Müller (M) hücrelerin normal görünümü.....	134
Şekil 79: MNU grubunda çubuk ve koni hücrelerin iç segmentlerinde piknotik mitokondriyonlar (ok), dış segment disklerinde yoğunlaşma (yıldız) (12. saat)	135
Şekil 80: MNU grubunda DNK hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A), nuklear kromatolizis (K), ve sekonder lizozomlar (ok) (12.saat).	135
Şekil 81: YDM grubunda DNK hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A) ve intrastoplazmik miyelin figürler (ok) (12.saat).	136
Şekil 82: MNU grubunda iç nuklear tabaka, bipolar hücre (B) ve amakrin hücrelerde (A) dejenerasyon ve intrastoplazmik ödem (yıldız), miyelin figürler (kalın ok), mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı (ince ok), normal Müller hücresi (M). (12.saat).....	136
Şekil 83: DDM grubunda, çubuk ve koni reseptörlerde dejenerasyon (yıldız), fotoreseptör katmanı. (24.saat)	137
Şekil 84: DDM grubunda, dış nukleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A), intrastoplazmik miyelin figürler (ok) ve hidropik vakuoller (V). (24.saat).....	137
Şekil 85: MNU grubunda, dış nukleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A), total organel dejenerasyonu (yıldız). (48. saat).....	138
Şekil 86: ODM grubunda, dış nukleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A), hücre dejenerasyonu (yıldız) (48. saat) (Bar=2 µm).	138
Şekil 87: MNU grubunda, iç nukleer tabakada amakrin ve bipolar hücrelerde dejenerasyon (yıldız), mitokondriyal dilatasyon ve krista kaybı (ok), Müller hücresi (M) (48. saat).....	139
Şekil 88: ODM grubunda, iç nukleer tabaka, amakrin (A) ve bipolar (B) hücrelerde dejenerasyon ve intrastoplazmik ödem (yıldız), miyelin figür (ok), Müller hücresi (M) (48. saat).....	139
Şekil 89: MNU grubunda, çubuk ve koni reseptörlerde dejenerasyon (yıldız), piknotik mitokondriyonlar (kalın ok), lizozom birikimi (ince ok), miyelin figür içeren otofagozom (F) (Bar=1µm) (72. saat) (Bar=2 µm).....	140
Şekil 90: MNU grubunda, dış nukleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A) ve nuklear kromatolizis (K), nukleus fragmentasyonu (ok) (72. saat)	140

Şekil 91: YDM grubunda, dış nükleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A), nuklear kromatin fragmentasyonu (ok) ve nuklear kromatolizis (yıldız) (72. saat).....	141
Şekil 92: MNU grubunda, iç nükleer tabakada amakrin ve bipolar hücrelerde dejeneratif değişiklikler (yıldız), Müller hücresi (M) (72. saat).....	141
Şekil 93: MNU grubunda, dış nükleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A) ve nuklear kromatolizis (K), nukleus fragmentasyonu (ok), hücre dejenerasyonu (yıldız) (7. gün).....	142



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: MNU' nun kullanıldığı modeller	21
Tablo 2: Hayvan deneyinde, gruplar, uygulama gruplarındaki hayvan sayıları ve sakrifikasyon zamanları.	31
Tablo 3: İmmunohistokimyasal skorlama yöntemi.	42
Tablo 4: İmmunohistokimyasal incelemelerde kullanılan primer antikorlar, sulandırma oranları ve klonları.	43
Tablo 5: Onikinci saat retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.	46
Tablo 6: Yirmidördüncü saat retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.	49
Tablo 7: Kırksekizinci saat retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.	52
Tablo 8: Yetmişikinci saat retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.	56
Tablo 9: Yedinci gün retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.	62
Tablo 10: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, sentral dış nükleer katman kalınlıkları üzerine etkileri.	65
Tablo 11: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, perifer dış nükleer katman kalınlıkları üzerine etkileri.	66
Tablo 12: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, sentral fotoreseptör katman kalınlıkları üzerine etkileri.	67
Tablo 13: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, perifer fotoreseptör katman kalınlıkları üzerine etkileri.	68
Tablo 14: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, retinada apoptotik indeks üzerine etkileri.	75
Tablo 15: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, rodopsin seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).	123
Tablo 16: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, Red/Green Opsin seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).	124

Tablo 17: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, 8-OHdG seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).	125
Tablo 18: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, PCNA seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).	126
Tablo 19: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, GFAP seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).	127
Tablo 20: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, Bax seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).	128
Tablo 21: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, Bcl-2 seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).	129
Tablo 22: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, kaspaz-3 seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).	130
Tablo 23: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak Kaspaz-6 seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).	131

KISALTMALAR LİSTESİ

Bax	:	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	:	B-cell lymphoma
DDM	:	Düşük doz minosiklin grubu
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DNK	:	Dış nükleer katman
DPK	:	Dış pleksiform katman
FK	:	Fotoreseptör katmanı
GFAP	:	Glial fibrillary acidic protein
GHK	:	Gangliyon hücreleri katmanı
HCl	:	Hidroklorik asit
İF	:	İmmunflorasan
İF-KB	:	İnhibitör faktör kappa-b
İNK	:	İç nükleer katman
İP	:	İmmunperoksidaz
İPK	:	İç pleksiform katman
nm	:	Nanometre
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
MNU	:	N- Metil- N- Nitrozüre
NF-KB	:	Nükleer faktör kappa b
ODM	:	Orta doz minosiklin grubu
PCNA	:	Proliferating cell nuclear antigen

Ph	:	Potansiyel hidrojen
PRA	:	Progresif retinal atrofi
RD	:	Retinal dejenerasyon
ROS	:	Reaktif oksijen radikalleri
RP	:	Retinitis pigmentoza
RPE	:	Retinal pigmentli epitel hücreleri
SARD	:	Sudden acquired retinal degeneration
UV	:	Ultraviyole
YDM	:	Yüksek doz minosiklin grubu
7-med-gua:		7-metildeoksiguanozin
8-OHdG:		8-hidroksil-deoksiguanozin
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre

1. ÖZET

Retinal dejenerasyon (RD), çoğunlukla, çeşitli genlerin kodladığı fotoreseptör-özgü proteinlerin noksanlığı veya hatalı üretilmesiyle ilgili olup, fotoreseptör hücrelerin apoptotik ve süregelen ölümüyle karakterizedir.

Bu çalışmada RD oluşturmak amacıyla 80 adet sıçana tek doz periton içi (i.p.) 50 mg/kg N-Metil-N-Nitrozüre (MNU) verildi. Bu sıçanlardan 60 tanesine ise RD' u engellemek amacıyla MNU ile beraber farklı dozlarda (50 mg/kg: 20 hayvan, 75 mg/kg: 20 hayvan, 100 mg/kg: 20 hayvan), MNU dan 1 gün önce ve 1 saat sonra olmak üzere 2 kez i.p. minosiklin uygulandı. Yirmi hayvan ise kontrol grubu olarak ayrıldı ve sadece i.p. serum fizyolojik uygulandı. Yedi günlük deney süresince 12., 24., 48., 72. saatlerde ve 7. günde olmak üzere 5 farklı dönemde ötenazi yapılarak göz örnekleri elde edildi. Göz örnekleri histopatolojik, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak incelendi. MNU uygulanan gruplarda, önemli derecede RD oluştuğu görüldü ve fotoreseptör ölümlerinin apoptotik mekanizma ile gerçekleştiği TUNEL yöntemi ile ortaya konuldu. MNU uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında fotoreseptör katmanı ve dış nükleer katmanın 12. saatten başlayarak giderek incelendiği, kaspaz-3, kaspaz-6, bax, 8-OHdG, PCNA ve GFAP seviyelerinin arttığı; rodopsin, red/green opsin ve Bcl-2 seviyelerinin ise düştüğü görüldü. Elektron mikroskopik incelemelerde ise, iç nükleer katmanda bulunan hücrelerden amakrin ve bipolar hücrelerin de fotoreseptörler kadar ciddi boyutta olmamakla beraber etkilendiği görüldü. Minosiklin uygulanan tedavi gruplarında ise anlamlı farklılığa rastlanmadı ve minosiklinin, MNU ile oluşturulan RD' da; retinal katman kalınlıkları ile, kaspaz-3, kaspaz-6, bax, 8-OHdG, PCNA, GFAP,

rodopsin, red/green opsin ve Bcl-2 boyamalarının şiddet ve dağılımı üzerinde etkili olmadığı tespit edildi.

Sonuç olarak, MNU' nun tek doz uygulama ile kısa sürede ve fazla sayıda fotoreseptör hücreyi etkilemesine rağmen, minosiklinin bu durumu önlemede etkisiz kaldığı görülmüştür. Bu durumun, MNU ile oluşturulan RD' un patogeneğinde çok fazla sayıda faktörün rolü olmasından kaynaklandığı, minosiklin ile daha farklı ilaçların kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılmasının gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, minosiklin, N-Metil-N-Nitrozüre, retinal dejenerasyon, retinitis pigmentosa, sıçan.

2. ABSTRACT

Effects of Minocycline on Experimental Retinal Degeneration Induced By N-Methyl-N-Nitrosourea in Rats

Retinal degeneration (RD) is often associated with deficiencies or inaccurate production of photoreceptor-specific proteins encoded by various genes, characterized by apoptotic and ongoing death of photoreceptor cells.

In this study, 80 rats were given a single dose of intraperitoneally (i.p.) 50 mg / kg N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU) to induce RD. Sixty of these rats were treated with i.p. minocycline, at different doses (50 mg/kg: 20 animals, 75 mg/kg: 20 animals, 100 mg/kg: 20 animals) and two times; 1 day before and 1 hour later of MNU administration, to prevent retinal degeneration. Twenty animals were administered only saline, as control animals. Euthanasia was performed in 5 different periods, at 12th, 24th, 48th, 72th hours and 7th day, during the seven-day experiment, and eye samples were obtained. Eye samples were examined histopathologically, immunohistochemically and electron microscopically. Significant RD was observed in MNU-administered groups, and photoreceptor deaths were demonstrated by the TUNEL method, which was performed by apoptotic mechanism. Compared to the control group, without MNU administration, it was seen that photoreceptor layer and outer nuclear layer gradually become thinner and increased levels of caspase-3, caspase-6, bax, 8-OHdG, PCNA, GFAP and decreased levels of rhodopsin, red/green opsin and Bcl-2, starting from the 12th hour. Electron microscopic studies showed that amacrin and bipolar cells were also affected but not only by the size of the photoreceptors. There was no significant difference in treatment groups treated with minocycline,

and it was seen that minocycline is ineffective on retinal layer thicknesses and staining levels of caspase-3, caspase-6, bax, 8-OHdG, PCNA, GFAP, rhodopsin, red / green opsin and Bcl-2 in MNU-induced retinal degeneration.

Consequently, it has been determined that MNU affects a large number of photoreceptor cells in a short time with a single dose application, while minocycline has been shown to be ineffective to prevent this condition. It is thought that this would require investigating the efficacy of minocycline with different combinations of drugs, due to the large number of factors involved in the pathogenesis of MNU-induced RD.

Key Words: Apoptosis, minocycline, N-Methyl-N-Nitrosourea, rat, retinal degeneration, retinitis pigmentosa.

3. GİRİŞ

Retinitis pigmentoza, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, diabetik retinopati ve retinal dekolman insanlarda en önemli retina hastalıkları olup, en önemli körlük sebepleri arasında yer alırlar (1). Küçük ırk köpeklerde görülen, ani kazanılmış RD (Sudden acquired retinal degeneration: SARD) (2) ve progresif retinal atrofi (PRA, insanlardaki retinitis pigmentozanın köpeklerdeki karşılığı olarak kabul edilir) (3) hayvanlarda RD ile seyreden hastalıklara örnektir. Kedilerde de daha sporadik olmakla beraber RD görülmektedir (4). RD' da, fotoreseptör hücrelerin süregelen ölümü söz konusu olup, olguların yaklaşık %50' si körlük ile sonuçlanır (5).

Retinitis pigmentoza (RP), insanlarda en önemli körlük sebepleri arasında gösterilen herediter bir retina hastalığıdır. Bilateral olarak seyreden, progresif, dejeneratif bir hastalıktır. Retinanın fotoreseptör hücrelerinin progresif dejenerasyonu ve ölümü hastalığa temel teşkil eder. Öncelikle skotopik (monokromatik, gece görüşü, siyah-beyaz görüş) görüşten sorumlu olan çubuk reseptörlerin, sonrasında ise polikromatik (renkli) görüşten sorumlu olan koni reseptörlerin dejenerasyonu söz konusudur ve bu durum da görüş kaybının temel nedenidir. İlk başlarda, oluşumunda yangısal olayların etkili olduğu düşünüldüğünden 'retinitis' denilerek terminolojik olarak yanlış adlandırılmıştır. Fotoreseptör hücrelerinin beslenmelerini sağlayan pigmentli epitel hücreleri, retina-sklera sınırında ki Bruch's membranın üzerine oturmuşlardır. Pigmentli epitel hücreleri bilinmeyen bir sebeple bu membrandan ayrılarak retinanın daha iç katmanlarına ilerlerler ve retinada pigmentli bir görüntü oluştururlar ki bu durum hastalığın RP olarak adlandırılmasının sebebidir (6-8).

Hastalığın 1/4000 görülme sıklığına sahip olması onu en önemli körlük sebeplerinden biri haline getirir. RP' de fotoreseptör hücrelerinin ölümüne bağlı olarak öncelikle gece görüş kaybı, bunu izleyen yan görüş kaybı ve en son olarak da merkezi görüş kaybı söz konusudur. Hastalığın patogenezinde etkili 40 tan fazla gende meydana gelen 160 civarında mutasyon olup olguların; otozomal-dominant (%50-60), otozomal-resesiv (%30-40) ve X kromozomu-bağımlı (%5-15) genlerle ilgili olduğu ortaya konmuştur (9-11). İnsanlarda en sık rastlanan RP mutasyonu, çubuk reseptörlere özgü 'rodopsin' isimli proteini kodlayan gende meydana gelen P23H mutasyonudur (12).

RP' de, RD tipik olarak çubuk reseptörlerin ölümü ile başlar. Bunu koni reseptörlerin ölümü izler. Bu durum ile ilgili savunulan 3 farklı teori mevcuttur. Bunların ilki, çubuk reseptörler öldüğünde açığa çıkan toksik maddelerin koni reseptörleri öldürdüğü yönündedir. İkincisi; çubuk reseptörlerin ölümünün provake ettiği Müller hücre aktivasyonu ve bu hücrelerin toksik salgılarının koni reseptörleri öldürdüğü yönündedir. Üçüncü ve son teori ise çubuk reseptörlerin, koni reseptörlerin hayatta kalması için gerekli bir salgı ürettiği yönündedir. Ancak bu teorilerden hiçbiri RP hastalığının doğal formunda çubuk reseptörler tamamen ortadan kaybolduktan sonra bile, koni reseptörlerin nasıl yıllarca hayatta kalabildiğini tam olarak açıklayamamaktadır (13).

Retina yüksek aktivite ile çalışan fotoreseptör hücreleri sebebiyle süperoksit anyonları, hidroksil radikaller ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen radikallerinin (ROS) tehditi altındadır. Bu maddelerin birikimi, fotoreseptör ölümü, sonuç olarak ta retinal hasar ve görme kaybıyla neticelenir. RD' a sahip hastalar üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, bu hastaların sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında,

yüksek ROS ve düşük antioksidatif protein seviyelerine sahip oldukları görülmüştür. Bu durum RD' un patogeneğinde oksidatif stresin etkili olduğunu göstermektedir (14, 15).

RD modeli oluşturmak için fotoreseptör ölümü sağlamak esastır ve retinada fotoreseptör ölümünü sağlamak için de iki temel kategori içinde yer alan yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan ilki RD' a sebep olan genetik defektlere sahip transjenik deney hayvanların kullanımınıdır (rd1 fareleri, RCS ratları). İkincisi ise indükleyici modellerdir. İndükleyici modellerde ışık veya iyonize radyasyon gibi fiziksel bir uyarı kullanılacağı gibi kobalt klorit, iodoasetik asit veya N-Metil-N-Nitrozüre (MNU) gibi kimyasal ajanların kullanımını mümkündür (10, 16, 17).

3.1. Retinanın Hücreyel Organizasyonu

Retinanın temel hücreyel yapısını; retinal pigmentli epitel hücreleri (RPE), fotoreseptörler, internöronlar, gangliyon hücreleri ve glial hücreler oluşturur (18).

3.1.1. Pigmentli Epitel Hücreleri

Pigmentli epitel hücrelerinin embriyonik kökeni, retinanın sensörük komponentleri gibi nöroektodermaldır (19). Yetişkin insan retinası yaklaşık 3.5 milyon RPE hücresi içerir. Fotoreseptör hücrelerin gövde kısımları bu hücrelere tutunmuş vaziyettedir. Tek katlı, küboidalden heksagonale değişen bir yapıdadırlar (20, 21). Özellikle retinanın optik sinire yakın, merkezi bölgelerinde bu hücreler arasındaki *sıkı bileşke* adı verilen sıkı bağlantılar, koroidteki ki damarlardan, fotoreseptörlerin bulunduğu daha iç kısımlara moleküllerin serbest geçişini engelleyen *kan-retina bariyerini* oluşturur (22). Koyu-kahve renginden siyaha

kadar değişen, pigmentli görünümlerini *melaninden* alırlar. Pigmentasyonları insanlarda gebeliğin 35. gününde başlayıp çok hızlı bir şekilde, 1 hafta içinde tamamlanır. Koroidal melanositlerin pigmentasyonu ise gebeliğin 5. ayında başlayıp, postnatal dönemde devam eder. Nöronal tüpten köken alan koroidal melanositlerin aksine, RPE hücrelerinin pigmentasyon derecesi ırksal varyasyon göstermez veya çok az gösterir (23).

3.1.2. Fotoreseptör Hücreler

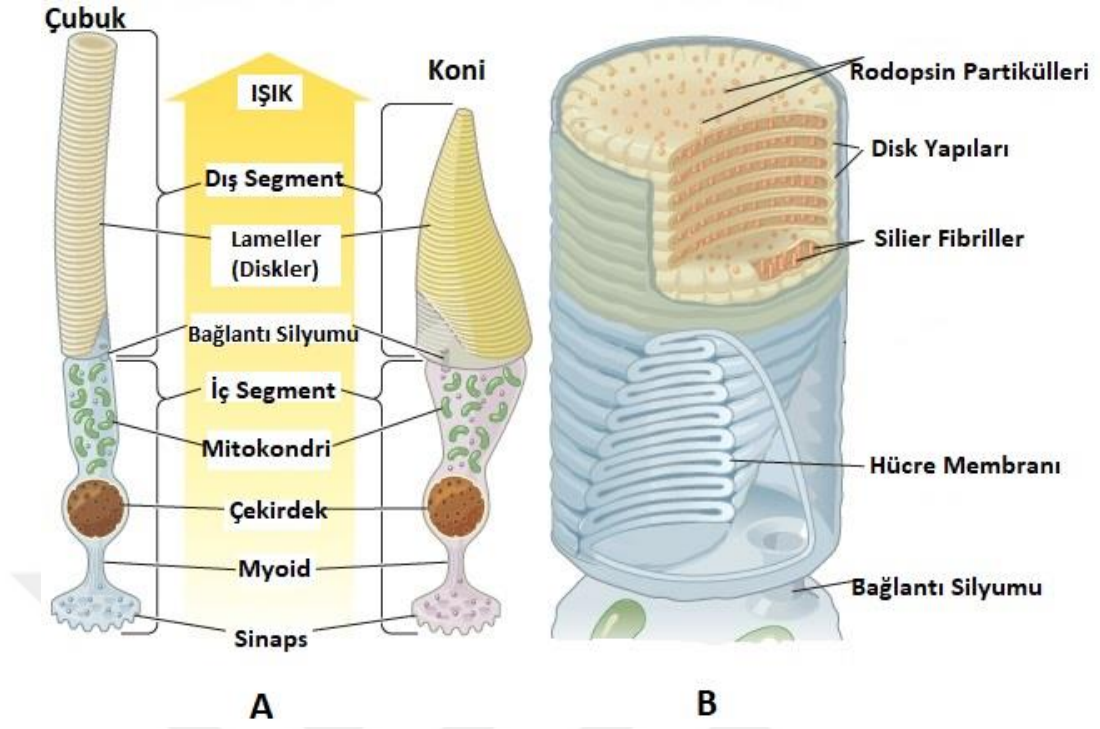
Fotoreseptör hücreler, transdüksiyon olarak adlandırılan, ışık fotonlarının sinir sinyallerine dönüşümünü sağlayan, çubuk (gece görüşü=monokromatik görüş) ve koni (renkli görüş=polikromatik görüş) olmak üzere iki farklı alt tipi olan, görsel sistem sensörleridirler. Nöronal özellikte olan bu hücreler, ışığın yakalanması ve bir görsele dönüşecek elektriksel bir ileti oluşturulması yönünde özelleşmişlerdir (24).

Fotoreseptörler tarafından sağlanan görüş kalitesi hayvanlar arasında büyük farklılık gösterir. Örneğin yassı solucanlarda çok az sayıda fotoreseptör hücre vardır ve bu ancak ışık kaynağına doğru yönelebilmelerine olanak sağlamaktadır (25). İnsan retinası ise 4-5 milyon civarında koni fotoreseptör, 77-107 milyon civarında çubuk fotoreseptör içerir. Koni reseptörleri %63 oranında (yaklaşık 2,9 milyon) kırmızı ışık duyarlı, %32 oranında (yaklaşık 1,4 milyon) yeşil ışık duyarlı ve %5 oranında (yaklaşık 0,2 milyon) mavi ışık duyarlı alt tiplere ayrılır. Bu hücreler sadece *fovea* denilen, gözün posterior kutbunda, optik diske 3-4 milimetre mesafede ki alanda bulunurlar ki bu bölge *sarı nokta* olarak ta bilinen *makula* sınırları içerisinde yer alır. Fovea' da koni reseptör yoğunluğu mm² de 199,000 civarındadır

ve bu bölgede çubuk reseptörler bulunmadığı için *rod-free zone* olarak ta adlandırılmaktadır. Bu bölgenin dışındaki kısımlarda ve tüm perifer retinada çubuk reseptörler bulunmaktadır (18). İnsanlar, bazı maymun türleri ve domuzlar dışındaki hayvanlarda anatomik olarak belirgin bir makula yapısı bulunmamaktadır (26).

Her bir fotoreseptör; bir dış segment, iç segment (mitokondri, endoplazmik retikulum), bir nükleus, akson lifleri ve sinaptik bir terminalden oluşur. Fotoreseptör dış segmentleri *opsin* adı verilen foton yakalayıcı *fotopigmentleri* bulundurur. Foton absorpsiyonu, fotoreseptörlerin çıkış sinyallerinin oluşmasına katkı sağlar (18).

Çubuk ve koni reseptörlerin dış segmentlerinde fotopigmentlerin bulunduğu yuvarlak şekilli disk yapıları mevcuttur. Bu diskler, çubuk reseptörlerde tamamen kapalıyken, koni reseptörlerde kısmen açıklık gösterir. Tipik bir çubuk reseptörde, bu disk yapılarından ortalama 1000 civarında bulunur ve her bir disk yaklaşık 150.000 adet çubuk reseptörlere özgü fotopigment olan *rodopsin* molekülü barındırır ki bu da her bir çubuk reseptör için 150 milyon rodopsin molekülü anlamına gelmektedir (25).



Şekil 1: A: Çubuk ve koni reseptörlerin genel yapısı, B: Çubuk reseptörün dış segmentinin genel yapısı (25).

Fotoreseptör hücrelerde dört farklı özellikte, temelde *opsin* olarak adlandırılan fotopigment bulunur. Bunların ilki ve en çok bulunanı, çubuk reseptörlere özgü, düşük ışıktaki görüşü sağlayan *rodopsin* dir. Çubuk reseptörlerin ışığa olan hassasiyetleri, çok düşük şiddetteki ışıklara bile yanıt vermelerini sağlayan rodopsin moleküllerinden kaynaklanmaktadır. Koni reseptörlere özgü opsinerler ise üç tiptir. Bunlar renkli görüşü sağlayan, mavi, yeşil ve kırmızı renkli dalgalı boylarına cevap veren opsinerlerdir. Aynı zamanda, kısa dalga boylu (mavi, 419 nm), orta dalga boylu (yeşil, 531 nm) ve uzun dalga boylu (kırmızı, 558 nm) opsinerler olarak ta bilinmektedir (25).

3.1.3. İnternöron Hücreler

İnternöron hücreler, retinanın iç nükleer katmanında, fotoreseptör katmanıyla gangliyon hücreleri arasında yer alırlar. Bu hücreler; bipolar, horizontal ve amakrin hücrelerdir. Fotoreseptörler tarafından üretilen sinyalin dış pleksiform katmandan iç pleksiform katmana iletilmesini sağlayarak, fotoreseptör-gangliyon hücre bağlantısını sağlamış olurlar ki bu son derece kompleks olan nöro-retinal devrenin temel ögesidir (18, 27).

Bipolar hücreler, çubuk ve koni reseptörlerden gelen sinyali alıp gangliyon hücrelerine doğru iletmekle görevlidirler. Koni reseptörler ile bağlanan bipolar hücreler birkaç tane reseptöre tutunabilirken, çubuk reseptörlere bağlanan bipolar hücrelerde bu rakam 70' e kadar çıkabilmektedir. Horizontal hücreler de bipolar hücrelere benzer fonksiyona sahipken, amakrin hücrelerin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (18).

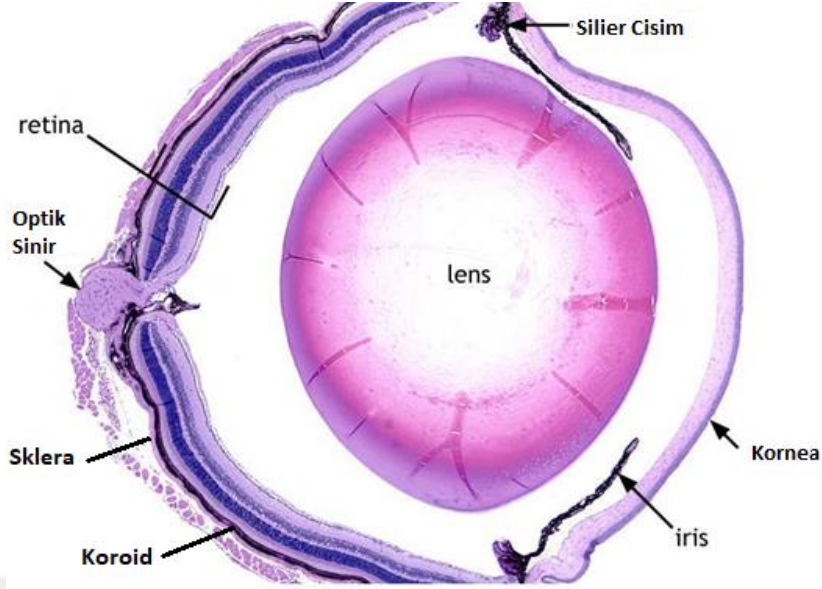
3.1.4. Gangliyon Hücreler

Gangliyon hücreler, fotoreseptörler tarafından elde edilen görsel bilginin retinadan beyine iletilmesinde görevlidirler. Gangliyon hücrelerin gövde kısımları gangliyoner katmanda bulunurken, bunların dentritleri iç pleksiform katmana kadar uzanarak bipolar ve amakrin hücreler ile kontak halinde bulunurlar. İnsan retinasında 20 farklı gangliyon hücre tipi tanımlanmıştır. Bunların en iyi bilinenleri tüm gangliyon hücre popülasyonunun %80 ini oluşturan *midget* ve *parasol* hücreleridir (28). Retina ve beyin arasındaki anatomik mesafeden dolayı, metabolitlerin gangliyon çekirdeğinden anterograd hareketi veya retrograd dönüşü için gangliyon aksonları, efektif transport mekanizmalarına ihtiyaç duyarlar.

Aksonal transport, yavaş (< 10 mm/gün), hızlı (günde yüzlerce mm) veya orta hızda olabilmektedir. Transportun büyük bir kısmını yavaş ve anterograd transport oluşturur (18).

3.1.5. Glial Hücreler

Retina da 4 tip glial hücre mevcuttur. Bunlar; *Müller hücreleri*, astrositler, mikroglialar ve seyrek olarak görülen oligodentrositlerdir. Müller hücreleri iç nükleer katmanda yer alırlar, retinanın temel glial hücreleridir, retinal nöronların işlevlerini ve varlıklarını korumayla ilgili birçok biyolojik fonksiyona sahiptirler (29). Bunlar arasında glikoz transportu, amonyak derivatlarının ortadan kaldırılması, potasyum iyonlarının dağıtımı ve aminoasit döngüsü yer almaktadır. Özellikle RD, yani progresif fotoreseptör ölümü ile seyreden retinitis pigmentosa ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon gibi hastalıklarda bu hücrelerin sayılarının arttığı bilinmektedir (30). Astrositlerin, optik sinirdeki kök hücrelerden köken aldıkları düşünülmektedir. Bu hücreler nöroretinanın süperfisial katmanlarında gangliyon hücrelerinin, sinir ipliklerinin ve damarların çevrelerinde bulunurlar. Mikroglialar, retinaya kan dolaşımından gelirler, fagositik hücrelerdir ve retikülo-endotelyal sistemin bir parçasıdırlar. Genellikle sinir iplikleri arasında küçük sayılarda bulunurlar, ancak mobil oldukları için retinanın her katmanına ulaşabilirler (31). Oligodentrositler perifer sinir sisteminin miyelin kılıfını üreten hücrelerdir. Normal şartlar altında retinanın sinir iplikleri miyelin kılıfa sahip değildir. Bazı durumlarda rastlantısal olarak myelinli sinirlerin görülmesi, oligodentrositlerin retinaya geldiğinin bir göstergesi kabul edilir (18).



Şekil 2: Gözün normal histo-anatomik yapısı (32)

3.2. Retinanın Histolojik Katmanları

Retina göz küresinin nöro-sensörük bölümünü oluşturur. Dıştan, damar tabakası olan koroid ve koruyucu bağ tabakasından oluşan sklera tarafından çevrelenmiştir. Retinanın hücresel elemanları, retinanın farklı bölgelerinin fonksiyonel gereksinimlerini karşılayacak şekilde bir adaptasyon ve düzenleme dahilinde organize olmuşlardır. Bu bölgesel farklılaşma, yavaş bir olgunlaşma sürecidir ve tamamlanması birkaç yılı alır (18).

3.2.1. Bruch's Membran

Bruch's membran, koriokapillarlar ile retinal pigmentli epitel hücrelerini (RPE) birbirinden ayıran bir zardır. Beş farklı katmandan oluşan elastik bir yapıya sahiptir. Bu katmanlar; koriokapillarların bazal membranı, bir dış kollejen katman, bir merkezi elastik katman, bir iç kollajen katman ve RPE hücrelerinin bazal

memranıdır. Optik diskten ora serrataya kadar, 2 ile 4 µm arasında değişen kalınlıklarda uzanır (18).

3.2.2. Retinal Pigmentli Epitel (RPE) Hücreleri Katmanı

Her bir göz yaklaşık 3,5 milyon RPE hücresi ihtiva eder. Bu hücreler tek katlı ve sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunmuş vaziyette, Bruch's membrana dizilmişlerdir (22). Embriyogenezis boyunca, optik vezikülün sentral nöroektodermi invagine olarak optik diskin iç yaprağını oluşturur ki bu kısım daha sonra sensörik retinayı oluşturur. Optik vezikülün periferal nöroektodermi ise, yine invagine olarak optik diskin pigmentli dış yaprağını oluşturur ve bu kısım da RPE hücrelerine farklılaşır. Bütün bu oluşum süreci sonucunda nöroretina ile RPE hücreleri sadece küçük bir subretinal boşluk ile birbirlerinden ayrılacak şekilde bulunurlar ve bu boşlukta olası bir sıvı retensiyonu, *retinal dekolman/detachment* adı verilen retinanın epitel katmandan ayrılması ve beslenememesi sonucu dejenerasyona uğraması ile sonuçlanabilmektedir (18).

3.2.3. Fotoreseptör Katmanı (FK)

Çubuk ve koni reseptörlerin gövde kısımlarının sıkışık bir şekilde yer aldıkları katmandır. Bu ince katman nöroretinanın ışığa duyarlı kısmı olup fototransdüksiyon alanıdır. Retinanın diğer bütün katmanları burada üretilen sinyallerin iletilmesinde görevlidirler (24).

3.2.4. Dış Sınırlayıcı Membran (DSM)

Gerçek anlamda bir membran olmamakla beraber Müller hücrelerinin uzantıları ile fotoreseptörler arasındaki bağlantılar ile oluşan, fotoreseptör katmanı ile dış nükleer katman arasında yer alan bir yapıdır (33).

3.2.5. Dış Nükleer Katman (DNK)

Fotoreseptör hücrelerin çekirdeklerinin oluşturduğu katmandır. Foveolar bölgede en ince kalınlıktadır. İnsan retinası ortalama 4-5 milyon koni, 77-100 milyon çubuk reseptör içerir. Koni reseptörler sadece fovea da bulunur (primatlarda) ve bu bölgede çubuk reseptör bulunmaz (rod-free zone). Geriye kalan tüm bölgelerde ise çubuk reseptörler dominanttır (18, 28).

3.2.6. Dış Pleksiform Katman (DPK)

Bu katmanda fotoreseptör hücreler ile bipolar ve horizontal hücrelerin aksonları ve sinaptik bağlantıları bulunur. Fotoreseptör sinyalleri internöronlara doğru bu katman aracılığıyla iletilir (34).

3.2.7. İç Nükleer Katman (İNK)

İç nükleer katman; horizontal, bipolar amakrin hücreler ve Müller hücrelerinin çekirdeklerinin oluşturduğu katmandır. Horizontal hücreler bu katmanın dış kısmına yakın DPK sınırında, amakrin hücreler iç kısmına yakın, iç pleksiform katman sınırında bulunurken, bipolar hücreler ve Müller hücreleri bu katmandaki herhangi bir pozisyonda bulunabilmektedirler (28).

3.2.8. İç Pleksiform Katman (İPK)

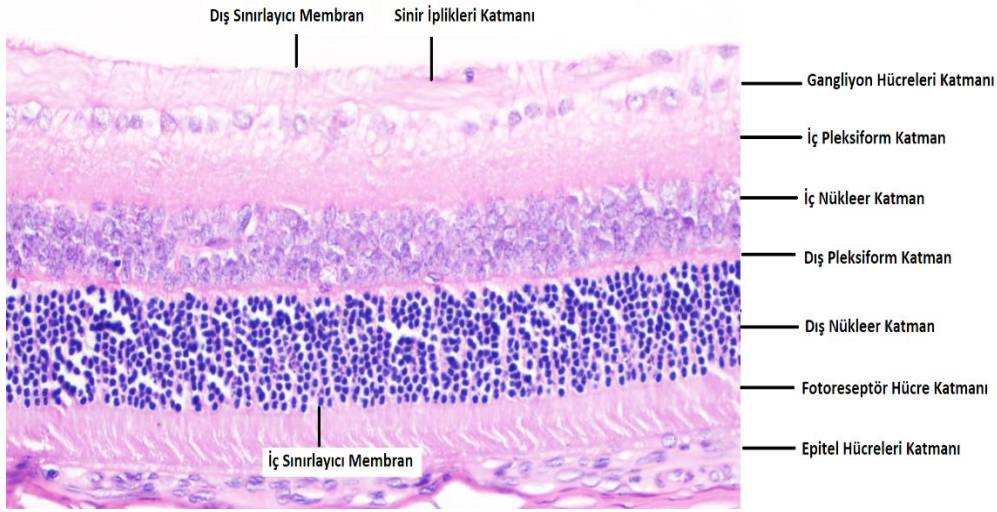
Bipolar hücreler, amakrin hücreler ve gangliyon hücrelerinin aksonal uzantılarının bulunduğu katmandır. Fotoreseptör sinyallerinin DPK' dan sonra ilerlemeye devam ettiği ve gangliyon hücrelerine iletiildiği katmandır (34).

3.2.9. Gangliyon Hücreleri Katmanı (GHK)

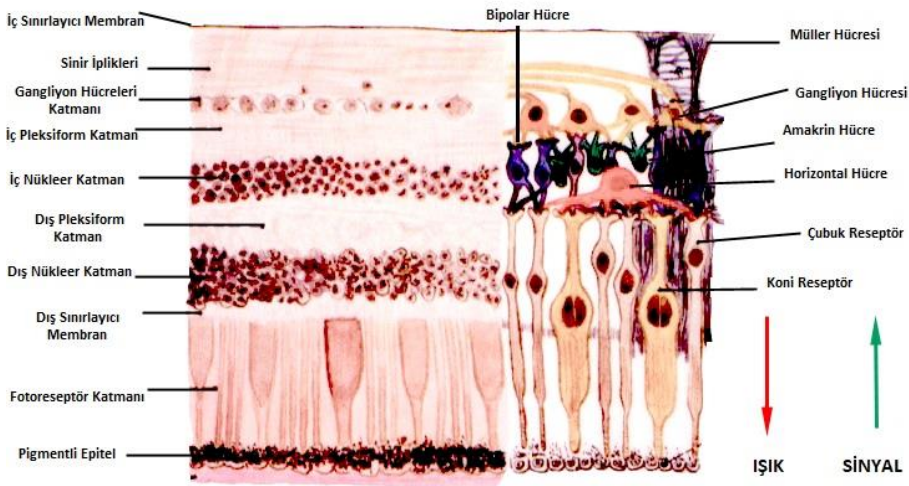
Bu katman, 1,2 milyon civarında gangliyon hücrelerinin yanında, yer değiştirmiş amakrin hücreleri, astrosit ve endotel hücresi içerir (24). Katmanın kalınlığı perifoveal makulada 8-10 kat gangliyon hücresiyle maksimum kalınlığına ulaşır (60-80 µm), makula dışında kalan bölgelerde ise tek kat gangliyon hücreleri ile 10-20 µm kalınlığa kadar düşer ve tam fovea bölgesinde katman gözden silinir. Küçük *midget hücreleri* ve daha iri olan *parasol hücreler* gangliyon hücrelerin %80' ini oluştururlar. Bu hücreler İPK' da ki dentritik bağlantılarına göre *on/açık* yada *off/kapalı* hücreler olarak sinyalin iletilmesini düzenlerler (34).

3.2.10. Sinir İplikleri Katmanı

Gangliyonik aksonlar optik sinire doğru, sinir iplikleri katmanında ilerlerler. Uzak periferik bölgelerde son derece ince ve farkedilmesi güç bir hal alan bu katman, optik diske yaklaştıkça da tüm retinal aksonlar, optik sinir ile buluştuğu için incelik (27).



Şekil 3: Retinanın katmanları.



Şekil 4: Retinanın histolojik yapısı, şematik (35)

3.3. Retinitis Pigmentoza (RP)

Retinitis pigmentoza, çubuk ve koni reseptörlerin dejenerasyonu ile karakterize bir grup kalıtsal hastalık için kullanılan genel bir terimdir. Dünya genelinde, hastalıktan 1 milyonun üzerinde insanın etkilendiği tahmin edilmektedir

(9). Hastalığın kalıtımı, %30-40 oranında otozomal dominant, %50-60 otozomal resesif ve %5-15 oranında X- ilişkili genler aracılığıyla olmaktadır (36).

Retinitis pigmentosa, hastalarda ortaya çıkan semptomlar bakımından yüksek değişkenlik gösteren bir hastalıktır. Kimi hastalarda görme kaybı erken dönemde başlarken bazılarında yetişkinlik dönemine kadar klinik bir bulgu görülmemektedir. Hastalıkta görülen en klasik bulgular sırasıyla; karanlık adaptasyonu bozuklukları ve gece körlüğü, bunların sonrasında ortaya çıkan periferik görüş kaybı ki bu durum *tünel görüşü* adı verilen sadece merkezi görüşe olanak tanıyan bozukluğa yol açar ve en son ortaya çıkan merkezi görüş kaybı olarak belirtilmiştir. Bu görsel bozuklukların merkezinde ise, akromatik görüşten sorumlu çubuk reseptörlerin (yıldız ışığında, ayışığında görüş= gece görüşü) ve kromatik görüşten sorumlu koni reseptörlerin (günlük ışığında görüş= renkli görüş) kitlesel ölümü yer almaktadır. Retinanın dış nükleer katman adı verilen, fotoreseptör hücre çekirdeklerinin bulunduğu bölge, hastalıkta en çok etkilenen kısımdır. Amakrin hücreler, bipolar hücreler ve horizontal hücrelerden oluşan iç nükleer katman ile gangliyon hücreleri katmanı, hastalıktan az miktarda ve ilerleyen dönemlerde etkilenir (9). Hastalığın tipik formlarında, çubuk reseptör kaybı, koni reseptör kaybından her zaman daha fazladır. Bazı formlarda ise, çubuk ve koni reseptör kaybı eşit oranda seyrederek. En seyrek görülen formda ise koni reseptör kaybı, çubuk reseptör kaybını aşar ve bu durum renkli görüş bozukluğu ile ilgili erken dönem semptomlarını ortaya çıkarır (37).

Genetik bakımından RP oldukça heterojenik bir hastalıktır. Hastalıkla doğrudan ilgili 45 civarında gen mutasyonu tespit etmiş ve kayıt altına alınan hastaların yarısından fazlasında bu durum ortaya konmuştur. Dominant RP de

vakaların %25' inin *rodopsin* geni (RHO) mutasyonu, resesif hastalıkta vakaların yaklaşık %20'sinin *usherin* geni (USH2A) mutasyonu, X-ilişkili formda ise vakaların yaklaşık %70' inin *retinitis pigmentosa GTPase regülator* geni (RPGR) mutasyonu ilişkili olduğu bilinmektedir. Genel olarak bakıldığında ise tüm vakaların yaklaşık %30' undan bu üç gen; RHO, USH2A ve RPGR mutasyonları sorumlu tutulmaktadır (9).

3.4. N- Metil- N- Nitrozüre (MNU)

N- nitrozo bileşenleri, nitrojen oksitlerinin, sekonder ve tersiyer aminler veya amidlerle reaksiyona girmesi sonucu oluşabilen oldukça geniş bir grup kimyasal bileşenlerdir. Bu kimyasallar, karsinojenik ajanlar gibi hareket edip tümör oluşumunu sağladıkları için, kanser araştırmalarında, hayvan deneyi modellerinde kullanılmaktadır (38). İnsanlar nitrozo bileşenlerini; diet ile (tütsülenmiş et, domuz pastırması, fümelenmiş yada kızartılmış balık, bira, tereyağı, sosis, jambon, turşu), meslek gereği (kuaför, kauçuk, metal ve deri endüstrisi, tarım), sosyal alışkanlıklar ile (tütün ürünleri) ve açık alan veya kapalı alan havasında farmasötik ve kozmetik ürünlere düşük düzeylerde maruz kalmak suretiyle doğal olarak alabilmektedir (39).

Nitrozo bileşenlerinden bazıları; N- metil- N- nitrozüre (MNU), N-nitrozodimetilamin (NDMA), streptozotosin (STZ), 4-metilnitrozamino-1-3-piridil-1-butanon (NNK) ve metilnitroznitroguanidin (MNNG), nükleik asitler ve proteinlerle reaksiyona girme kabiliyetindedirler ve bir alkilasyon tepkimesine yol açarlar (40). Bu alkilleyici ajanlardan, MNU, STZ VE MNNG gibi bazıların, karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve immunsupresant özelliklerinden deneysel

çalışmalarda faydalanılmaktadır. Ayrıca kimi lösemi modellerinde antineoplastik ajan olarak da kullanılmaktadırlar (41). Askeri amaçlarla, kimyasal silah olarak kullanılan hardal gazı da bu grup kimyasallara dahil bir kitle imha silahıdır (42).

Nükleik asitlerle reaksiyona girip DNA hasarına neden olan kimyasallar genotoksik kimyasallar olarak adlandırılırlar (43). N-nitrozo grubuna dahil bahsi geçen maddeler kendi alkil gruplarını DNA' ya transfer ederek, pirin ve pirimidin bazlarındaki nükleofilik nitrojen ve oksijen atomlarıyla reaksiyona girmesine neden olurlar, yani DNA' yı alkilerler. Bu durum da, N^7 ve N^3 alkilpürinler, O^6 -alkilguanin ve O^4 -alkiltimin gibi DNA ürünlerinin oluşmasına neden olur. DNA yapısında meydana gelen bu değişiklikler, replikasyon sırasında hatalı nükleotid dizilimine, dolayısıyla da hatalı RNA transkripsiyonuna neden olur. Bu durum mutajenik ve karsinojenik süreç için önemli bir adım olarak kabul edilir (38). Tüm nitrozo komponentleri içinde, karsinogenez çalışmalarında en çok tercih edilen kimyasal indükleyici MNU' dur (44).

MNU ilk olarak 1889 yılında Gustave Von Brüning tarafından, sodyum nitrat ile metilüre solüsyonunun reaksiyonu ile elde edilmiştir. Sonrasında bu madde, yoğun bir şekilde çalışmalarda kullanılmış ve mutajenik etkileri ilk olarak Rapaport (45) tarafından *Drosophila* spp. üzerinde belirlenmiştir. Son olarak MNU' nun karsinojenik etkileri farklı hayvan türlerinde ve hatta insanlar üzerinde ortaya konmuştur (42).

MNU, $C_2H_5N_3O_2$ moleküler formülüne sahip, 103.08g/mol moleküler ağırlığında, soluk sarı renkte, kristal formunda, suda, alkolde, eterde, asetonda, benzende ve kloroformda çözünebilir bir maddedir. Çözünme süreci uzundur ve

10mg/ml oranından fazla oranda çözdürmek oldukça zordur. Çözelti formu için 125 saat ile en uzun yarı ömür pH 4 te sağlanır, pH 9 da ise yarı ömür 2 dakikaya kadar düşer. Genellikle 3 saat civarı yarı ömür süresi olan pH 5, en çok tercih edilen çözelti formudur. MNU' yu parçalayıp kullanılan çözeltiyi etkisizleştirmek için ise için ise sodyum bikarbonat çözeltileri tercih edilmektedir (46).

Günümüzde MNU, meme, dalak, böbrek, uterus, ovaryum, karaciğer, hemapoetik sistem, ince bağırsak, kolon, mide, deri, prostat, mesane ve retinada ki kimyasal karsinogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1: MNU' nun kullanıldığı modeller (40)

Hedef Organ	Hayvan Türü	Hayvan Yaşı (Hafta)	MNU Dozu	DeneY Süresi (Hafta)	Tümör Yüzdesi	Histopatolojik Sınıflandırma
Meme	Sprague Dawley Rat	7-15	12-60 mg/kg i.v.	14-35	33-100	Adenokarsinom, sarkom, fibrom
Prostat	Gerbil	13	30 mg/kg s.c.	12	20	Adenokarsinom
Hemapoetik Sistem	C57BL/6, BALB/C Fare	10	50 mg/kg i.p.	16-43	50	Lenfom
Karaciğer	B6C3F1 Fare	2	25 mg/kg i.p.	52	10-17	Karsinom, Adenom
Retina	Sprague-Dawley Rat	6-10	40-60 mg/kg i.p.	24 saat-20	-	Retinal Dejenerasyon
Deri	Xiphophorus balık türleri	5	1mM	24	21-36	Melanom
Perifer Sinirler, Göz	Xiphophorus balık türleri	5	1mM	56	2,8-6,6	Schwannom, retinoblastom, fibrosarkom

3.5. Minosiklin

Tetrasiklinler, bakteriyostatik etkinliğe sahip geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Minosiklin ise bu gruba dahil, ikinci jenerasyon, uzun etkili, yarı-sentetik bir antibiyotiktir. Yıllar süren çalışmalar sonucunda minosiklinin antimikrobiyal etkinliğinden tamamen bağımsız olarak; matriks metalloproteaz, tümör bağımlı anjiyogenez, nitrik oksit sentetaz (yangı mediyatörü) ve mitokondriden sitokrom-c salınımını engelleyerek, kaspaz-3 inhibitörlüğü yaptığı, ayrıca nötrofillerden oksijen radikalleri salınımını baskıladığı ortaya konulmuştur (47). Bu yangı önleyici ve anti-apoptotik özellikleri sebebiyle, merkezi sinir sisteminin dejeneratif ve iskemik hastalık modellerinde koruyucu etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (48). Nöroprotektif özelliklerinden faydalanılarak; amiotrofik lateral skleroz, serebral iskemik, travmatik beyin hasarı, Huntington ve Parkinson hastalık modellerinde kullanılmıştır. Bu hastalıklarda nitrik oksit sentetazın indüklediği yangının ve kaspaz ailesine dahil enzimlerin rolü olduğu düşünüldüğünden, bunların inhibitörlüğünü yaptığı savunulan minosiklin, denemeye aday bir ilaç haline gelmiştir (49). Bunların dışında ağır bir yangısal hastalık olan romatoid artrit de minosiklinin yangı önleyici etkinliğinden faydalanılmaktadır (50). Son dönemlerde yapılan çalışmalarda ise yine yangısal faaliyetler ve apoptozisin ön planda olduğu, fotoreseptör hücre ölümü ile seyreden hastalık modellerinde minosiklin önleyici ajan olarak kullanılmaktadır (48, 51-60).

3.6. N-Metil-N-Nitrozüre İle Oluşturulan Retinal Dejenerasyon Modeli

RD ile ilgili tedavi seçeneklerini ortaya koyabilmek için oluşturulan hayvan modelleri büyük önem taşımaktadır. RD fareler olarak bilinen retinal dejenerasyon

geni taşıyan hayvanlarda, siklik guanozin monofosfat fosfodiesterazın, beta-alt ünitesinde bulunan defekt, yaşamlarının 11. gününde RD' a uğramalarına, 20. gününde ise neredeyse tüm fotoreseptörlerini kaybetmelerine neden olmaktadır. (61). Periferin/rds geninde mutasyon taşıyan RDS (retinal degeneration slow) farelerinde, fotoreseptör kaybı 2 haftalık yaşta başlayıp, yavaş bir şekilde ilerleyerek 1 yaşına kadar devam etmektedir (62). RCS (Royal College of Surgeons) sıçanlarında RPE hücreleri tarafından üretilen bir reseptör tirozin kinaz genindeki delesyon, bu hayvanların 20. günde fotoreseptörlerinin apoptozis ile ölmeye başlamasına ve 60. günde tespit edilebilir fotoreseptörlerinin kalmamasına neden olmaktadır. Bahsi geçen hayvanlar heterojenik genetik defektlerinden dolayı nükleozomal fragmentasyonla karakterize apoptozis ile fotoreseptörlerini kaybeden spontane modellerdir (63).

Genetik modellere ek olarak, ışık ile fototoksik etki oluşturarak veya belirli kimyasalları kullanarak yapay bir fotoreseptör hücre hasarı oluşturmak mümkündür. Kimyasal ajanlar içerisinde yer alan N-metil-N-nitrozüre (MNU), kendi metil gruplarını nükleik asitlerdeki nükleobazlara transfer ederek sitotoksik etki gösteren alkilleyici bir ajandır. Seçici olarak fotoreseptör hücreleri etkilediği için RD, özellikle de retinitis pigmentosa modelleri için uygun bir adaydır (64). Bu seçici etkisinin, özellikle çubuk reseptörlerin MNU' ya bu kadar duyarlı olmasının nedeni net olarak ortaya koyulmamakla beraber, fotoreseptör hücrelerindeki glutasyon oranı düşüklüğünün ya da yokluğunun etkili olduğu, muhtemel bir açıklama olarak karşımıza çıkmaktadır. Glutasyonun, MNU' yu katalizleyici ve dekompoze edici etkisi olduğu, aynı zamanda alkilasyon ürünlerini temizlediği düşünülmektedir (65).

Herrold, 1967 yılında ilk olarak, MNU kullanarak, Suriye hamsterlerinde haftada 1 kez 4 hafta boyunca 5 mg dozunda intravenöz uygulama ile iç nükleer katmanın direk koroidle temasa geçeceği boyutta fotoreseptör hücre kaybı meydana getirmiştir (66). Daha sonra yapılan çalışmalarda da, F344 sıçanlarında, beyaz Japon sıçanlarında, Sprague Dawley sıçanlarda, kahverengi Norveç sıçanlarında, BALB/c ve C57BL farelerde, kedilerde ve maymunlarda 15-75 mg/kg tek doz i.p. MNU uygulaması ile 7 gün içinde belirgin olarak RD oluşturulmuştur (64).

Genç erişkinlerde MNU uygulaması RD ile sonuçlanırken, transplasental uygulamalar yada yenidoğan hayvanlara yapılan uygulamalar nöroblastların progresif disorganizasyonu ile karakterize olan retinal displaziye sonuçlanmaktadır. C57BL farelerinde 0-3 günlük dönemde uygulanan MNU, retinal displaziye neden olurken, 11 günlükten büyük hayvanlarda RD olduğu görülmüş ve 5-8 günlük hayvanlara MNU uygulandığında herhangi bir değişikliğin oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum MNU'nun, 0-3 günlük dönemdeki, retinanın proliferatif fazında, retinal displaziye neden olduğunu, 5-8 günlük dönemdeki, nöroblastik hücrelerin çoğalmasının bitmesini takiben başlayan farklılaşma fazında ise herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Retinal farklılaşma fazından sonraki dönemlerde ise fotoreseptörler artık MNU' nun dejeneratif etkisine duyarlı birer hedef haline gelmektedirler. Yaşla beraber de MNU' ya olan duyarlılık artmaktadır. Muhtemeldir ki bu durum yaşla beraber artan DNA hasarı birikimiyle paralellik göstermektedir. Sıçanlarda en az 21 günlük hayvanlara yapılan MNU uygulamaları, seçici bir şekilde retinanın diğer nöronlarını etkilemeden fotoreseptör hücreleri önemli derecede etkilemektedir (67-69).

3.7. N-Metil-N-Nitrozüre İle Oluşturulan Retinal Dejenerasyonun Moleküler Mekanizması

3.7.1. Hatalı DNA Ürünleri Birikimi

Fotoreseptör hücre ölümüne neden olan fotoreseptör apoptozisi, retinitis pigmentoza başta olmak üzere, RD ile seyreden hastalıklarda ki temel mekanizmadır. Ancak bu hücreleri apoptozise sürükleyen nedenler henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. MNU, DNA bileşenleri ile reaksiyona girip DNA'yı alkillemekte ve çeşitli artık alkilasyon ürünlerin oluşmasını sağlamaktadır. Bu ürünlerden en fazla oluşanları ise 7-metildeoksiguanozin (70, 71) ve 8 hidroksil-2-deoksiguanozin (72, 73) isimli ürünlerdir. DNA'nın alkilendiğinin göstergesi olarak kabul edilen ve immunohistokimya dahil, çeşitli yöntemlerle ortaya konabilen parametrelerdir. Fotoreseptör hücre çekirdeğinde biriken bu ürünler DNA sentezini baskılayarak hücrenin apoptozise sürüklenmesine neden olmaktadır (64).

3.7.2. Poly (ADP-riboz) Polimeraz (PARP) Aktivasyonu

Poly (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA onarımında görevli ve hücre çekirdeğinde bulunan nükleer bir enzimdir. Alkilleyici ajanlar tarafından oluşturulan DNA hasarı PARP aktivasyonuna neden olur ve bu enzim substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺)' i kullanır. PARP hiperaktivasyonu, NAD⁺ havuzunun boşalmasına neden olur ve bu durum da, ATP eksikliği, enerji kaybı ve sonunda hücre ölümü ile sonuçlanır (74). Sadece MNU modelleriyle kalmayıp, kalıtsal modellerde de, PARP aktivasyonu, fotoreseptör apoptozisinin en önemli bileşenlerinden biridir. PARP aynı zamanda *nükleer faktör kappa-B* (NF-

KB) ve *aktivatör protein-1* (AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri ile olan bağlantıları ile transkripsiyonu da düzenler (75).

3.7.3. Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri hücre sağ kalımı ve ölümünün düzenlenmesi üzerinde hayati fonksiyonlara sahiptirler. Bunların en önemlisi ise özellikle hücre hasarı sonucu oluşan strese cevap olarak transkripsiyonu düzenleyip hücre sağ kalımını sağlayan NF-KB dir. NF-KB' nin sitoplazmada ki latent formu, nükleusa geçmesini engelleyen, *inhibitör faktör kappa-B* (İF-KB) ile bağlanmış durumdadır. İF-KB' nin serin 32 aminoasitinde meydana gelen fosforilasyon NF-KB' nin serbest kalmasına neden olmaktadır. Tam aktive olup transkripsiyondaki rolünü oynaması için de, p65 alt ünitesindeki serin 276 aminoasitinde fosforilasyonun oluşması gerekmektedir (76). Sıçanlarda MNU uygulamasının ve ışığa maruz bırakmanın NF-KB' nin p65 alt ünitesinin seviyelerini önemli ölçüde düşürerek fotoreseptör hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Genetik defektli, retinal dejenerasyon (rd) farelerinde ise tam tersi durum gözlemlenmiş olup, bu farelerin fotoreseptör hücrelerini kaybettikleri dönemde NF-KB p65' in aktivasyonu ve çekirdeğe translokasyonu söz konusudur. Sonuç olarak NF-KB' nin aktivasyonu, RD modeline ve patolojik stimülasyona bağlı olarak pro-apoptotik veya anti-apoptotik etkinlik gösterebilmektedir (64).

Aktivatör protein-1 (AP-1), hücre siklusu, farklılaşma ve apoptozis ile ilişkili olan, temelde c-Jun ve c-Fos proteinlerinden oluşan dimerik yapıda bir proteindir. Işığa maruz bırakılan transjenik c-Fos^{+/+} farelerinde artan fotoreseptör apoptozisinin, artmış AP-1 aktivasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Apoptozise dirençli transjenik c-Fos^{-/-} farelerinde ise ışığa maruziyette AP-1 aktivasyon artışı görülmemesi bu durumu destekler niteliktedir. Buradan c-Fos proteininin ışıkla oluşturulan apoptoziste esansiyel olduğu sonucu çıkmaktadır. MNU verilen sıçanlarda da c-Fos değerlerinin arttığı görülmüştür. Işığa maruziyetin aksine, MNU uygulaması, hem c-Fos^{+/+} hem de c-Fos^{-/-} farelerde fotoreseptör apoptozisine yol açmaktadır (77).

P53, genotoksik strese karşı hayati bir rol oynayan ve DNA hasarı durumlarında hücre ölümünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Ancak transjenik p53^{+/+} ve p53^{-/-} farelerde MNU uygulamasının p53 düzeyini etkilemeksizin fotoreseptör apoptozisine yol açtığı bilinmektedir. Benzer şekilde, ışığa maruziyette de, p53 bağımsız olarak retinal lezyonlar oluşmaktadır (64).

3.7.4. Bcl-2 (B-cell lymphoma) Ailesi

Bu gruba dahil proteinler apoptozisin önemli belirleyicileridirler. Bcl-X1 ve Bcl-2 apoptozisi engellerken, Bax (Bcl-2 associated X protein), apoptozisi indüklemektedir. MNU' nun yol açtığı DNA hasarı, bu aileye dahil proteinlerin miktarını değiştirmektedir. Pro-apoptotik/anti-apoptotik oranı, MNU uygulamasını takiben 24 saat içinde artmaya başlamaktadır. Bax ekspresyonu artarken, Bcl-2 ekspresyonu azalabilmekte veya sabit kalabilmektedir (78).

3.7.5. Kaspaz Aktivasyonu

Kaspazlar, apoptozisi koordine eden sistin aspartat özgül proteazlardır. Kaspaz ailesi MNU ile oluşturulan fotoreseptör apoptozisinde önemli rol oynar. Özellikle; kaspaz-3/CPP32, kaspaz-6/Mch2 ve kaspaz-8/FLICE proteazların, MNU

uygulamasını takiben ekspresyonları artmakta ve bu durumda retinal apoptozisi indüklemektedir (79).

3.7.6. Kalsiyum Artışı ve Kalpain Aktivasyonu

Sitotoksik stimülasyonlar hedef hücrenin içine doğru yoğun bir kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) geçişine neden olur ve artmış hücre içi konsantrasyon da kalpain aktivasyonunu sağlar (80). Genetik defektli RD farelerinde, fotoreseptör hücrelerinin öldüğü dönemde Ca^{+2} miktarı ile kalpain ve kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı bilinmektedir (81). Sıçanlarda MNU uygulamasını takiben retinada Ca^{+2} ve kalpain miktarının dramatik bir şekilde arttığı görülmüştür. Hücreye aşırı kalsiyum akışı membran depolarizasyonuna ve NAD^{+} ile ATP depleksiyonuna neden olarak enerjik kollapsa, sonuç olarak ise nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır (80). Kalpain direkt hücre ölümüne neden olmamakla beraber *apoptozis indükleyici faktör* (AIF) isimli proteini aktive ederek DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (83).

3.7.7. Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS)

Oksidatif stres nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir yer tutmaktadır. RD farelerde görülen fotoreseptör kaybında, oluşan reaktif oksijen radikallerinin (ROS) de payı bulunmaktadır. MNU uygulanan hayvanların retinalarında hücre içi ROS seviyelerinin arttığı görülmekte ve bu durumun fotoreseptör hücre apoptozisi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. İn vitro olarak ta hücre hattarında MNU' nun seçici bir şekilde ROS seviyelerini arttırdığı ve fotoreseptör ölümüne yol açtığı görülmüştür (64).

Yapılan bu çalışma ile; ülkemizde daha önce denenmemiş olan bir retinal dejenerasyon modeli oluşturmak hedeflenmiştir. MNU isimli DNA alkilleyici kimyasal maddenin periton içi uygulamasıyla sıçanlarda fotoreseptör apoptozisi sağlayarak RD oluşturmak, MNU uygulanan belli sayıdaki sıçana değişen dozlarda minosiklin de uygulayarak RD' u engellemeye çalışmak, yedi günlük deney süresince beş farklı zaman diliminde ötenaziler uygulayarak retinal katmanlardaki değişimleri gösterebilecek göz örnekleri elde etmek ve elde edilen örnekleri, histopatolojik, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak incelemek amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hayvan Deneyi

Çalışmada, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden (FÜDAM) temin edilen, ağırlıkları 150-200 gram arasında değişen, 100 adet, 7 haftalık, dişi, Sprague Dawley ırkı albino sıçan kullanıldı. Çalışma için gerekli etik izin Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' ndan alındı (09.03.2016, Karar No: 46).

4.1.1. Hayvanların Gruplandırılması

FÜDAM' dan temin edilen 100 adet sıçan, herbiri 20 hayvandan oluşan 5 eşit gruba ayrıldı. Gruplardan bir tanesi kontrol grubu olarak ayrılıp diğer 4 grup deney grubu olarak belirlendi (Tablo 2). Deney gruplarından ilki N-metil-N-nitrozüre (MNU) grubu, ikincisi MNU + düşük doz minosiklin (DDM) grubu, üçüncüsü MNU + orta doz minosiklin (ODM) grubu, sonuncusu ise MNU + yüksek doz minosiklin (YDM) grubu olarak ayrıldı. Hayvan deneyi standart kafeslerde, normal nem, sıcaklık, ısı koşullarında, *ad libitum* besleme ile gerçekleştirildi ve herhangi bir özel koşul uygulanmadı.

Tablo 2: Hayvan deneyinde, gruplar, uygulama gruplarındaki hayvan sayıları ve sakrifikasyon zamanları.

GRUP NO	GRUPLAR	YAPILACAK UYGULAMA	SAKRİFİKASYON ZAMANLARI*					Toplam Hayvan Sayısı	
			12.s.	24.s.	48.s.	72.s.	7.gün		
1	KONTROL GRUBU	1 ml. i.p. serum fizyolojik	4	4	4	4	4	20	
2	MNU GRUBU	Tek doz, 50 mg/kg i.p. MNU	4	4	4	4	4	20	
3	MNU+Düşük Doz Minosiklin Grubu	Tek doz, 50 mg/kg i.p. MNU	İki doz, 50 mg/kg i.p. minosiklin**	4	4	4	4	4	20
4	MNU+Orta Doz Minosiklin Grubu	Tek doz, 50 mg/kg i.p. MNU	İki doz, 75 mg/kg i.p. minosiklin**	4	4	4	4	4	20
5	MNU+Yüksek Doz Minosiklin Grubu	Tek doz, 50 mg/kg i.p. MNU	İki doz, 100mg/kg i.p. minosiklin**	4	4	4	4	4	20

*Sakrifikasyon zamanları MNU uygulaması yapıldığı saatten itibaren belirlenmiştir.

**Minosiklin uygulamaları, MNU uygulamasından 24 saat önce ve 1 saat sonra olmak üzere iki doz şeklinde yapılmıştır.

4.1.2. N- Metil- N- Nitrozüre Solüsyonunun Hazırlanması

RD oluşturmak için MNU (Pfaltz&Bauer Inc., Connecticut, A.B.D.) kullanıldı. Kristal formda olan ve -20 °C de muhafaza edilen MNU' dan, %1' lik çözelti (42) hazırlamak için 80 hayvana tek doz yetecek şekilde, 800 mg. tartılıp, 80 ml. fizyolojik tuzlu içerisinde yaklaşık 10 dk karıştırıldı. Son olarak çözeltiye %0,05'e karşılık gelen 40 mikrolitre glasiyel asetik asit (Merck KGaA, Darmstadt,

Almanya) eklenerek (74, 84) solüsyon hazır hale getirildi. Solüsyonun son halinde, 1 ml. de 10 mg. MNU bulunmaktadır (83). Yarılanma ömrü kısa olduğundan MNU hazırlanma işlemi enjeksiyonlardan hemen önce gerçekleştirildi.

4.1.3. Minosiklin Solüsyonunun Hazırlanması

RD' u engelleyici etkisinin araştırılması için minosiklin hidroklorür (Sigma-Aldrich, Missouri, A.B.D.), kristal formda temin edildi ve +4 °C muhafaza edildi. Minosiklin solüsyonu üretici firmanın verdiği bilgiler ışığında %2' lik solüsyon şeklinde, distile su kullanılarak hazırlandı. Kristal formdaki minosiklinden 60 hayvana 2 doz yetecek şekilde, 1,6 gr. tartılıp, 80 ml. distile su içerisinde karıştırılarak solüsyon hazırlandı. Karıştırma işlemi steril cam kavanoz içerisinde, 37 °C de ki benmari de gerçekleştirildi. Solüsyonun son halinde, 1 ml. de 20 mg. minosiklin bulunmaktadır. Minosiklin hazırlanma işlemi enjeksiyonlardan hemen önce gerçekleştirildi.

4.1.4. Hayvanlara Enjeksiyonların Yapılması

Deney planına uygun olarak kontrol grubu 20 hayvana sadece tek doz 1 ml. serum fizyolojik, MNU grubu 20 hayvana sadece tek doz 50 mg/kg MNU, DDM grubu 20 hayvana tek doz 50 mg/kg MNU ve iki eşit doz 50 mg/kg minosiklin, ODM grubu 20 hayvana tek doz 50 mg/kg MNU ve iki eşit doz 75 mg/kg minosiklin, YDM grubu 20 hayvana tek doz 50 mg/kg MNU ve iki eşit doz 100 mg/kg minosiklin uygulandı (Tablo 2). Kontrol grubu hariç tüm enjeksiyonlar, hayvanların tartımı yapıp, pratik bir tablo ile hemen doz hesaplandıktan sonra 1 ml. lik steril insülin enjektörleri (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye) ile, periton

içi gerçekleştirildi. Kontrol grubu hayvanlara ise deney grubu hayvanlara verilen yaklaşık sıvı miktarı olan 1 ml., serum fizyolojik şeklinde periton içi verildi. Kullanılan enjektörler dahil MNU' nun temas ettiği herşey tedbir amaçlı, etkisizleşmesi için doymuş sodyum bikarbonat solüsyonu (42) içerisine atıldı. MNU' nun uygulandığı saat deneyin başlangıcı kabul edilip periyodik ötenazi safhasına geçildi.

4.1.5. Periyodik Ötenaziler ve Göz Örneklerinin Elde Edilmesi

Denemenin başlangıcından itibaren, 12., 24., 48., 72. saatlerde ve 7. günde olmak üzere 5 farklı dönemde ötenazi uygulandı. Her periyotta, tüm gruplardan 4' er hayvan olmak üzere toplam 20 hayvan ötenazi edildi. İncelenen parametrelerin zamana bağlı değişimini ortaya koymak için de bu şekilde 5 farklı zaman diliminde ötenaziler uygulandı. Hayvanlar, 0.3 ml. periton içi %10' luk ketamin (Bremer Pharma GmbH, Warburg, Almanya) enjeksiyonu ile genel anesteziye alındıktan sonra dekapite edilerek ötenazi edildi. Korneanın dorsal ve ventral kısmı hafif ısıtılmış bir iğne ile, penetrasyon oluşturmayacak şekilde dağlanarak işaretlendi. Burada gözün vertikal düzleminin belirlenmesi suretiyle, trimleme işleminde tüm gözlerin bir örnek olacak şekilde orta hattan ikiye bölünmesi amaçlandı. İnce uçlu bir makas ve pensle göz küreleri bütün olarak çıkarıldıktan sonra, Davidson's çözeltisi (86) içeren 100 ml. lik plastik numune kaplarına (Fıratmed, İstanbul, Türkiye) konuldu. Her kesim periyodunda, her gruptan sadece 1 göz ise elektron mikroskopik inceleme için %2,5' lik gluteraldehit solüsyonunda tespit edildi. Çalışmanın 7. gününde son 20 hayvanın da ötenazi edilmesiyle hayvan deneyi aşaması sonlandırıldı.

4.1.6. Davidson's Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada, %10' luk formole göre daha hızlı ve daha güçlü bir doku tespiti sağlayan ve retinal ayrılmaların önüne geçebilen (86) Davidson's çözeltisi kullanıldı. Bu solüsyon; 2 kısım %37' lik formalin (Sigma-Aldrich, Missouri, A.B.D.), 3 kısım %96' lık alkol (Tosel Medikal Solüsyonlar, Ankara, Türkiye) 1 kısım glasiyel asetik asit (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ve 3 kısım çeşme suyu kullanılarak hazırlandı.

4.1.7. Gluteraldehit Solüsyonunun Hazırlanması

Elektronmikroskopik inceleme için her ötenazi periyodunda, her gruptan bir göz, %25' lik gluteraldehit çözeltisinin (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) distile su ile %2,5' e seyreltilmesiyle elde edilen solüsyona alındı. Gözler solüsyon içinde +4 °C de 24 saat muhafaza edildi. Sonrasında gözler ortadan ikiye trimlendi, optik sinire yakın bölgelerden tüm göz katmanlarını içeren 2-3 mm' lik örnekler alındı ve elektron mikroskopik incelemenin yapılacağı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına ulaştırıldı.

4.2. Laboratuvar Çalışmaları

Hayvan deneyi ile elde edilen göz örneklerinin Davidson's ve gluteraldehit solüsyonlarında tespit edilmelerinden sonra gerekli analizler için gözlerin işlenmesi aşamalarına geçiş yapıldı.

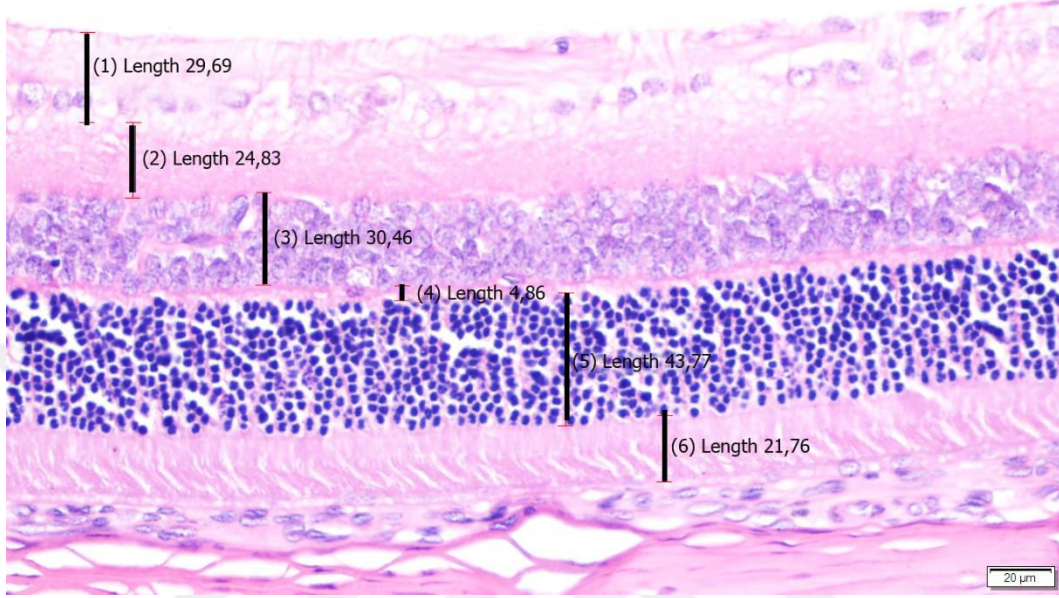
4.2.1. Doku Kesitlerinin Alınması

Davidson's fiksatifinde tespit edilen gözler, daha önceden işaretlenmiş olan kornea kısımları rehberliğinde, sagittal olarak, optik sinir hizasında tam ortadan ikiye bölünüp (87), bir pens yardımıyla lens alınıp atıldıktan sonra standart doku takip kasetlerine (Isolab GmbH, Wertheim, Almanya) yerleştirildi. Yaklaşık 2 saat akan çeşme suyu altında yıkandıktan sonra otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020, Wetzlar, Almanya) alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirilip doku bloklama cihazında (Leica EG 1150 H, Wetzlar, Almanya) parafin ile bloklandı. Parafin bloklardan rotary mikrotom (Leica RM2125, Wetzlar, Almanya) ile 3-5 mikron kalınlığında çok sayıda kesit pozitif şarjlı lamlara (Thermo Fischer Scientific, Superfrost, Massachusetts, A.B.D.) alındı.

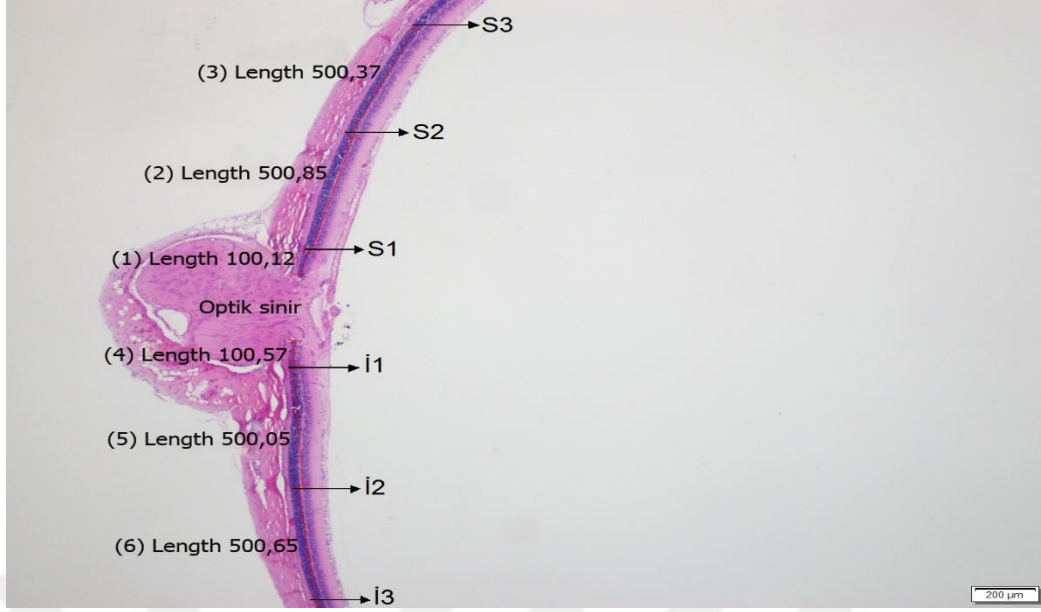
4.2.2. Hematoksilen-Eozin Boyama, İnceleme ve Ölçümler

Hazırlanan kesitlerden her hayvana ait olanlardan sadece birer göz alınıp otomatik doku boyama makinasında (Leica Autostainer XL, Wetzlar, Almanya) Hematoksilen-Eosin boyamaya tabi tutuldu. İnceleme; kameralı (Olympus DP72, Tokyo, Japonya) ve görüntüleme analiz sistemli (cellSens Standart) ve florasan ataçmanlı trinoküler ışık mikroskopunda (Olympus BX43, Tokyo, Japonya) yapıldı. Histopatolojik değişikliklerin incelenip görüntülenmesinin yanı sıra, sentral ve perifer retinada, fotoreseptör katmanı ve dış nükleer katman kalınlıkları ölçüldü (Şekil 5; 5. ve 6. uzunluklar). Ölçümler, sentral retinada, optik sinirden 100 µm uzaklıktan başlayıp, 500 µm arayla, hem süperior hemde inferior çeyrekte 3' er noktada, toplamda 6 noktada (57) yapıldı (Şekil 6). Perifer retina da ise, retinanın, silier cisime bağlandığı nokta olan *ora serrata* dan 500 µm ve 1000 µm uzaklıkta,

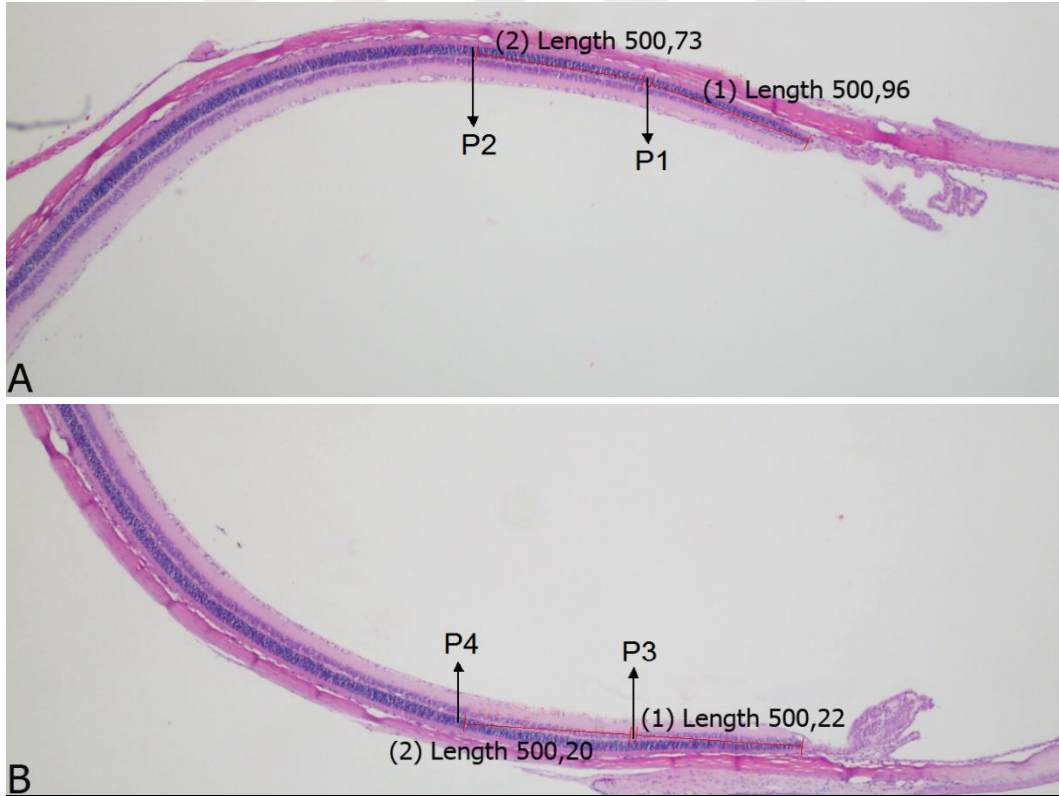
hem süperior hemde inferior çeyrekte 2' şer noktada toplamda 4 noktada yapıldı (Şekil 7).



Şekil 5: Retinal katmanların ölçümleri, µm, 1.uzunluk; gangliyon hücreleri katmanı ve sinir iplikleri, 2. uzunluk; iç pleksiform katman, 3. uzunluk; iç nükleer katman, 4. uzunluk; dış pleksiform katman, **5. uzunluk; dış nükleer katman, 6. uzunluk; fotoreseptör katman.** Çalışmada 5. ve 6. uzunluklar kullanıldı.



Şekil 6: Sentral retinada fotoreseptör katmanı ve dış nükleer katmanın ölçüm noktaları (μm); S1, S2, S3, İ1, İ2, İ3. S: Süperior Çeyrek, İ: İnferior Çeyrek



Şekil 7: Perifer retinada fotoreseptör katmanı ve dış nükleer katmanın ölçüm noktaları (μm); P1, P2, P3, P4. **A:** Süperior Çeyrek **B:** İnferior Çeyrek.

4.2.3. TUNEL Yöntemi

Apoptozisin varlığını ve derecesini ortaya koymak için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUPT nick end labeling) metodu kullanıldı. Pozitif sarjlı lamlara alınmış olan kesitler bir saat 65 °C de etüvde tutuldu. Sırasıyla ksilolde deparafinize edilip, azalan alkol serilerinde dehidre edildi, PBS te 10 dakika bekletildi. Tespit solüsyonunun antijenik unsurları maskeleyici etkisini ortadan kaldırmak için sitratlı tampon solüsyonda (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, A.B.D.), 600 watt gücündeki mikrodalga fırında 20 dakika kaynatıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra 15 dakika PBS te bekletildi. Hidrojen peroksit blok solüsyonunda (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, A.B.D.) 10 dakika bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi engellendi ve 15 dakika PBS te bekletildi. Bu aşamadan sonra kullanıma hazır apoptozis kitinde (Apop Tag Plusperoxidase In Situ Apoptosis Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) hazır bulunan kimyasallar kullanıldı ve üretici firmanın önerdiği standart prosedüre göre hareket edildi. Equilibration tampon solüsyonu ile 6 dakika inkübe edildi. Sonrasında kesitler TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) enzimi ve digoxigenin ile işaretli nükleotitleri içeren reaksiyon tamponu karışımı ile 1 saat oda sıcaklığında, nemli ortamda inkübasyona bırakılarak, DNA kırılmalarının olup, 3'-OH uçlarının açıldığı bölgelere işaretli nükleotitlerin eklenmesi sağlandı. İnkübasyon sonunda reaksiyon durdurma solüsyonu ile yıkanan kesitler 10 dakika PBS te bekletildi. Anti-digoxigenin ile işaretli peroksidaz enzimiyle 30 dakika inkübe edilerek işaretli DNA kırıklarının olduğu bölgelere peroksidaz enziminin bağlanması sağlandı. PBS te 15 dakika yıkandıktan sonra 3,3' diaminobenzidine (DAB) kromojeni uygulanıp kontrollü bir

şekilde 1-2 dakika beklendikten sonra Gill's hematoksilen (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ile 5 saniye karşıt boyama yapıldı ve entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ile kesitler kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenip görüntülendi. Apoptozisin derecesini belirlemek adına, her gözde optik sinirin sağ ve sol tarafında (süperior çeyrek ve inferior çeyrek) 400 µm uzaklıkta ki 2 bölgede, 400X büyütmede bir mikroskop sahasındaki, kahverengi boyanan fotoreseptör hücre çekirdekleri sayıldı. Ardından aynı bölgedeki boyanan/boyanmayan tüm fotoreseptör hücre çekirdekleri sayılıp apoptotik indeks yüzde olarak belirlendi. (Apoptotik İndeks = TUNEL pozitif hücre sayısı / total hücre sayısı) (72).

4.2.4. İmmunohistokimyasal Yöntemler

Çalışmada yer alan immunohistokimyasal analizler için; immunperoksidaz (İP) ve indirek immunflorasan (İF) yöntemleri uygulandı.

4.2.4.1. İmmunperoksidaz Yöntemi

Daha önceden hazırlanan preparatlarda, Streptavidin Biotin Peroksidaz Kompleks (SABPK) tekniğiyle (88, 89) tablo-4 de verilen primer antikor analizleri yapıldı. Pozitif şarjlı lamlardaki dokular 65 °C de ki etüvde 1 saat tutuldu. Sırasıyla ksilolde deparifinize edilip, azalan alkol serilerinde dehidre edildi. Distile su ve PBS te 10' ar dakika bekletildi. Tespit solüsyonunun antijenik unsurları maskeleyici etkisini ortadan kaldırmak için sitratlı tampon solüsyonda 600 watt gücündeki mikrodalga fırında 20 dakika kaynatıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra 15 dakika PBS te bekletildi. Bu aşamadan sonra kullanıma hazır immunohistokimya kitinde (Ultra Vision Detection System, Anti-Polyvalent, HRP,

Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, A.B.D.) hazır bulunan kimyasallar kullanıldı ve üretici firmanın önerdiği standart prosedüre göre hareket edildi. Hidrojen peroksit blok solüsyonda 10 dakika bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi engellendi ve 15 dakika PBS te bekletildi. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için protein blok solüsyonunda da 5 dakika bekletildikten sonra yıkama yapılmaksızın sadece kesitlerin üzerindeki fazla sıvı giderildi ve primer antikorlar (tablo 4) ile 1 saat, oda sıcaklığında, nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 15 dakika PBS te bekletilen kesitler biotinle işaretlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi ve 15 dakika PBS te bekletildi. Sonrasında HRP (Horse Radish Peroksidase) enzimi ile işaretli streptavidin ile inkübe edilerek incelenmek istenilen parametrenin işaretlenmesi işlemi tamamlandı. Yine 15 dakika PBS te yıkama işlemi uygulandıktan sonra kromojen ile işaretlenen bölgelerin belirlenmesi işlemine geçildi ve kesitler 3-amino-9-etilkarbozol (AEC) (Ultra Vision AEC Substrate System, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, A.B.D.) veya 3,3' diaminobenzidine (DAB) (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ile kontrollü bir şekilde inkübe edildi. Bakılan parametreye göre değişmekle beraber 1-5 dakika arasında değişen sürelerde bekletildikten sonra, inkübasyon distile su ile yıkamak suretiyle sonlandırıldı. Karşıt boyamada kesitler yaklaşık 5 saniye Gill's hematoksilen solüsyonunda tutuldu. Su bazlı yapıştırıcı (Lerner Laboratories, Chicago, A.B.D.) ile kapatılan kesitler ışık mikroskobunda incelendi.

4.2.4.2. İndirek İmmunflorasan Yöntemi

Pozitif şarjlı lamlardaki dokular 65 °C de ki etüvde 1 saat tutuldu. Sırasıyla ksilolde deparifinize edilip, azalan alkol serilerinde dehidre edildi. Distile su ve PBS te 10' ar dakika bekletildi. Tespit solüsyonunun antijenik unsurları maskeleyici etkisini ortadan kaldırmak için sitrat tamponlu solüsyonda 600 watt gücündeki mikrodalga fırında 20 dakika kaynatıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra 15 dakika PBS te bekletildi. Protein blok (Ultra V Block, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, A.B.D.) solüsyonunda da 5 dakika bekletildikten sonra yıkama yapılmaksızın sadece kesitlerin üzerindeki fazla sıvı giderildi ve primer antikolar (tablo-4) ile 1 saat oda sıcaklığında, nemli ortamda inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda 15 dakika PBS te bekletilen kesitler FITC (flourescein isothiocyanate) ile işaretli sekonder antikor (Goat Anti-Mouse IgG Seconder Antybody, Alexa Fluor 488 Plus, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, A.B.D.) ile 1 saat oda sıcaklığında, nemli ortamda inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda 15 dakika PBS te bekletilen kesitler su bazlı yapıştırıcı (Lerner Laboratories, Chicago, A.B.D.) ile kapatılıp, florasan mikroskopta, FITC filtre ile incelendi.

İmmunperoksidaz ve immunflorasan analizlerde değerlendirme yapılırken her hayvana ait bir göz preparatı kullanıldı ve Tablo 3 te ki skorlama (90) ile bir histoskor oluşturuldu. Her gözde, süperior çeyrek ve inferior çeyrek değerlendirilerek 2 değer elde edildi. İmmunperoksidaz yöntemi ile indirek immunfloresan yönteminden elde edilen pozitiflikler örtüştüğü için istatistiksel değerlendirme yapılırken immunperoksidaz yöntemi ile elde edilen preparatlar kullanıldı.

Tablo 3: İmmunohistokimyasal skorlama yöntemi.

Histoskor= İmmunreaktivitenin Yaygınlığı x İmmunreaktivitenin Şiddeti. (90)

<i>İmmunreaktivitenin Yaygınlığı</i>	<i>İmmunreaktivitenin Şiddeti</i>
0,1: %25' ten küçük	0: Yok
0,4: %26-50 arası	0,5: Çok Az
0,6: %51-75 arası	1: Az
0,9: %76-100 arası	2: Orta
	3: Şiddetli

4.2.4.3. İmmunohistokimyasal Parametreler

İmmunohistokimya ile; çubuk reseptörlere özgü bir fotopigment olan *rodopsin* ekspresyonları (16), koni reseptörlere özgü fotopigmentler olan *blue opsin* (10) ve *red/green opsin* (16) ekspresyonları, DNA alkilasyon tepkimesi sonucu açığa çıkan ara ürünlerden olan *8-OHdG* seviyeleri (73), oluşan hasar sonucu aktive olan Müller hücreleri, diğer glial hücrelerin ortaya konması için *PCNA* ve *GFAP* ekspresyonları (64) ve apoptotik değişimleri değerlendirmek için ilgili parametreler olan, *kaspaz-3*, *kaspaz-6* (79), *Bax* ve *Bcl-2* ekspresyonları (85) incelendi. Bu parametrelerin hepsi immunperoksidaz yöntemle; rodopsin, blue opsin, red/green opsin, 8-OHdG, PCNA ve GFAP parametreleri ise, ek olarak immunflorasan yöntemle de incelendi.

Tablo 4: İmmunohistokimyasal incelemelerde kullanılan primer antikorlar, sulandırma oranları ve klonları.

Antikor/Klon	Antikor Türü	Konak	Kullanılan Dilüsyon	Üretici Firma
Rodopsin (1D4)	Monoklonal	Fare	1/100	Sanra Cruz
Red/Green Opsin	Poliklonal	Tavşan	1/200	Merck
Blue Opsin	Poliklonal	Tavşan	1/100	Thermo
8-OHdG (15A3)	Monoklonal	Fare	1/400	Santa Cruz
PCNA (PC10)	Monoklonal	Fare	1/100	Santa Cruz
GFAP (2E1)	Monoklonal	Fare	1/100	Santa Cruz
Bax (B-9)	Monoklonal	Fare	1/100	Santa Cruz
Bcl-2 (C-2)	Monoklonal	Fare	1/100	Santa Cruz
Kaspaz-3 (31A1067)	Monoklonal	Fare	1/100	Santa Cruz
Kaspaz-6 (p10)	Monoklonal	Fare	1/100	Santa Cruz

4.2.5. Elektron Mikroskopik İnceleme

Elektron mikroskopik inceleme için alınan göz örnekleri otomatik elektron mikroskopik doku takip cihazında (Leica EM AMV, Wetzlar, Almanya) % 2.5 gluteraldehit (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ve % 1 osmium tetroksit (Merck

KGaA, Darmstadt, Almanya) ile tespit edildikten sonra aseton ile dehidre edilerek araldit bloklar içine gömüldü ve polimerize edildi. Araldit bloklar içindeki retina doku yüzeyi ve sınırları trimer cihazı (Leica EM TRIM, Wetzlar, Almanya) ile açıldıktan sonra ultramikrotom (Leica Ultracut R, Wetzlar, Almanya) ile 80 nm kalınlığındaki kesitler bakır gridler üzerine alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlama işlemini takiben Zeiss Libra 120 (Oberkochen, Almanya) *transmission elektron mikroskop (TEM)* ile incelenerek fotoğraflar alındı.

4.2.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Version 21.0 (IBM Corp. Armonk, NY, U.S.A) analiz programı kullanıldı. Parametrik veriler için tek yönlü varyans analizi (Anova), gruplar arası ikili karşılaştırmalar için ise Tukey testi kullanıldı. Parametrik olmayan veriler için ise Kruskal Wallis ve Man Whitney U testleri kullanıldı. Önemlilik düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Tablolar hazırlanırken veriler *ortalama ± standart sapma* olarak verildi. Aynı sütunda (A-D) ve aynı satırda (a-e) farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlı kabul edildi ($P < 0.05$).

5. BULGULAR

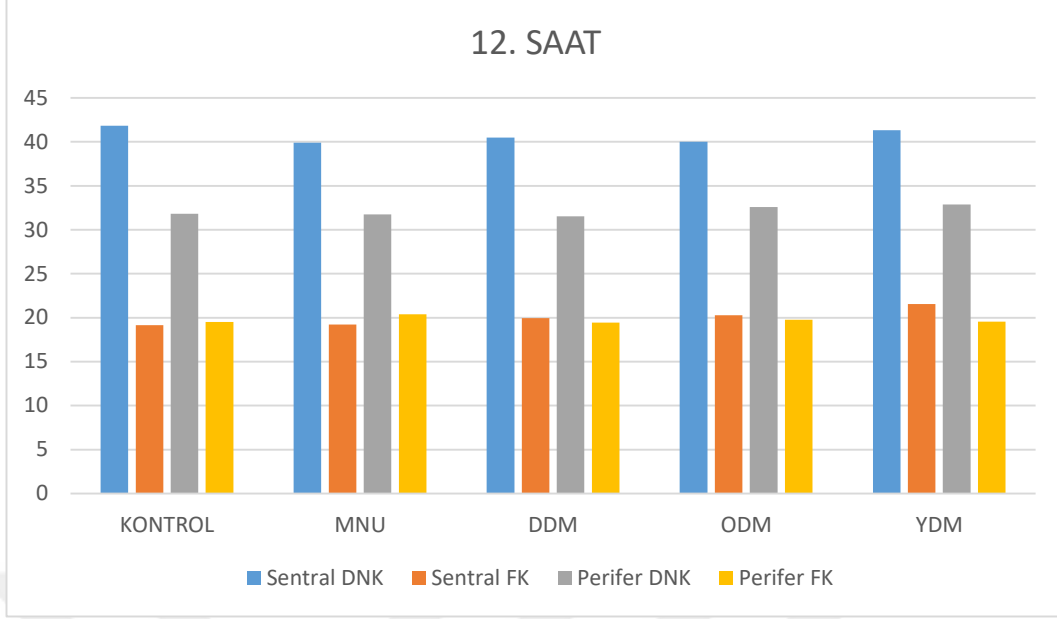
5.1. Klinik Bulgular

Klinik olarak MNU uygulanan hayvanların bulunduğu kafeslerde, kontrol grubu kafeslerine göre, azalan yem ve su tüketimi, depresif duruş ve inaktivasyon dikkati çeken bulgular olarak gözlemlendi. MNU uygulanan hayvanlardan kimilerinin gözlerini kısarak baktığı dikkati çekti. Deney süresince hayvanlarda ölüm görülmedi.

5.2. Histopatolojik Bulgular

5.2.1. Onikinci Saat Bulguları

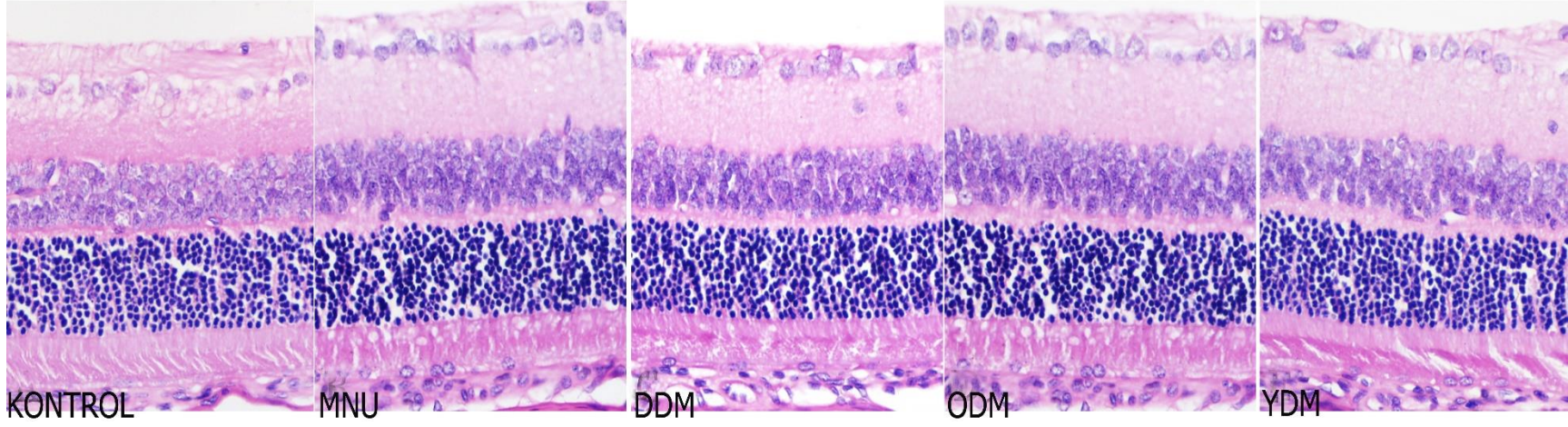
Bu periyodun, sentral retina ve perifer retina, dış nükleer katman (DNK) ve fotoreseptör katmanını (FK) ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları şekil-8 ve tablo 5 te verildi. Onikinci saatte, histopatolojik olarak kayda değer bir bulguya rastlanmadı (şekil 9). Gruplar arasında, DNK ve FK ölçümlerinde 1-2 µm civarında farklılıklar görülmüş olup, DNK'da hem sentralde hem periferde gruplar arasında anlamlı farklılığa rastlanılmadı, FK'nda ise sadece sentral retina ölçümlerinde, YDM grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Burada YDM grubunun diğer gruplara göre 2 µm civarında daha kalın olduğu görüldü.



Şekil 8: Onikinci saat retinal katman ölçüm ortalamaları (µm).

Tablo 5: Onikinci saat retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.

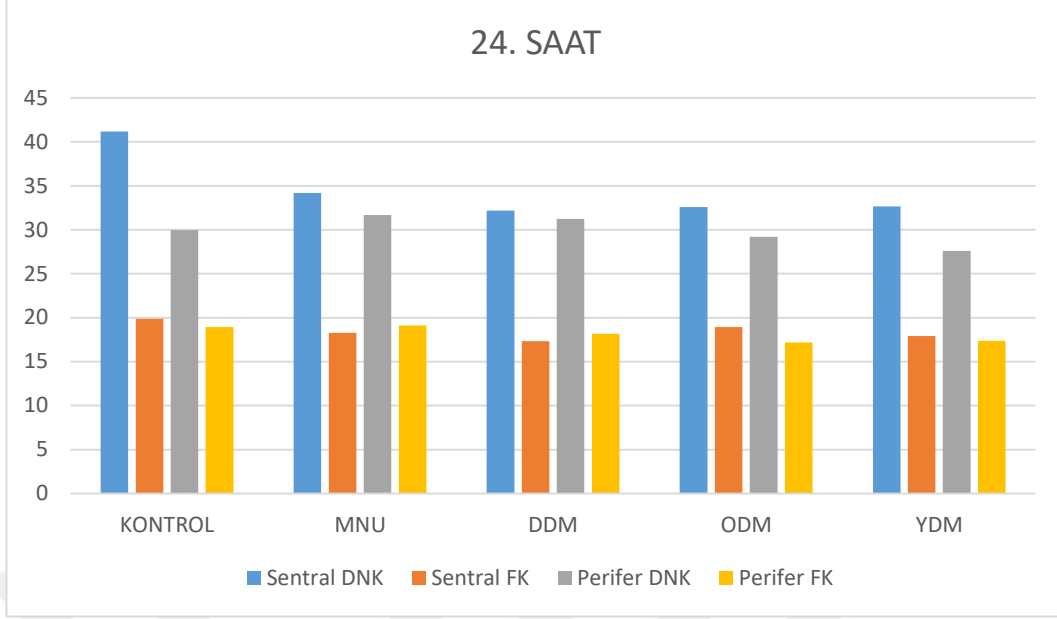
	Sentral DNK	Sentral FK	Perifer DNK	Perifer FK
Kontrol	41.82±2.6	19.13±1.66	31.8±2.73	19.5±2.06
MNU	39.88±2.23	19.22±1.37	31.75±2.81	20.4±1.25
DDM	40.48±4.0	19.95±2.86	31.53±2.17	19.43±4.11
ODM	39.99±2.9	20.27±2.06	32.57±3.12	19.76±1.83
YDM	41.33±3.1	21.54±1.25	32.87±2.79	19.53±2.73



Şekil 9: Onikinci saat, sentral retina, tüm gruplarda retinal katmanlar benzer görünümündedir (40X).

5.2.2. Yirmidördüncü Saat Bulguları

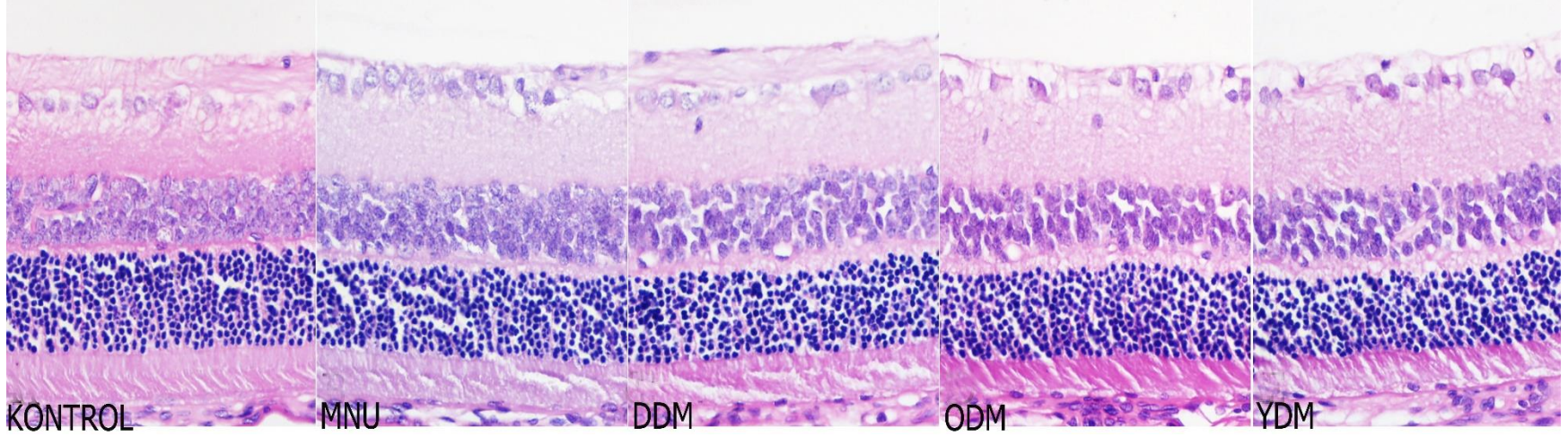
Bu periyodun, sentral retina ve perifer retina, DNK ve FK ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları şekil-10 ve tablo-6 da verilmiştir. Bu ötenazi periyodunda, tüm deney grubu hayvanlarının sentral retinalarında, DNK kalınlık ortalamalarının kontrol grubu ortalamalarına göre 5-9 µm civarında, FK kalınlık ortalamalarının ise 1-2 µm civarında azaldığı görüldü (şekil 11). DNK ve FK' nda sadece sentral retinada, kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında anlamlı farklılığa rastlanıldı ($p<0,05$), deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı. Buna karşılık perifer retinada ise gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi.



Şekil 10: Yirmidördüncü saat retinal katman ölçümleri (µm).

Tablo 6: Yirmidördüncü saat retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.

	Sentral DNK	Sentral FK	Perifer DNK	Perifer FK
Kontrol	41.17±3.63	19.87±2.36	29.97±2.81	18.94±1.28
MNU	34.17±3.69	18.27±2.23	31.68±2.53	19.1±2.46
DDM	32.17±3.21	17.34±1.67	31.23±3.16	18.16±2.87
ODM	32.58±3.05	18.92±2.14	29.19±3.25	17.17±2.95
YDM	32.65±4.01	17.9±2.69	27.59±3.84	17.37±2.06

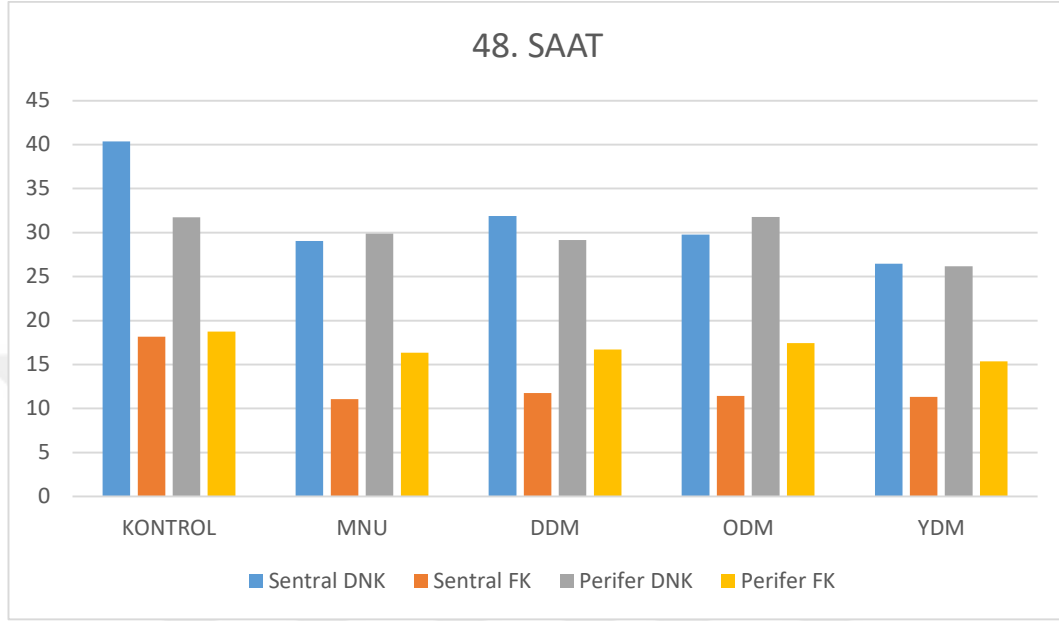


Şekil 11: Yirmidördüncü saat, sentral retina, deney gruplarında, DNK ve FK da, kontrol grubuyla kıyaslandığında görülen hafif derecede incelme (40X).

5.2.3. Kırksekizinci Saat Bulguları

Bu periyodun, sentral retina ve perifer retina, DNK ve FK ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları şekil-12 ve tablo-7 de verilmiştir. Bu ötenazi periyodunda, en dikkat çekici histopatolojik bulgunun, deney gruplarının tümünde, DNK ve FK' nın genel histolojik yapılarının bozulmasıyla karakterize şiddetli derecede karyoreksis tablosu olduğu görüldü. Özellikle DNK da yer alan fotoreseptör hücre çekirdeklerinin büyük çoğunluğunun parçalanması 48. saat için oldukça tipik olan bir görüntü oluşturdu (şekil 13). FK' nda yer alan fotoreseptör hücre gövde kısımlarının ise normal şartlarda uzun-ince, çizgisel tarzda ve açık pembe renkte olan görünümünün kaybolduğu ve hipereozinofilik bir görüntünün oluştuğu görüldü. İç nükleer katmanda (İNK) ise retinal glia hücrelerinin çekirdekçiklerinin deney grubu hayvanlarında, kontrol grubuna göre daha yoğun bazofilik boyandığı görüldü. Tedavi grupları da dahil MNU verilen tüm gruplarda bahsedilen bulgulara rastlanıldı. Tüm deney grubu hayvanların sentral retinalarında, DNK kalınlık ortalamalarının kontrol grubu ortalamalarına göre 10-14 µm civarında, FK kalınlık ortalamalarının ise 6-7 µm civarında azaldığı görüldü. Perifer retinada ise bu azalmanın her iki katmanda da 2-3 µm ile sınırlı kaldığı görüldü. Sentral retinada DNK kalınlık ortalamalarında, kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında ($p<0,05$), deney gruplarında ise, YDM grubu ile diğer deney grupları arasında anlamlı farklılığa rastlanıldı ($p<0,05$) ve deney grupları içerisinde yaklaşık 3 µm farkla en düşük ortalamaya YDM grubunun sahip olduğu görüldü. FK kalınlık ortalamalarında kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında ki farklılık ($p<0,05$) dışında anlamlı farklılığa rastlanılmadı. Perifer retinada ise, DNK ölçümlerinde sadece, ODM grup ortalamasının YDM grubundan yaklaşık 5

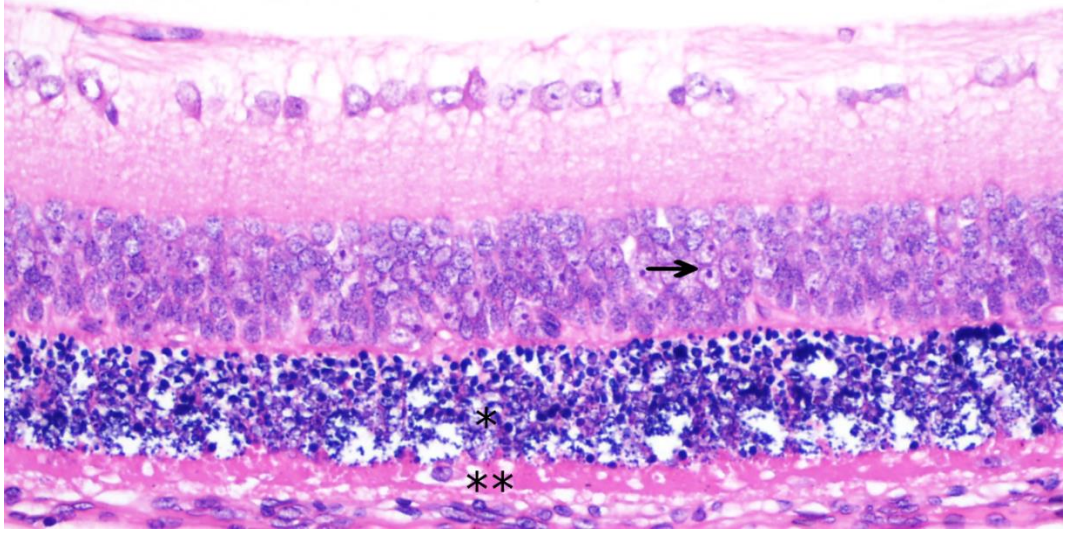
μm daha fazla olması, FK ölçümlerinde ise kontrol grup ortalamasının YDM grubundan yaklaşık 3 μm daha fazla olması anlamlı bulundu ($p<0,05$).



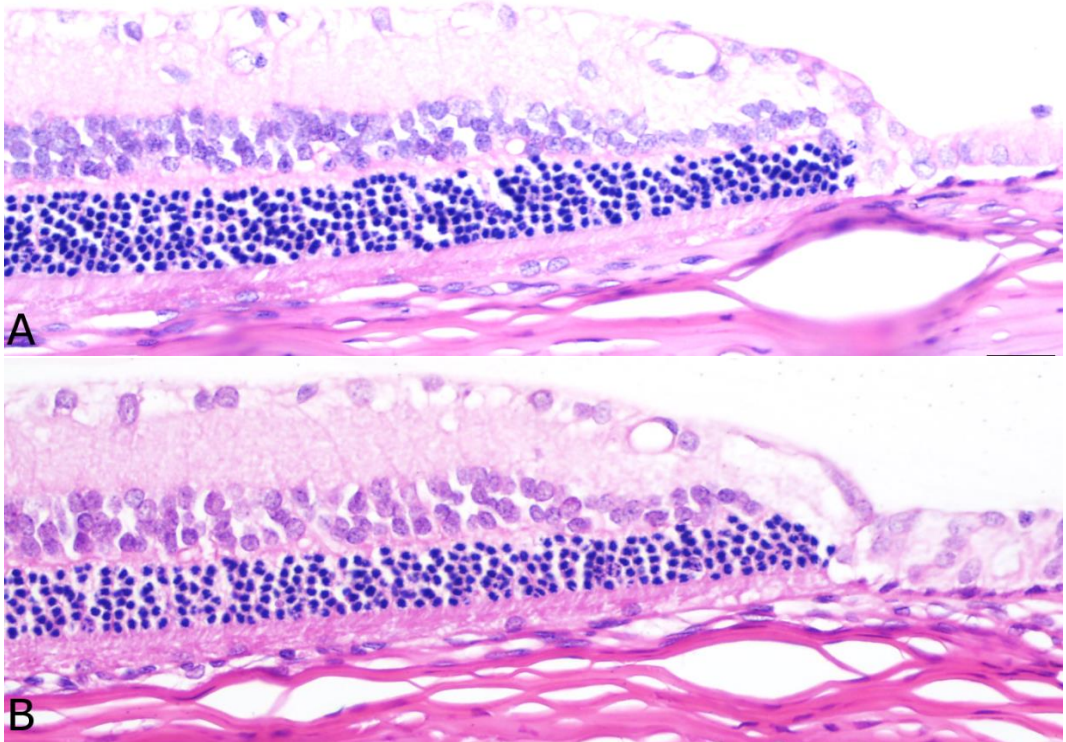
Şekil 12: Kırksekizinci saat retinal katman ölçümleri (μm).

Tablo 7: Kırksekizinci saat retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.

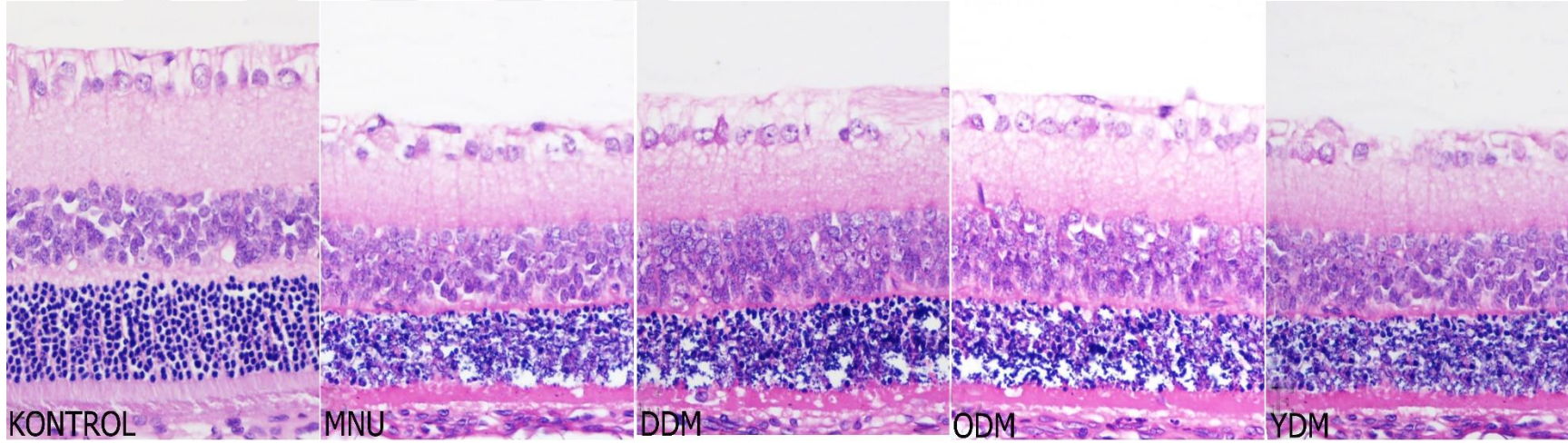
	Sentral DNK	Sentral FK	Perifer DNK	Perifer FK
Kontrol	40.36±3.93	18.16±1.96	31.73±2.54	18.76±1.86
MNU	29.03±2.76	11.06±2.68	29.89±5.58	16.33±2.99
DDM	31.9±2.6	11.77±2.33	29.16±5.02	16.7±3.07
ODM	29.78±3.78	11.44±1.94	31.79±2.22	17.45±2.53
YDM	26.47±2.63	11.32±1.16	26.16±2.62	15.37±2.79



Şekil 13: Kırksekizinci saatte DDM grubu, DNK' (*) da şiddetli karyoreksis, FK' (***) nda hipereozinofili ve İNK da, çekirdekçikleri belirginleşmiş retinal glia hücreleri (Ok). (40X).



Şekil 14: Kırksekizinci saate ait perifer retina görüntüleri; Kontrol Grubu (A) ve MNU Grubu (B) (40X).

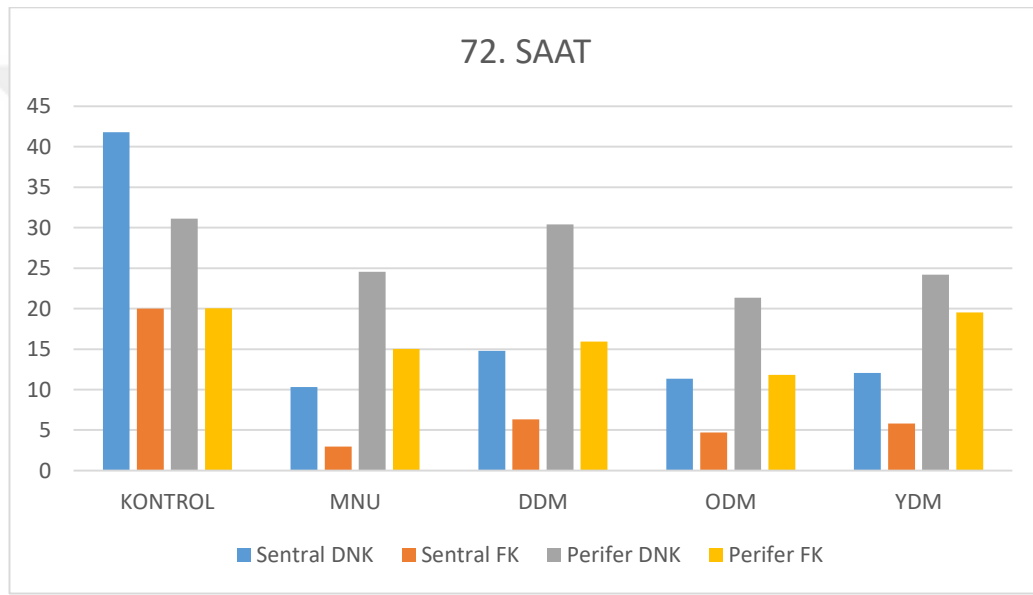


Şekil 15: Kırksekizinci saat, sentral retina, deney gruplarının tümünde, DNK ve FK da incelme, DNK da şiddetli karyoreksis ve FK da hipereozinoofili görülmektedir (40X).

5.2.4. Yetmişikinci Saat Bulguları

Bu periyodun, sentral retina ve perifer retina, DNK ve FK ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları şekil-16 ve tablo-8 de verilmiştir. Bu ötenazi periyodunda, en dikkat çekici histopatolojik bulgunun, 48. saatte parçalanmış fotoreseptör çekirdeklerinin ve gövde kısımlarının gözden silinmesiyle ortaya çıkan, ileri derecede, DNK ve FK incelmeleri olduğu görüldü. Tüm deney gruplarında, DNK ve FK'nda Müller hücreleri ve makrofajlardan oluşan hücreler infiltrasyonlara rastlandı (şekil 17). Bu infiltrasyonların en yoğun görüldüğü dönem 72. saat olarak kaydedildi. İNK' da daha fazla olmak kaydıyla, İNK ve DNK da yine tüm deney gruplarında mitoz gösteren hücrelere mevcuttu. Tüm deney grubu hayvanların sentral retinalarında, DNK kalınlık ortalamalarının kontrol grubu ortalamalarına göre 25-30 µm civarında, FK kalınlık ortalamalarının ise 14-16 µm civarında azaldığı görüldü. Perifer retinada ise bu azalmanın her iki katmanda da 5-9 µm ile sınırlı kaldığı görüldü. İncelmenin en fazla olduğu kısımlar optik sinire en yakın sentral retina kısımları olup, perifere doğru gidildikçe (optik sinirden her iki yöne doğru 1500-2000 µm) DNK ve FK'nın kalınlaşıp normale döndüğü görüldü (şekil 18). Ancak bu durumun istisnası olarak; MNU, ODM ve YDM gruplarına ait ötenazi edilen 4'er hayvandan, 1'er tanesinde perifer retinanın da ileri derecede etkilenerek incelendiği görüldü (şekil 20). Sentral retinada, hem DNK, hem de FK, kalınlık ortalamalarında, kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında anlamlı farklılığa rastlanıldı, deney gruplarındaki incelme anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise anlamlı farklılık görülmedi. Perifer retinada, DNK kalınlık ortalamalarında, kontrol grubuna göre, MNU, ODM ve YDM gruplarında ki düşüş anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile DDM grubu arasında anlamlı

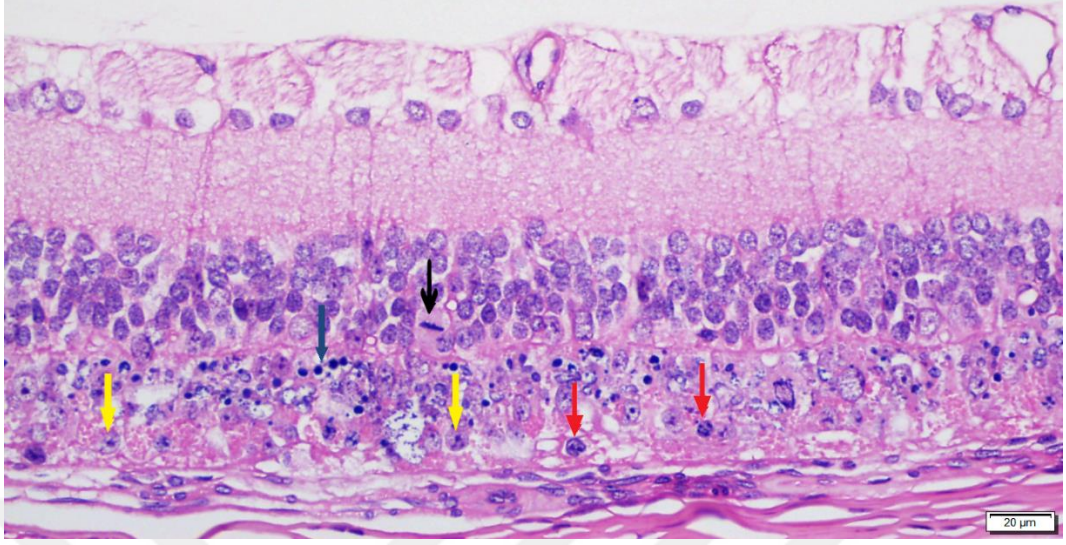
farklılık bulunmadı. Deney grupları arasında ise, DDM grup ortalamasının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). FK kalınlık ortalamalarında, yine kontrol grubuna göre, deney gruplarındaki düşüş anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise, ODM grup ortalamalarının diğer gruplara göre daha düşük olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).



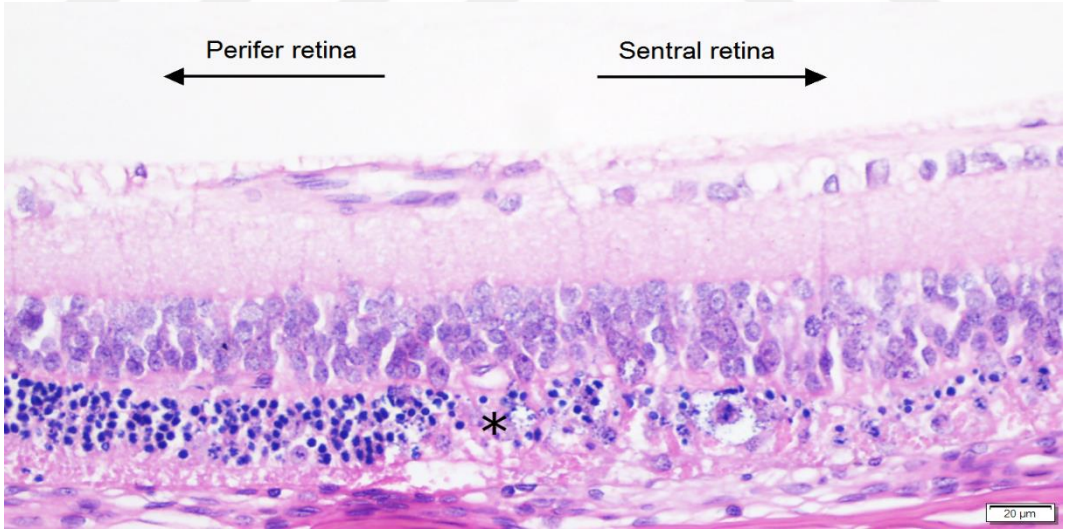
Şekil 16: Yetmişikinci saat retinal katman ölçümleri (μm).

Tablo 8: Yetmişikinci saat retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.

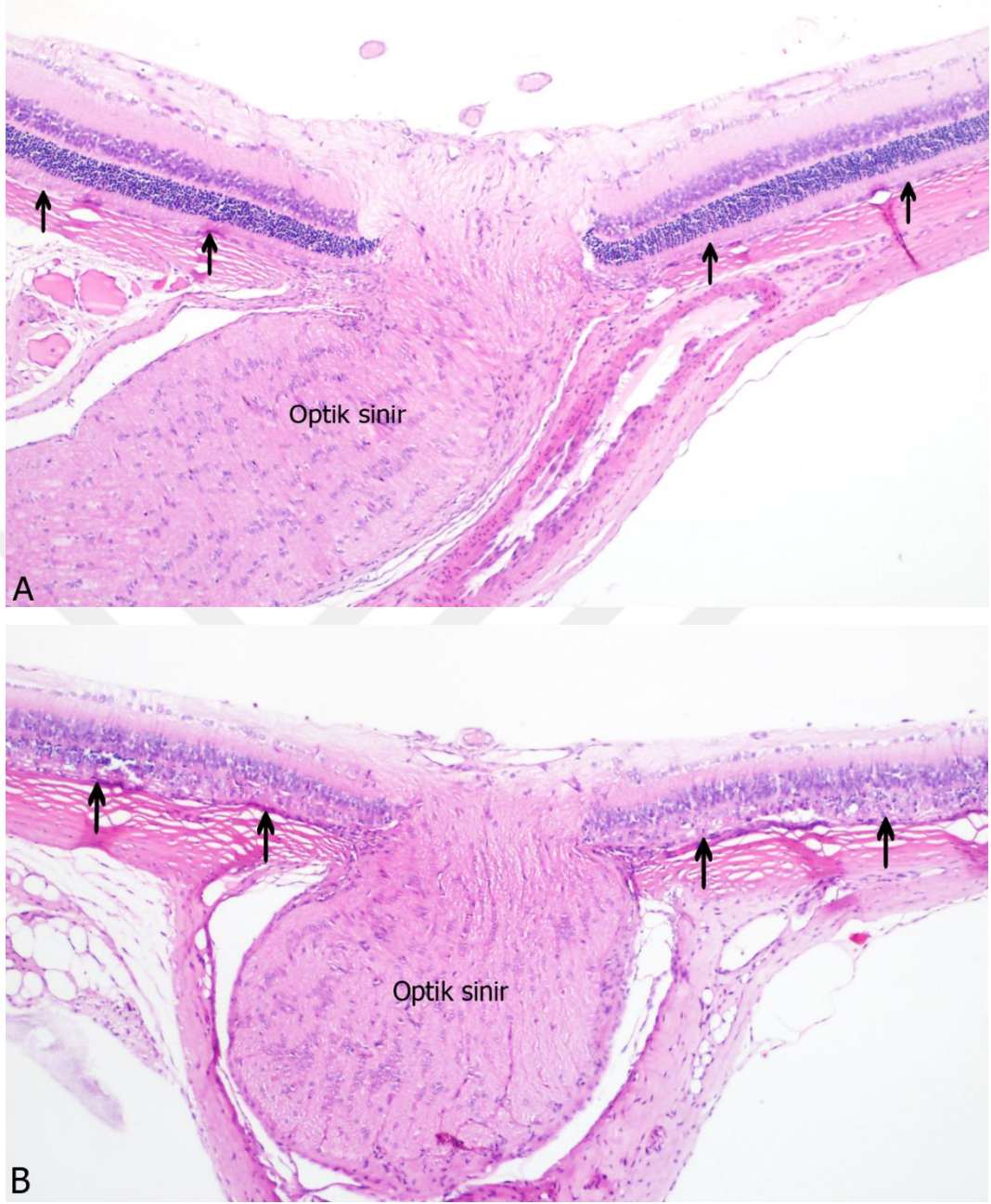
	Sentral DNK	Sentral FK	Perifer DNK	Perifer FK
Kontrol	41.79±1.83	20.01±1.99	31.11±3.35	20.06±2.02
MNU	10.31±9.27	2.96±5.37	24.56±4.56	15.03±3.35
DDM	14.8±11.2	6.33±6.31	30.38±3.29	15.91±1.62
ODM	11.33±7.39	4.7±5.98	21.34±9.11	11.83±4.97
YDM	12.07±8.44	5.79±5.37	24.19±7.66	13.24±3.04



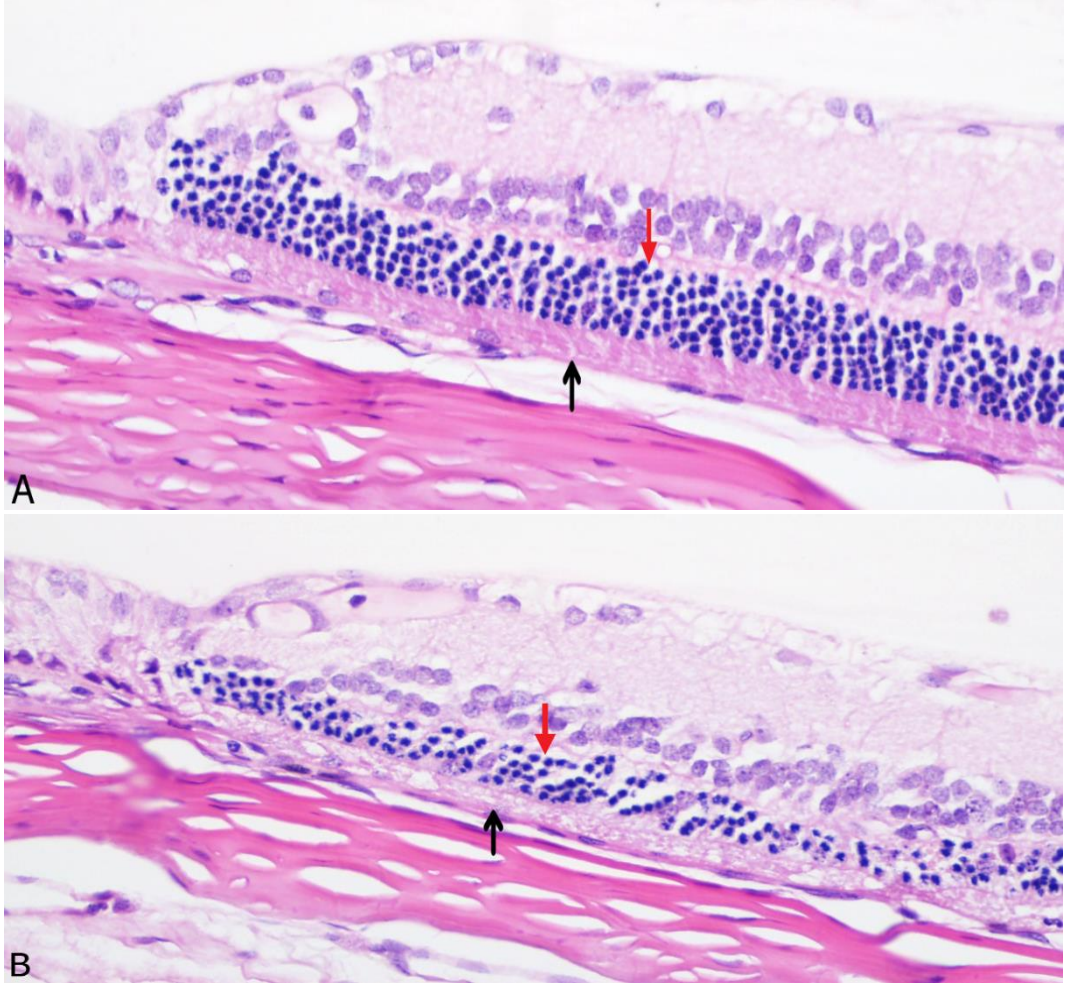
Şekil 17: Yetmişikinci saat, ODM grubu, **siyah ok;** mitoz gösteren Müller hücresi, **mavi ok;** sağ kalan fotoreseptör çekirdekleri, **kırmızı oklar;** DNK' ya göç etmiş makrofajlar, **sarı oklar;** DNK' ya göç etmiş Müller hücreleri.



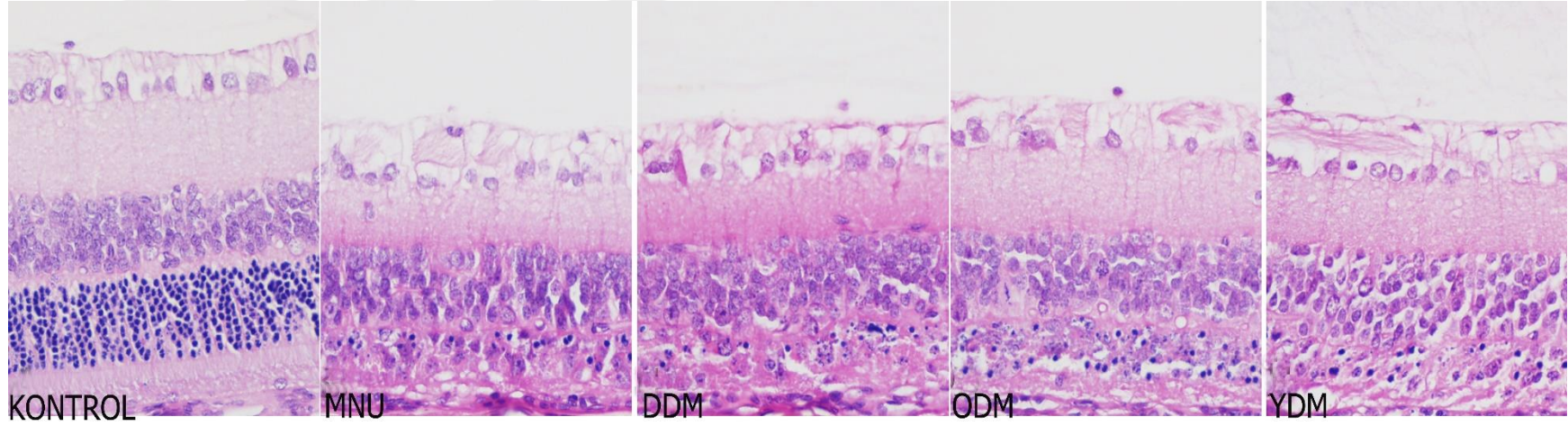
Şekil 18: Yetmişikinci saat, ODM grubu, sentralden perifere gidildikçe DNK ve FK da görülen normalleşme; (*) normalleşme başlangıç bölgesini göstermektedir.



Şekil 19: Yetmişikinci saat, optik sinire yakın bölgelerde DNK ve FK daki genel görünüm; **A:** Kontrol Grubu, normal görünüm, **B:** YDM Grubu, DNK ve FK da inceleme. **Oklar,** FK ve DNK yı göstermektedir (10X).



Şekil 20: Yetmişikinci saat, **ODM** grubu iki farklı hayvana ait perifer retina görüntüleri **A:** Birinci hayvan, perifer retinası iyi korunmuş, **B:** İkinci hayvan, perifer retina ciddi ölçüde etkilenmiş. **Siyah oklar** FK' yı, **kırmızı oklar** DNK' yı göstermektedir (40X).

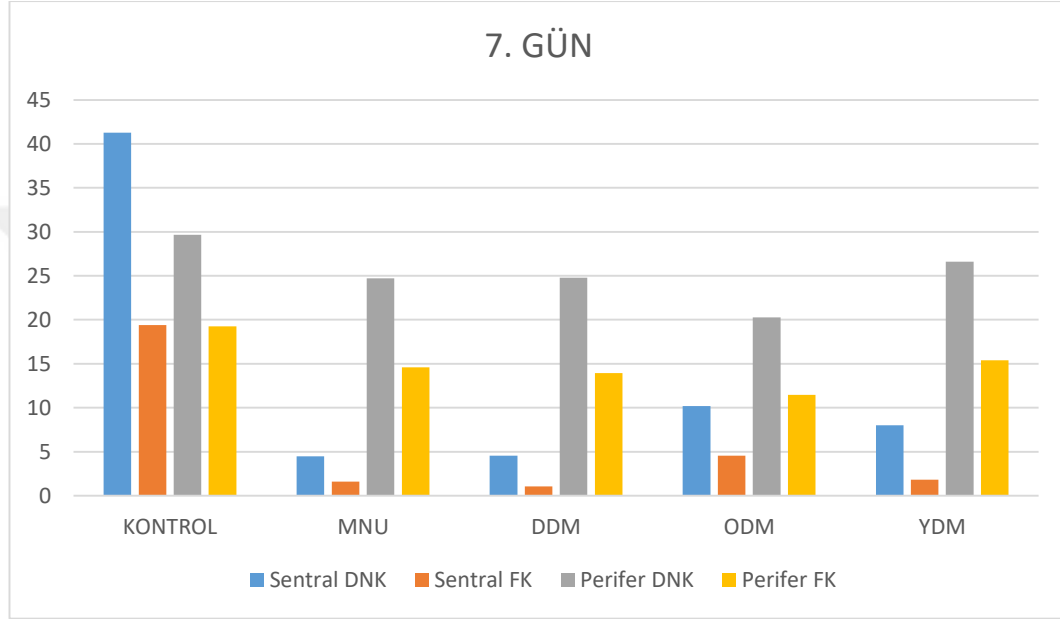


Şekil 21: Yetmişikinci saat, sentral retina, deney gruplarının tümünde, DNK ve FK da ileri derecede incelme, (40X).

5.2.5. Yedinci Gün Bulguları

Bu periyodun, sentral retina ve perifer retina, DNK ve FK ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları şekil-22 ve tablo-9 da verilmiştir. Bu ötenazi periyodunda, deney grubu hayvanlarında, 72. saatte en belirgin olarak ortaya çıkan, DNK ve FK incelmesinin ilerleyerek devam ettiği ve artık bu katmanların neredeyse gözden silinecek aşamaya geldiği görüldü. Özellikle, DNK da yer alan fotoreseptör hücre çekirdeklerinin büyük çoğunluğunun ölmesi ve ortadan kaldırılmasıyla deney gruplarında bu katmanın ileri derecede incelendiği, bazı hayvanlarda, retinanın bazı bölgelerinde tamamen yok olduğu dikkati çekti. Benzer şekilde FK' nda da ileri derecede incelmeye ve bazı bölgelerde tamamen gözden silinmeye rastlanıldı. Tüm deney gruplarında, 72. saatte en belirgin olarak gözlenen, DNK ve FK da, Müller hücreleri ve makrofaj infiltrasyonlarına, 7. gün de de rastlanıldı, ancak bu periyotta Müller hücrelerinin sayısının oldukça azaldığı, makrofajların sayılarının ise arttığı görüldü (şekil 23). Yine, İNK ve DNK da 72. saatte en iyi gözlenen, mitoz gösteren hücrelere daha az olmak kaydıyla 7. günde de rastlanıldı. Tüm deney grubu hayvanların sentral retinalarında, DNK kalınlık ortalamalarının kontrol grubu ortalamalarına göre 30-35 µm civarında, FK kalınlık ortalamalarının ise 15-17 µm civarında azaldığı görüldü. Perifer retinada ise bu azalma her iki katmanda da 5-9 µm ile sınırlı kaldığı görüldü. İncelmenin en fazla olduğu kısımlar optik sinire en yakın sentral retina kısımları olup, perifere doğru gidildikçe (optik sinirden her iki yöne doğru 1500-2000 µm) DNK ve FK' nın kalınlaşıp normale döndüğü görüldü (şekil 24). Ancak bu durumun istisnası olarak; MNU ve ODM gruplarına ait ötenazi edilen 4' er hayvandan, 1' er tanesinde perifer retinanın da ileri derecede etkilenerek incelendiği görüldü. Sentral ve perifer retinada,

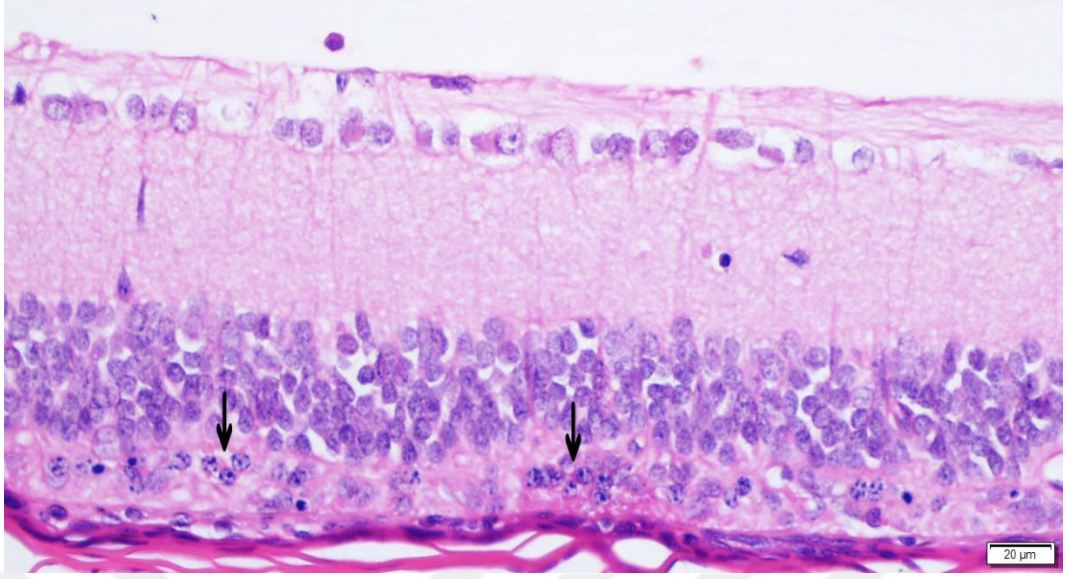
hem DNK, hem de FK kalınlık ortalamalarında, kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında anlamlı farklılığa rastlanıldı, deney gruplarındaki incelleme anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise anlamlı farklılık görülmedi.



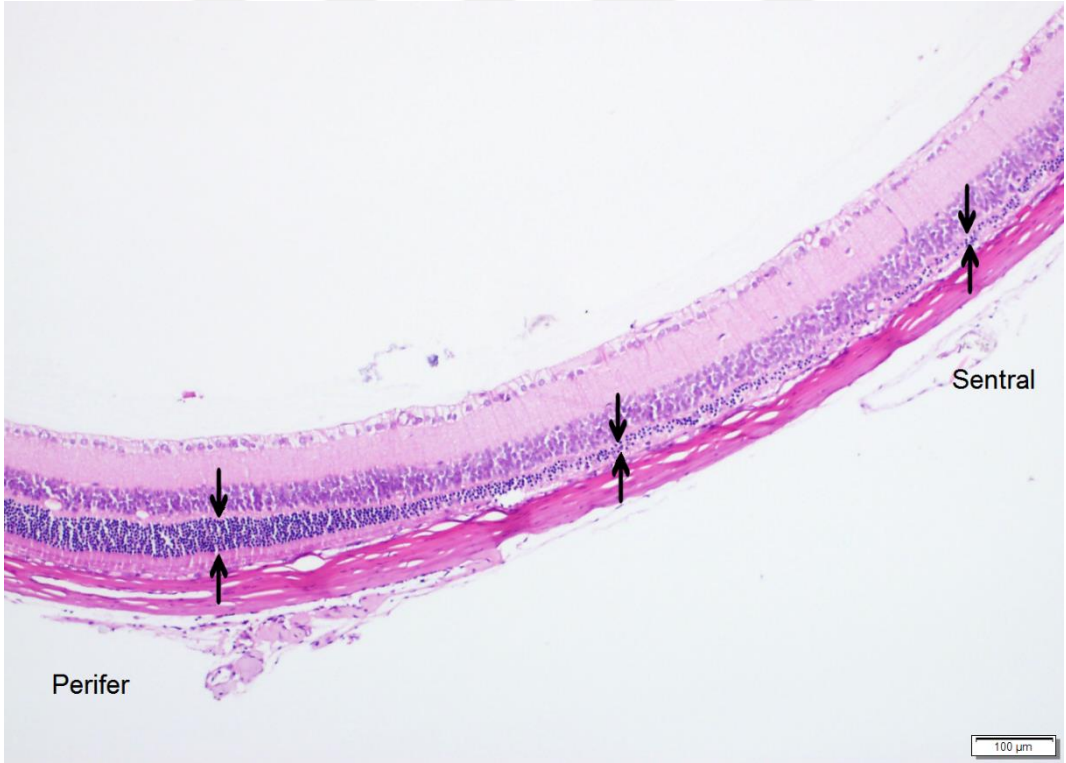
Şekil 22: Yedinci gün retinal katman ölçümleri (µm).

Tablo 9: Yedinci gün retinal katman ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.

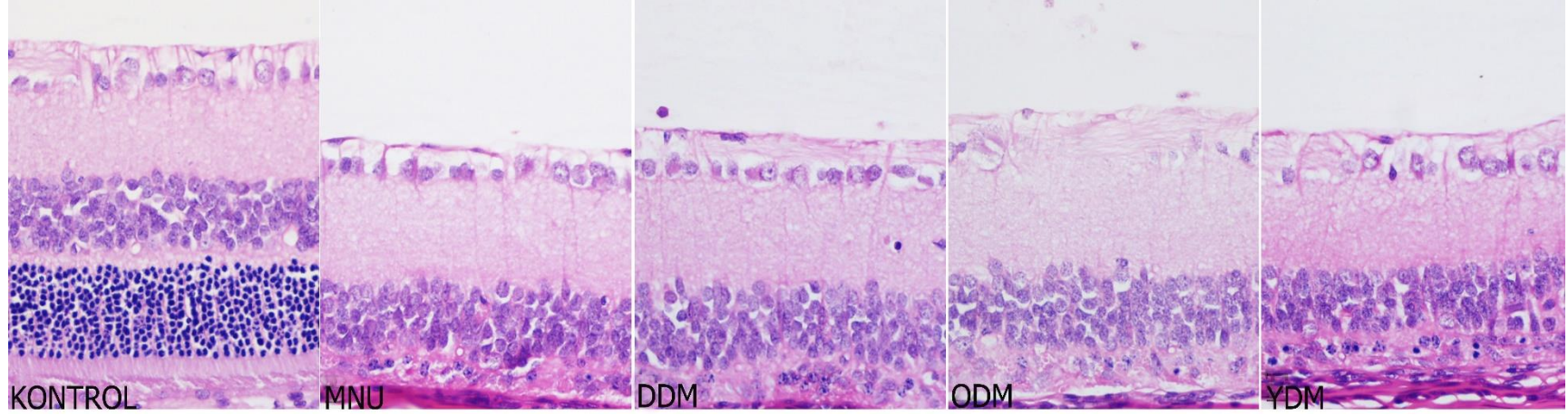
	Sentral DNK	Sentral FK	Perifer DNK	Perifer FK
Kontrol	41.27±1.41	19.4±1.32	29.67±1.36	19.24±1.6
MNU	4.48±5.17	1.59±5.08	24.72±5.89	14.61±4.78
DDM	4.53±9.06	1.04±3.71	24.8±10.9	13.93±5.28
ODM	10.19±11.02	4.53±7.37	20.29±10.36	11.47±6.51
YDM	8.02±7.68	1.81±4.3	26.6±9.16	15.4±6.46



Şekil 23: Yedinci gün, DDM grubu, DNK ve FK neredeyse tamamen gözden silinmiş durumda, **siyah oklar**; DNK ve FK' na göç etmiş makrofajları göstermektedir.



Şekil 24: Yedinci gün, MNU grubu, sentralden perifere gidildikçe DNK da görülen normalleşme, **oklar**; DNK' yı göstermektedir.



Şekil 25: Yedinci gün, sentral retina, deney gruplarının tümünde, DNK ve FK gözden silinmiş durumda (40X).

Tablo 10: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **sentral dış nükleer katman** kalınlıkları üzerine etkileri.

	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	41.82±2.60	41.17±3.63 ^A	40.36±3.93 ^A	41.79±1.83 ^A	41.27±1.41 ^A	0.386
MNU	39.88±2.23 ^a	34.17±3.69 ^{Bb}	29.03±2.76 ^{Cc}	10.31±9.27 ^{Bd}	4.48±5.17 ^{Be}	0.0001
DDM	40.48±4.00 ^a	32.17±3.21 ^{Bb}	31.90±2.60 ^{Bb}	14.80±11.20 ^{Bc}	4.53±9.06 ^{Bd}	0.0001
ODM	39.99±2.90 ^a	32.58±3.05 ^{Bb}	29.78±3.78 ^{BCb}	11.33±7.39 ^{Bc}	10.19±11.02 ^{Bc}	0.0001
YDM	41.33±3.10 ^a	32.65±4.01 ^{Bb}	26.47±2.63 ^{Dc}	12.07±8.44 ^{Bd}	8.02±7.68 ^{Bd}	0.0001
--P--*	0.118	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-D} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-e} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

Tablo 11: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **perifer dış nükleer katman** kalınlıkları üzerine etkileri.

	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	31.80±2.73	29.97±2.81 ^{AB}	31.73±2.54 ^A	31.11±3.35 ^A	29.67±1.36 ^A	0.072
MNU	31.75±2.81 ^a	31.68±2.53 ^{Aa}	29.89±5.58 ^{ABa}	24.56±4.56 ^{BCb}	24.72±5.89 ^{ABb}	0.0001
DDM	31.53±2.17 ^a	31.23±3.16 ^{Aa}	29.16±5.02 ^{ABab}	30.38±3.29 ^{ABab}	24.80±10.90 ^{ABb}	0.010
ODM	32.57±3.12 ^a	29.19±3.25 ^{ABa}	31.79±2.22 ^{Aa}	21.34±9.11 ^{Cb}	20.29±10.36 ^{Bb}	0.0001
YDM	32.87±2.79 ^a	27.59±3.84 ^{Bab}	26.16±2.62 ^{Bb}	24.19±7.66 ^{Cb}	26.60±9.16 ^{ABb}	0.001
--P--*	0.582	0.003	0.0001	0.0001	0.038	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-C} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-e} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

Tablo 12: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **sentral fotoreseptör katman** kalınlıkları üzerine etkileri.

	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	19.13±1.66 ^{Bab}	19.87±2.36 ^{Aa}	18.16±1.96 ^{Ab}	20.01±1.99 ^{Aa}	19.40±1.32 ^{Aab}	0.008
MNU	19.22±1.37 ^{Ba}	18.27±2.23 ^{ABa}	11.06±2.68 ^{Bb}	2.96±5.37 ^{Bc}	1.59±5.08 ^{Bc}	0.0001
DDM	19.95±2.86 ^{Ba}	17.34±1.67 ^{Ba}	11.77±2.33 ^{Bb}	6.33±6.31 ^{Bc}	1.04±3.71 ^{Bd}	0.0001
ODM	20.27±2.06 ^{ABa}	18.92±2.14 ^{ABa}	11.44±1.94 ^{Bb}	4.70±5.98 ^{Bc}	4.53±7.37 ^{Bc}	0.0001
YDM	21.54±1.25 ^{Aa}	17.90±2.69 ^b	11.32±1.16 ^{Bc}	5.79±5.37 ^{Bd}	1.81±4.30 ^{Be}	0.0001
--P--*	0.0001	0.002	0.0001	0.0001	0.0001	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-e} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

Tablo 13: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **perifer fotoreseptör katman** kalınlıkları üzerine etkileri.

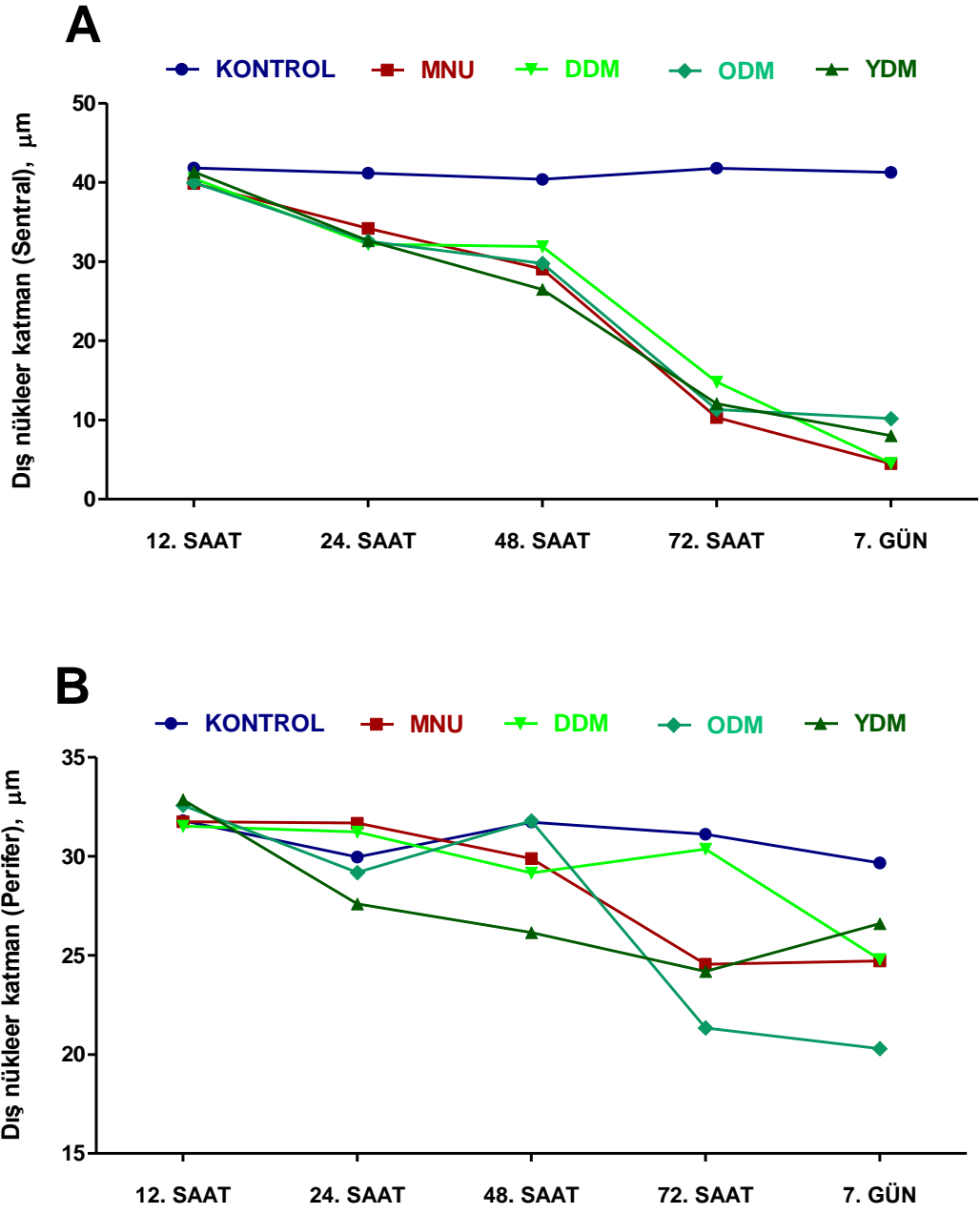
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	19.50±2.06	18.94±1.28	18.76±1.86 ^A	20.06±2.02 ^A	19.24±1.60 ^A	0.276
MNU	20.40±1.25 ^a	19.10±2.46 ^{ab}	16.33±2.99 ^{ABbc}	15.03±3.35 ^{Bc}	14.61±4.78 ^{ABc}	0.0001
DDM	19.43±4.11 ^a	18.16±2.87 ^a	16.70±3.07 ^{ABab}	15.91±1.62 ^{Bab}	13.93±5.28 ^{Bb}	0.001
ODM	19.76±1.83 ^a	17.17±2.95 ^a	17.45±2.53 ^{ABa}	11.83±4.97 ^{Cb}	11.47±6.51 ^{Bb}	0.0001
YDM	19.53±2.73 ^a	17.37±2.06 ^{ab}	15.37±2.79 ^{Bbc}	13.24±3.04 ^{BCbc}	15.40±6.46 ^{ABc}	0.0001
--P--*	0.826	0.083	0.010	0.0001	0.002	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

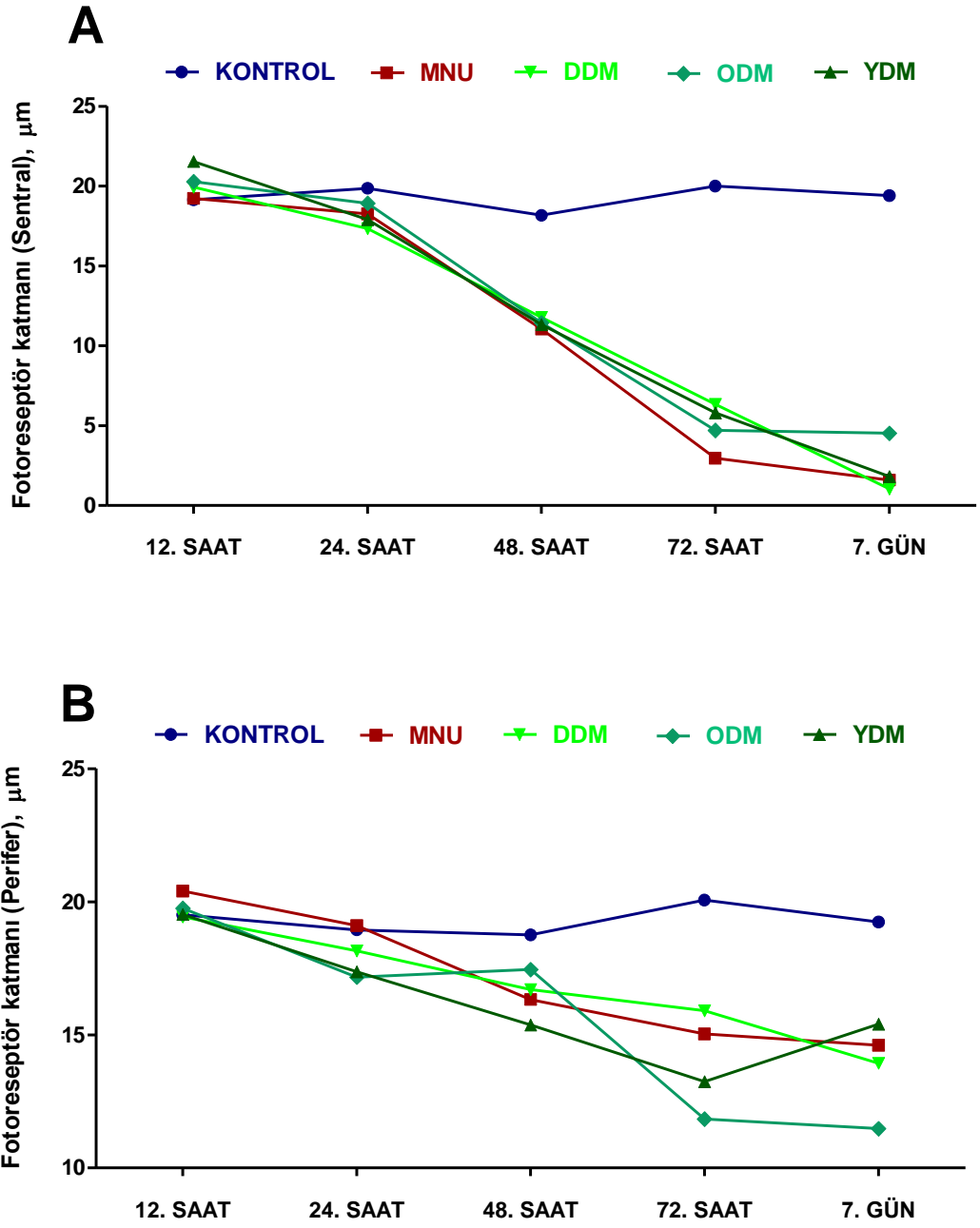
* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-c} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

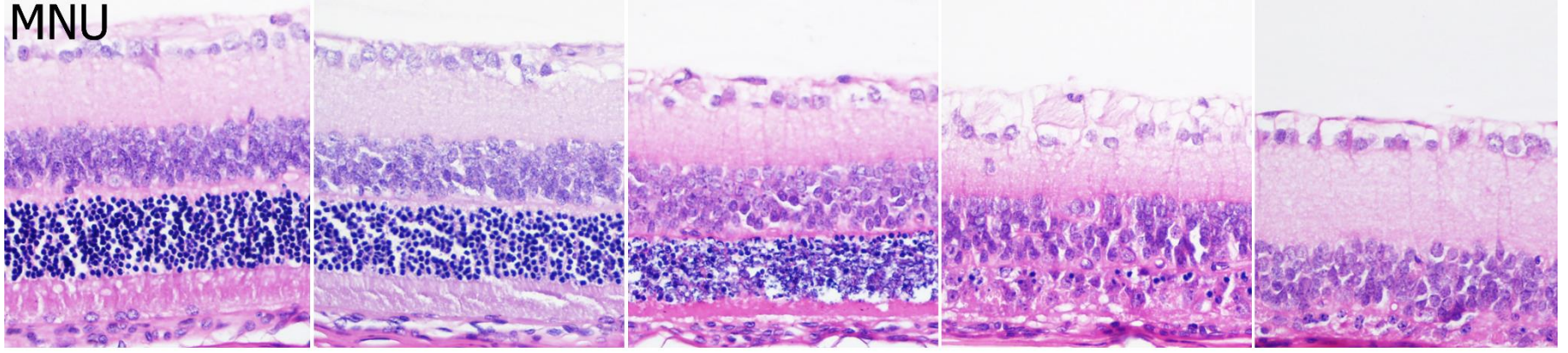


Şekil 26: Sıçanlarda N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin sentral (A) ve perifer (B) dış nükleer katman kalınlıkları üzerine etkileri.



Şekil 27: Sıçanlarda N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin sentral (A) ve perifer (B) fotoreseptör katman kalınlıkları üzerine etkileri.

MNU



12. SAAT

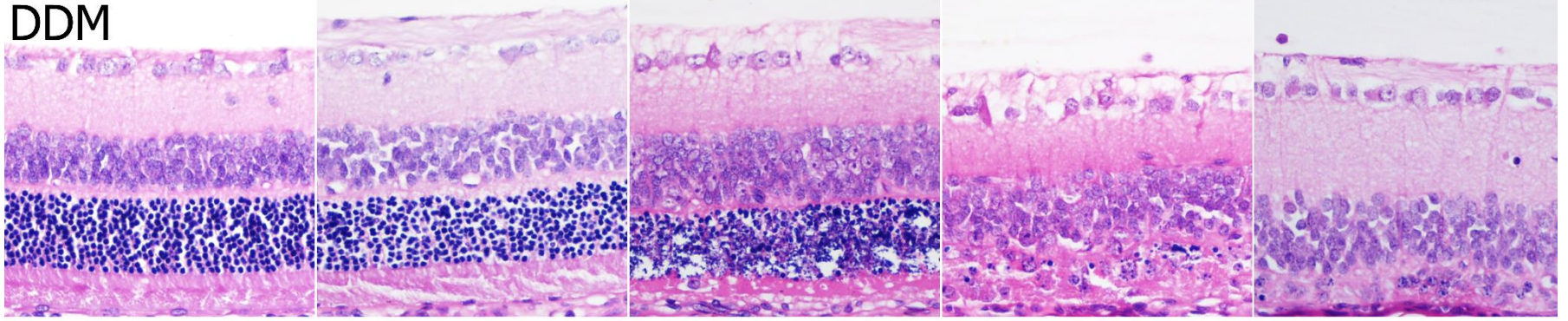
24. SAAT

48. SAAT

72. SAAT

7.GÜN

DDM



12. SAAT

24. SAAT

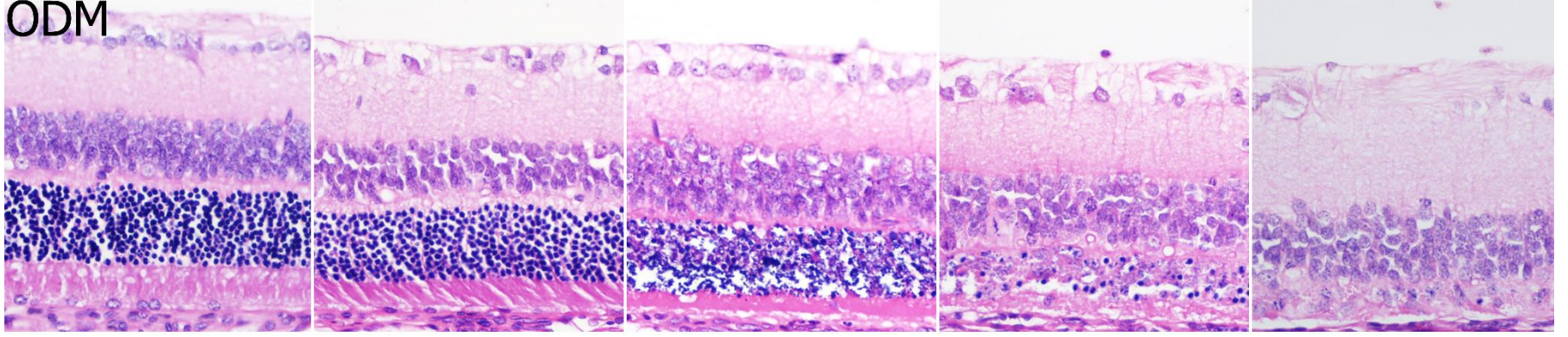
48. SAAT

72. SAAT

7.GÜN

Şekil 28: MNU ve DDM gruplarının sentral retinalarının zamana bağlı olarak değişimleri (40X).

ODM



12. SAAT

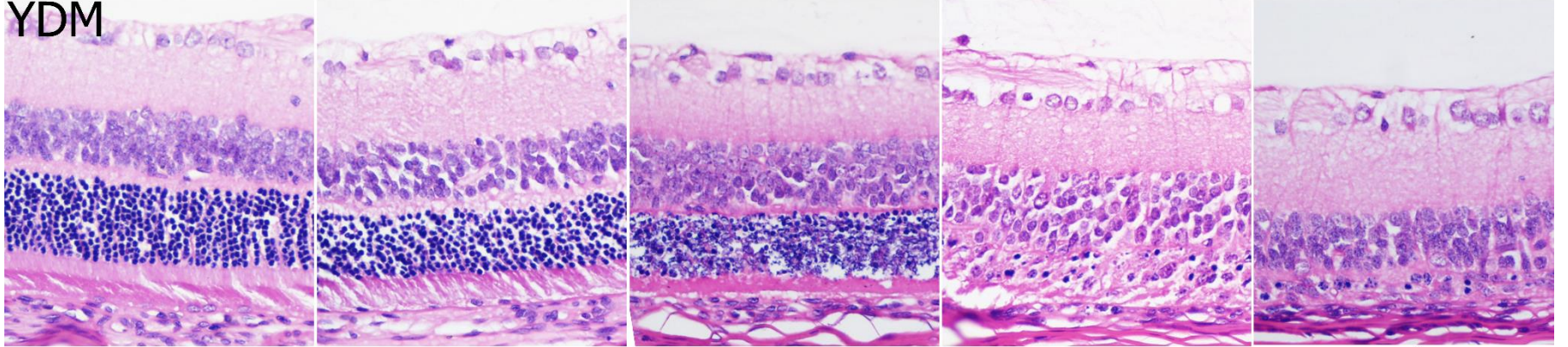
24. SAAT

48. SAAT

72. SAAT

7.GÜN

YDM



12. SAAT

24. SAAT

48. SAAT

72. SAAT

7.GÜN

Şekil 29: ODM ve YDM gruplarının sentral retinalarının zamana bağlı olarak değişimleri (40X).

5.3. TUNEL Bulguları

Kontrol ve deney grubu hayvanların retinalarında TUNEL boyama sonucu elde edilen verilerle ortaya konan apoptotik indeksler tablo 9 da verilmiştir. Kontrol grubu hayvanların retinalarında, tüm periyotlarda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında ise tüm periyotlarda, değişen derecelerde pozitiflik mevcuttu (Şekil 31, 32, 33). Pozitifliklerin sadece, retinanın dış nükleer katmanında (DNK) yer alan fotoreseptör hücre çekirdeklerinde olduğu görüldü. Sentralden perifere doğru gidildikçe pozitifliğin azaldığı, optik sinirden yaklaşık 1500-2000 µm uzaklıkta ise artık tamamen son bulunduğu görüldü (şekil 34). Diğer katmanlarda pozitifliğe rastlanılmadı.

Onikinci saatte ötenazi edilen deney grubu hayvanlarının DNK larında, %9-10 civarlarında pozitifliğe rastlanıldı ve en yüksek pozitifliğin %10,05 ile MNU grubunda, en düşük pozitifliğin ise %9,80 ile DDM grubunda olduğu görüldü. Deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık görülmedi, kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık ise anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Yirmidördüncü saatte ötenazi edilen deney grubu hayvanlarının DNK larında, 12. saate göre, pozitif hücre sayısının ve boyanma şiddetinin arttığı görüldü ve %33-35 civarlarında pozitifliğe rastlanıldı. En yüksek pozitifliğin %35,78 ile DDM grubunda, en düşük pozitifliğin ise %33,87 ile ODM grubunda olduğu tespit edildi. Deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık görülmedi, kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık ise anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Kırksekizinci saatte ötenazi edilen deney grubu hayvanlarının DNK larında, 24. saate göre, pozitif hücre sayısının ve boyanma şiddetinin arttığı görüldü ve %90-93 civarlarında pozitifliğe rastlanıldı. En yüksek pozitifliğin %93,61 ile

YDM grubunda, en düşük pozitifliğin ise %90,39 ile ODM grubunda olduğu tespit edildi. Apoptotik indeksin en yüksek seviyeye çıktığı periyod 48. saat olarak kaydedildi. Diğer saat dilimlerinde, DNK da ki pozitif fotoreseptör hücre çekirdekleri, sınırları belirgin ve boyanmayan hücrelerden net bir şekilde ayırt edilebilir bir boyanma gösterirken, 48. saatte, DNK' ın bir bütün olarak, seçici bir şekilde, koyu sarı/kahverengi boyandığı görüldü. Deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık görülmedi, kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık ise anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Yetmişikinci saatte ötenazi edilen deney grubu hayvanlarının DNK larında, % 14-15 civarlarında pozitifliğe rastlanıldı. En yüksek pozitifliğin %15,63 ile ODM grubunda, en düşük pozitifliğin ise %14,9 ile DDM grubunda olduğu görüldü. Kırksekizinci saatte en yüksek seviyeye çıkan pozitifliğin, sağ kalan hücre sayısının da oldukça azalmasına bağlı olarak ciddi oranda düştüğü görüldü. Bu saat diliminde de, DNK da, 48. saatte olduğu gibi, ancak çok daha hafif şiddette katmansal boyanma gözlemlendi. Deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık görülmedi, kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık ise anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Yedinci günde ötenazi edilen deney grubu hayvanlarının DNK larında, % 10-12 civarlarında pozitifliğe rastlanıldı. En yüksek pozitifliğin %12,23 ile MNU grubunda, en düşük pozitifliğin ise %10,18 ile YDM grubunda olduğu görüldü ve bu iki deney grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık da anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Tablo 14: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, retinada **apoptotik indeks** üzerine etkileri.

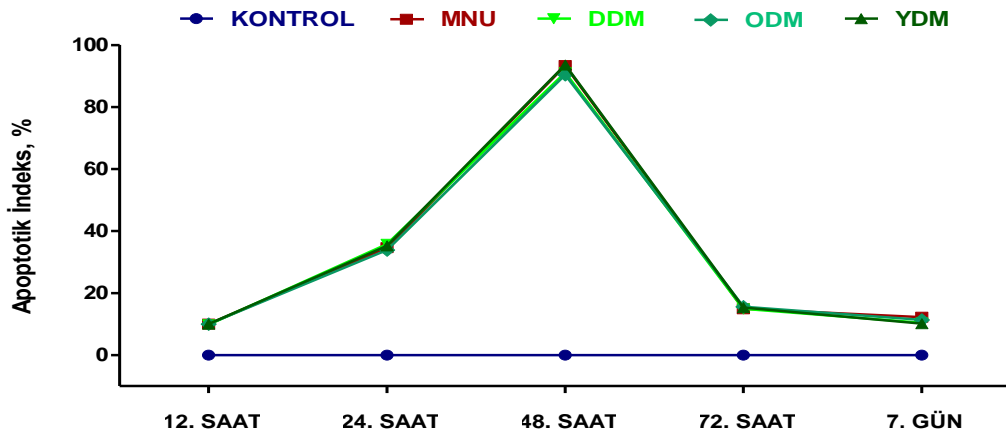
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^C	-
MNU	10.05±1.66 ^{Ad}	34.61±3.72 ^{Ab}	93.37±4.29 ^{Aa}	14.92±1.41 ^{Ac}	12.23±1.17 ^{AcD}	0.0001
DDM	9.80±1.66 ^{Ad}	35.78±1.76 ^{Ab}	91.07±6.11 ^{Aa}	14.90±1.06 ^{Ac}	10.42±1.84 ^{ABd}	0.0001
ODM	10.01±1.52 ^{Ad}	33.87±2.09 ^{Ab}	90.39±4.41 ^{Aa}	15.63±1.04 ^{Ac}	11.33±1.48 ^{ABd}	0.0001
YDM	10.03±1.24 ^{Ad}	35.22±1.15 ^{Ab}	93.61±4.01 ^{Aa}	15.34±0.80 ^{Ac}	10.18±1.80 ^{Bd}	0.0001
--P--*	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

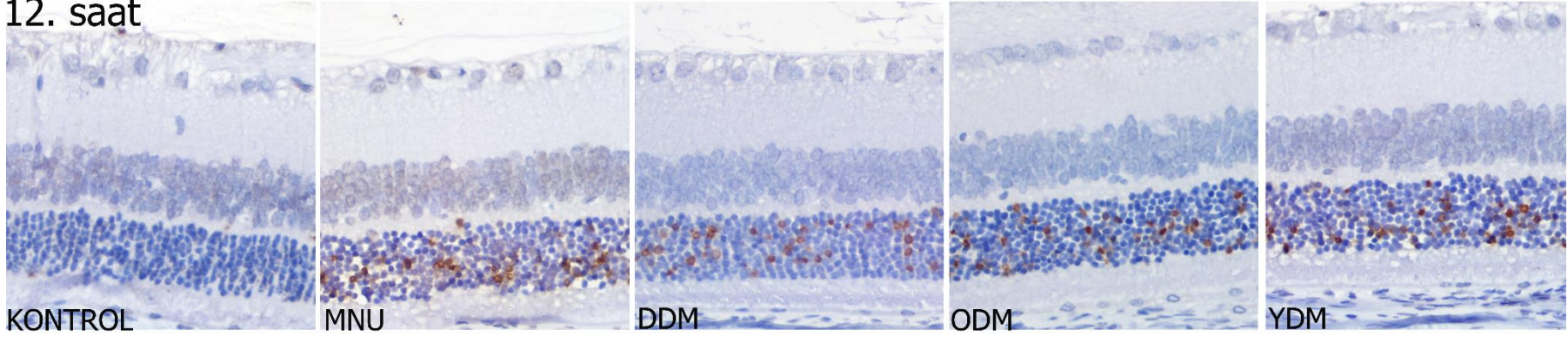
^{A-C} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-d} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

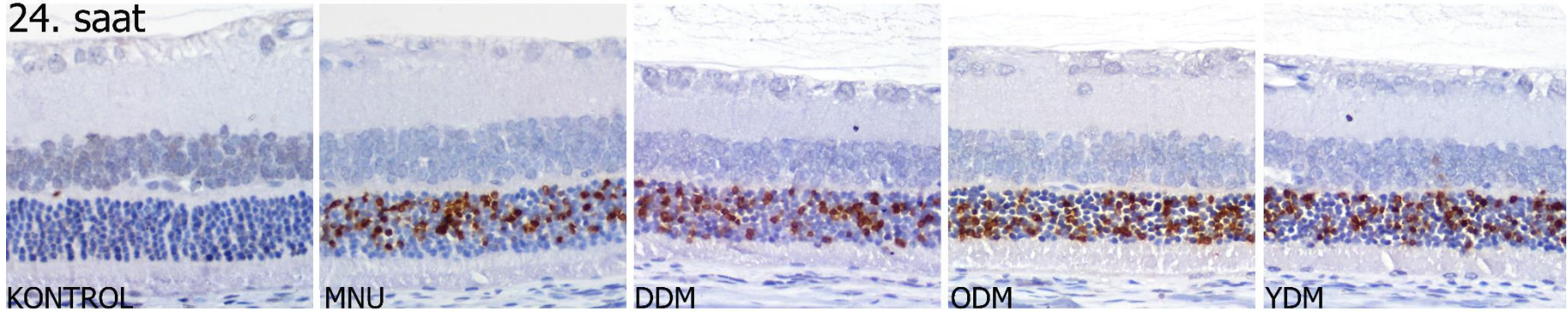


Şekil 30: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin retinada **apoptotik indeks** üzerine etkileri.

12. saat

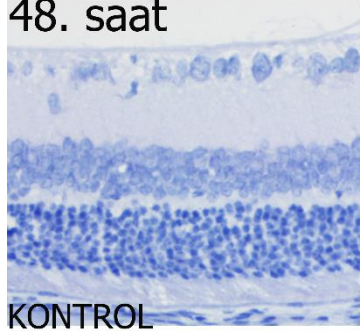


24. saat

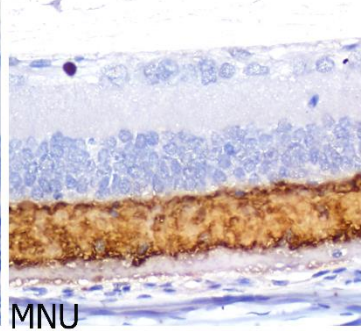


Şekil 31: Onikinci ve 24. saatlerde kontrol grubu ve deney gruplarında TUNEL boyama görüntüleri; kontrol grubu dışında kalan gruplarda DNK da pozitiflikler (kahverengi boyanan hücreler) görülmektedir (40X).

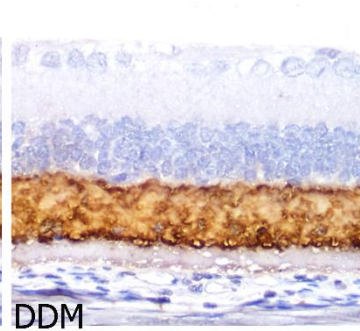
48. saat



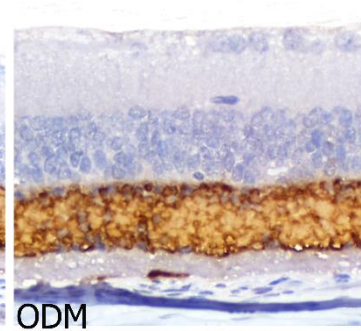
KONTROL



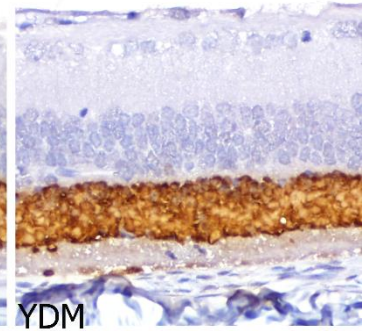
MNU



DDM

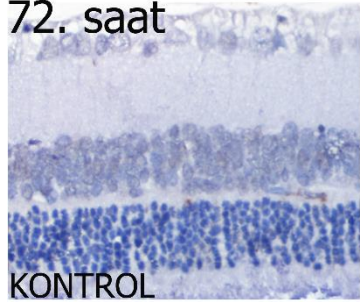


ODM

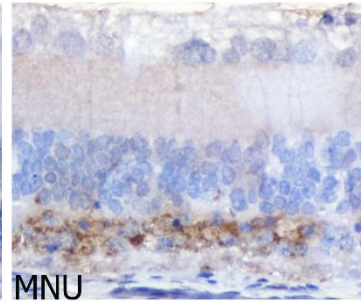


YDM

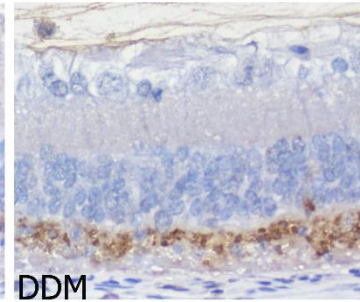
72. saat



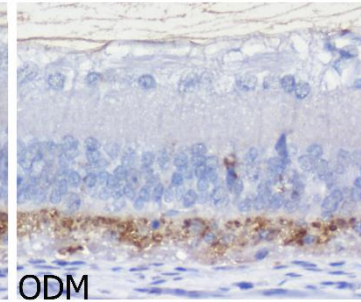
KONTROL



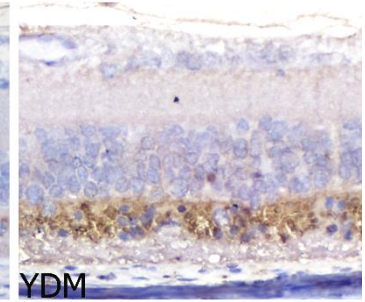
MNU



DDM

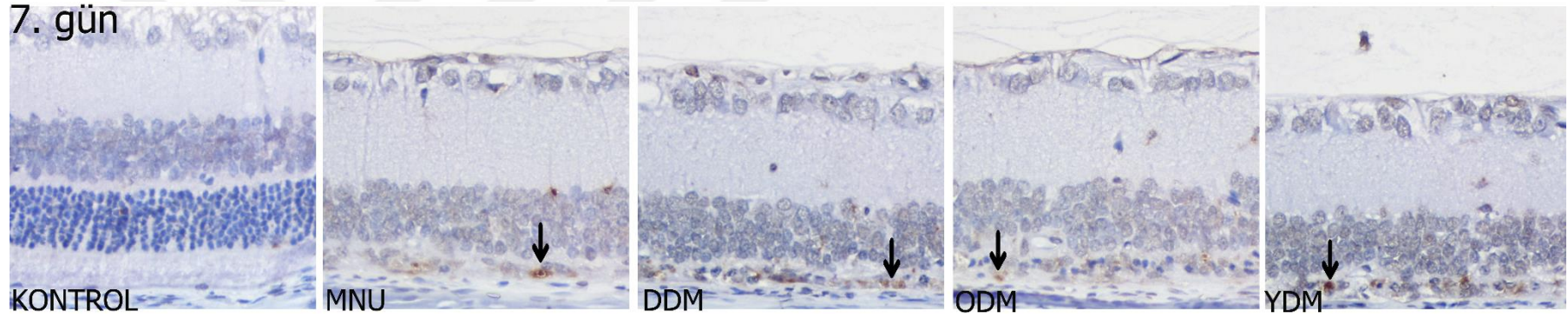


ODM

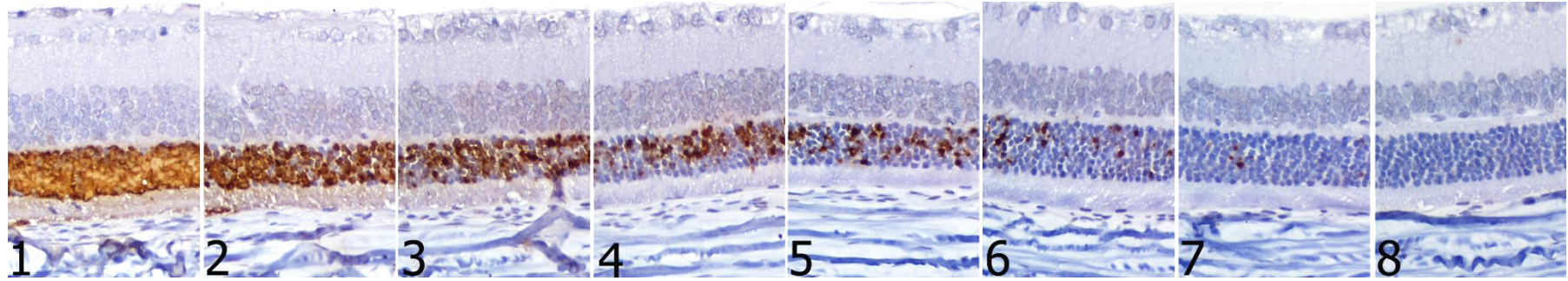


YDM

Şekil 32: Kırksekizinci ve 72. saatlerde kontrol grubu ve deney gruplarında TUNEL boyama görüntüleri; kontrol grubu dışında kalan gruplarda DNK da katmansal tarzda boyanma görülmektedir (40X).



Şekil 33: Yedinci günde kontrol grubu ve deney gruplarında TUNEL boyama görüntüleri; kontrol grubu dışında kalan gruplarda DNK da tek-tük pozitiflikler (oklar) görülmektedir (40X).



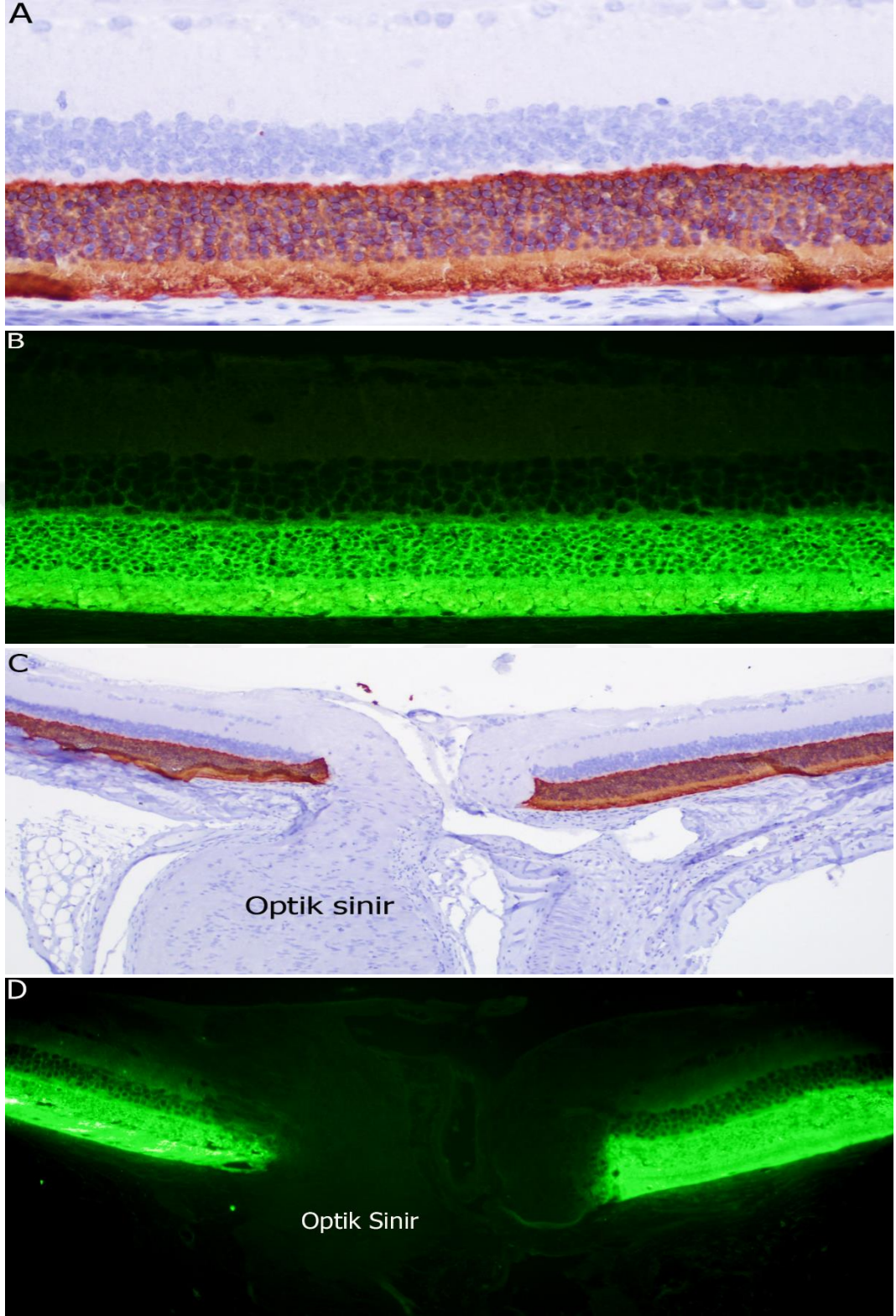
Şekil 34: Kırksekizinci saatte YDM grubunda sentralden-perifere (1-8) gidildikçe azalan TUNEL pozitifliği; fotoğraflar optik sinire, 250 µm mesafede başlanarak 250 µm aralıklarla çekildi (40X).

5.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

5.4.1. Onikinci Saat Bulguları

5.4.1.1. Rodopsin

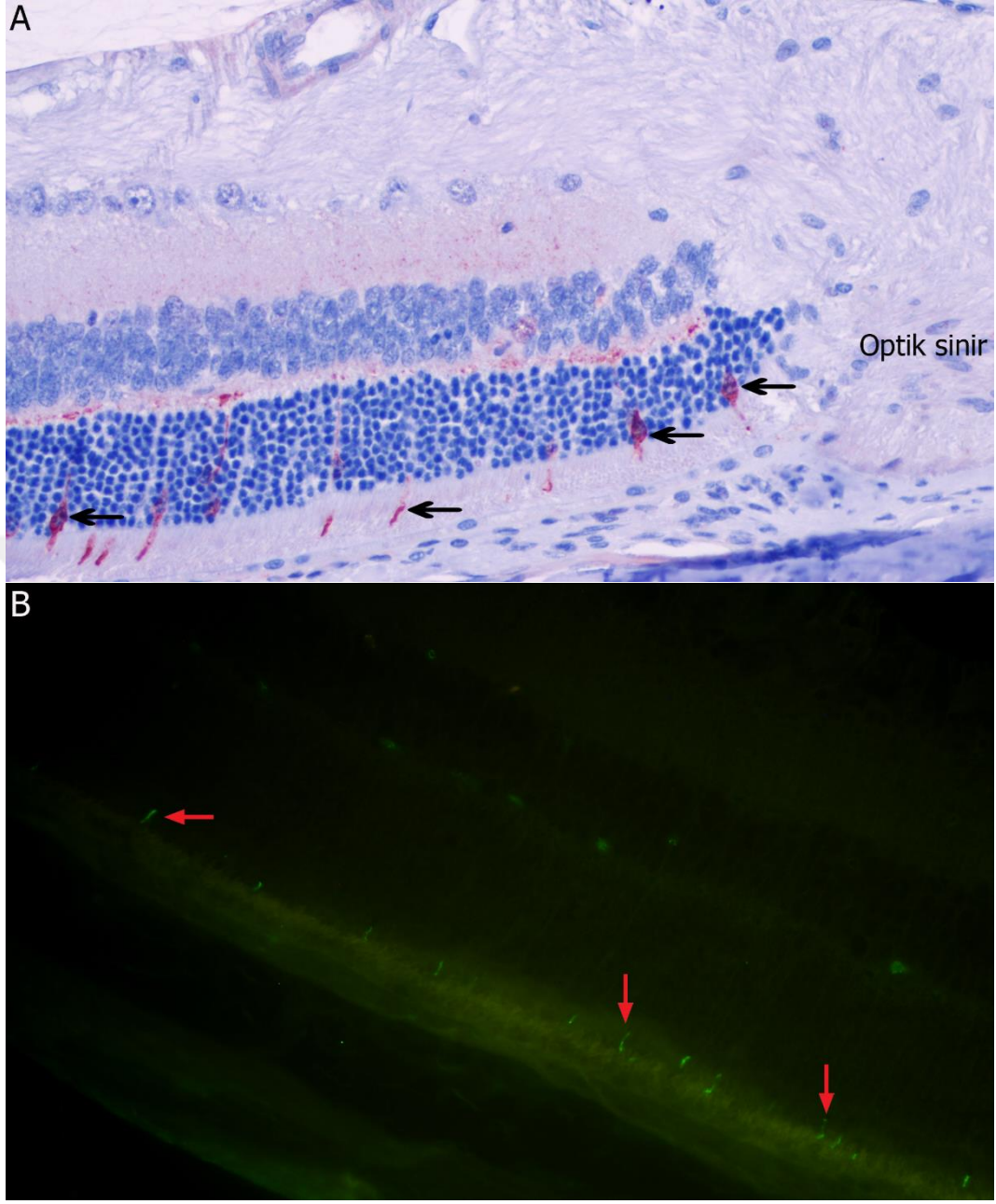
Rodopsinin, 12. saat immunperoksidaz (İP) boyamalarında, dış nükleer katman (DNK) ve fotoreseptör katmanı (FK) nın da yaygın ve şiddetli pozitiflikler tespit edildi. Pozitifliklerin intrastoplazmik olduğu, hücre çekirdeklerinin boyanmadığı görüldü. Sentral retina ile perifer retina arasında fark görülmedi ve iki bölgeninde yoğun bir şekilde boyandığı görüldü. İmmunflorasan (İF) boyamada da benzer bulgular elde edildi ve İP boyama ile farka rastlanılmadı (şekil 35). Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 15 te sunuldu.



Şekil 35: Onikinci saat rodopsin İP (A, C) ve İF (B, D) boyama, kontrol grubu, DNK ve FK' nda yoğun pozitiflikler, (A,B: 40X, C,D: 10X).

5.4.1.2. Red/Green Opsin (Uzun ve Orta Dalga Boyu Hassas Opsin)

Red/green opsinin, 12. saat, İP boyamalarında; DNK, FK ve dış pleksiform katman (DPK) da seyrek ama şiddetli pozitifliklerin olduğu görüldü. Pozitifliklerin intrastoplazmik olduğu, hücre çekirdeklerinin boyanmadığı tespit edildi. Boyanmaların, koni reseptörlerin anatomik yapısına uygun olarak, FK' da uzun ince tarzda başlayıp, DNK' da, fotoreseptör çekirdeği çevresinde biraz daha kalınlaştığı ve DNK bitiminde, DPK da sonlandığı görüldü (şekil 36). Koni reseptörler, çubuk reseptörlere nazaran çok daha az sayıda buldukları için, pozitifliklere, sentral retinada ortalama, 15-20 µm de bir tane, perifer retinada ise 30-40 µm de bir tane olacak şekilde rastlanıldı. İF boyamada da benzer bulgular elde edildi. Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 16 da sunuldu.



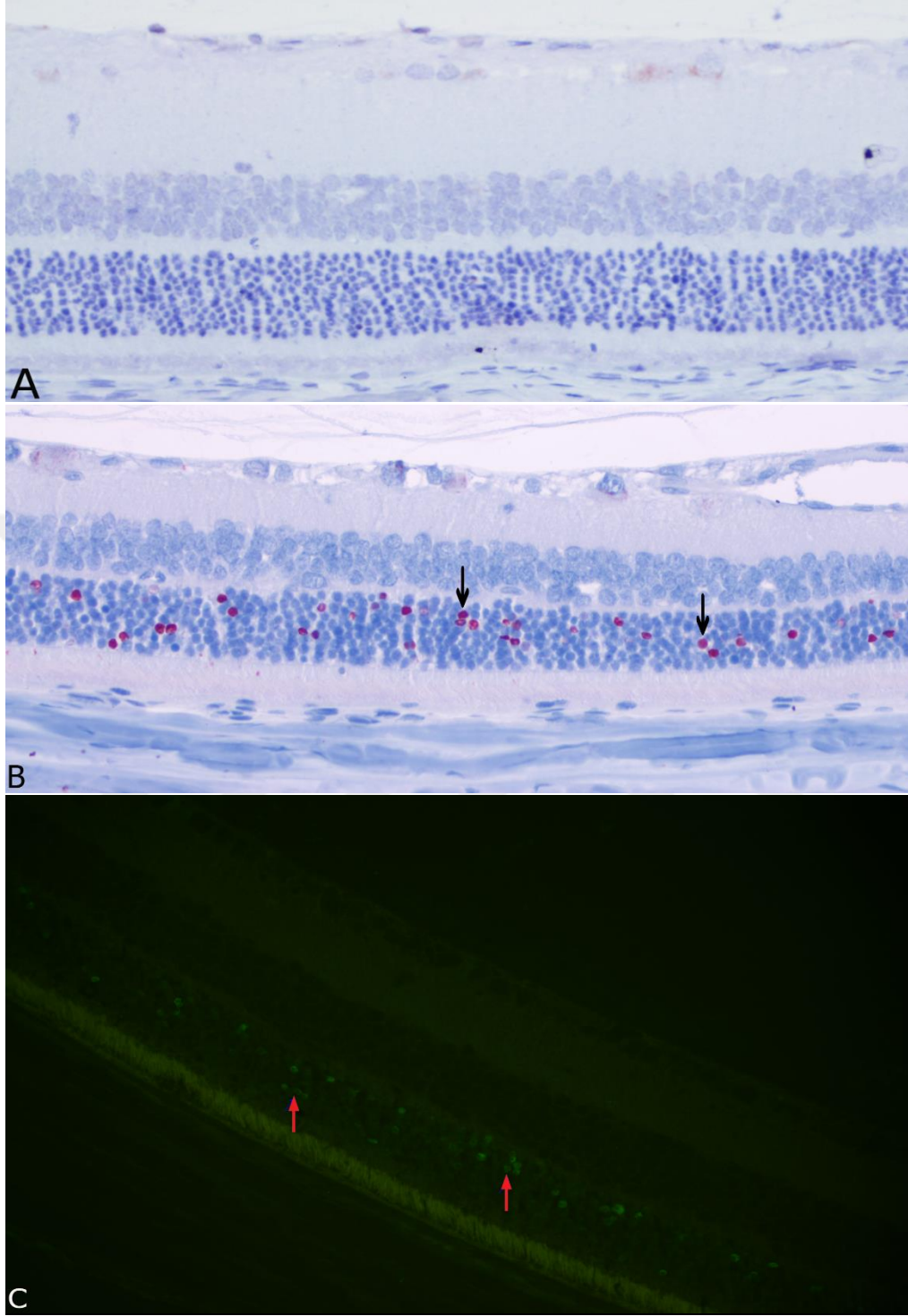
Şekil 36: Onikinci saat red/green opsin, kontrol grubu, İP (A) ve İF (B) boyamalarında sentral retinanın genel görünümü, DNK ve FK' nda seyrek pozitiflikler (oklar) (40X).

5.4.1.3. Blue Opsin (Kısa Dalga Boyu Hassas Opsin)

Onikinci saatte ötenazi edilen hayvanların retinalarında, tüm gruplarda, blue opsin, İP ve İF boyamalarında herhangi bir pozitifliğe rastlanılmadı.

5.4.1.4. 8-Hidroksil-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG)

8-OHdG; İP ve İF boyamalarında, 12. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarının tümünde seyrek ama şiddetli pozitifliklere rastlanıldı. Boyanmaların, sadece DNK da ki fotoreseptör hücre çekirdekleri ile sınırlı kaldığı görüldü (şekil 37). Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 17 de sunuldu.



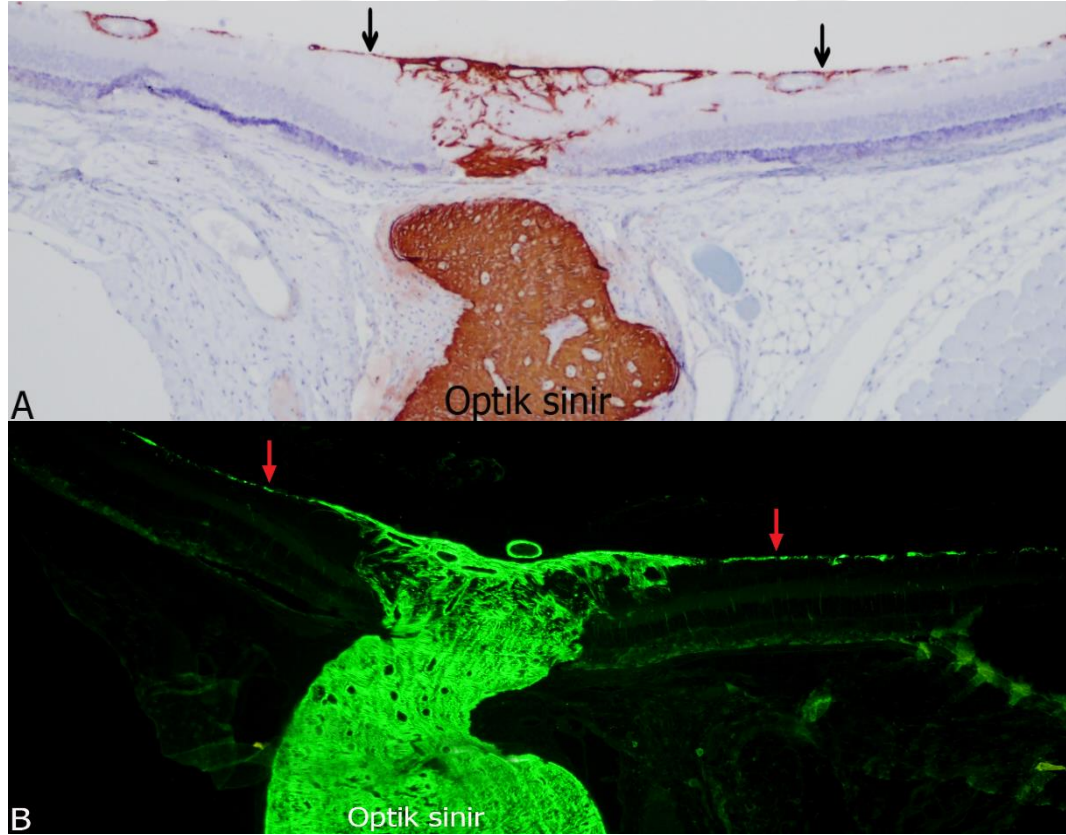
Şekil 37: Onikinci saatte 8-OHdG, İP (A, B) ve İF (C) boyamalarında kontrol grubu (A) ve MNU grubu (B, C) hayvanların sentral retinalarının genel görünümü, DNK da pozitiflikler (oklar) (40X).

5.4.1.5. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

PCNA; İP ve İF boyamalarında 12. saatte tüm gruplarda, herhangi bir pozitifliğe rastlanılmadı. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 18 te sunuldu.

5.4.1.6. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

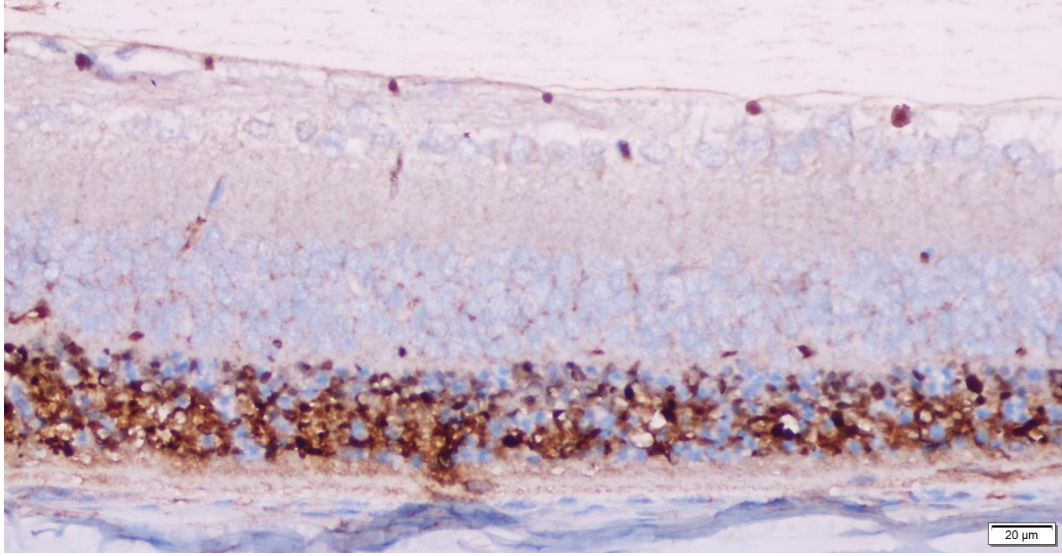
GFAP; İP ve İF boyamalarında 12. saatte tüm gruplarda, sadece gangliyon hücreleri katmanı (GHK) ve optik sinirde yoğun pozitifliğe rastlanıldı (şekil 38). Gruplar arası farklılığa rastlanılmadı. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 19 da sunuldu.



Şekil 38: Kontrol grubunda 12. saat GFAP, İP (A) ve İF (B) boyamalarında, optik sinir ve GHK' nda (oklar) pozitif boyanmalar.

5.4.1.7. Bcl-2 Associated X Protein (Bax)

Bax İP boyamalarında 12. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, sentral retinada ve DNK da daha yoğun olmak kaydıyla, stoplazmik ve nükleer, yaygın, orta şiddette pozitifliklere rastlanıldı (şekil 39). Perifere doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 20 de sunuldu.



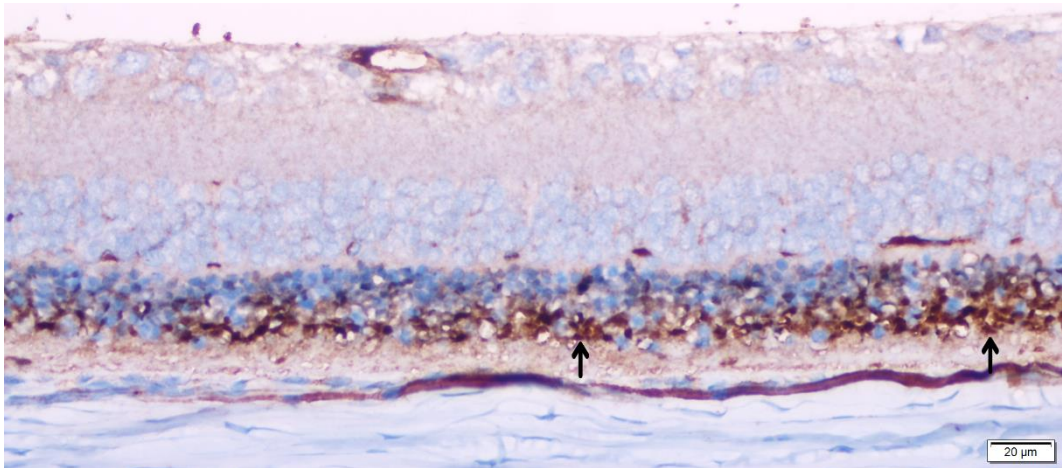
Şekil 39: Onikinci saat, YDM grubu, Bax, İP boyama, DNK da yoğun pozitiflikler görülmektedir.

5.4.1.8. B-cell Lymphoma-2 (Bcl-2)

Bcl-2; İP boyamalarında 12. saatte tüm gruplarda DNK ve FK' nda hafif şiddette boyanmalarara rastlanıldı. Kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanılmadı. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 21 de sunuldu.

5.4.1.9. Kaspaz-3

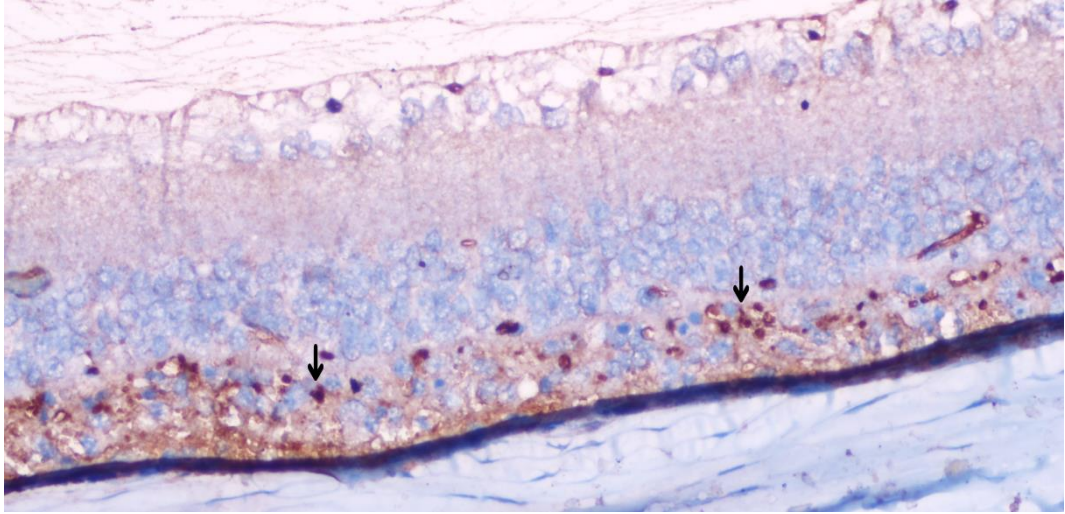
Kaspaz-3 İP boyamalarında 12. saatte tüm gruplarda DNK da, çekirdeklerde daha yoğun olmak kaydıyla orta şiddette boyanmalarara rastlanıldı (şekil 40). Perifere doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu görüldü. Kontrol grubunda ise pozitiflik görülmedi. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 22 de sunuldu.



Şekil 40: Onikinci saat, ODM grubu, kaspaz-3 İP boyama, DNK da yoğun pozitiflikler (oklar) görülmektedir.

5.4.1.10. Kaspaz-6

Kaspaz-6, İP boyamalarında 12.saatte tüm gruplarda DNK da, çekirdeklerde daha yoğun olmak kaydıyla hafif şiddette boyanmalara rastlanıldı (şekil 41). Perifere doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu görüldü. Kaspaz-3' e kıyasla boyanmaların daha hafif düzeyde olduğu dikkati çekti. Kontrol grubunda ise pozitiflik görülmedi. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Deney grupları arasında da farklılığa rastlanılmadı. Bu parametre ile ilgili histoskorların ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo 23 te sunuldu.

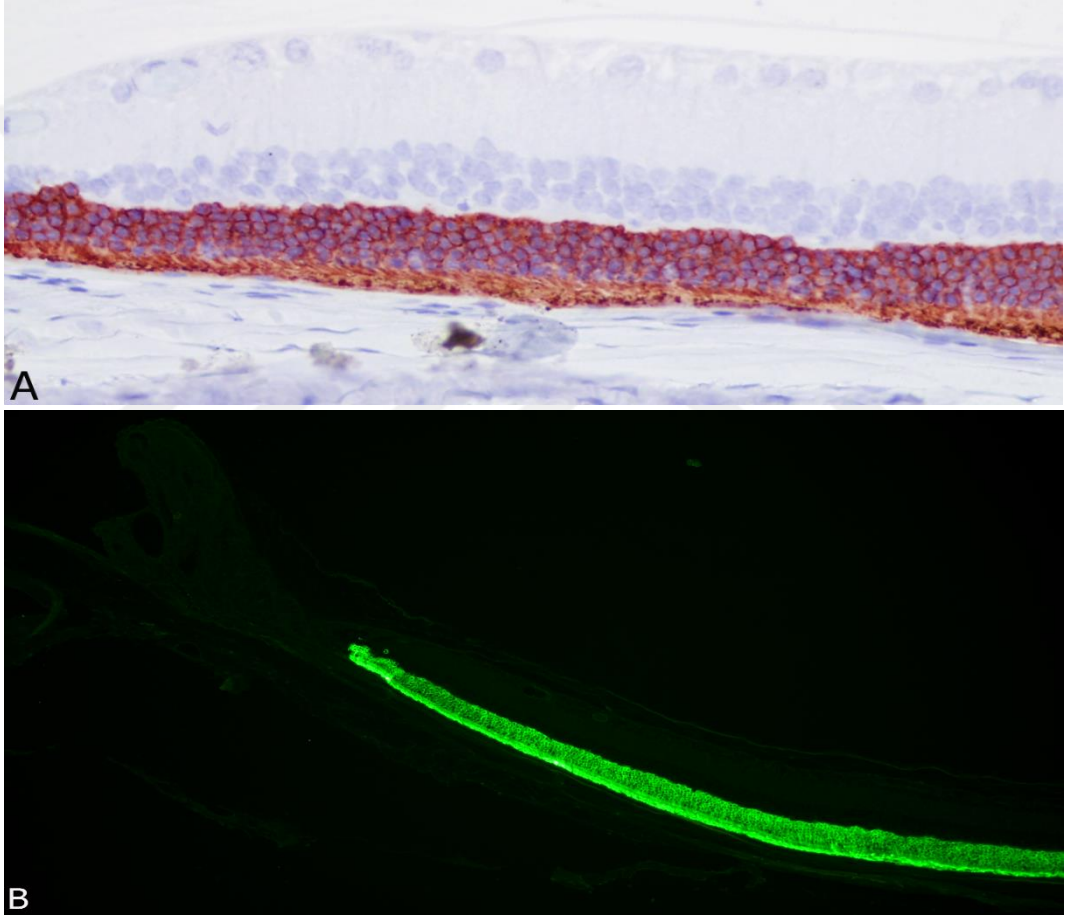


Şekil 41: Onikinci saat, ODM grubu, kaspaz-6, İP boyama, DNK ve FK da pozitiflikler (oklar) (40X).

5.4.2. Yirmidördüncü Saat Bulguları

5.4.2.1. Rodopsin

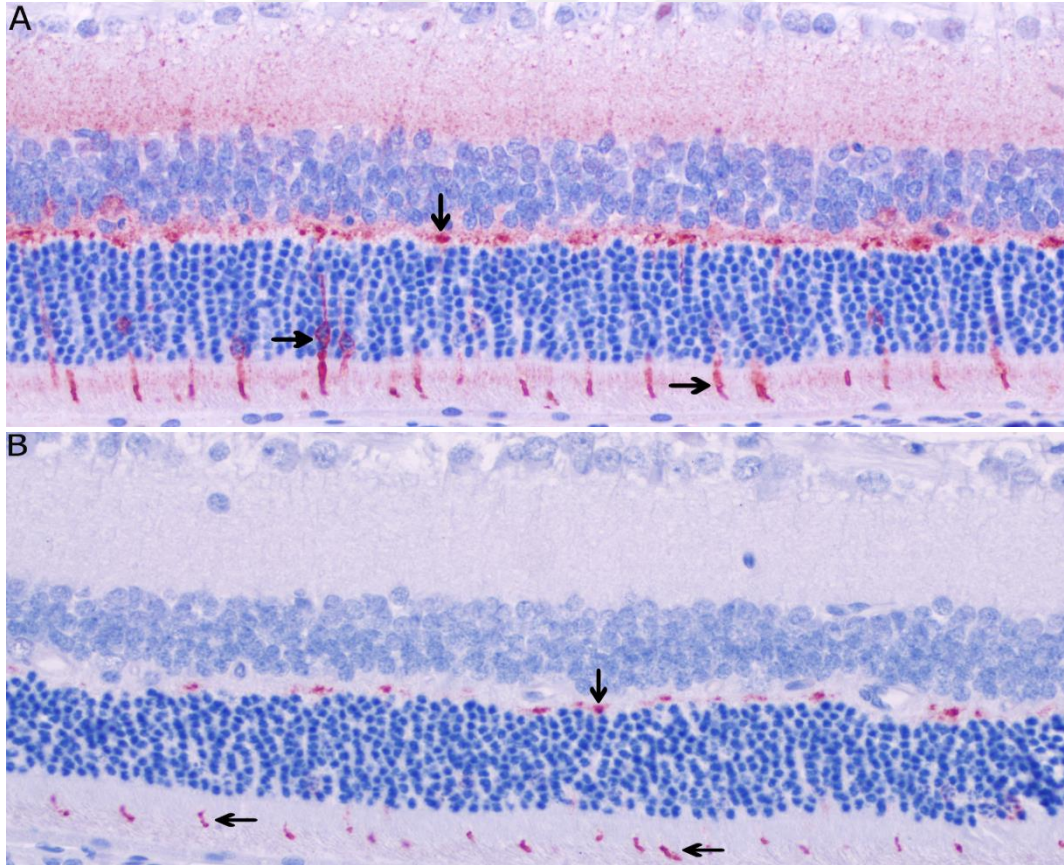
Rodopsinin, 24. saat İP ve İF boyamalarında 12. saatte elde edilen bulguların benzerleri elde edildi, tüm gruplarda DNK ve FK da yoğun pozitiflikler görüldü. Gruplar arasında herhangi bir farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 42: Yirmidördüncü saat, kontrol grubu, rodopsin İP (A) ve İF (B) boyamaları, perifer retinada, DNK ve FK' nda yoğun pozitiflikler görülmektedir (A: 20X, B: 10X).

5.4.2.2. Red/Green Opsin

Red/green opsinin, 24. saat, İP ve İF boyamalarında, 12. saat boyamalarından ve kontrol grubundan farklı olarak, deney gruplarının tümünde, sadece FK' nda ve DPK da seyrek ama şiddetli pozitiflikler elde edildi ve DNK da pozitiflik görülmedi. Pozitifliklerin FK' nda 12. saatte olduğu gibi uzun-ince çizgisel tarzda, intrastoplazmik olduğu, hücre çekirdeklerinin boyanmadığı görüldü (şekil 43). Boyanan reseptör sayısında farklılığa rastlanılmadı. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



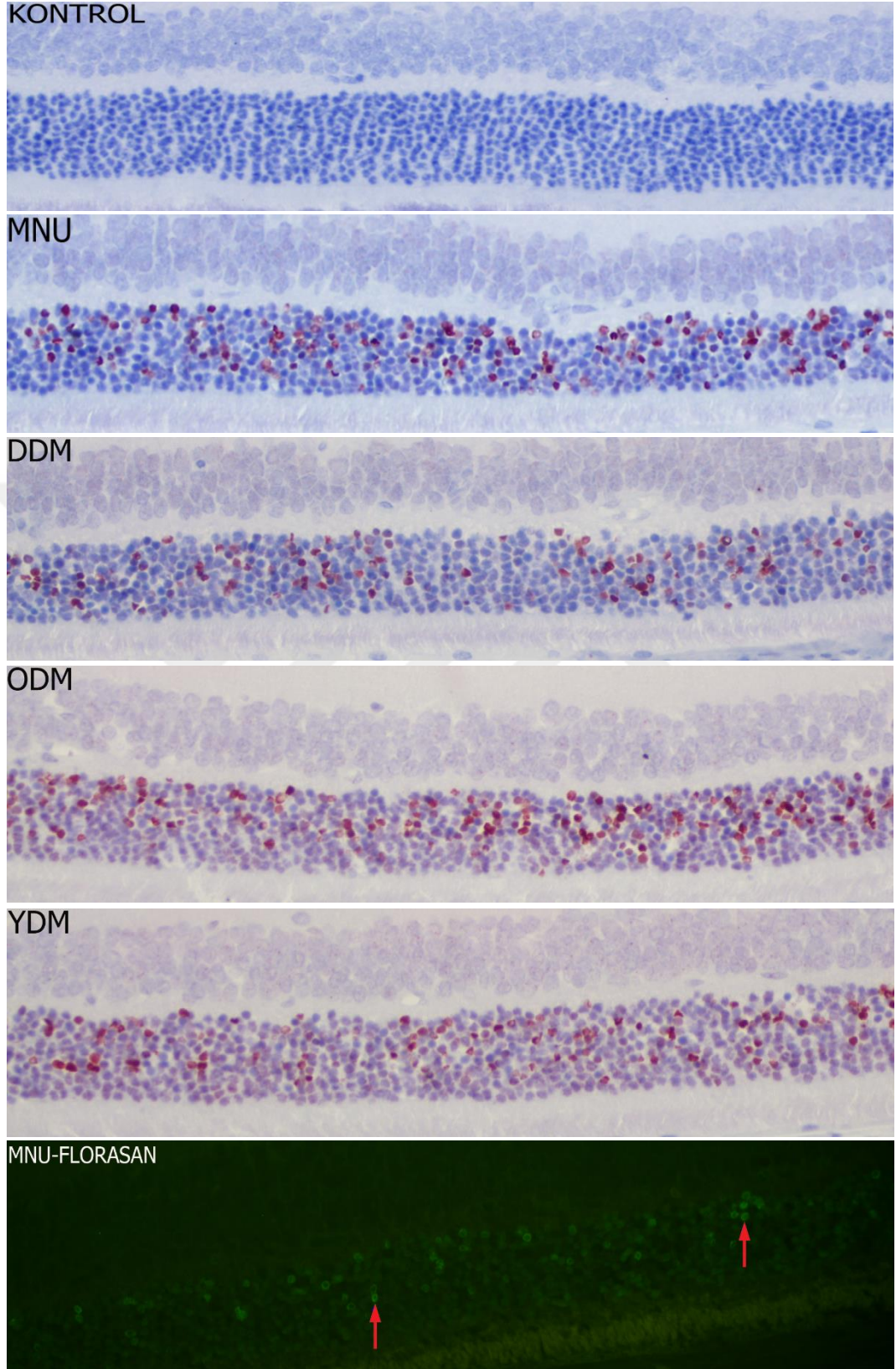
Şekil 43: Yirmidördüncü saat red/green opsin, İP boyamada kontrol grubu (A) ve MNU grubunun (B) sentral retinalarının genel görünümü, seyrek pozitiflikler (oklar) (40X)

5.4.2.3. Blue Opsin

Yirmidördüncü saatte ötenazi edilen hayvanların retinalarında, tüm gruplarda, blue opsin İP ve İF boyamalarında herhangi bir pozitifliğe rastlanılmadı.

5.4.2.4. 8-OHdG

8-OHdG, İP ve İF boyamalarında, 24. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarının tümünde yoğun ve şiddetli pozitifliklere rastlanıldı. Boyanmaların, sadece DNK da ki fotoreseptör hücre çekirdekleri ile sınırlı kaldığı görüldü (şekil 44). Onikinci saate kıyasla pozitif hücrelerin sayısında artış görüldü ve bu parametrenin en yoğun pozitiflik verdiği saat, 24. saat olarak kaydedildi. Perifere doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 44: Yirmidördüncü saat 8-OHdG İP ve İF boyamaları; kırmızı boyanan hücreler ve oklar pozitiflikleri göstermektedir.

5.4.2.5. PCNA

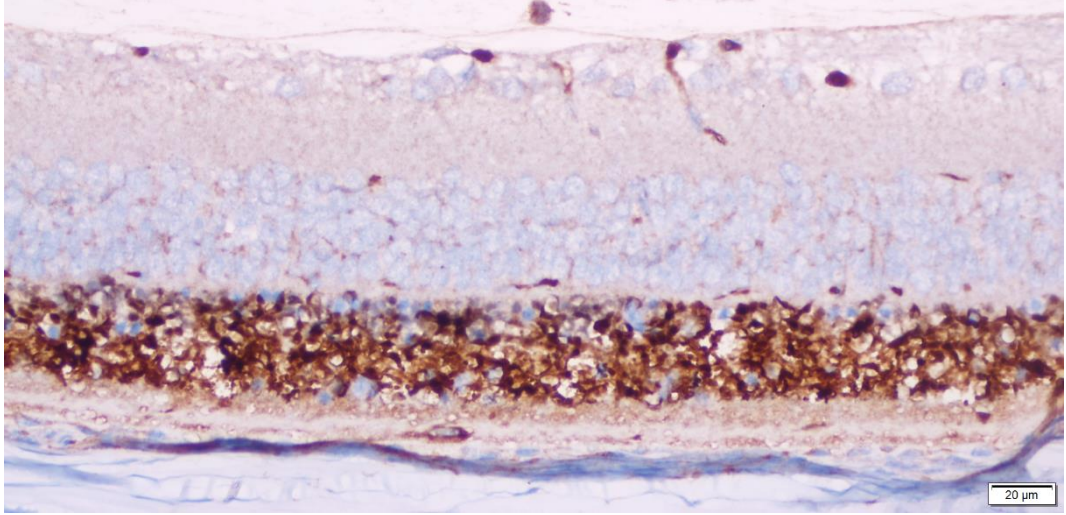
PCNA, İP ve İF boyamalarında 24. saatte, sadece deney gruplarında, İNK da, bazı hücrelerde belli-belirsiz, hafif şiddette, seyrek pozitifliklere rastlanıldı. Boyanmaların hücre çekirdekleri ile sınırlı olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise boyanma görülmedi. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu, deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı ($p<0,05$).

5.4.2.6. GFAP

GFAP, İP ve İF boyamalarında 24. saatte tüm gruplarda, GHK ve optik sinirde yoğun pozitifliğe rastlanıldı, 12. saatten farklı olarak sadece deney gruplarında, İNK da da, ince, GHK' ndan uzanan saçaklanmalar tarzında, çok hafif şiddette pozitifliğe rastlanıldı. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki bu farklılık istatistiksel anlamlı bulunmadı.

5.4.2.7. Bax

Bax, İP boyamalarında, 24. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 12. saatte görülen boyanmaların biraz daha şiddetlenerek devam ettiği, pozitifliğin arttığı görüldü (şekil 45). Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



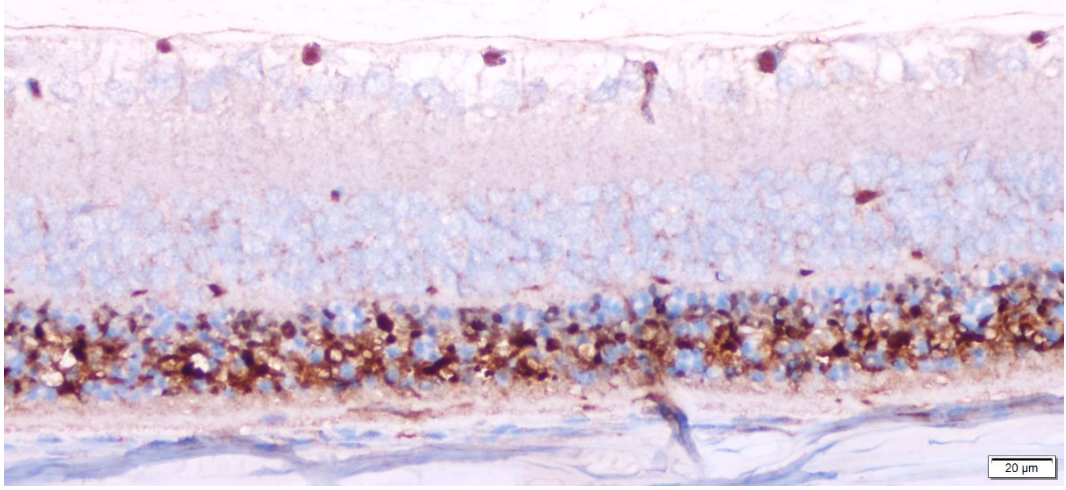
Şekil 45: Yirmidördüncü saat, DDM grubu, bax, İP boyama, DNK da yoğun pozitiflikler görülmektedir.

5.4.2.8. Bcl-2

Bcl-2, İP boyamalarında 24. saatte tüm gruplarda, kontrol grubu retinalarında daha belirgin olmak kaydıyla, DNK ve FK' nda hafif şiddette boyanmalarına rastlanıldı. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.

5.4.2.9. Kaspaz-3

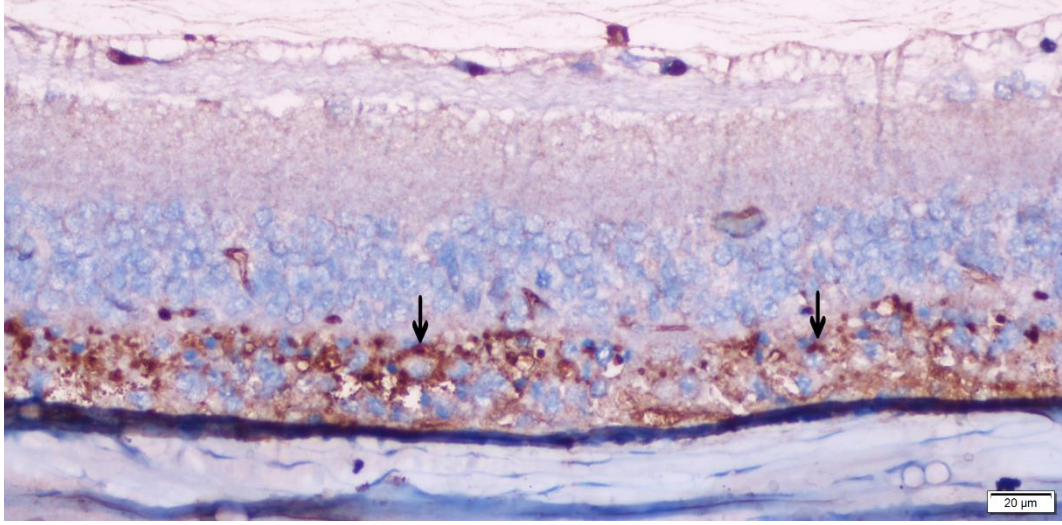
Kaspaz-3 İP boyamalarında, 24. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 12. saatte, DNK ve FK da görülen boyanmaların biraz daha şiddetlenerek devam ettiği, pozitifliğin arttığı görüldü (şekil 46). Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 46: Yirmidördüncü saat, MNU grubu, kaspaz-3, İP boyama, DNK da yoğun pozitiflikler görülmektedir.

5.4.2.10. Kaspaz-6

Kaspaz-6, İP boyamalarında, 24. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 12. saatte, DNK ve FK da görülen boyanmaların biraz daha şiddetlenerek devam ettiği, pozitifliğin arttığı görüldü (şekil 47). Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Deney grupları arasında da farklılığa rastlanılmadı.

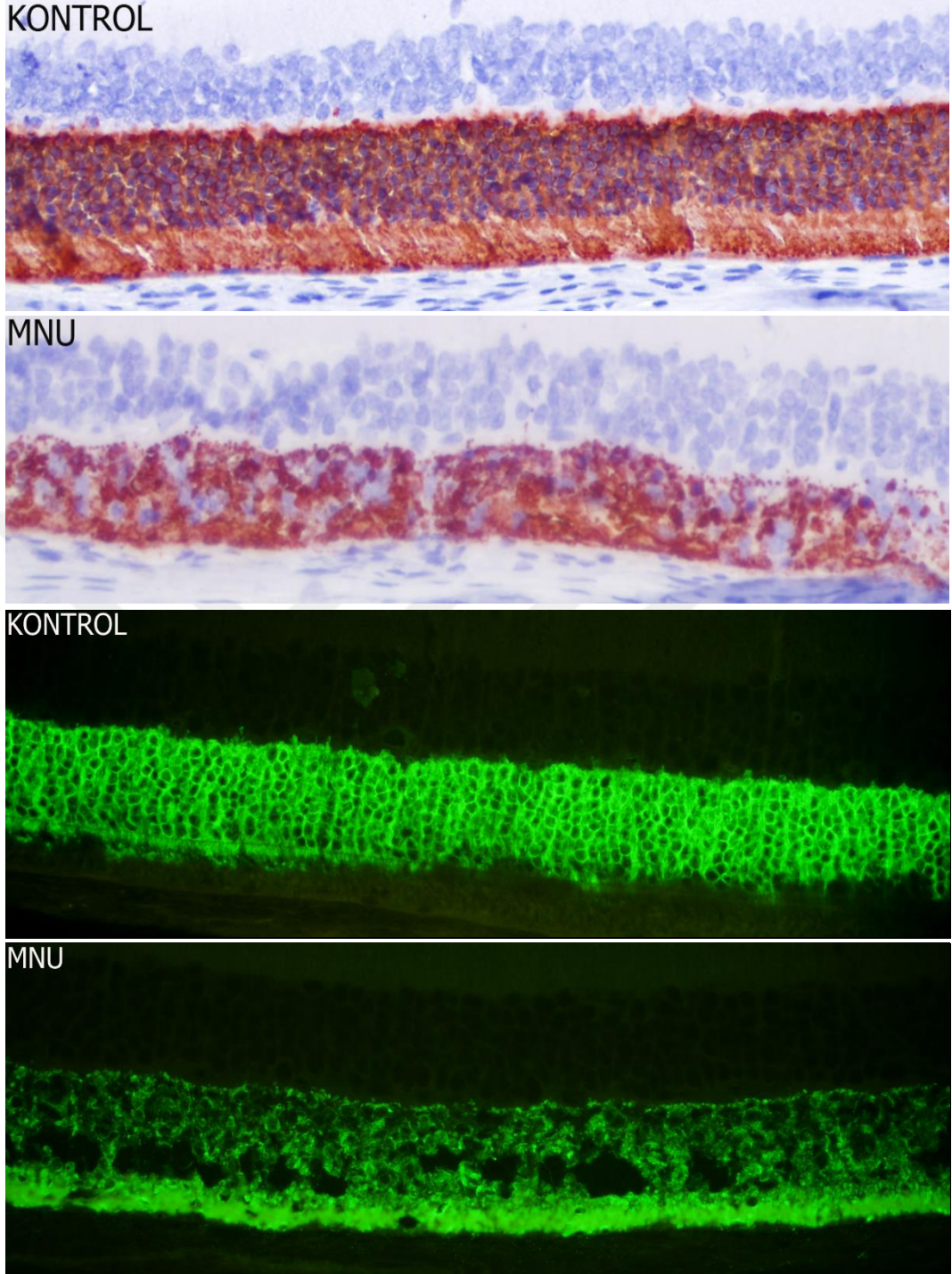


Şekil 47: Yirmidördüncü saat, MNU grubu, kaspaz-6, İP boyama, DNK ve FK da pozitiflikler (oklar).

5.4.3. Kırksekizinci Saat Bulguları

5.4.3.1. Rodopsin

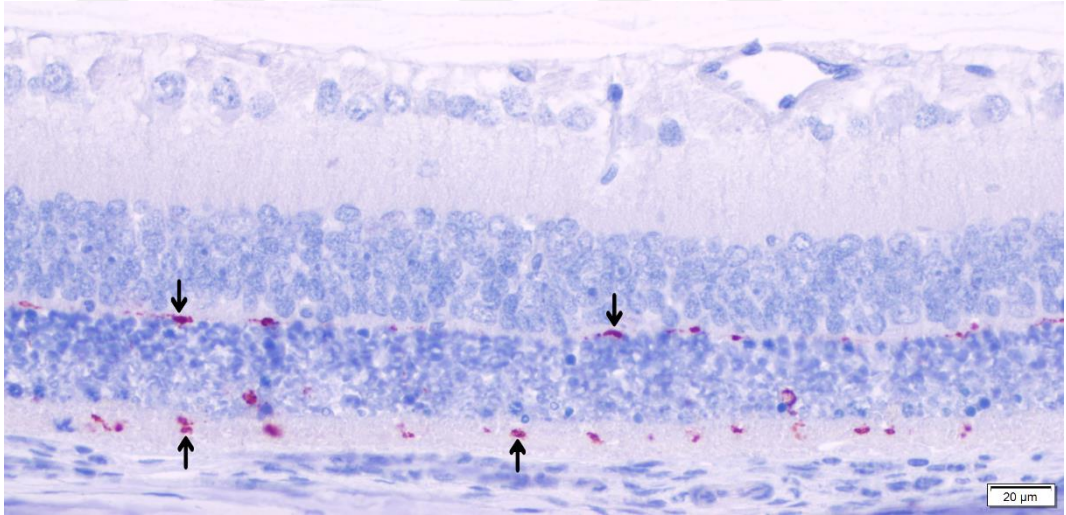
Rodopsinin, 48. saat İP ve İF boyamalarında, kontrol grubunun, 12. ve 24. saatlerdeki gibi yoğun boyandığı görülürken, deney gruplarının sentral retinalarında, DNK ve FK da, boyanma şiddetinin azaldığı, partiküler ve yer yer boşlukların olduğu tarzda bir boyanmanın olduğu görüldü (şekil 48). Perifere doğru gidildikçe pozitifliğin arttığı, kontrol grubu ile benzer görünümün elde edildiği tespit edildi. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 48: Kırksekizinci saat rodopsin, İP ve İF boyamaları; MNU grubunda DNK ve FK da, kontrol grubuna göre pozitiflikler azalmıştır.

5.4.3.2. Red/Green Opsin

Red/Green opsinin, 48. saat, İP ve İF boyamalarında, kontrol grubunun 12. ve 24. saatlerde ki gibi boyandığı görülürken, deney grupların tümünde, kontrol grubuna göre boyanmanın azaldığı görüldü. Önceki saat dilimlerinde, uzun-ince tarzda görülen boyanmaların azaldığı, parçalanmış-partiküler görünümde bir boyanmanın olduğu dikkati çekti (şekil 49). Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



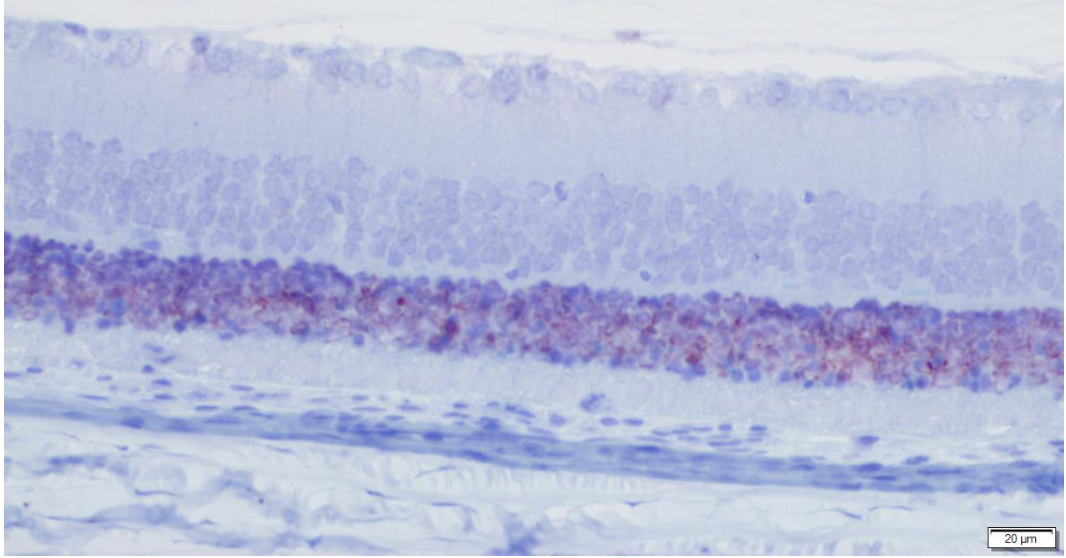
Şekil 49: Kırksekizinci saat, YDM grubu, red/green opsin, İP boyama, FK ve DPK da partiküler tarzda pozitiflikler (**oklar**).

5.4.3.3. Blue Opsin

Kırksekizinci saatte ötenazi edilen hayvanların retinalarında, tüm gruplarda, blue opsin İP ve İF boyamalarında herhangi bir pozitifliğe rastlanılmadı.

5.4.3.4. 8-OHdG

8-OHdG, İP ve İF boyamalarında, 48. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 24. saatte en üst seviyeye ulaşan pozitifliğin, neredeyse sıfıra düştüğü görüldü. DNK da sadece hafif zemin boyanması tarzında boyanmalar dışında pozitifliğe rastlanılmadı (şekil 50). Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



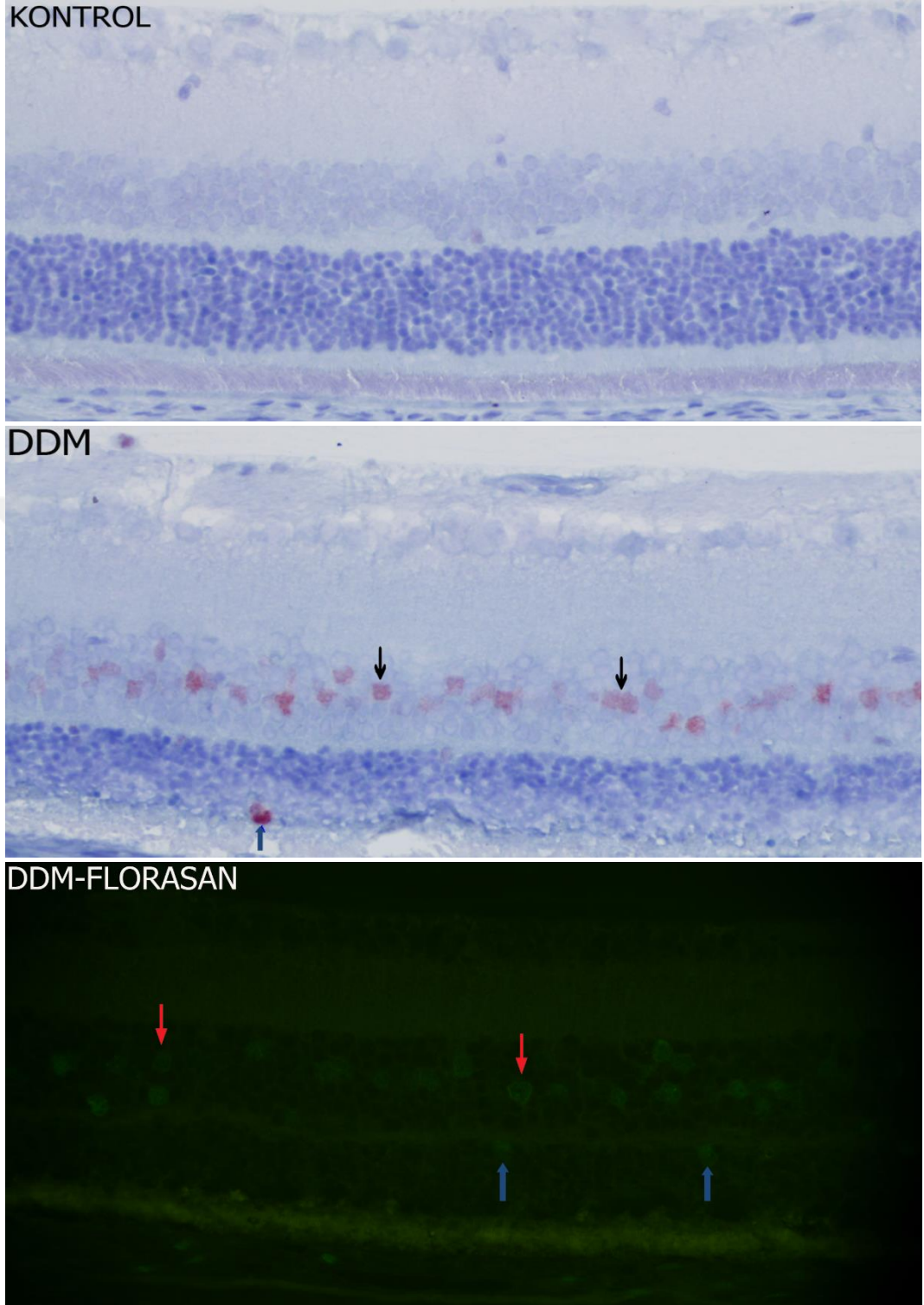
Şekil 50: Kırksekizinci saat, ODM grubu, 8-OHdG, İP boyama, DNK da hafif boyanma görülmektedir.

5.4.3.5. PCNA

Kırksekizinci saat, PCNA, İP ve İF boyamalarında, 24. saatte, sadece deney gruplarında, İNK da, bazı hücrelerde belli-belirsiz, hafif şiddette ve seyrek olarak rastlanılan pozitifliklerin, biraz daha belirgin hale geldikleri ve sayılarının arttığı görüldü. Yirmidördüncü saatten diğer bir farklılık olarak, İNK' a ek olarak DNK

ve hatta FK da da pozitifliklerin var olduğu görüldü (şekil 51). Pozitif boyanan hücrelerin, Müller hücreleri ve bölgeye göç etmiş makrofajların olduğu tespit edildi. Boyanmaların hücre çekirdekleri ile sınırlı olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise boyanma görülmedi. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu, deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı ($p < 0,05$).



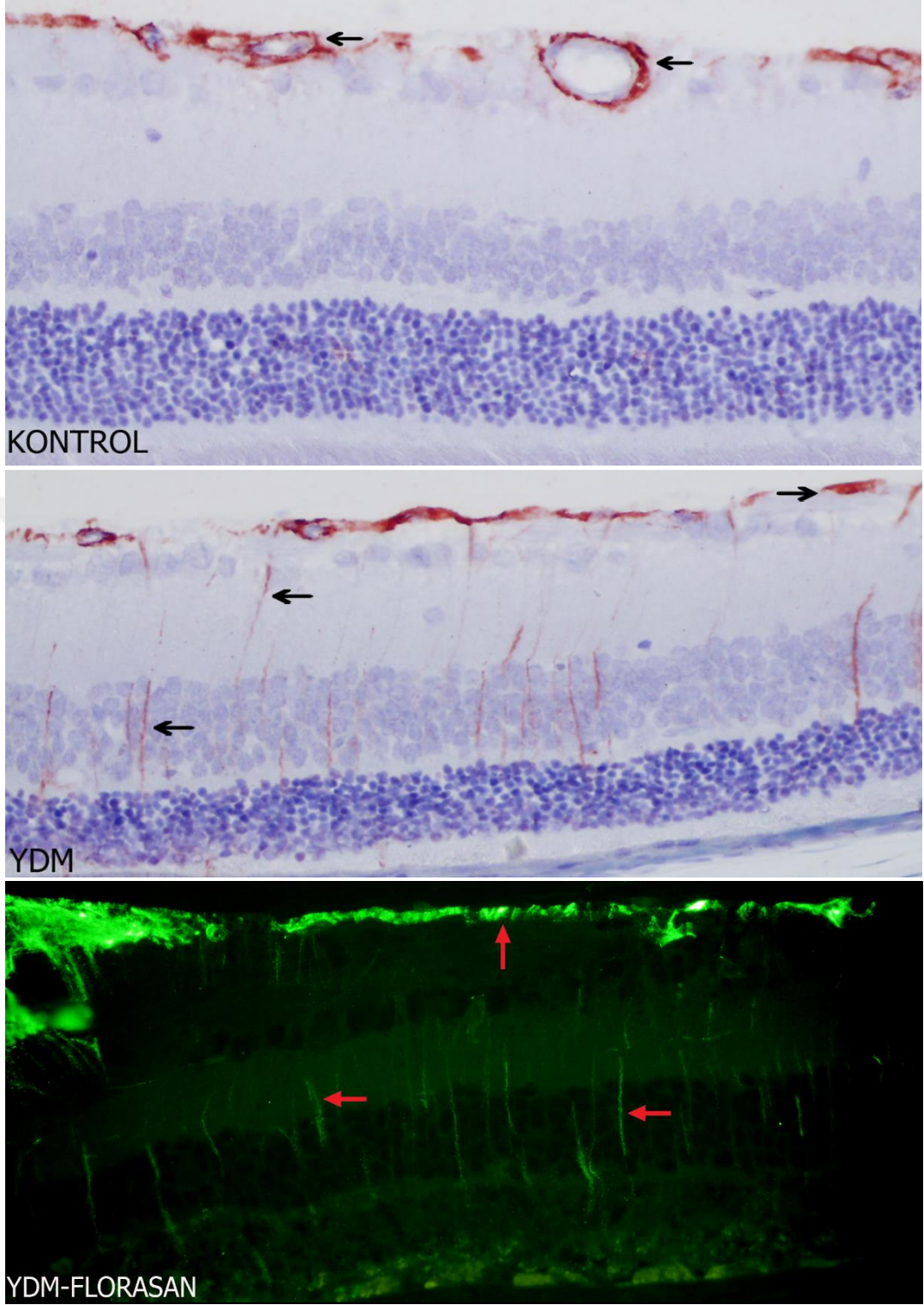


Şekil 51: Kırksekizinci saat PCNA, İP ve İF boyamaları; DDM grubunda hafif boyanma; **siyah ve kırmızı oklar**; İNK da ki, **mavi oklar**; DNK da ki pozitiflikleri göstermektedir.

5.4.3.6. GFAP

Kırksekizinci saat GFAP, İP ve İF boyamalarında; 24. saatte, GHK ve optik sinire ek olarak, sadece deney gruplarında, İPK da, ince, GHK' ndan uzanan saçaklaklanmalar tarzında, çok hafif şiddette görülen pozitifliğin artış gösterdiği ve saçaklanma şeklindeki boyanmanın biraz daha ilerleyerek DNK' a kadar ulaştığı görüldü (şekil 52). Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu, deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı ($p < 0,05$).

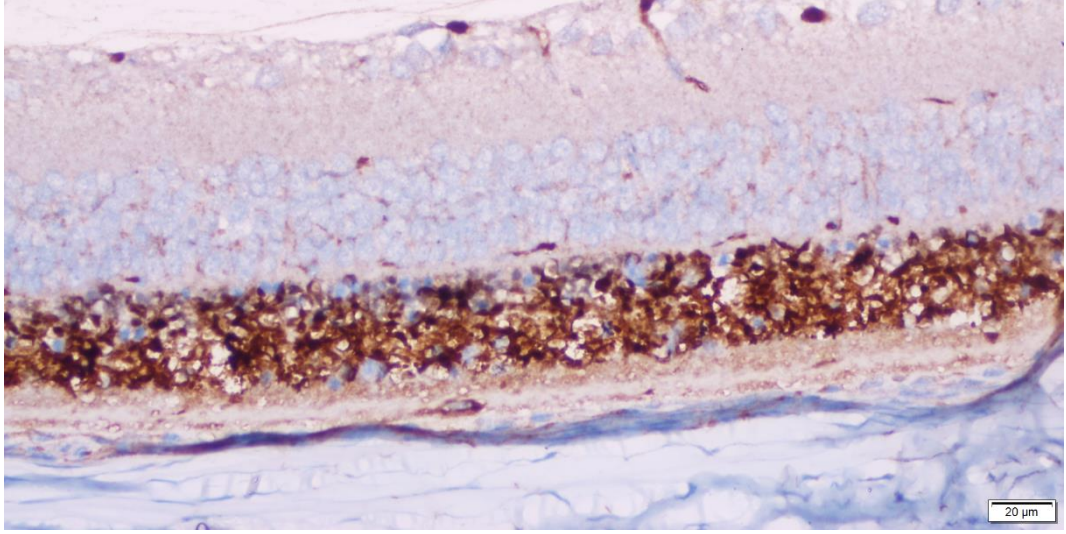




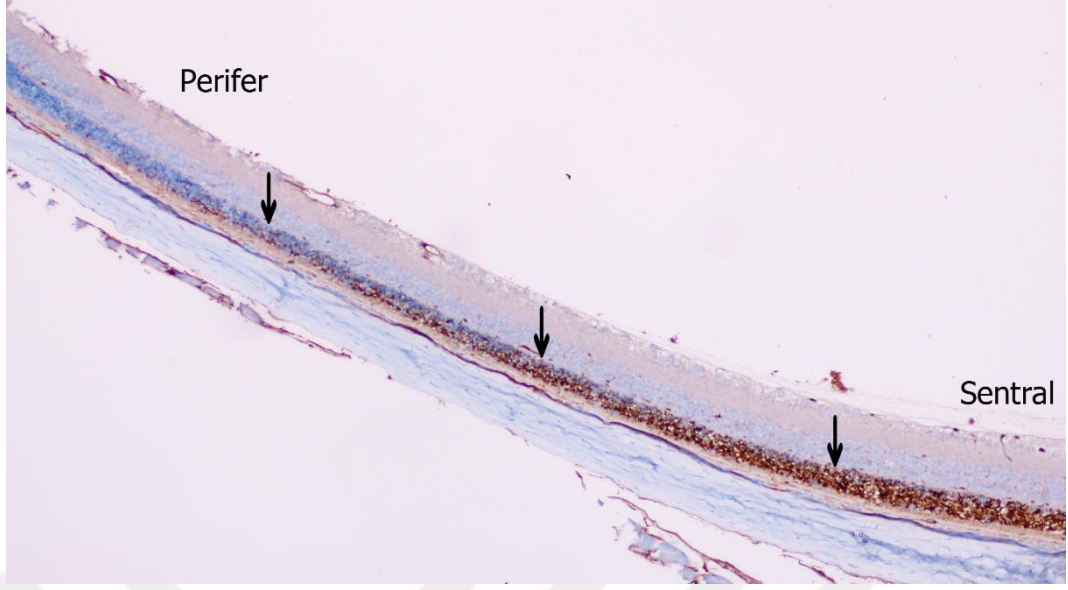
Şekil 52: Kırksekizinci saat GFAP, İP ve İF boyamaları; siyah ve kırmızı oklar; pozitiflikleri göstermektedir.

5.4.3.7. Bax

Bax immunperoksidaz boyamalarında, 48. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 12. ve 24. saatlerde görülen boyanmaların biraz daha şiddetlenerek devam ettiği, pozitifliğin arttığı görüldü (şekil 53). Bax pozitifliğinin en yüksek düzeyde görüldüğü saat dilimi, 48. saat olarak kaydedildi. Sentral retinadan periferine doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu görüldü (şekil 54). Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 53: Kırksekizinci saat, ODM grubu, bax, İP boyama; DNK da yoğun pozitiflikler görülmektedir.



Şekil 54: Kırksekizinci saat, MNU grubu, bax, İP boyama, sentralden perifere gidildikçe DNK (**oklar**) da pozitiflik azalmaktadır.

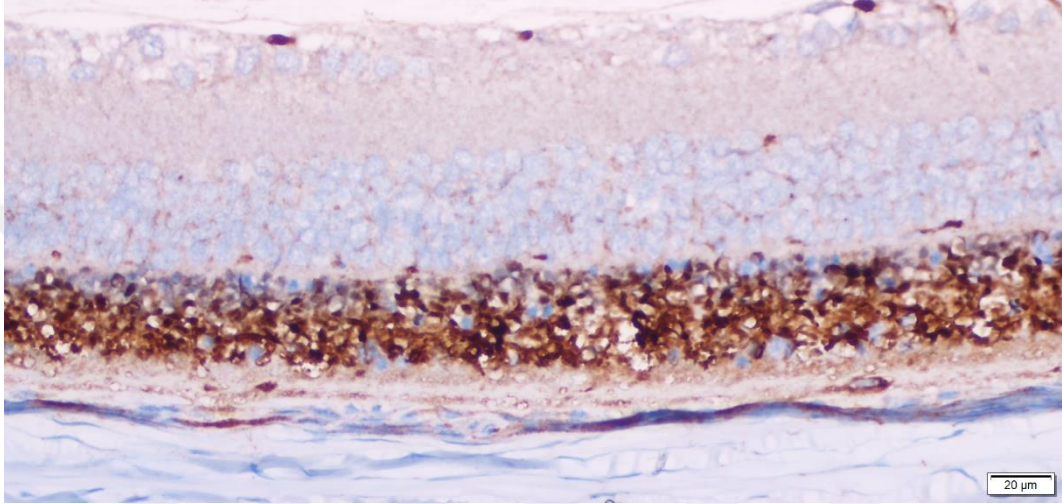
5.4.3.8. Bcl-2

Bcl-2, İP boyamalarında 48. saatte tüm gruplarda, kontrol grubu retinalarında daha belirgin olmak kaydıyla, DNK ve FK' nda hafif şiddette boyanmalarına rastlanıldı. Deney gruplarında Bcl-2 pozitifliğinin 12. ve 24. saatlere göre daha azaldığı görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.

5.4.3.9. Kaspaz-3

Kaspaz-3, İP boyamalarında, 48. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 12. ve 24. saatlerde, DNK ve FK da görülen boyanmaların biraz daha şiddetlenerek devam ettiği, pozitifliğin arttığı görüldü (şekil 55). Kaspaz-3 pozitifliğinin en yüksek düzeyde görüldüğü saat dilimi, 48.

saat olarak kaydedildi. Sentral retinadan perifere doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.

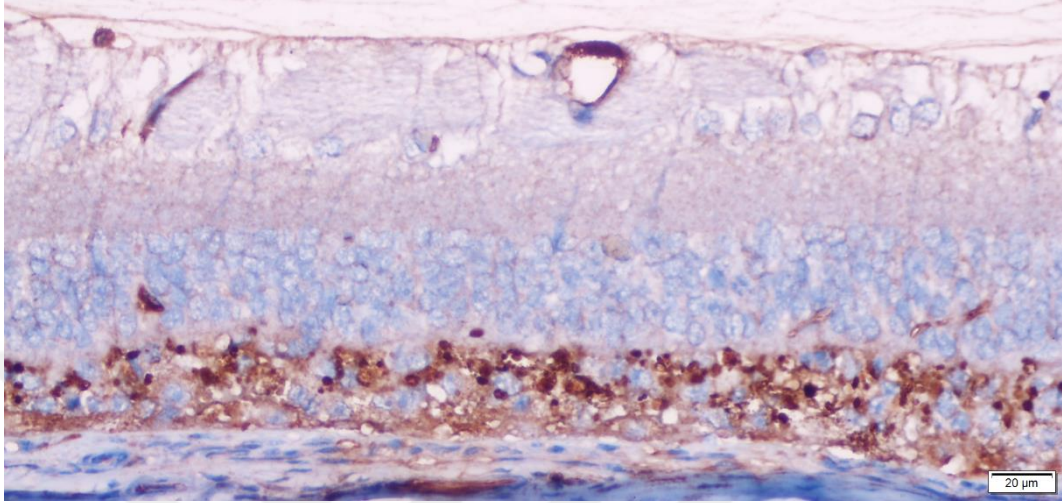


Şekil 55: Kırksekizinci saat, DDM grubu, kaspaz-3, İP boyama, DNK da yoğun pozitiflikler görülmektedir.

5.4.3.10. Kaspaz-6

Kaspaz-6, İP boyamalarında, 48. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 12. ve 24. saatlerde, DNK ve FK da görülen boyanmaların biraz daha şiddetlenerek devam ettiği, pozitifliğin arttığı görüldü (şekil 56). Kaspaz-6 pozitifliğinin en yüksek düzeyde görüldüğü saat dilimi, 48. saat olarak kaydedildi. Sentral retinadan perifere doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı. Kaspaz-6 boyamalarında

kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılığın, istatistiksel olarak anlamlı olduğu tek saat dilimi 48. saat olarak kaydedildi.

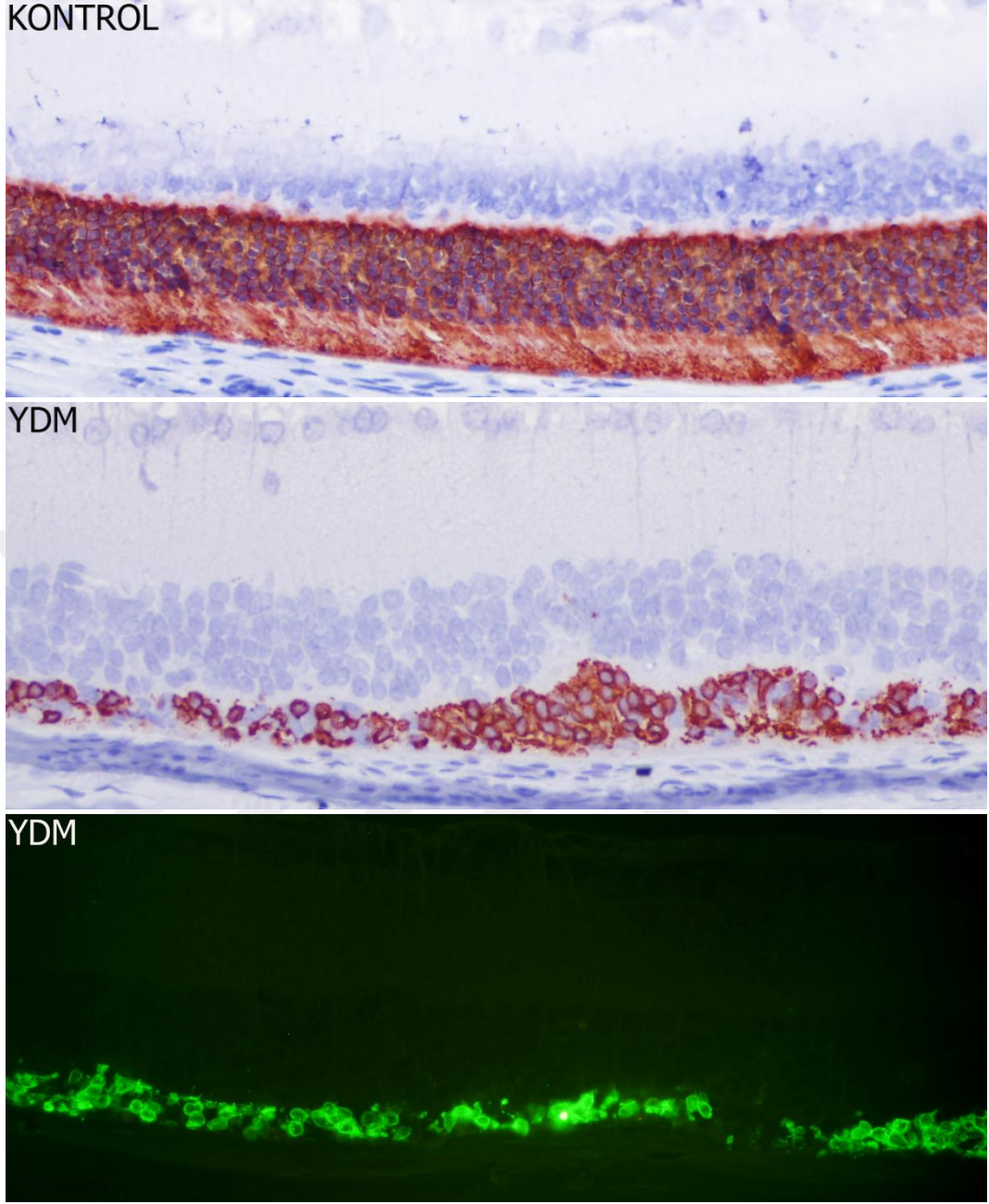


Şekil 56: Kırksekizinci saat, DDM grubu, kaspaz-6, İP boyama, DNK da yoğun pozitiflikler görülmektedir.

5.4.4. Yetmişikinci Saat Bulguları

5.4.4.1. Rodopsin

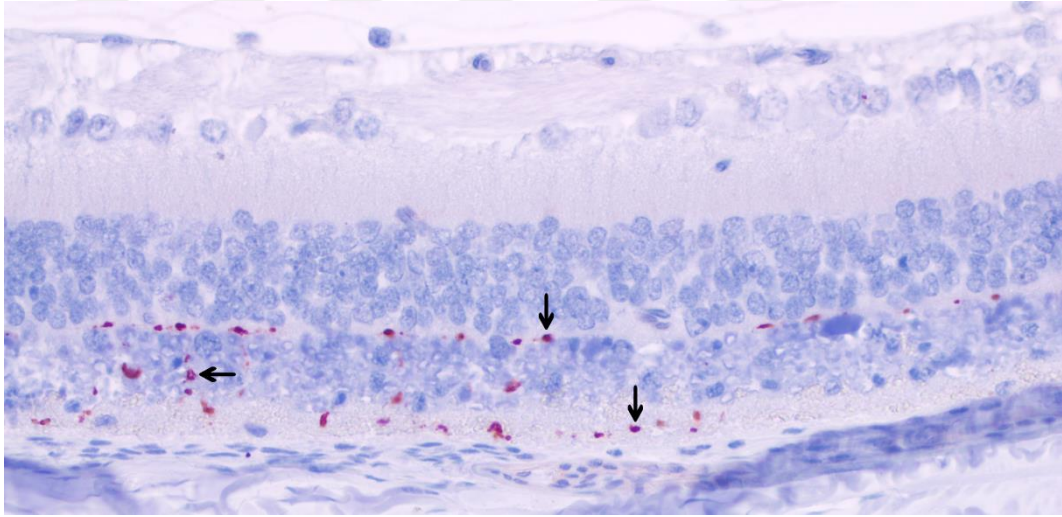
Rodopsinin, 72. saat İP ve İF boyamalarında, kontrol grubunun, önceki saatlerdeki gibi yoğun boyandığı görülürken, deney gruplarının sentral retinalarında, DNK da boyanmanın son derece azaldığı, sadece sağ kalan fotoreseptör hücre çekirdeklerinin etrafında boyanmaların olduğu, FK da ise boyanmanın olmadığı görüldü (şekil 57). Perifere doğru gidildikçe pozitifliğin arttığı, kontrol grubu ile benzer görünümün elde edildiği tespit edildi. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 57: Yetmişikinci saat rodopsin, İP ve İF boyamaları; YDM grubunda, DNK da ve FK da, kontrol grubuna göre pozitiflikler azalmış durumda ve sadece sağ kalan fotoreseptör çekirdeklerin çevresinde pozitiflikler görülmektedir (40X).

5.4.4.2. Red/Green Opsin

Red/Green opsinin, 72. saat, İP ve İF boyamalarında, kontrol grubunun önceki saatlerde ki gibi boyandığı görülürken, deney grupların tümünde, DNK ve FK da, kontrol grubuna göre boyanmanın son derece azaldığı, görüldü. Önceki saat dilimlerinde, uzun-ince tarzda görülen boyanmaların, parçalanmış-partiküler bir görünümde olduğu görüldü (şekil 58). Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 58: Yetmişikinci saat, ODM grubu, red/green opsin, İP boyama; FK, DNK ve DPK da partiküler tarzda pozitiflikler (**oklar**). (40X).

5.4.4.3. Blue Opsin

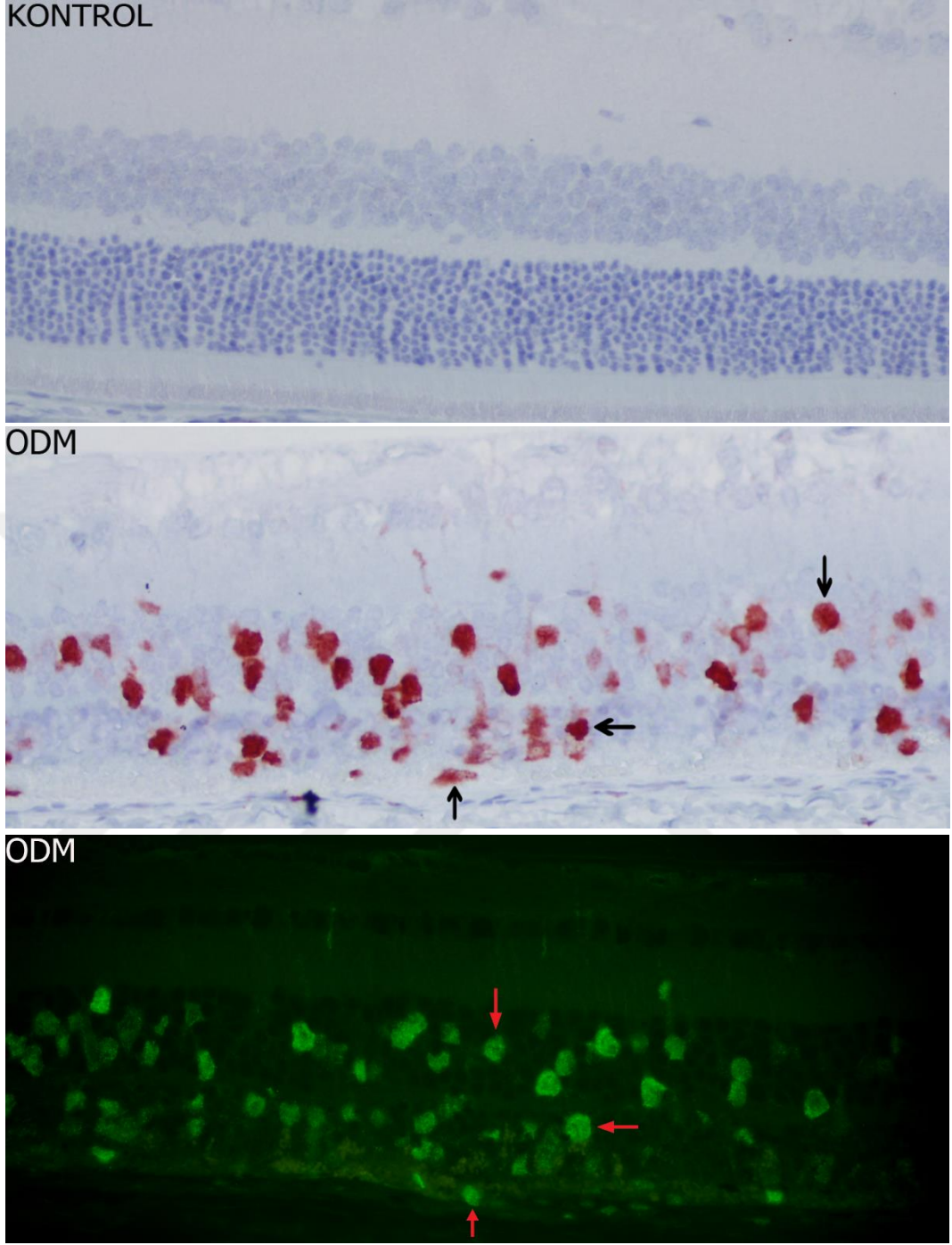
Yetmişikinci saatte ötenazi edilen hayvanların retinalarında, tüm gruplarda, blue opsin İP ve İF boyamalarında herhangi bir pozitifliğe rastlanılmadı.

5.4.4.4. 8-OHdG

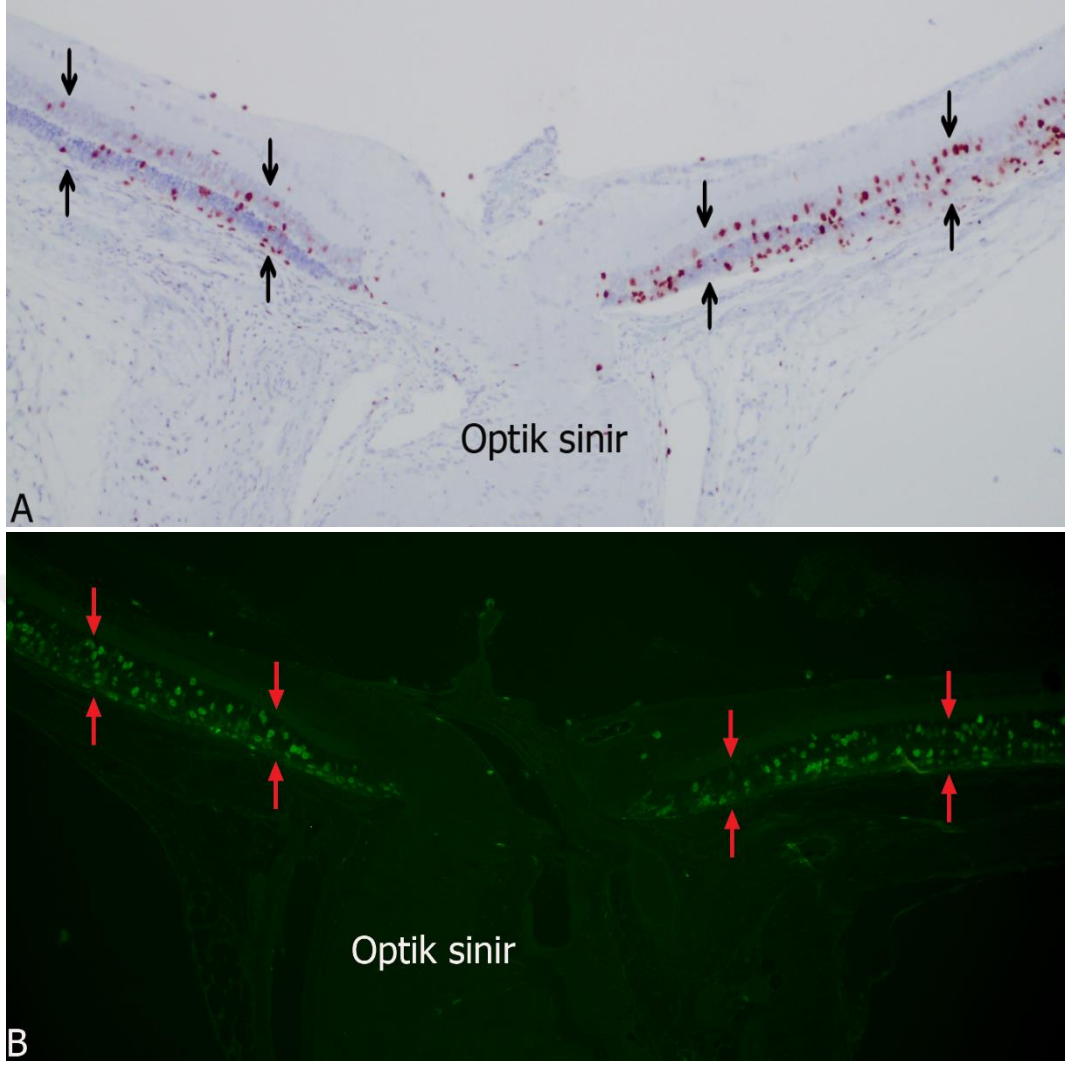
8-OHdG, İP ve İF boyamalarında, 72. saatte kontrol grubunda ve deney gruplarında pozitifliğe rastlanılmadı. Deney gruplarında, 24. saatte en üst seviyeye ulaşan 8-OHdG pozitifliğinin, 72. saatte artık tamamen sıfıra düştüğü görüldü.

5.4.4.5. PCNA

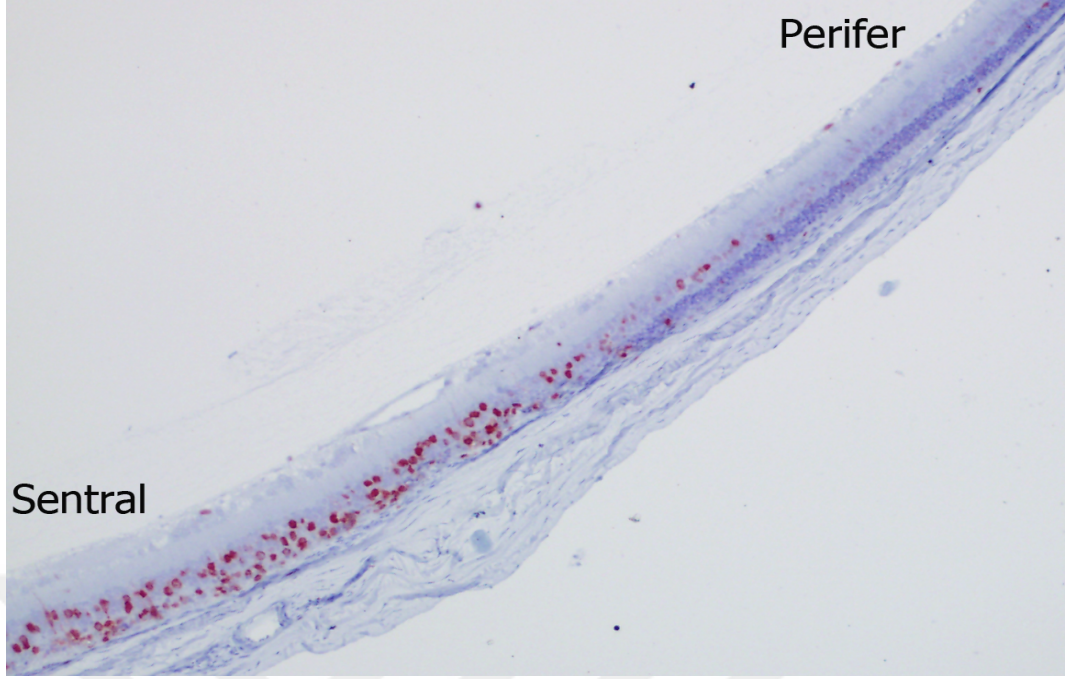
Yetmişikinci saat, PCNA, İP ve İF boyamalarında, 48. saatte, sadece deney gruplarında, İNK, DNK ve FK da hafif derecede belirgin olan pozitifliklerin hem sayısının hemde şiddetinin arttığı görüldü (şekil 59-60). PCNA pozitifliğinin en yoğun ve en şiddetli olduğu saat dilimi 72. saat olarak kaydedildi. Boyanmaların hücre çekirdekleri ile sınırlı olduğu görüldü. Pozitifliklerin özellikle fotoreseptör yıkımının fazla olduğu optik sinire yakın, sentral retinada yoğunlaştığı, perifere doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu belirlendi (şekil 61). Kontrol grubunda ise boyanma görülmedi. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu, deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı ($p < 0,05$).



Şekil 59: Yetmişikinci saat, PCNA, İP ve İF boyamaları; ODM grubunda, İNK, DNK ve FK' nda yoğun pozitiflikler (oklar) (40X).



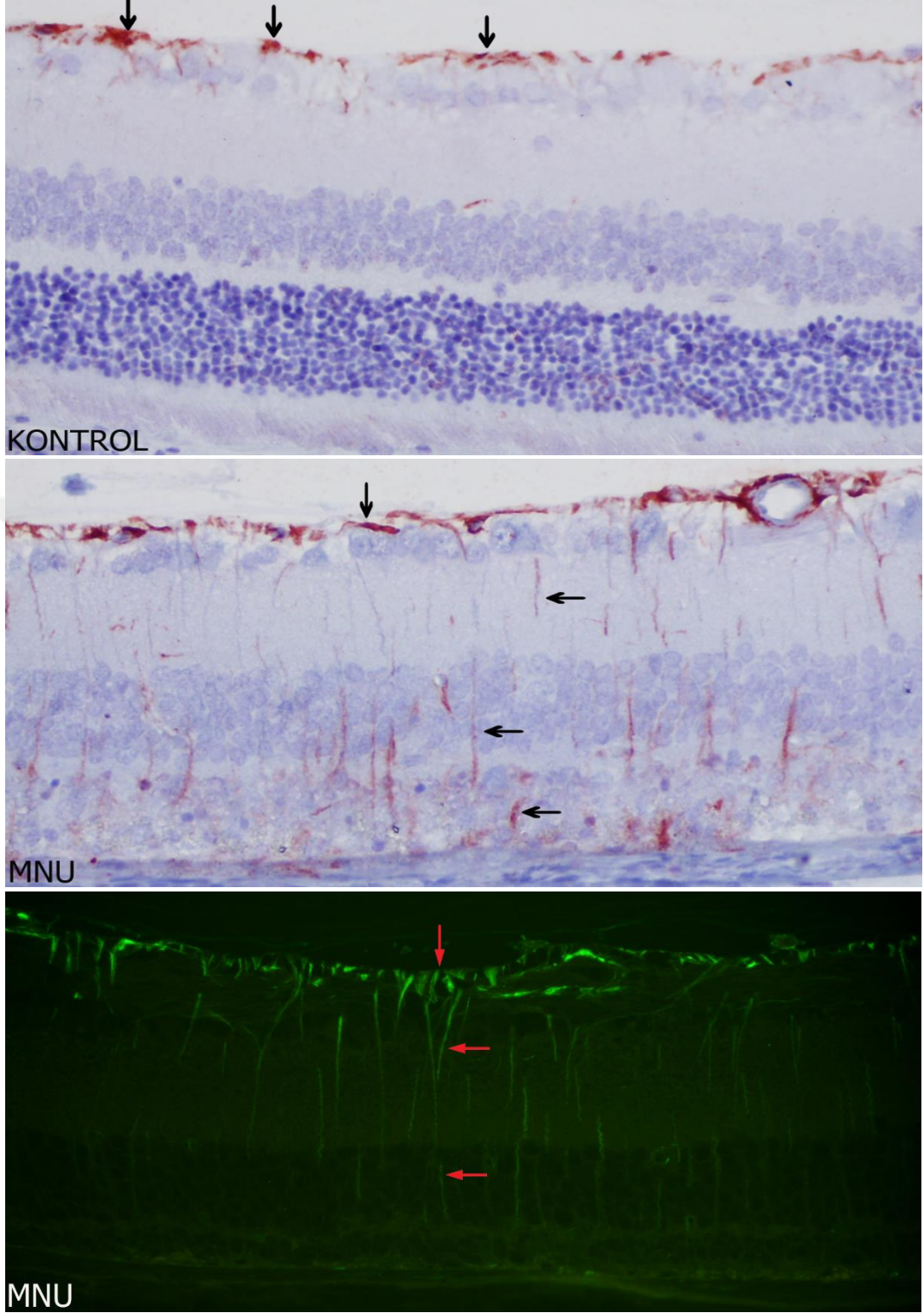
Şekil 60: Yetmişikinci saat, MNU grubu, PCNA, İP (A) ve İF (B) boyamaları, İNK, DNK ve FK' nda (oklar arasında kalan bölge) yoğun pozitiflikler (40X).



Şekil 61: Yetmişikinci saat, DDM grubu, PCNA, İP boyama, deney gruplarında, sentralden perifere gidildikçe azalan pozitiflikler (10X).

5.4.4.6. GFAP

Yetmişikinci saat GFAP, İP ve İF boyamalarında; 48. saatte, GHK ve optik sinire ek olarak, sadece deney gruplarında, İPK, İNK, DNK ve FK da, ince, GHK'ndan uzanan saçaklanmalar tarzında, orta şiddette görülen pozitifliğin artış gösterdiği görüldü (şekil 62). Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu, deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı ($p < 0,05$).



Şekil 62: Yetmişikinci saat GFAP, İP ve İF boyamaları; siyah ve kırmızı oklar; pozitiflikleri göstermektedir (40X).

5.4.4.7. Bax

Bax İP boyamalarında, 72. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 48. saatte en yüksek seviyeye ulaşan pozitifliğin son derece azaldığı, DNK ve FK da hafif zemin boyanması tarzında pozitiflik verdiği, sentral retinadan periferine doğru gidildikçe, bu hafif pozitifliğinde kaybolduğu görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.

5.4.4.8. Bcl-2

Yetmişikinci saat Bcl-2, İP boyamalarında, 48. saatte görülen bulgulara oldukça benzer şekilde tüm gruplarda, kontrol grubu retinalarında daha belirgin olmak kaydıyla, DNK ve FK' nda hafif şiddette boyanmalarına rastlanıldı. Deney gruplarında Bcl-2 pozitifliğinin 12. ve 24. saatlere göre daha azaldığı görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.

5.4.4.9. Kaspaz-3

Kaspaz-3, İP boyamalarında, 72. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 48. Saatte en yüksek seviyeye ulaşan pozitifliğin son derece azaldığı, DNK ve FK da hafif zemin boyanması tarzında pozitiflik verdiği, sentral retinadan periferine doğru gidildikçe, bu hafif pozitifliğinde kaybolduğu görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık

istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.

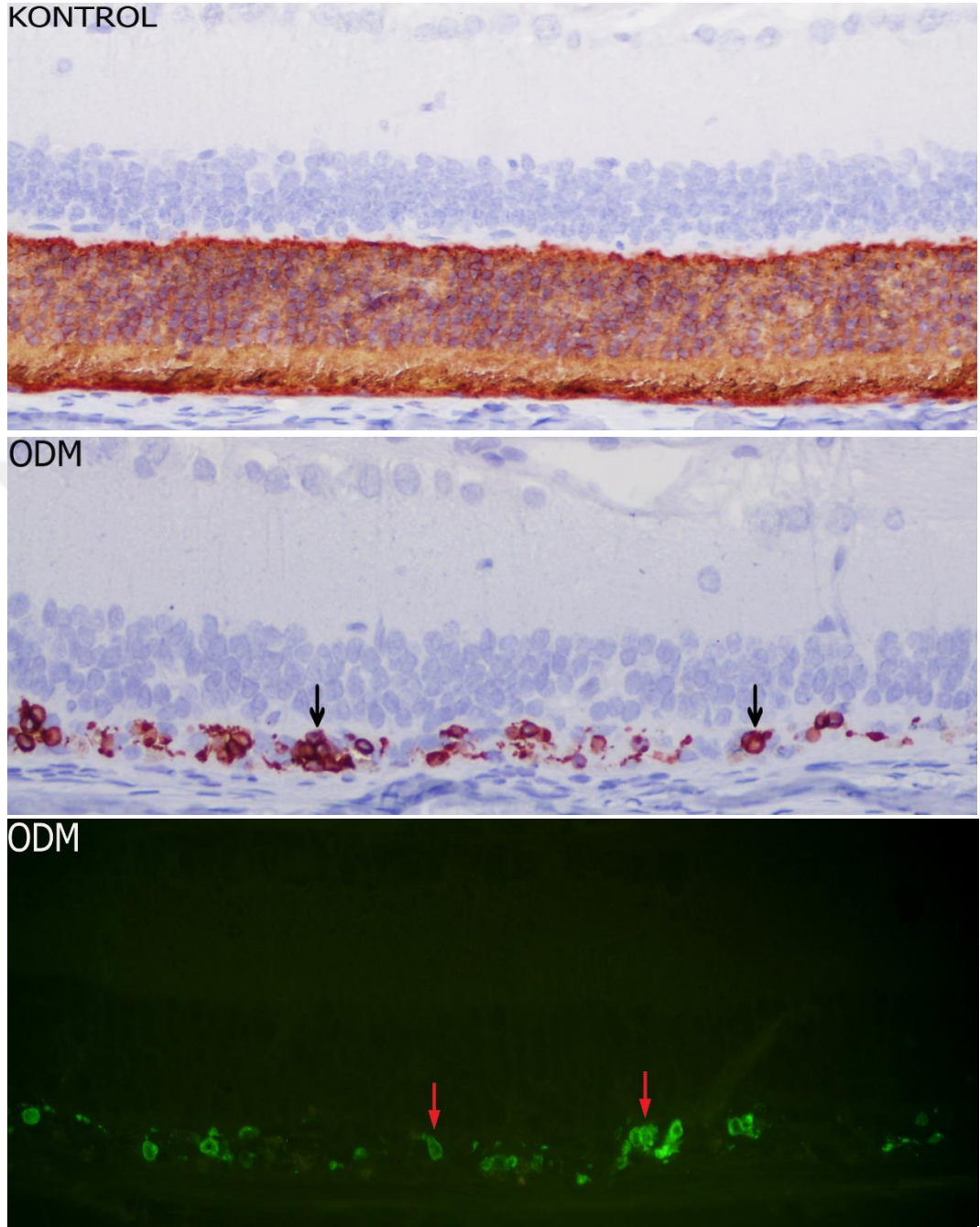
5.4.4.10. Kaspaz-6

Kaspaz-6, İP boyamalarında, 72. saatte kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında, 48. saatte en yüksek seviyeye ulaşan pozitifliğin son derece azaldığı, DNK ve FK da hafif zemin boyanması tarzında pozitiflik verdiği, sentral retinadan perifere doğru gidildikçe, bu hafif pozitifliğinde kaybolduğu görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.

5.4.5. Yedinci Gün Bulguları

5.4.5.1. Rodopsin

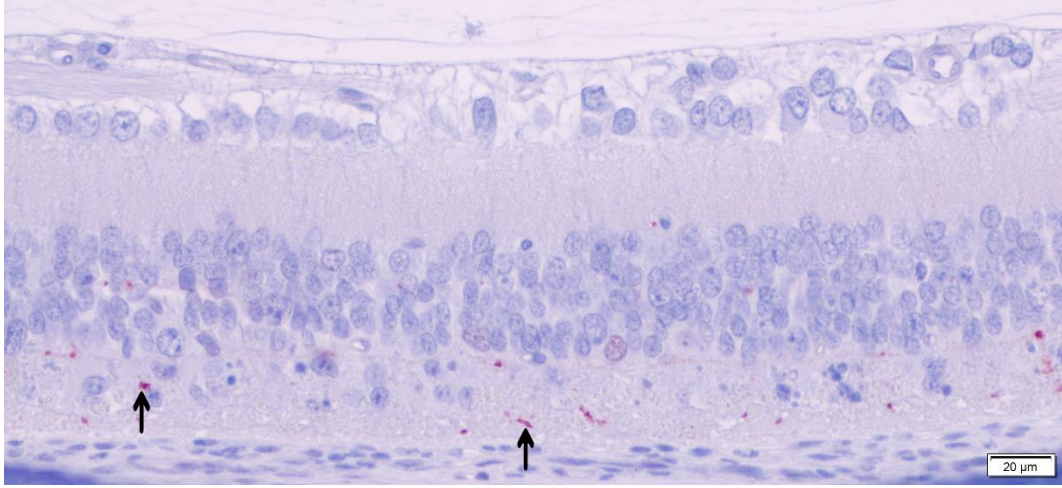
Rodopsinin, 7. gün İP ve İF boyamalarında, kontrol grubunun, önceki saatlerdeki gibi yoğun boyandığı görülürken, deney gruplarının sentral retinalarında, DNK da boyanmanın son derece azaldığı, sadece sağ kalan az sayıdaki fotoreseptör hücre çekirdeklerinin etrafında boyanmaların olduğu, FK da ise boyanmanın olmadığı görüldü (şekil 63). Yetmişikinci saate kıyasla, 7. gün de, DNK da sağ kalan fotoreseptör hücre çekirdeği sayısı daha az olduğu için pozitifliğin daha da düşük seviyelerde olduğu görüldü. Perifere doğru gidildikçe pozitifliğin arttığı, kontrol grubu ile benzer görünümün elde edildiği tespit edildi. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 63: Yedinci gün rodopsin, İP ve İF boyamaları; deney gruplarında DNK da ve FK da, kontrol grubuna göre pozitiflikler azalmış durumda ve sadece sağ kalan az sayıdaki fotoreseptör hücre çekirdeklerin çevresinde pozitiflikler görülmektedir (**Oklar**) (40X).

5.4.5.2. Red/Green Opsin

Red/Green opsinin, 7. gün, İP ve İF boyamalarında, kontrol grubunun önceki saatlerde ki gibi boyandığı görülürken, deney grupların tümünde, sentral retinanın DNK' ı ve FK' nda, kontrol grubuna göre boyanmanın son derece azaldığı görüldü. Önceki saat dilimlerinde, uzun-ince tarzda görülen boyanmaların, parçalanmış-partiküler bir görünümde olduğu, fotoreseptör hücre sayısının son derece azalması sebebiyle boyamaların da ileri derecede azaldığı belirlendi (şekil 64). Perifere doğru gidildikçe fotoreseptör hücre sayısının artmasıyla doğru orantılı olarak red/green opsin pozitifliğinin de arttığı görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 64: Yedinci gün, DDM grubu, red/green opsin, İP boyama, DNK da partiküler tarzda pozitiflikler (**oklar**).

5.4.5.3. Blue Opsin

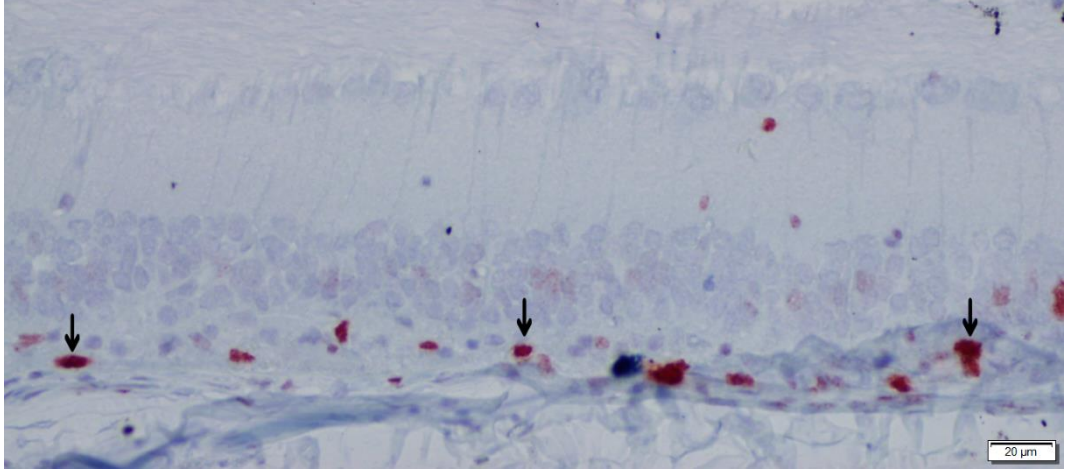
Yedinci günde ötenazi edilen hayvanların retinalarında, tüm gruplarda, blue opsin İP ve İF boyamalarında herhangi bir pozitifliğe rastlanılmadı.

5.4.5.4. 8-OHdG

8-OHdG, İP ve İF boyamalarında, 7. günde kontrol grubunda ve deney gruplarında pozitifliğe rastlanılmadı.

5.4.5.5. PCNA

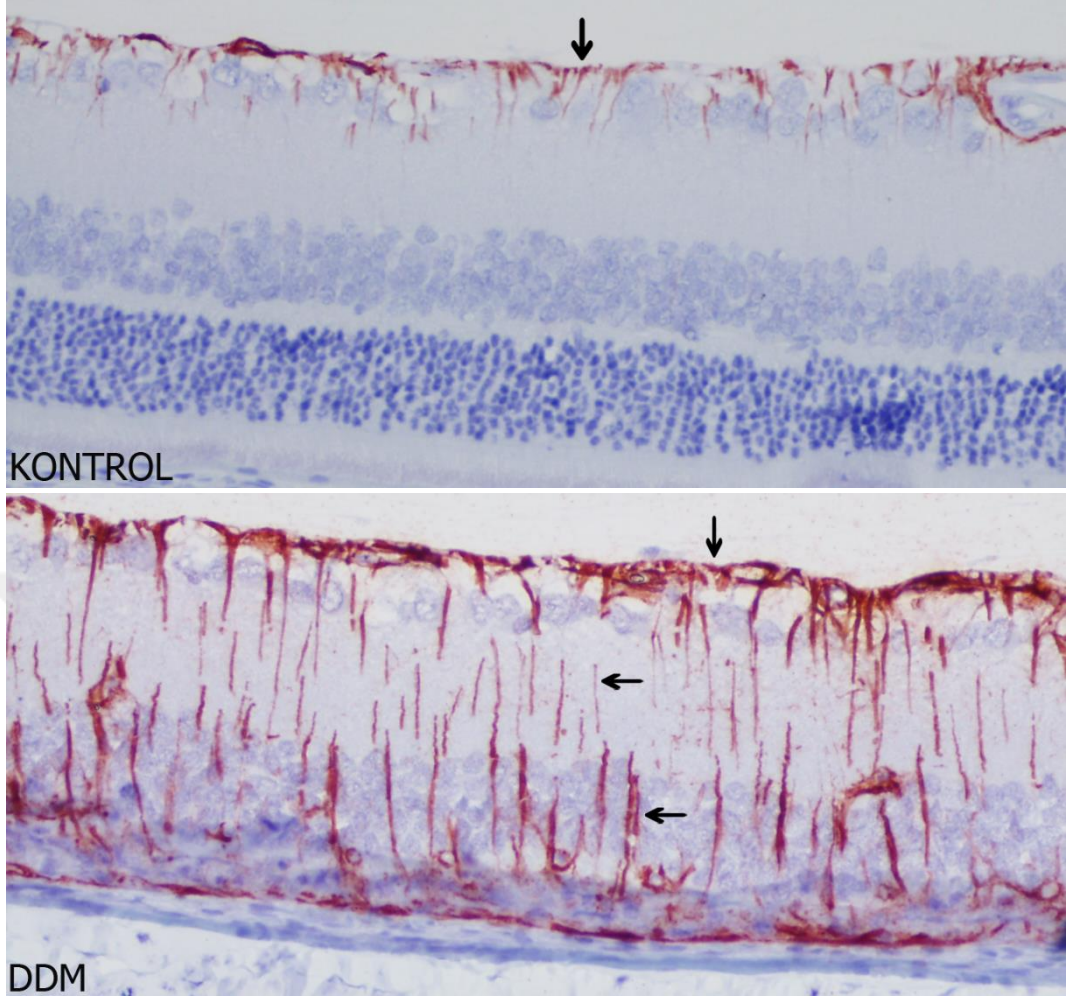
Yedinci gün, PCNA, İP ve İF boyamalarında, 72. saatte en üst seviyeye çıkan pozitifliğin 7. günde azaldığı, ama devam ettiği, boyanmaların hücre çekirdekleri ile sınırlı olduğu görüldü. Optik sinire yakın bölgelerde yıkım çok şiddetli olduğu için, pozitifliklerin, neredeyse tamamen yok olan ve ayrımı yapılamayan DNK ve FK da yoğunlaştığı, periferde doğru gidildikçe pozitifliklerin azaldığı ve belli bir bölgeden sonra tamamen son bulduğu görüldü (şekil 65). Kontrol grubunda ise boyanma görülmedi. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$), deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı.



Şekil 65: Yedinci gün, PCNA, İP boyama, DNK ve FK da seyrek pozitiflikler (oklar).

5.4.5.6. GFAP

Yedinci gün GFAP, İP ve İF boyamalarında; 72. saatte, GHK ve optik sinire ek olarak, sadece deney gruplarında, İPK, İNK, DNK ve FK da, ince, GHK'ndan uzanan saçaklanmalar tarzında, orta şiddette görülen pozitifliğin artış gösterdiği görüldü (şekil 66). GFAP pozitifliğinin en yüksek seviyeye ulaştığı zaman dilimi 7. gün olarak kaydedildi. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$), deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı.



Şekil 66: Yedinci gün, GFAP, İP boyama; DDM grubunda tüm katmanlarda, kontrol grubuna göre artmış pozitiflikler görülmektedir (**oklar**).

5.4.5.7. Bax

Bax, İP boyamalarında, 7. günde kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında ise, harap olmuş durumdaki DNK ve FK da oldukça hafif derecedeki zemin boyanması dışında pozitifliğe rastlanılmadı. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu, deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı ($p < 0,05$).

5.4.5.8. Bcl-2

Yedinci gün Bcl-2, İP boyamalarında, 72. saatte görülen bulgulara oldukça benzer şekilde tüm gruplarda, kontrol grubu retinalarında daha belirgin olmak kaydıyla, DNK ve FK' nda hafif şiddette boyanmalarara rastlanıldı. Deney gruplarında Bcl-2 pozitifliğinin önceki saatlere göre hafif derecede azaldığı görüldü. Kontrol grubu ile deney grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Deney grupları arasında ise farklılığa rastlanılmadı.

5.4.5.9. Kaspaz-3

Kaspaz-3, İP boyamalarında, 7. günde kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, deney gruplarında ise, harap olmuş durumdaki DNK ve FK da oldukça hafif derecedeki zemin boyanması dışında pozitifliğe rastlanılmadı. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu, deney grupları arasında ise farka rastlanılmadı ($p<0,05$).

5.4.5.10. Kaspaz-6

Yedinci günde ötenazi edilen hayvanların retinalarında, tüm gruplarda, kaspaz-6, İP boyamalarında herhangi bir pozitifliğe rastlanılmadı.

Tablo 15: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **rodopsin** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).

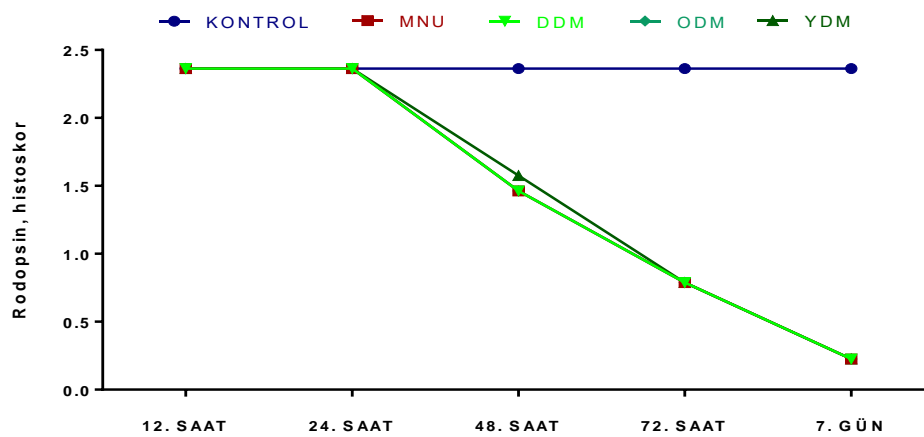
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	2.36±0.16	2.36±0.16	2.36±0.16 ^A	2.36±0.16 ^A	2.36±0.16 ^A	-
MNU	2.36±0.16 ^a	2.36±0.16 ^a	1.46±0.16 ^{Bb}	0.78±0.08 ^{Bc}	0.22±0.01 ^{Bd}	0.0001
DDM	2.36±0.16 ^a	2.36±0.16 ^a	1.46±0.16 ^{Bb}	0.78±0.08 ^{Bc}	0.22±0.01 ^{Bd}	0.0001
ODM	2.36±0.16 ^a	2.36±0.16 ^a	1.46±0.16 ^{Bb}	0.78±0.08 ^{Bc}	0.22±0.01 ^{Bd}	0.0001
YDM	2.36±0.16 ^a	2.36±0.16 ^a	1.57±0.14 ^{Bb}	0.78±0.08 ^{Bc}	0.22±0.01 ^{Bd}	0.0001
--P--*	-	-	0.001	0.0001	0.0001	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-d} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).



Şekil 67: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **Rodopsin** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

Tablo 16: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **Red/Green Opsin** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).

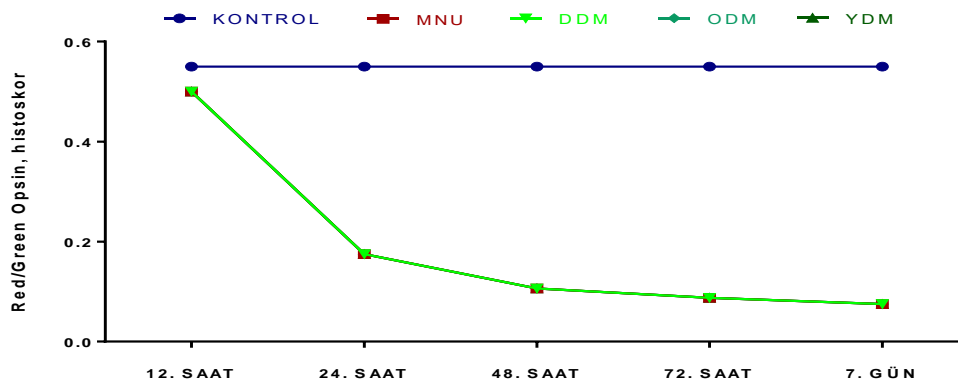
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.55±0.14	0.55±0.14 ^A	0.55±0.14 ^A	0.55±0.14 ^A	0.55±0.14 ^A	-
MNU	0.50±0.11 ^a	0.17±0.01 ^{Bb}	0.10±0.01 ^{Bb}	0.08±0.008 ^{Bb}	0.07±0.01 ^{Bb}	0.0001
DDM	0.50±0.11 ^a	0.17±0.01 ^{Bb}	0.10±0.01 ^{Bb}	0.08±0.008 ^{Bb}	0.07±0.01 ^{Bb}	0.0001
ODM	0.50±0.11 ^a	0.17±0.01 ^{Bb}	0.10±0.01 ^{Bb}	0.08±0.008 ^{Bb}	0.07±0.01 ^{Bb}	0.0001
YDM	0.50±0.11 ^a	0.17±0.01 ^{Bb}	0.10±0.01 ^{Bb}	0.08±0.008 ^{Bb}	0.07±0.01 ^{Bb}	0.0001
--P--*	0.998	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-b} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).



Şekil 68: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **Red/Green opsin** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

Tablo 17: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **8-OHdG** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).

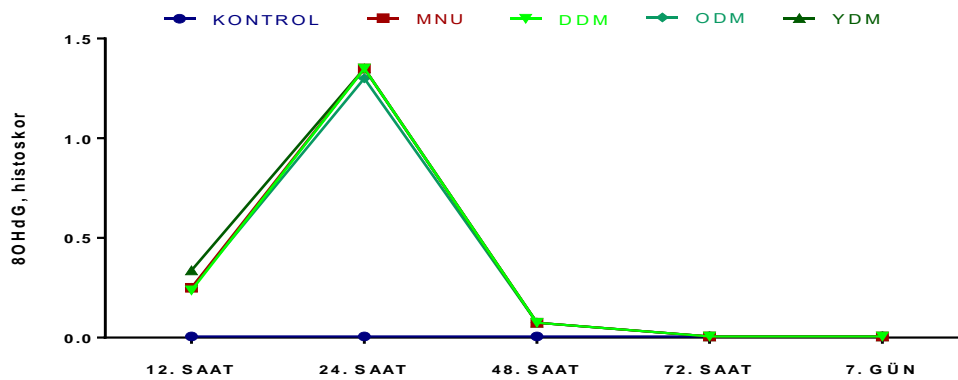
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00	0.00±0.00	-
MNU	0.25±0.08 ^{ABb}	1.35±0.09 ^{Aa}	0.07±0.01 ^{Abc}	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.0001
DDM	0.24±0.08 ^{ABb}	1.35±0.09 ^{Aa}	0.07±0.01 ^{Ab}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.0001
ODM	0.25±0.08 ^{ABb}	1.30±0.119 ^{Aa}	0.07±0.01 ^{Ab}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.0001
YDM	0.34±0.10 ^{Ab}	1.35±0.09 ^{Aa}	0.07±0.01 ^{Ac}	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.0001
--P--*	0.048	0.0001	0.007	-	-	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-c} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).



Şekil 69: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **8-OHdG** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

Tablo 18: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **PCNA** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).

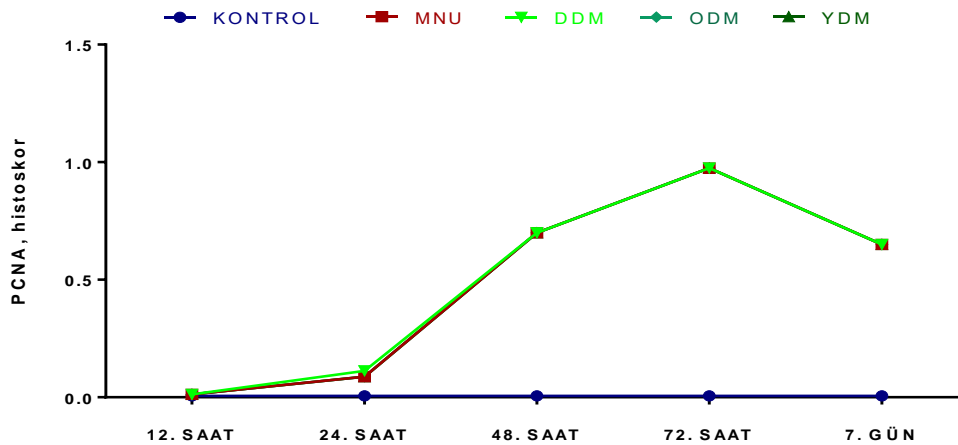
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.00±0.00	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	-
MNU	0.00±0.00 ^b	0.08±0.02 ^{ABb}	0.70±0.06 ^{Aa}	0.97±0.14 ^{Aa}	0.6±0.09 ^{Aa}	0.0001
DDM	0.00±0.00 ^b	0.11±0.02 ^{Ab}	0.70±0.06 ^{Aa}	0.97±0.14 ^{Aa}	0.6±0.09 ^{Aa}	0.0001
ODM	0.00±0.00 ^b	0.08±0.02 ^{ABb}	0.70±0.06 ^{Aa}	0.97±0.14 ^{Aa}	0.6±0.09 ^{Aa}	0.0001
YDM	0.00±0.00 ^b	0.08±0.02 ^{ABb}	0.70±0.06 ^{Aa}	0.97±0.14 ^{Aa}	0.6±0.09 ^{Aa}	0.0001
--P--*	-	0.010	0.0001	0.0001	0.0001	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-b} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).



Şekil 70: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **PCNA** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

Tablo 19: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **GFAP** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).

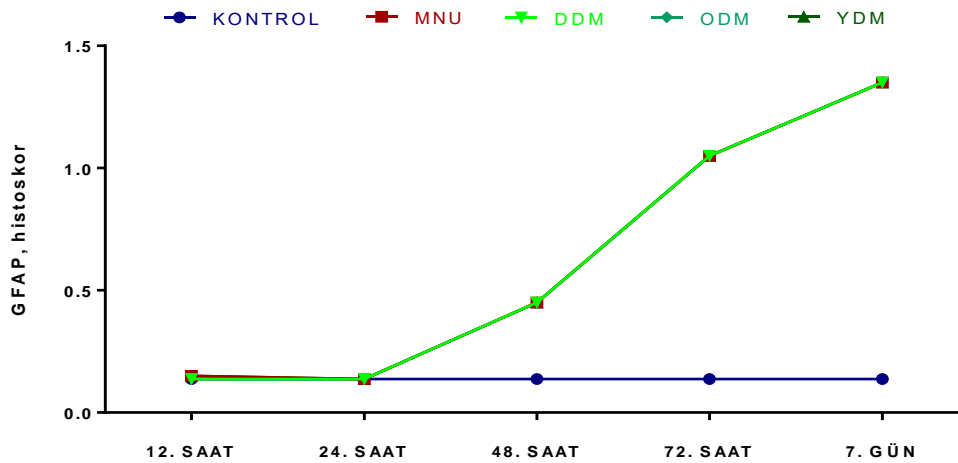
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01 ^B	0.13±0.01 ^B	0.13±0.01 ^B	1.000
MNU	0.15±0.01 ^b	0.13±0.01 ^b	0.45±0.03 ^{Ab}	1.05±0.16 ^{Aa}	1.35±0.09 ^{Aa}	0.0001
DDM	0.13±0.01 ^b	0.13±0.01 ^b	0.45±0.03 ^{Ab}	1.05±0.16 ^{Aa}	1.35±0.09 ^{Aa}	0.0001
ODM	0.13±0.01 ^b	0.13±0.01 ^b	0.45±0.03 ^{Ab}	1.05±0.16 ^{Aa}	1.35±0.09 ^{Aa}	0.0001
YDM	0.15±0.01 ^b	0.13±0.01 ^b	0.45±0.03 ^{Ab}	1.05±0.16 ^{Aa}	1.35±0.09 ^{Aa}	0.0001
--P--*	0.968	1.000	0.0001	0.0001	0.0001	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-b} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).



Şekil 71: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **GFAP** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

Tablo 20: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **Bax** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).

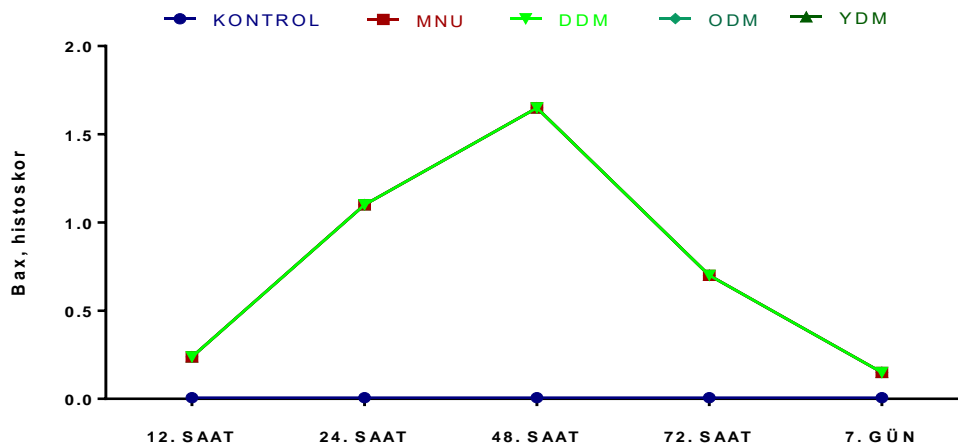
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	1.000
MNU	0.23±0.03 ^{Ad}	1.1±0.06 ^{Ab}	1.65±0.09 ^{Aa}	0.7±0.06 ^{Ac}	0.15±0.03 ^{Ad}	0.0001
DDM	0.23±0.03 ^{Ad}	1.1±0.06 ^{Ab}	1.65±0.09 ^{Aa}	0.7±0.06 ^{Ac}	0.15±0.03 ^{Ad}	0.0001
ODM	0.23±0.03 ^{Ad}	1.1±0.06 ^{Ab}	1.65±0.09 ^{Aa}	0.7±0.06 ^{Ac}	0.15±0.03 ^{Ad}	0.0001
YDM	0.23±0.03 ^{Ad}	1.1±0.06 ^{Ab}	1.65±0.09 ^{Aa}	0.7±0.06 ^{Ac}	0.15±0.03 ^{Ad}	0.0001
--P--*	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.004	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-d} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).



Şekil 72: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **Bax** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

Tablo 21: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **Bcl-2** seviyeleri üzerindeki etkileri (Histoskorlar).

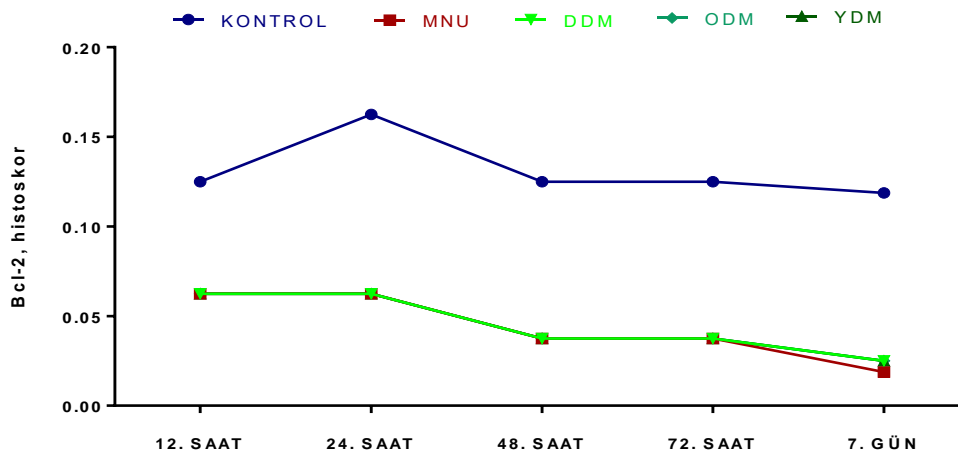
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.13±0.03 ^A	0.16±0.05 ^A	0.13±0.03 ^A	0.13±0.03 ^A	0.12±0.04 ^A	0.972
MNU	0.06±0.01 ^{Ba}	0.06±0.01 ^{Ba}	0.03±0.00 ^{Bab}	0.03±0.00 ^{Bab}	0.01±0.00 ^{Bb}	0.009
DDM	0.06±0.01 ^{Ba}	0.06±0.01 ^{Ba}	0.03±0.00 ^{Bab}	0.03±0.00 ^{Bab}	0.02±0.00 ^{Bb}	0.026
ODM	0.06±0.01 ^{Ba}	0.06±0.01 ^{Ba}	0.03±0.00 ^{Bab}	0.03±0.08 ^{Bab}	0.02±0.00 ^{Bb}	0.026
YDM	0.06±0.01 ^{Ba}	0.06±0.01 ^{Ba}	0.03±0.00 ^{Bab}	0.03±0.00 ^{Bab}	0.02±0.00 ^{Bb}	0.026
--P--*	0.49	0.033	0.003	0.003	0.002	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-b} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0.05).



Şekil 73: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **Bcl-2** seviyeleri üzerindeki etkileri (Histoskor).

Tablo 22: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak, **kaspaz-3** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskorlar).

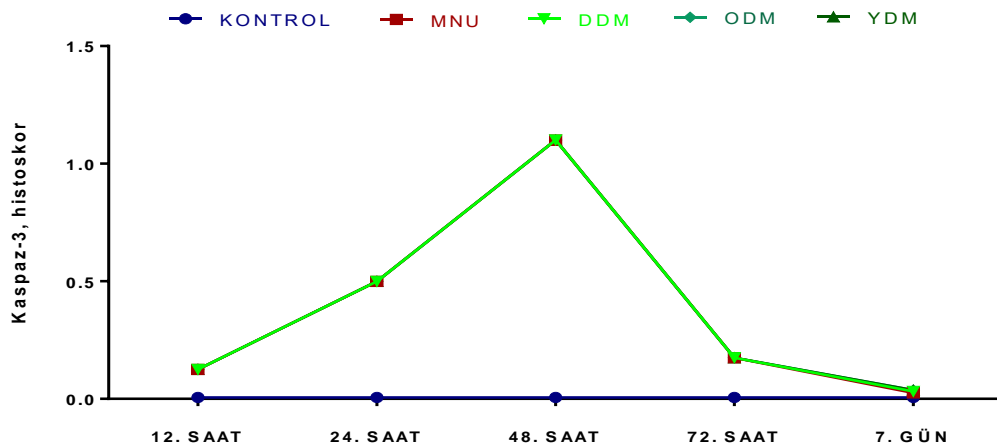
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00	-
MNU	0.12±0.01 ^{Ac}	0.5±0.06 ^{Ab}	1.1±0.06 ^{Aa}	0.17±0.01 ^{Ac}	0.02±0.00 ^c	0.0001
DDM	0.12±0.01 ^{Ac}	0.5±0.06 ^{Ab}	1.1±0.06 ^{Aa}	0.17±0.01 ^{Ac}	0.03±0.00 ^c	0.0001
ODM	0.12±0.01 ^{Ac}	0.5±0.06 ^{Ab}	1.1±0.06 ^{Aa}	0.17±0.01 ^{Ac}	0.03±0.00 ^c	0.0001
YDM	0.12±0.01 ^{Ac}	0.5±0.06 ^{Ab}	1.1±0.06 ^{Aa}	0.17±0.01 ^{Ac}	0.03±0.00 ^c	0.0001
--P--*	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.066	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-c} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0.05).



Şekil 74: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **Kaspaz-3** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

Tablo 23: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **Kaspaz-6** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

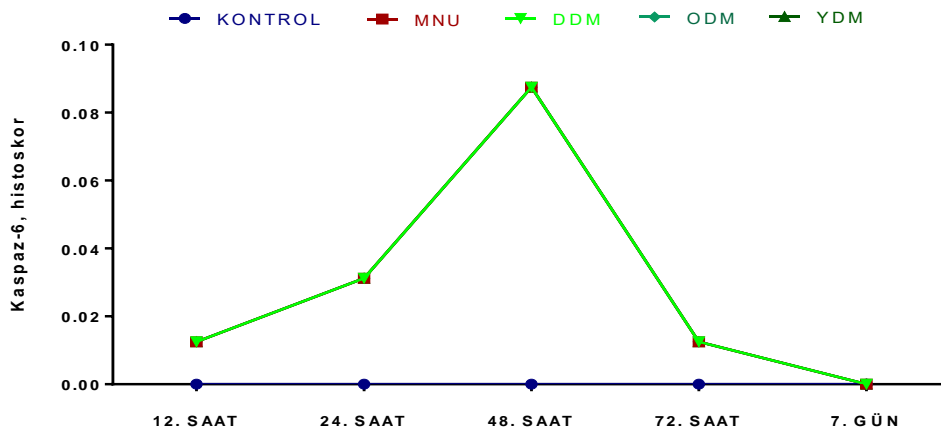
	Zaman					--P--*
	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	7. gün	
Kontrol	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00 ^B	0.00±0.00	0.00±0.00	-
MNU	0.01±0.00 ^b	0.03±0.00 ^b	0.08±0.00 ^{Aa}	0.01±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.0001
DDM	0.01±0.00 ^b	0.03±0.00 ^b	0.08±0.00 ^{Aa}	0.01±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.0001
ODM	0.01±0.00 ^b	0.03±0.00 ^b	0.08±0.00 ^{Aa}	0.01±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.0001
YDM	0.01±0.00 ^b	0.03±0.00 ^b	0.08±0.00 ^{Aa}	0.01±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.0001
--P--*	0.972	0.179	0.0001	0.972	-	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

* Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilirken grupların ikili karşılaştırılmalarında *post hoc* test olarak Tukey kullanılmıştır.

^{A-B} Aynı sütunda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).

^{a-b} Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlıdır (P<0.05).



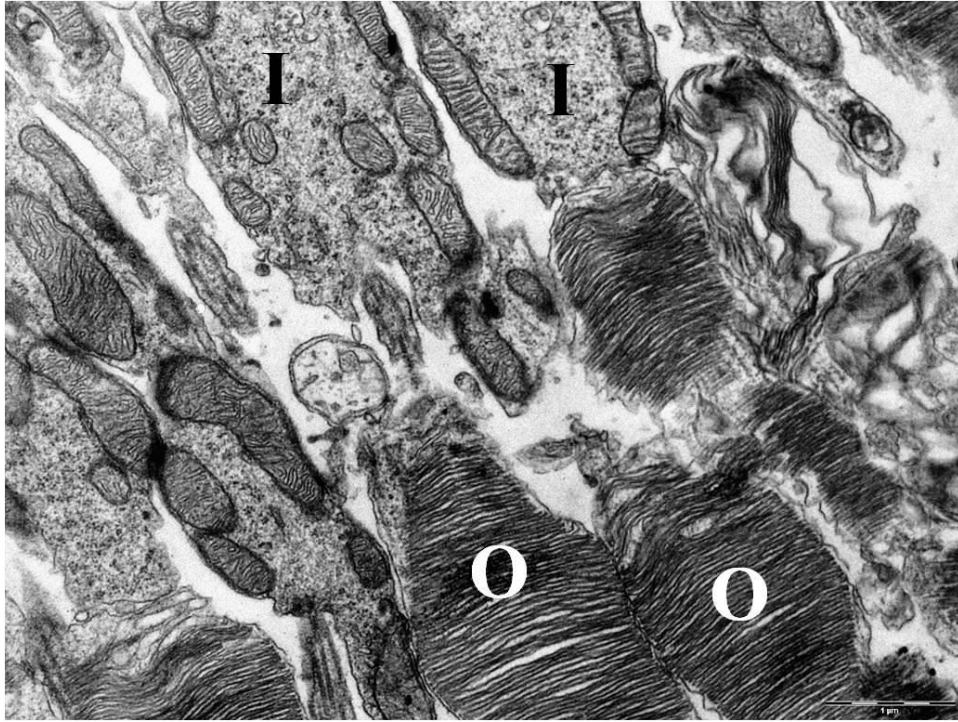
Şekil 75: Sıçanlarda, N-Metil-N-Nitrozüre ile oluşturulan deneysel retina dejenerasyonunda üç farklı dozda (50, 75 ve 100 mg/kg) kullanılan minosiklinin zamana bağlı olarak **Kaspaz-6** seviyeleri üzerine etkileri (Histoskor).

5.5. Elektron Mikroskopik Bulgular

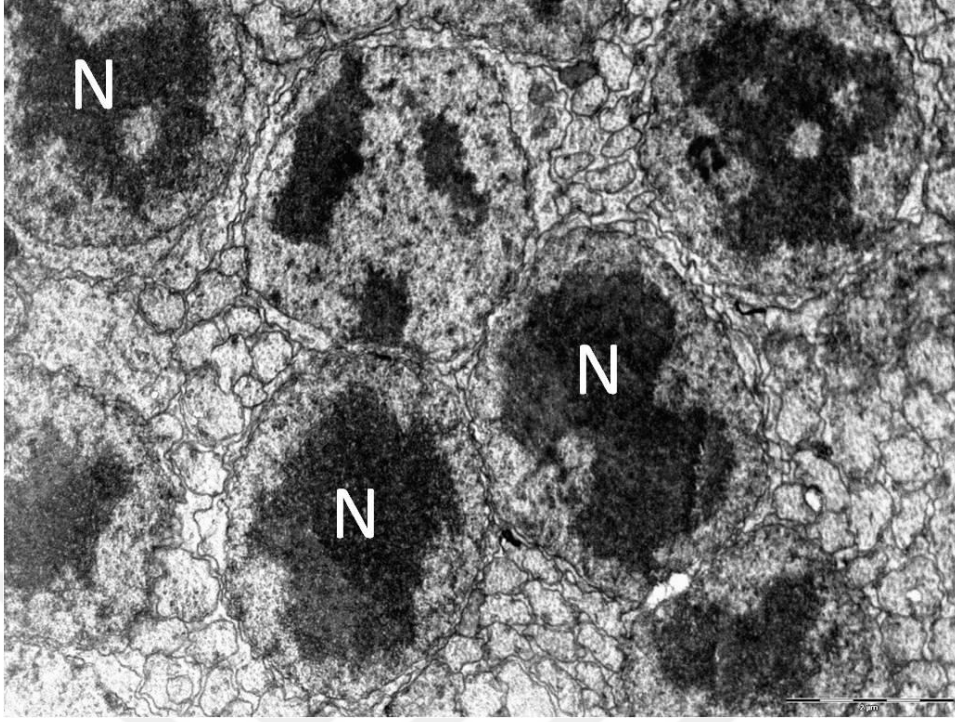
Elektron mikroskopik inceleme için alınan retina örneklerinin **12. saat analizlerinde;** MNU uygulanan deney gruplarının tümünde, dış nükleer katmandaki (DNK) fotoreseptör hücre çekirdeklerinde nükleer piknozis en dikkat çeken bulgu olarak kaydedildi (şekil 80, 81). Ayrıca nükleer kromatolizis ve intrastoplazmik miyelin figürlerin varlığı dikkati çekti (şekil 80, 81). Fotoreseptör katmanında (FK) ise, çubuk ve koni reseptörlerin iç segmentlerinde piknotik mitokondriyonlar ve dış segment disklerinde yoğunlaşma ve dejeneratif değişiklikler görüldü (şekil 79). İç nükleer tabakada ise, sayıları az olmakla beraber, dejenere olmuş bipolar ve amakrin hücrelere rastlanıldı. Bu hücrelerde, intrastoplazmik ödem, miyelin figürler, mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı dikkati çekti (şekil 82). Müller hücrelerinin ise etkilenmediği görüldü.

Yirmidördüncü saat incelemelerinde; MNU uygulanan deney gruplarının tümünde, DNK da ki nükleus kondensasyonu ve piknozun artarak ve daha fazla hücrede görülerek devam ettiği görüldü. Ayrıca hücre dejenerasyonun ilerlediği ve intrastoplazmik hidropik vakuollerin varlığı dikkati çekti (şekil 84). Benzer şekilde FK' nda da dejeneratif değişikliklerin ilerlediği görüldü. **Kırksekinci saatte;** MNU uygulanan deney gruplarında, DNK da nükleus kondensasyonu ve piknoza ek olarak total organel dejenerasyonu dikkati çekti (şekil 85, 86). FK' nda da dejenerasyonun ilerlediği, dış segment lamellerinde düzensizlik ve yoğunlaşmanın var olduğu görüldü. **Yetmişikinci saatte;** MNU uygulanan gruplarda, DNK da nükleus kondensasyonu, piknozis, nükleer kromatolizis ve nükleus fragmentasyonu görüldü (şekil 90). FK' nda ise fotoreseptör hücrelerde, piknotik mitokondriyonlar, lizozim birikimleri ve miyelin figür içeren otofagozomların varlığı dikkati çekti

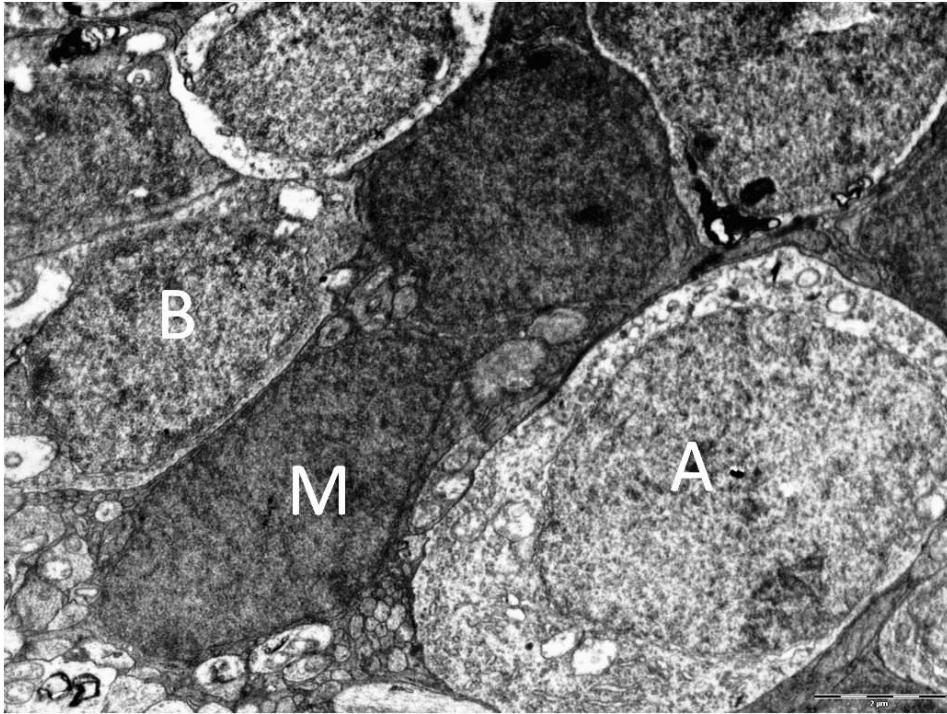
(Şekil 89). İç nükleer katmanda ise az sayıda amakrin hücrede dejeneratif değişiklikler, intrastoplazmik ödem, bazı bipolar hücrelere ise mitokondriyal dilatasyon ve krista kaybı gözlemlendi. **Yedinci günde;** yine MNU uygulanan tüm gruplarda, DNK da, nükleer kondensasyonlu ve piknotik hücreler varlıklarını sürdürürken, çok sayıda nükleer kromatolizisli ve fragmentasyonlu hücrenin olduğu dikkati çekti (şekil 93). FK ve İNK da ki değişimlerin, önceki periyotlardakilere benzerlik gösterdiği görüldü.



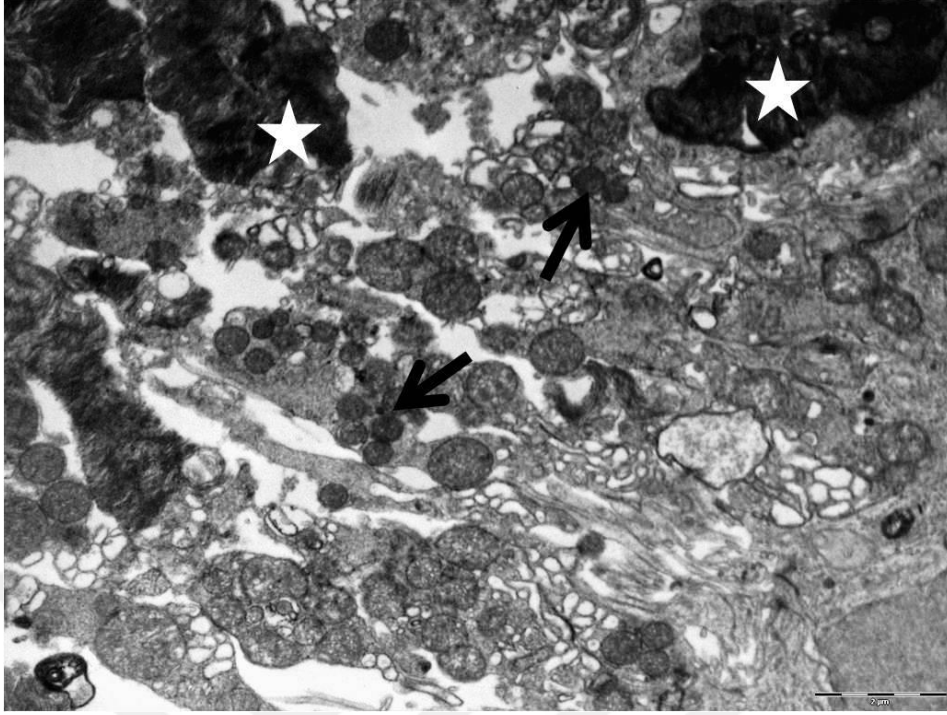
Şekil 76: Kontrol grubunda çubuk ve koni reseptörlerin iç (I) ve dış (O) segmentlerinin normal görünümü, fotoreseptör katmanı (Bar=1 µm).



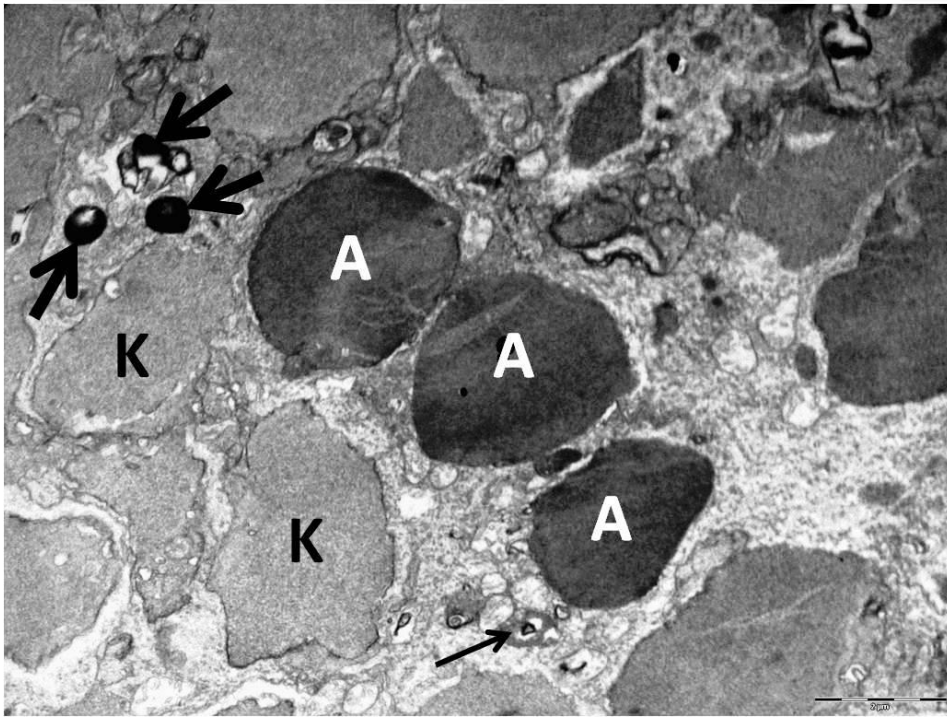
Şekil 77: Kontrol grubunda çubuk ve koni reseptörlerin çekirdeklerinin (N) normal görünümü, dış nükleer katman (Bar=2 μ m).



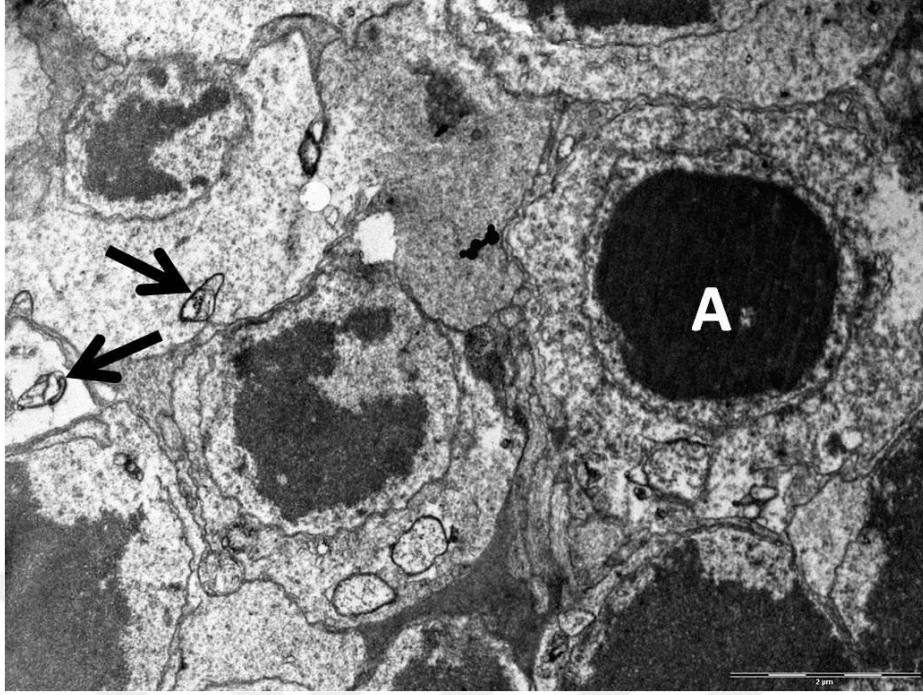
Şekil 78: Kontrol grubunda bipolar (B), amakrin (A) ve Müller (M) hücrelerin normal görünümü, iç nükleer katman (Bar=2 μ m).



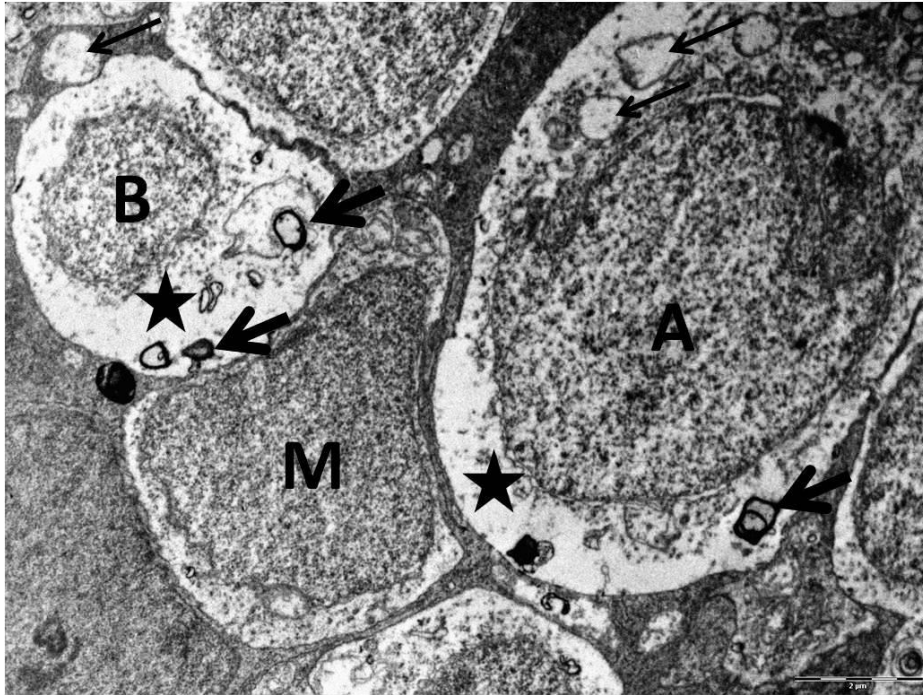
Şekil 79: MNU grubunda çubuk ve koni hücrelerin iç segmentlerinde piknotik mitokondriyonlar (ok), dış segment disklerinde yoğunlaşma (yıldız) (12. saat) (Bar=2 μ m).



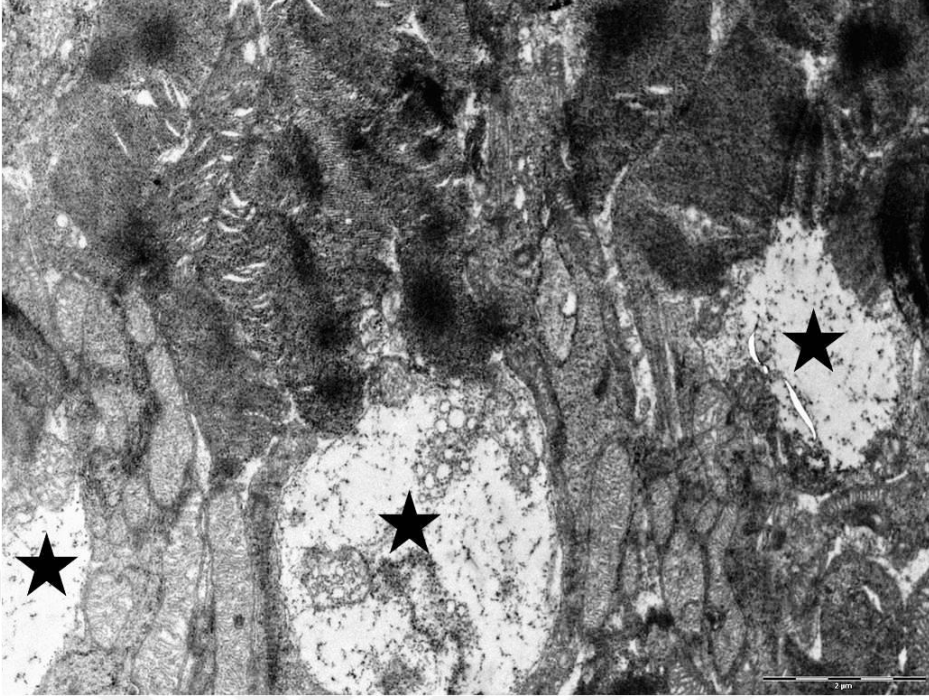
Şekil 80: MNU grubunda DNK hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A), nuklear kromatolizis (K), ve sekonder lizozomlar (ok) (12.saat) (Bar=2 μ m).



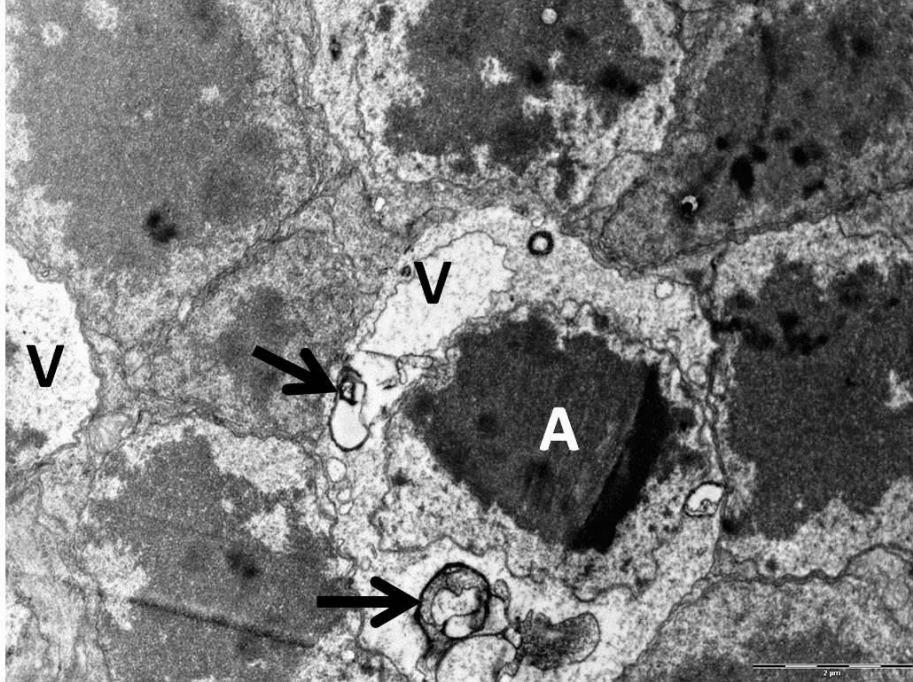
Şekil 81: YDM grubunda DNK hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A) ve intrastoplazmik miyelin figürler (ok) (12.saat) (Bar=2 μm).



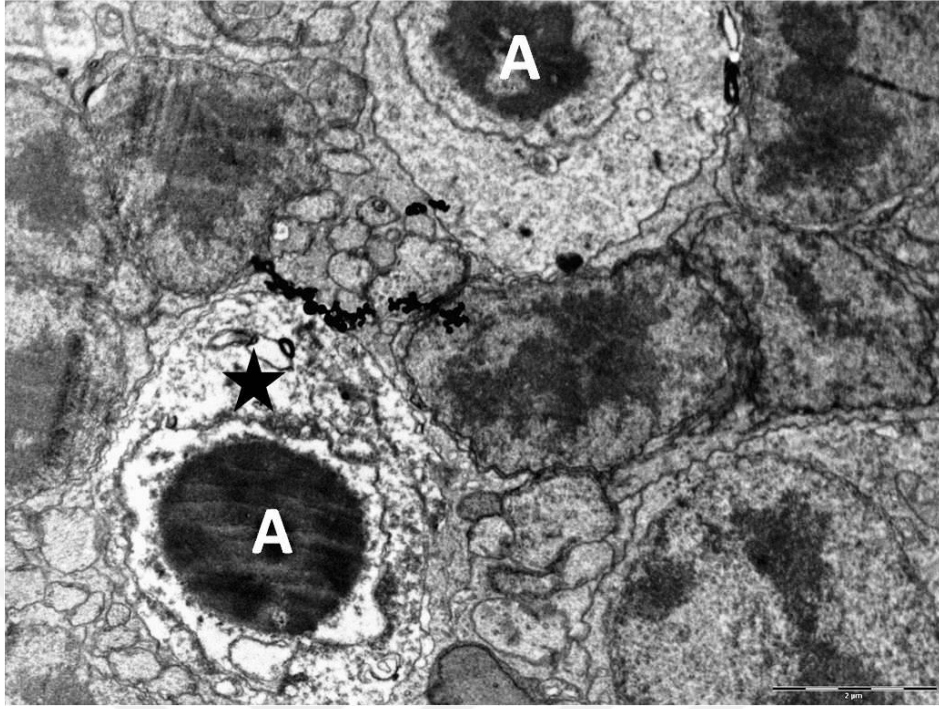
Şekil 82: MNU grubunda iç nuklear tabaka, bipolar hücre (B) ve amakrin hücrelerde (A) dejenerasyon ve intrastoplazmik ödem (yıldız), miyelin figürler (kalın ok), mitokondriyonlarda dilatasyon ve krista kaybı (ince ok), normal Müller hücresi (M). (12.saat) (Bar=2μm).



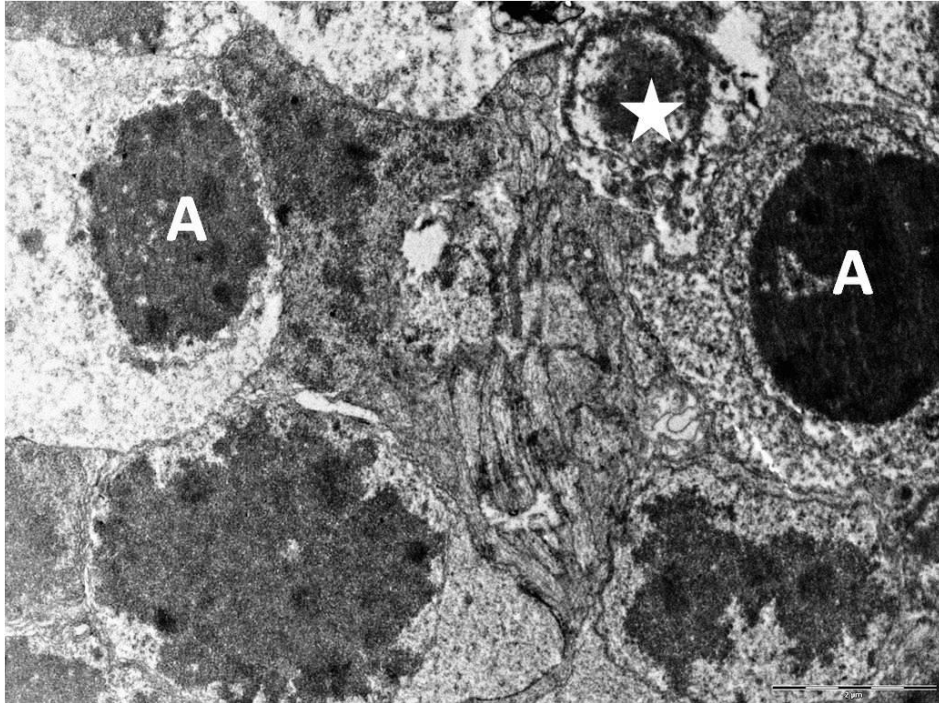
Şekil 83: DDM grubunda, çubuk ve koni reseptörlerde dejenerasyon (yıldız), fotoreseptör katmanı. (24.saat) (Bar=2 μ m).



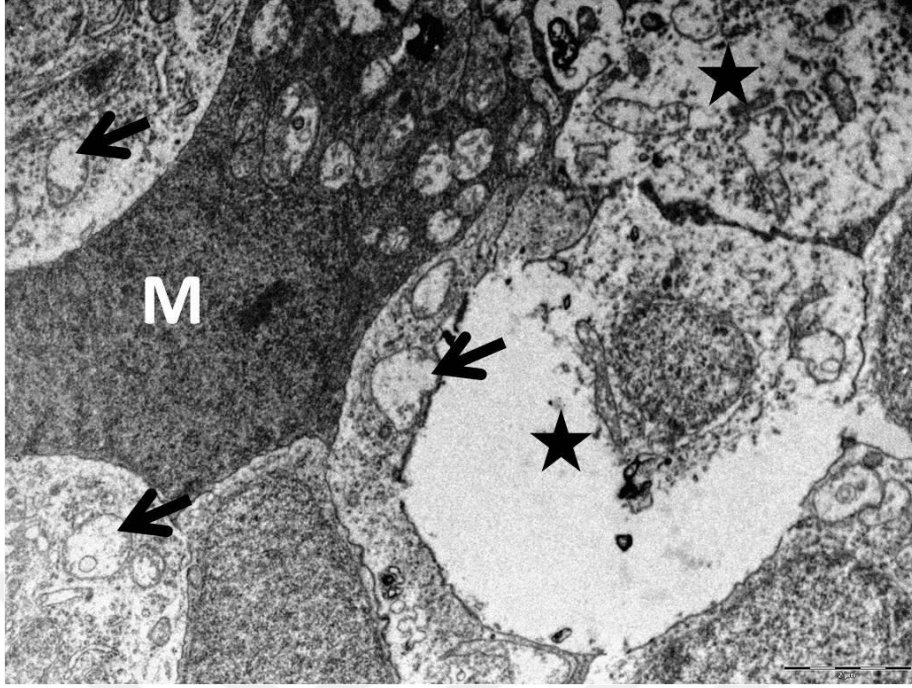
Şekil 84: DDM grubunda, dış nükleer tabaka hücrelerinde nükleus kondensasyonu ve piknosis (A), intrasitoplazmik miyelin figürler (ok) ve hidropik vakuoller (V). (24.saat) (Bar=2 μ m).



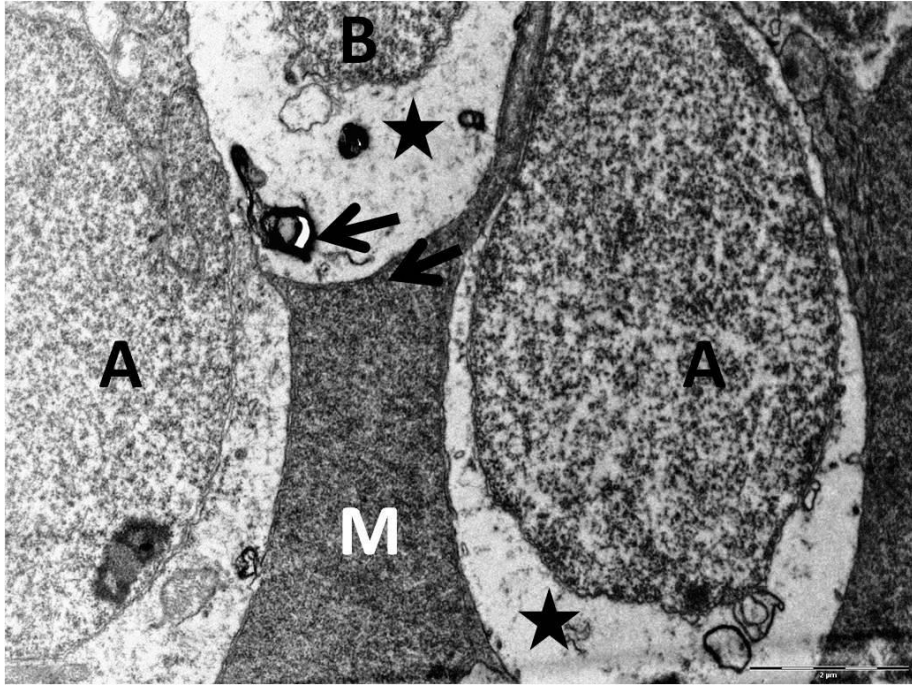
Şekil 85: MNU grubunda, dış nükleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A), total organel dejenerasyonu (yıldız). (48. saat) (Bar=2 µm).



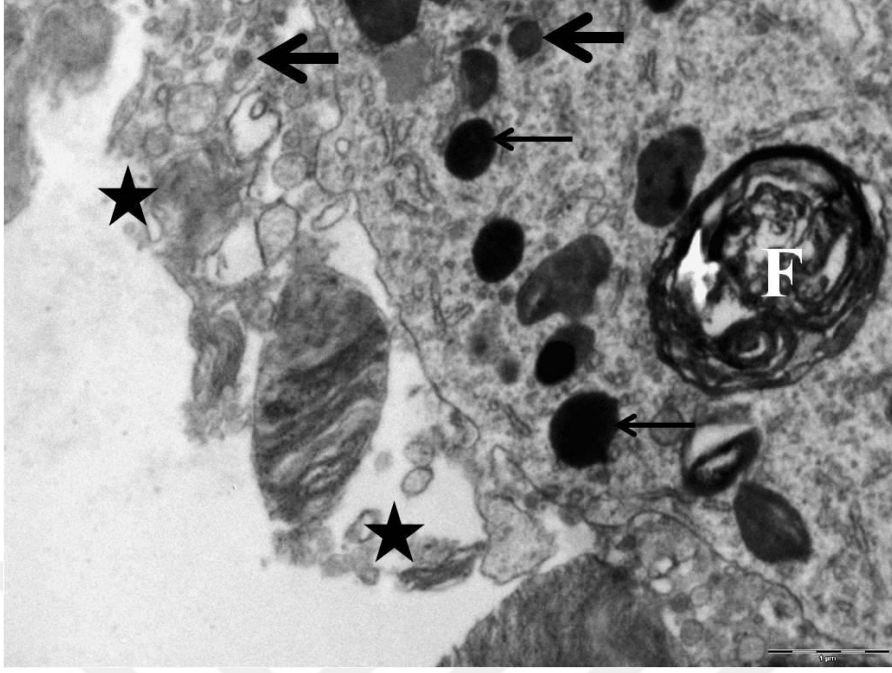
Şekil 86: ODM grubunda, dış nükleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A), hücre dejenerasyonu (yıldız) (48. saat) (Bar=2 µm).



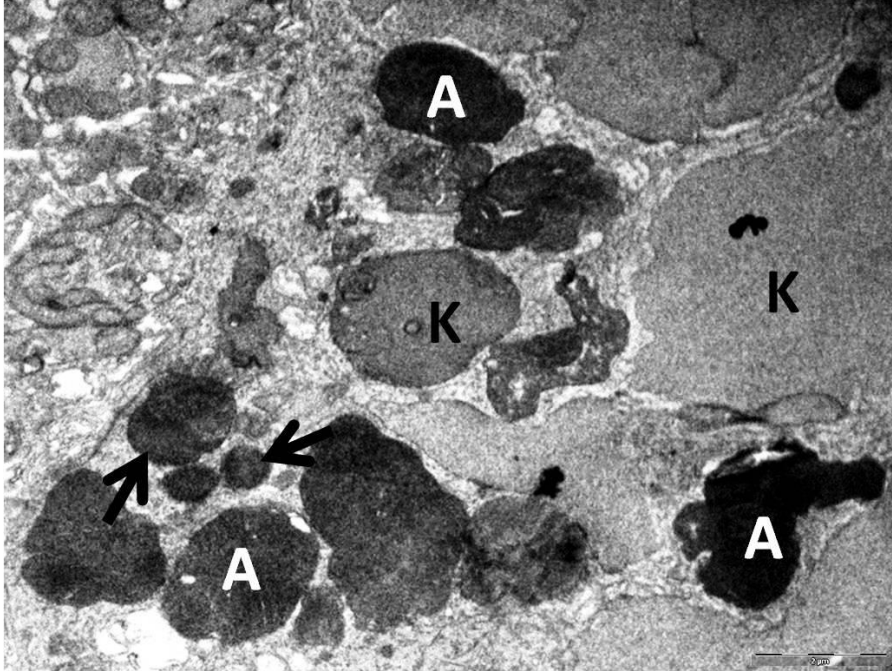
Şekil 87: MNU grubunda, iç nükleer tabakada amakrin ve bipolar hücrelerde dejenerasyon (yıldız), mitokondriyal dilatasyon ve krista kaybı (ok), Müller hücresi (M) (48. saat) (Bar=2 µm).



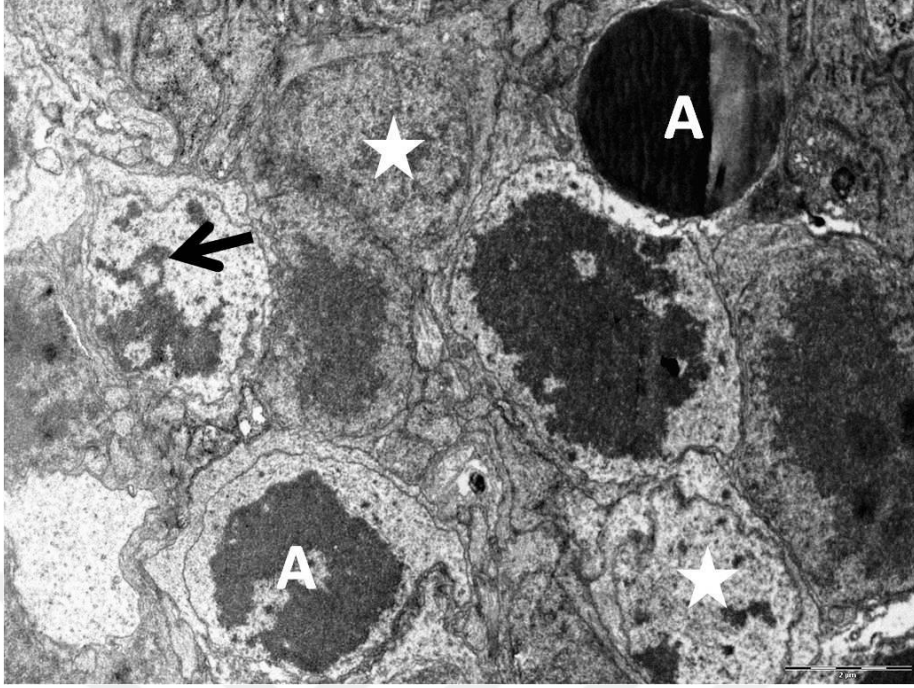
Şekil 88: ODM grubunda, iç nükleer tabaka, amakrin (A) ve bipolar (B) hücrelerde dejenerasyon ve intrasitoplazmik ödem (yıldız), miyelin figür (ok), Müller hücresi (M) (48. saat) (Bar=2 µm).



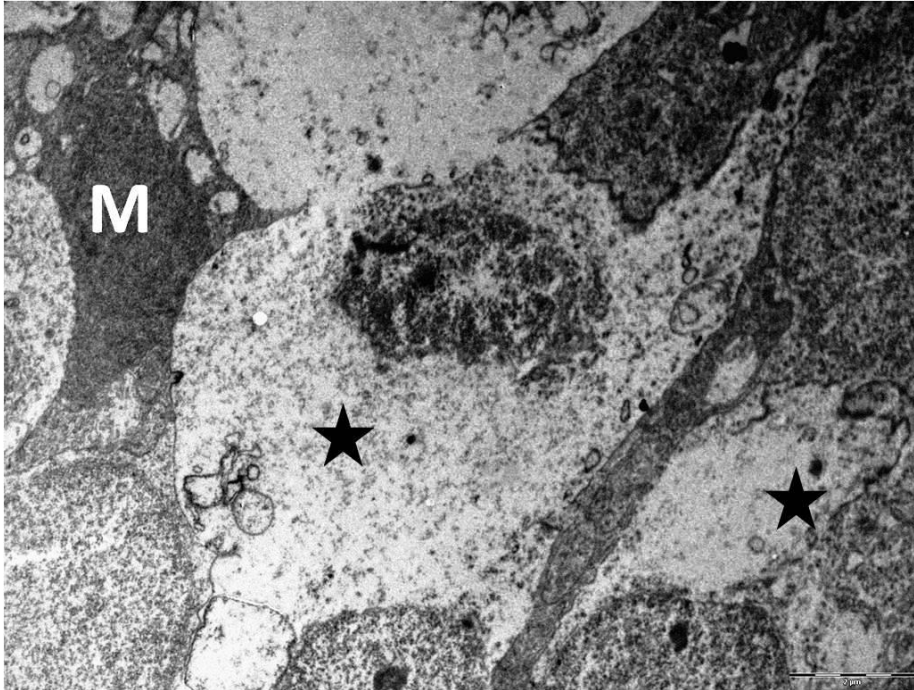
Şekil 89: MNU grubunda, çubuk ve koni reseptörlerde dejenerasyon (yıldız), piknotik mitokondriyonlar (kalın ok), lizozom birikimi (ince ok), miyelin figür içeren otofagozom (F) (Bar=1 μ m) (72. saat) (Bar=2 μ m).



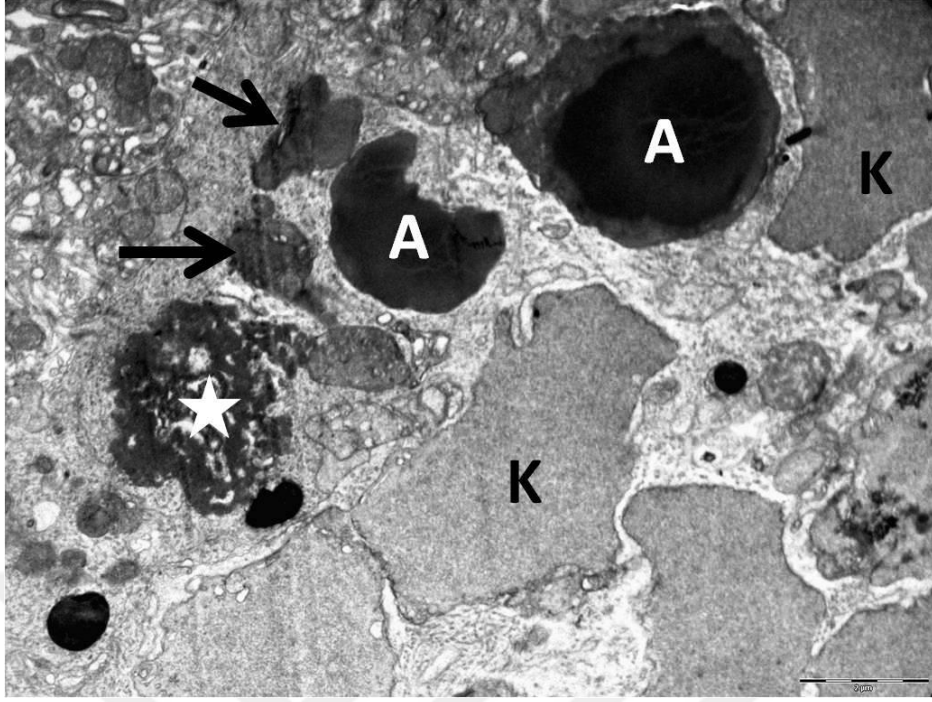
Şekil 90: MNU grubunda, dış nükleer tabaka hücrelerinde nükleus kondensasyonu ve piknosis (A) ve nuklear kromatolizis (K), nükleus fragmentasyonu (ok) (72. saat) (Bar=2 μ m)



Şekil 91: YDM grubunda, dış nükleer tabaka hücrelerinde nükleus kondensasyonu ve piknosis (A), nuklear kromatin fragmentasyonu (ok) ve nuklear kromatolizis (yıldız) (72. saat) (Bar=2 μ m).



Şekil 92: MNU grubunda, iç nükleer tabakada amakrin ve bipolar hücrelerde dejeneratif değişiklikler (yıldız), Müller hücresi (M) (72. saat) (Bar=2 μ m).



Şekil 93: MNU grubunda, dış nukleer tabaka hücrelerinde nukleus kondensasyonu ve piknosis (A) ve nuklear kromatolizis (K), nukleus fragmentasyonu (ok), hücre dejenerasyonu (yıldız) (7. gün) (Bar=2 µm).

6. TARTIŞMA

Retinitis pigmentosa (RP), insanlarda en önemli körlük sebepleri arasında gösterilen herediter bir retina hastalığıdır. Bilateral olarak seyreden, progresif, dejeneratif bir hastalıktır. Retinanın fotoreseptör hücrelerinin progresiv apoptotik ölümü hastalığa temel teşkil eder. Retinal dejenerasyon (RD) çalışmalarında sıklıkla model olarak kullanılmaktadır (6, 7).

Retinitis pigmentosa hastalığından sorumlu gen sayısının oldukça fazla olduğu bilinmektedir. Sadece rodopsin ile ilgili 30' dan fazla gen ve bu genlerde görülen 100' den fazla mutasyon bildirilmiştir (9). Bu nedenle retinitis pigmentosa modeli oluşturmak için uygun genetik modeli seçmek oldukça zordur. (26, 91, 92). N-Metil-N-Nitrozüre isimli alkilleyici kimyasal, seçici bir şekilde, apoptotik mekanizma ile fotoreseptör ölümü sağladığı (84) için rodentlerde RD modeli oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır (10-12, 14, 16, 70, 84, 85, 92-95)

Sunulan bu çalışmada; N-Metil-N-Nitrozüre (MNU) isimli DNA alkilleyici kimyasal madde ile sıçanlarda fotoreseptör apoptozisi sağlayıp, retinitis pigmentosa modeli oluşturmak, sonrasında oluşacak değişimleri, histopatolojik, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak değerlendirmek ve minosiklinin bu durumu önlemedeki etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır.

Geçmişte MNU ile yapılan benzer çalışmalarda, tedavi edici ajan olarak, modelin patogenezine uygun kimyasallar kullanılmıştır. Bunlar arasında; PARP inhibitörleri (74, 94), kaspaz inhibitörleri (84), kalpain inhibitörleri (96), doymuş yağ asitleri (95), gıda takviyeleri (85, 97), nörotropik faktörler (98), antioksidanlar (11, 12) yer almaktadır.

Tsubara ve ark. (64), MNU ile oluşturulan RD konusunda geçmişte yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri verileri bir araya topladıkları çalışmalarında, tek doz 50-75 mg/kg MNU uygulanan sıçanların retinalarında, HXE boyamada, histopatolojik olarak; 24. saatte, fotoreseptör çekirdeklerinin hiperkromatik boyandıklarını, 48. saatte, fotoreseptör hücrelerin yoğun bir şekilde piknoz ve karyoreksis gösterdiklerini, DNK ve FK' nda şiddetli bir yıkımın ve disoryantasyonun görüldüğünü, 72. saatte, yıkımın ilerlediği ve İNK ve DNK da mitoz gösteren hücrelerin ortaya çıktıklarını, 7. günde ise DNK ve FK 'nın gözden kaybolduğu, İNK' nin koroid ile temas edecek seviyeye geldiğini ve yıkımın özellikle optik sinire yakın sentral retina bölgelerinde yoğunlaştığını, perifere gidildikçe azaldığını belirtmişlerdir. Sunulan bu çalışmada da histopatolojik olarak benzer bulgular elde edilmiş ancak iki farklı durum tespit edilmiştir. Bunlardan ilki, 24. saatte, fotoreseptör çekirdeklerinin hiperkromatik boyanması durumunun görülmemiş olmasıdır, çünkü, halihazırda oldukça koyu boyanan bu hücrelerde hiperkromaziyi tespit etmenin güç bir durum olduğu düşünülmektedir. İkinci farklılık olarak ise, az sayıda hayvanda perifer retinanın da ciddi ölçüde etkilendiğinin görülmüş olmasıdır. Burada da hayvanlar arası bireysel farklılıkların MNU' ya direnci etkilediği düşünülmektedir. Tsubara ve ark. (64) immunohistokimyasal olarak; 12. saatte, alkilenen DNA' nın ara ürünlerinden olan 7-metildeoksiguanozin (70, 71) pozitifliğini, 72. saat ve 7. günde ise, PCNA, GFAP ve vimentin pozitifliğini tespit etmiş, bu durumu, aktive olan Müller hücreleri, diğer glial hücreler ve bölgeye göç eden makrofajların varlığına bağlamışlardır. Sunulan bu çalışmada ise, yine alkilenen DNA' nın ara ürünlerinden olan 8-hidroksil-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) (72, 73, 99, 100) pozitifliğine 12. ve 24. saatlerde

rastlanıldığı, 24. saatte pik yaparak 48. saatten sonra pozitifliğin kaybolduğu görüldü. Bu parametre, DNA' nın, MNU tarafından alkilendiğinin önemli bir göstergesi olması bakımından önem taşımaktadır. PCNA ve GFAP boyamalarında ise benzer bulgular elde edildi. Yine Tsubara ve ark. (6, 7, 64) elektron mikroskopik incelemelerde, DNK da, 12. saatten itibaren görülen hiperkromatik çekirdeklerin varlığını en tipik bulgu olarak kaydetmişler, sunulan çalışmada da, elektron mikroskopik incelemede, benzer şekilde, en dikkati çeken bulgu olarak, fotoreseptör çekirdeklerinde ki kondensasyon kaydedildi. Burada önemli bir nokta olarak, sadece elektron mikroskopik incelemede gözlemlenen amakrin hücre ve bipolar hücre dejenerasyonu, Tsubara ve ark. (10)' nın, MNU' nun retinal nöronlardan sadece fotoreseptörleri etkilediği iddiasından farklılık göstermektedir. Ancak bu dejenerasyonun; myelin figürlerin intrastoplazmik olarak görülmesinden dolayı, hücre zarını değil, hücre organellerinin zarlarını etkileyen, yani geri dönüşümlü bir dejenerasyon olduğu düşünülmektedir.

Yoshizawa ve ark. (84), 50 günlük dişi Sprague Dawley sıçanlarda, 60mg/kg periton içi MNU uyguladıkları çalışmalarında, 24. saatte ötenazi ettikleri hayvanlarda TUNEL metodu ile apoptotik indeksi, (Dış nükleer katmanda ki TUNEL pozitif nükleuslar / total fotoreseptör nükleus sayısı X 100) sentral retinada ortalama %83 olarak tespit etmişlerdir. Kontrol grubunda ise bu değer %0.4 olarak bulunmuştur. Dejenerasyonu önlemede ise; fotoreseptör ölümlerinin apoptotik mekanizmayla gerçekleşmesinden yola çıkılarak, 60 mg/kg MNU ile beraber intravitreal olarak, bir kaspaz-3 inhibitörü olan Ac-DEVD-CHO, 4000 ng dozunda 0. ve 10. saatlerde uygulandığında, apoptotik indeksin ortalama %71'e düştüğünü gözlemlemişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise 24. saatte, apoptotik indeks MNU

grubunda %34, MNU ile birlikte artan dozlarda minosiklin verilen gruplarda ise sırasıyla %35-33-35 olarak tespit edildi, kontrol grubunda ise pozitifliğe rastlanılmadı. Bu durumda, minosiklin, TUNEL pozitifliğini düşürmede bir etkinlik göstermemiş, bahsedilen çalışmada ise kaspaz-3 inhibitörü 12 birim kadar düşüş sağlamıştır. Yine bir farklılık olarak Yoshizawa ve ark. (84) TUNEL boyamalarında 24. saatte, apoptotik indekste %83 gibi bir rakama ulaşmışken, sunulan bu çalışmada %34-35 civarında pozitifliğe rastlanıldı, 48. saatte ise %90'ları geçen seviyede bir pozitifliğe ulaşıldı. Buradan, 24-48 saat aralığının TUNEL pozitifliği için en önemli aralık olduğu sonucu çıkmaktadır. Yoshizawa ve ark. (84), retinal katman ölçümlerinde DNK ve FK' nı birlikte ele alarak, *dış retina kalınlığı* adı altında, sadece 7. günde, optik sinire sağlı-sollu 400 µm mesafeden iki noktada ölçüm yapmış, MNU verilen grupta bu katmanın ortalamasını 2 µm, MNU ile birlikte kaspaz-3 inhibitörü verilen grupta 9 µm, kontrol grubunda ise 64 µm olarak ölçmüşlerdir. Sunulan bu çalışmada ise DNK ve FK ölçümleri ayrı ve daha önce belirtildiği üzere 6 noktadan yapıp kaydedildi. Yedinci günde bu iki katmanın toplam kalınlığı, kontrol grubunda 71 µm, MNU grubunda 6 µm, MNU ile birlikte artan dozlarda minosiklin verilen gruplarda ise sırasıyla 5.5 µm (DDM), 14 µm (ODM) ve 10 µm (YDM) olarak kaydedildi. Bu ölçümlere göre retinal katman kalınlıkları üzerine minosiklinin, kaspaz-3 inhibitöründen daha etkili olduğu düşünülse bile, standart sapmalar çok yüksek olduğu için ODM ve YDM gruplarında elde edilen rakamların MNU grubundan farkı, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Aynı zamanda sunulan çalışmada ölçüm noktalarının daha fazla olmasından dolayı, optik sınırdan daha uzak yani daha az etkilenmiş bölgeleri de içerme şansı olduğundan Yoshizawa ve ark. (84) larının yaptığı ölçümlerden daha

yüksek değerler elde edildi. Bu veriler ışığında, Yoshizawa ve ark. (84) larının yaptığı çalışmada, kaspaz-3 inhibitörünün, dış retina kalınlığını, 2 μm ' den, 9 μm ' ye çıkardığını söylemek mümkündür, ancak kontrol grubu kalınlık ortalamasının 63 μm olduğu düşünüldüğünde, kaspaz-3 inhibitörünün, düşük seviyede katkı sağladığını söylemek mümkündür. Bu çalışma ile sunulan çalışmanın kıyaslaması, minosiklinin de, kaspaz-3 inhibitörlüğü yaptığı düşünülmesinden (47) dolayı önemlidir.

Kiuchi ve ark. (74), 6 haftalık dişi Sprague Dawley sıçanlarda 50mg/kg periton içi MNU ile oluşturulan 7 günlük bir RD çalışmasında; kontrol grubu hayvanlarında ortalama 70 mikrometre olan dış retina kalınlığını (DNK+FK) sadece MNU uygulanan grupta yaklaşık 7 mikrometreye düşüğünü; MNU ile birlikte derialtı, 25mg/kg nikotinamid uygulanan hayvanlarda ise bu kalınlığın ortalama 65 mikrometre olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu durumun açıklamasını ise şöyle yapmaktadırlar; MNU, DNA' yı alkilleyerek hasara sebebiyet vermekte, bu hasar DNA tamir mekanizmasında görev alan poly ADP-riboz polimeraz (PARP) in aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. PARP, DNA' yı onarıırken substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid' (NAD⁺) i kullanmakta, bu durumda NAD⁺ depolarının boşalmasına sebebiyet vermektedir. NAD' in oksijenli solunumdaki rolünden dolayı, eksikliği, adenzin trifosfat (ATP) üretiminin aksamasıyla sonuçlanmaktadır. NAD' in prekürsörü olan nikotinamid, MNU ile indüklenen fotoreseptör hasarında kullanıldığında, NAD deplezyonunun önüne geçmekte, aynı zamanda negatif feed-back ile PARP inhibitörlüğü de yaparak dejenerasyonun şiddetini ciddi ölçüde azaltmaktadır. Sunulan bu çalışma ve Yoshizawa ve ark. (84) larının, kaspaz-3 inhibitörü kullanarak yaptıkları çalışma

ile kıyaslandığında, PARP inhibitörü nikotinamidin, fotoreseptör ölümünü önlemede çok daha etkili olduğu görülmektedir.

RD çalışmalarında, bu duruma sahip hastaların, sağlıklı bireylerle kıyaslandığında, yüksek reaktif oksijen radikalleri seviyelerine ve düşük glutatyon, süperoksit dizmutaz, katalaz gibi antioksidan protein seviyelerine sahip olduklarının bilinmesinden dolayı (15), antioksidan özellikteki maddeler denenmiştir (11,12, 14)

Emoto ve ark. (11, 12), 7 haftalık dişi Spraque Dawley sıçanlarda, periton içi tek doz 40mg/kg MNU ile fotoreseptör hasarı oluşturup, antioksidan özellikleriyle bilinen, kurkumin ve yeşil çay ekstraktı kullanarak yaptıkları iki ayrı çalışmada fotoreseptör apoptozisini belli bir ölçüde önlemişlerdir. Kurkumin çalışmasında kontrol grubunda %45' ler seviyesinde olan fotoreseptör hücre oranının (Total retinal kalınlık/ (DNK+FK) X 100), MNU grubunda %5 seviyesinde, MNU+ 200 mg/kg kurkumin grubunda ise %23 seviyesinde olduğu görmüşlerdir. Kurkumini periton içi yolla, MNU injeksiyonundan 3 gün önce başlayıp, günlük 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozda, 7 günlük deney süresinin sonuna kadar uygulamışlardır. Bu etkiyi 200 mg/kg uygulanan grupta daha iyi gördükleri için, kurkuminin etkisini doz bağımlı olarak gösterdiğini savunmuşlardır. MNU ile oluşan DNA hasarını ortaya koymak için 8-OHdG seviyelerine ELISA ile bakmışlardır. 8-OHdG, oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarını gösteren en hassas biyobelirteçlerden biridir (72, 74, 99, 100). Altıncı saatte; MNU grubunda retinal 8-OHdG seviyesini; 0,55 ng/ml, MNU+ 200 mg/kg kurkumin grubunda 0,51 ng/ml; 12. saate, MNU grubunda 0,78 ng/ml, MNU+ 200 mg/kg kurkumin grubunda 0,50 ng/ml; 24. saate, MNU grubunda 0,63 ng/ml, MNU+ 200 mg/kg

kurkumin grubunda 0,52 ng/ml olarak kaydetmişlerdir. Bu durumda, MNU uygulamasının takiben, 12. saatte retinal 8-OHdG seviyesinin en üst düzeye çıktığını, kurkuminin ise, MNU bağımlı retinal 8-OHdG seviye artışını belirli seviyede düşürdüğünü belirtmişlerdir. Yeşil çay ekstraktı çalışmasında ise, 250 mg/kg/gün oral yolla yeşil çay ekstraktı vererek, mm² ye düşen TUNEL pozitif hücre sayısını ilk 24 saatte 2056' dan (sadece MNU uygulanan grup) 981' e (MNU+Yeşil çay ekstraktı uygulanan grup) düşürmüşlerdir. Yeşil çay ekstraktını oral yolla, MNU injeksiyonundan 3 gün önce başlayıp, günlük 250 mg/kg dozda, 7 günlük deney süresinin sonuna kadar uygulamışlardır. Sunulan bu çalışma ile, MNU' nun 7 günde oluşturduğu hasar ve TUNEL verileri konusunda benzerlik taşıyan bu iki çalışma, tedavi gruplarında kurkuminin ve yeşil çay ekstraktının, minosikline kıyasla gösterdiği etkinlik bakımından farklılık göstermektedir. Aynı zamanda sunulan çalışmada 8-OHdG düzeyinin 24. saatte en üst seviyeye çıktığı görülmüşken bahsedilen kurkumin çalışmasında bu durum 12. saat olarak kaydedildi. Ogino ve ark. (70) da sıçanlarda 40 mg/kg, Yoshizawa ve ark. (79) ise 75 mg/kg MNU ile yaptıkları RD çalışmasında, benzer bir parametre olan 7-metildeoksiguanozini, immunperoksidaz yöntem ile, 12. ve 24. saatlerde, DNK da pozitif olarak bulmuşlardır.

Kim ve ark. (14), 6 haftalık C57BL/6J erkek farelerde 50 mg/kg periton içi tek doz MNU ile oluşturulan RD' u, antioksidan özellikler taşıyan, hurma yaprağı (*diospyros kaki*) ekstraktı ile önlemeye çalışmışlardır. Dört haftalık deneyin 1. Haftasında ötenazi edilen hayvanlarda, kontrol grubunda ortalama 54 mikrometre olan DNK kalınlığının, MNU ile ortalama 30 mikrometreye düştüğü, MNU ile birlikte, günlük 50 mg/kg dozda, oral, hurma yaprağı ekstraktı verilen tedavi

grubunda ise ortalama 38 mikrometre civarında olduğu görmüşlerdir. İç nükleer katamnın ve gangliyon hücreleri katmanının ise sunulan çalışmaya benzer şekilde etkilenmediğini görmüşlerdir. İmmunohistokimyasal analizlerde ise GFAP ekspresyonunun, kontrol grubunda ortalama 1 birim, MNU verilen grupta ortalama 3,2 birim, MNU ile birlikte hurma yaprağı ekstraktı verilen tedavi grubunda ise ortalama 1,85 birim olduğunu gözlemlemişlerdir. Sunulan çalışmada da, MNU grubunda GFAP ekspresyonunun, 48. saatten itibaren kontrol grubuna göre yüksek seviyede olduğu ve 7. günde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür. Hurma yağrağı ekstraktının, MNU' nun yükselttiği GFAP seviyelerini düşürdüğü görülürken, sunulan çalışmada kullanılan minosiklinin bu konuda başarılı olmadığı görülmüştür. Artmış GFAP seviyeleri, aktive olmuş glial hücreler ve astrositleri ifade eden, RD için oldukça önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir (101). Yine bu çalışmadaki immunohistokimyasal incelemelerde, rodopsin ekspresyonunun kontrol grubunda 1 birim, MNU verilen grupta ortalama 0,67 birim, MNU ile birlikte hurma yaprağı ekstraktı verilen tedavi grubunda ise ortalama 0,89 birim olduğunu gözlemlemişlerdir. Sunulan bu çalışmada da benzer şekilde MNU grubunda, çubuk reseptör kaybına bağlı olarak rodopsin ekspresyonunun oldukça düştüğü, minosiklinin ise rodopsin ekspresyonu üzerine etkinliğinin olmadığı gözlemlendi.

Koriyama ve ark. (92), 8-9 haftalık erkek C57BL/6 farelerde, periton içi tek doz 60 mg/kg MNU uygulaması ile ile fotoreseptör hasarı oluşturup, stres durumlarında aktive olup, çevresel streslere karşı hücreleri koruyan, *ısı şok proteinleri* nin (102), bu durumu önlemedeki etkinliğini araştırmışlardır. Bu amaçla, ısı şok proteini 70 aktivatörü olduğu iyi bilinen, kısa zincirli bir yağ asidi olan

valproik asiti (103, 104) kullanmışlardır. MNU verilen grubun retinalarının DNK' larında; 3. günde %60, 5. günde %80, 7. günde ise %90' a varan seviyede incelmeye olduğunu kaydetmişlerdir. TUNEL boyama ile apoptotik indeksi ise 3., 5. ve 7. günlerde, birbirine oldukça yakın, %88-81-82 seviyelerinde bulmuşlardır. Sunulan çalışmada, MNU verilen gruplarda, DNK kalınlık ortalamalarındaki azalma, bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Apoptotik indeks verilerinde ise, bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu çalışmada 3. günde ve 7. günde %80' ler seviyesinde olan apoptotik indeks, sunulan çalışmada %10-15 seviyelerinde bulundu. Bu farklılığın sebebi olarak, 3. günden sonra DNK da sağ kalan fotoreseptör sayısının azalması, özellikle 7. günde bu katmanın bazı bölgelerde neredeyse gözden silinmesi, apoptotik indeks belirlemek için hücre sayımı yapmayı zorlaştırmaktadır. Apoptotik indeks belirlenirken; *apoptotik İndeks = TUNEL pozitif hücre sayısı / total hücre sayısı* formülü uygulanmaktadır. Bu sebeple daha önceden belirlenen sayım bölgelerinde sağ kalan 3-5 adet fotoreseptör çekirdeği bulunması ve bunların 2 tanesinin bile pozitif olması durumunda, apoptotik indeks %50' ler seviyesinde olabilmektedir. Bu bakımdan bu ve benzeri çalışmalarda 3. gün ve sonrasında yapılan TUNEL boyamalarında, değişen oranlarda apoptotik indeksler çıkabilmektedir. Bu çalışmanın tedavi grubunda kullanılan, ısı şok proteini 70 aktivatörü olan valproik asitin, MNU verilen gruba kıyasla DNK kalınlığını, %30 seviyesinde arttırdığı, TUNEL pozitifliğini ise %25 seviyesinde düşürdüğü görülmüştür. Valproik asit kullanılarak yapılan MNU modeli dışındaki RD çalışmalarında da olumlu sonuçlar alınmıştır. Kimura ve ark. (105), glakom modelinde, Mitton ve ark. (106), Rd1 ve Rd10 transjenik farelerde, Kumar ve ark. (107) ve Clemson ve ark. (108) doğal retinitis pigmentosa hastalığına sahip

insanlarda, valproik asit ile RD' u önlemede değişen derecelerde olumlu sonuçlar elde etmişlerdir.

Chen ve ark. (10), 7 haftalık C57/BL farelerde tek doz 60 mg/kg periton içi MNU uygulaması ile yaptıkları benzer bir çalışmada, histopatolojik olarak, DNK ve FK' nın, sentral retinada, perifer retinaya kıyasla çok daha fazla etkilendiğini, İNK ve GHK' nın ise etkilenmediğini belirtmişlerdir. Deneyde, 1., 3., 5., 7. günlerde, 2., 3., 4. ve 8. haftada ötenaziler yaparak veriler elde etmişlerdir. Bir haftanın sonunda tek-tük fotoreseptör çekirdeğine rastlanıldığını kaydetmişlerdir. İmmunflorasan teknikle, GFAP ve blue opsin analizleri de yapmışlardır. GFAP, retinada, Müller hücre aktivasyonunu gösteren bir parametre olarak kabul edilmektedir (109). Bu çalışmada, araştırmacılar, kontrol gruplarında, sadece retinanın iç kısımlarında, özellikle iç sınırlayıcı membranda, deney gruplarında ise 3. günden itibaren artış gösterecek ve 7. günde tüm retinayı kapsayacak şekilde GFAP pozitifliğine rastlamışlardır. Bu durumu, MNU uygulamasından sonra görülen fotoreseptör ölümlerinin harekete geçirdiği glial hücrelerin aktivasyonunun 7. günde en üst seviyeye çıktığının göstergesi olarak kabul etmişlerdir. Western blot tekniğiyle de, benzer şekilde 7. günde ki GFAP pozitifliğinin en üst noktaya çıktığını, %76 seviyesinde bir artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Sunulan çalışmada ki GFAP verileri de, bu çalışma ile büyük benzerlik göstermektedir. Blue opsin, koni reseptörlere özgü bir fotopigmenttir. Bu çalışmada, MNU grubunda 3. günde, kontrol grubunda görülen pozitifliklerin yaklaşık yarısının kaybolduğu, 5. günde ise bu kaybın daha belirgin seviyeye geldiği ortaya konulmuştur. Sunulan çalışmada ise blue opsin pozitifliğine hiçbir grupta rastlanılmadı, yine koni reseptör özgü fotopigmentler olan, red/green opsin boyamalarında ise bu çalışma ile benzer

sonuçlar elde edildi, MNU' nun çubuk reseptörleri etkilediği kadar, koni reseptörleri de etkilediği (16, 7, 66, 84, 110, 111) görüldü. Sunulan çalışmada blue opsin pozitifliği elde edilememesinin muhtemel nedeni, *kısa dalga boyu hassas koni reseptörler* olarak bilinen bu koni reseptör alttiplerinin sayılarının, *orta ve uzun dalga boyu hassas koni reseptörlere* (red/green opsin) göre oldukça az olması (yaklaşık 1.4 milyon koni reseptörün, %7-8' ini kısa dalga boyu hassas, %92-93' ünü ise orta ve uzun dalga boyu hassas koni reseptörleri oluşturmaktadır) ve lokasyonlarının kısıtlı, retinanın temporo-dorsal sektörü gibi belirli bölgelerde olması (112) olarak düşünölmektedir. Sunulan bu çalışmada, koni reseptörler ile ilgili veriler red/green opsin boyamaları ile elde edildi.

Yang ve ark. (85), 7 haftalık dişi Sprague Dawley ırkı sıçanlarda tek doz 40 mg/kg periton içi MNU uygulaması ile RD oluşturdukları çalışmalarında, Reichi mantarı olarak ta bilinen *Ganoderma lucidum'* un sporlarını kullanmışlardır. Bu sporlarda bulunan triterpenoitler, polisakkaritler ve steroidler gibi biyoaktif maddelerden yağ asitlerinin, bu durumu önlemekdeki etkinliğini araştırmışlardır. Bu biyoaktif maddelerin nöroprotektif etkinliğinin olduğu daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (113-115). Bu çalışmada, araştırmacılar, dejenerasyon grubu hayvanlara 40 mg/kg MNU, tedavi grubu hayvanlara MNU ile birlikte ganoderma sporu yağını (GSL) intragastrik olarak ve günlük, 0,5, 1, 2, ve 4 mg/kg dozda vermişlerdir ve immunflorasan yöntemle kaspaz-3, bax ve bcl-2 seviyelerini, TUNEL yöntemi ile de apoptotik indeksi analiz etmişlerdir. Ötenazileri, 0., 1., 3., 7. ve 10. günlerde yapmışlardır. Deney gruplarında bax pozitifliğinin 0. günden başlayıp, 3. günde en yüksek seviyeye çıktığını, 7. ve 10. günde ise 0. gün seviyesine düştüğünü görmüşlerdir. Tedavi gruplarında ise 2

mg/kg GSL kullandıkları grupta ise bax pozitifliğinin %20-25 seviyelerinde düştüğünü belirtmişlerdir. Deney gruplarında bcl-2 pozitifliğinin, MNU ile birlikte 2 mg/kg GSL verilen gruplarda yine 3. gün itibariyle %20 seviyelerinde arttığını, kaspaz-3 pozitifliğinin ise bax verileriyle uyumlu bir profil gösterdiğini, GSL verilen gruplarda, sadece MNU verilen gruplara göre, 3. günde, %30' lara varan bir düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan çalışmadaki bax, bcl-2 ve kaspaz-3 verileri bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Ancak bax ve kaspaz-3 ekspresyonlarının pik yaptığı dönem bu çalışmada 3. gün olarak verilmişken sunulan çalışmada 2. gün olarak bulundu ve 1 günlük bir farklılık ortaya çıktı. Yoshizawa ve ark. (84)' nın daha önce bahsedilen çalışmalarında da, bax ve kaspaz-3 artışı ile doğrudan ilişkili olan TUNEL pozitifliği, 2. günde en üst seviyede bulunmuştur. Bu 1 günlük farklılığın oluşmasında verilen MNU dozunun etkisinin olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu çalışmada 40 mg/kg olarak uygulanan MNU, sunulan çalışmada 50 mg/kg, Yoshizawa ve ark. (84) yaptığı çalışmada ise 60 mg/kg olarak uygulanmıştır. MNU' nun 50 mg/kg' ın altındaki dozlarının fotoreseptörler için daha az toksik olduğu bilinmektedir (84, 116). Bahsi geçen apoptotik parametrelerin seviyeleri üzerine, GSL' nin belirli seviyede etkinliği olduğu gözlemlenirken sunulan çalışmada, minosiklin verilen tedavi grupları ile MNU grubu arasında farklılığa rastlanılmadı.

Moriguchi ve ark. (95) da yine MNU ile oluşturulan RD' da 5 farklı yağ asidinin etkinliğini araştırmışlardır. Yedi haftalık dişi Sprague Dawley ırkı sıçanlara, tek doz, 50 mg/kg, periton içi MNU vererek fotoreseptör apoptozisini tetikledikleri çalışmalarında, tedavi gruplarına, %10 lineoik asit (LA); %9,5 palmitik asit (PA) ve %0,5 LA; %9,5 eikosapentaenoik asit (EPA) ve %0,5 LA;

%4,75 EPA, %4,75 dokosahekzaenoik asit (DHA) ve %0,5 LA; ve son olarak %%9,5 DHA ve %0,5 LA, toplamda %10 semi-pürifiye yağ asidi içeren 5 farklı diyetten birini vermişlerdir. Deney süresi 20 hafta olarak belirlenmiş ancak bir kriter olarak, hayvanlarda 1 cm çapında veya daha büyük, MNU bağımlı meme tümörü oluştuğu görüldüğünde deney sonu süresi beklenilmeden ötenazi uygulanmış ve retina örnekleri histopatolojik değerlendirmeye almışlardır. MNU grubunda, bazı hayvanlarda RD oluşmadığını ve 20. haftada ötenazi edilen hayvanların retinaları ile daha önceki dönemlerde ötenazi edilen hayvanların retinaları arasında ciddi farklılık olmadığını görmüşler ve MNU' nun kullanılan bu dozda, zamanla sürekli ilerleyen bir şekilde dejenerasyon oluşturmadığını ve bazı hayvanlarda bilinmeyen sebeplerden dolayı dejenerasyon oluşmayabileceğini belirtmişlerdir. Tedavi gruplarında, sadece %9,5 DHA içeren diyetle beslenen sıçanların retinalarının belirli ölçüde korunduğunu, diğer diyetlerin etkinliğinin olmadığını, bu sonuçlara göre DHA' nın MNU ile oluşturulan fotoreseptör hücre hasarında, koruyucu etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Daha önce yapılan çalışmalarda da bu çalışmayı destekler şekilde, retinitis pigmentozalı hastalarda ve hastalığın, transjenik rd fare modellerinde, plazma DHA seviyeleri düşük bulunmuştur (117, 118). RD farelerde, retinada ve fotoreseptör hücrelerde de DHA seviyelerinin düşük olduğu ortaya konulmuştur (119). Ancak yağ asitlerinin, RD' da ki kesin rolleri henüz bilinmemektedir (95). Sunulan çalışmada da, bu çalışmada ki bulgulara benzer şekilde, MNU ile bazı hayvanlarda çok ciddi, perifer retinayı da içine alan, ora serrataya kadar uzanan bir dejenerasyon oluşturulurken, bazı hayvanların belirli seviyede direnç gösterdiği, hayvanların genelinde perifer retinanın düşük oranda etkilendiği ancak optik sinire yakın bölgelerin düşük

seviyede olsa bile mutlaka etkilendiği, en ciddi lezyonların görüldüğü ve DNK-FK kalınlıklarının en fazla düştüğü bölgelerin her zaman optik sinire en yakın bölgeler olduğu kaydedildi.

MNU ile oluşturulan RD alışmalarında MNU genellikle periton içi yolla (6, 7, 79, 84, 85, 92, 95) verilmiştir. Ancak intravenöz (66, 70) ve intravitreal (16) uygulamalar ile de MNU' yu uygulamak mümkündür. Rösç ve ark. (16) 8 haftalık erkek C57BL/6J farelerde, sistemik ve intravitreal uygulamaları karşılaştırmak için MNU' yu, 60 mg/kg periton içi, 0,15-3 mg/kg doz aralığında ise intravitreal uygulamışlardır. İki hafatalık deney sonunda, her iki uygulama şeklinde de aynı derecede RD oluştuğunu görmüşlerdir. Sistemik uygulamanın tek olumsuz noktası olarak, 2 haftada %12 düzeyinde canlı ağırlık kaybı olduğunu belirtmişlerdir. İnavitreal uygulamada ise bu durum gözlemlenmemiştir. İnavitreal uygulamanın dezavantajı olarak ise, DNK da ki incelmanın, enjeksiyon bölgesine yakın bölgelerde daha fazla olması, dolayısıyla dejenerasyonun, enjeksiyon noktasına bağlı olması durumu görülmüştür. Ancak retinanın istenilen belirli bir bölgesinde dejenerasyon oluşturulmak istenildiği takdirde bu durumun avantaja döneşebileceği düşünölmektedir. Bu çalışmada araştırmacılar immunflorasan metot ile rodopsin, red/green opsin ve GFAP ekspresyonlarına bakmışlar ve her iki MNU uygulama metodunda da, rodopsin ve red/green opsin pozitifliğinin 2. hafta sonunda oldukça düştüğünü, çubuk ve koni reseptörlerin, MNU' dan benzer şekilde etkilendiğini belirtmişlerdir. GFAP pozitifliğinin ise 2. hafta sonunda, MNU verilmeyen kontrol gruplarına kıyasla yüksek bir artış gösterdiğini kaydetmişlerdir. Sunulan çalışmada da benzer tespitler yapıldı. İmmunflorasan boyamalarda, rodopsin ve red/green opsin pozitifliğininde ki düşüşün, 24. saatten sonra

başlayarak, 7. güne kadar sürekli bir azalma göstererek devam ettiği, GFAP pozitifliğinin ise tam tersi şekilde fotoreseptör ölümü arttıkça, artış gösterdiği ve deneyin son günü olan 7. günde en yüksek seviyeye ulaştığı görüldü.

MNU ile oluşturulan RD' da, rutin apoptotik faaliyetler, fotoreseptör ölümünün temel nedeni olarak kabul edilmektedir (6, 7, 16, 84, 85, 92, 95). Bu nedenle, başlatıcı ve efektör kaspazların inhibisyonuyla, dejenerasyonun önüne belirli bir derecede geçilebilmektedir (84, 120). Ancak, kaspaz-bağımsız apoptozisin de MNU modelinde görülebilmesi mümkündür (121). Endoplazmik retikulum stresi ile başlatılan apoptozis ve kalpain aktivasyonu gibi alternatif programlı hücre ölümü yollarının da etkinliğinin olduğu bildirilmiştir (87). Reisenhofer ve ark. (87), MNU modelinde hangi programlı hücre ölümü yolağının etkin rolü olduğunu tespit etmek için 6-8 haftalık C57BL/6 farelere 60 mg/kg tek doz periton içi MNU uygulamışlardır. Ötenazileri, MNU enjeksiyonundan sonra, 1., 3. ve 7. günlerde yapmışlardır. TUNEL pozitifliğinin, 1. günden başladığını, 3. günde en yüksek seviyeye çıktığını ve 7. günde azalarak devam ettiğini belirtmişlerdir. Kaspaz-bağımlı ve kaspaz-bağımsız apoptozis derecesini ortaya koymak adına RT-PCR ve immunflorasan yöntem ile kaspaz-3-9-12 ve kalpain seviyelerine bakmışlardır. Kaspaz-3 ve 9 seviyelerinin 3. günde en yüksek seviyeye çıktığını kaspaz-12' nin ise 3 ve 9' a göre daha düşük ama anlamlı bir yükseliş gösterdiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde kalpain pozitifliğinde 1., 3. ve 7. günlerde anlamlı bir artış gösterdiğini ve 3. günde en yüksek seviyeye çıktığını, ancak bu yükselmenin kaspaz-3-9 ve 12 ile kıyaslamada daha geride kaldığını immunflorasan incelemede, TUNEL pozitif hücrelerin bazılarının, kalpain pozitif de boyandığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, MNU ile

oluşturulan RD' da, temel ve daha etkin olan yolağın kaspaz bağımlı yolak olduğunu, ama kalpain bağımlı yolağında belirli derecede etkin rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Yoshizawa ve ark. (79), da benzer bir çalışmada, immunohistokimya ile, kaspaz-3-6-8, bax ve bcl-2' nin, MNU ile oluşturulan fotoreseptör apoptozisinde etkin rol oynadığını, bu parametrelerden kaspaz-3-6-8 ve bax' ın 12. saatten itibaren pozitiflik verdiğini, 3. günde ise en yüksek düzeye ulaştığını, bcl-2 pozitifliğinin ise 12. saatten itibaren düşüş gösterdiğini belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada da, bu iki çalışmada olduğu gibi, kaspaz-3-6 ve bax aktivitesinin, MNU verilen grupların tümünde 12. saatten itibaren başladığı, 48. saatte en yüksek seviyeye çıktığı, 3. ve 7. günlerde ise giderek düşüş gösterdiği, bcl-2 pozitifliğinin ise kontrol grubuna kıyasla, 12. saatten itibaren hafif derecede bir düşüş gösterdiği immunperoksidaz yöntem ortaya konuldu. Buradan, MNU verilmesini takiben apoptotik parametreler olan kaspazların ve bax' ın aktifleştğini, anti-apoptotik protein bcl-2' nin ise etkinliğin azaldığı söylemek mümkündür. Kaspaz-3 inhibitörlüğü yaptığı iddia edilen minosiklinin (47) ise bu durumu değiştirmede bir etkinliğinin olmadığı görüldü.

Dejenere fotoreseptör hücrelerin fagositozunu gösteren bir bulgu olarak, makrofaj infiltrasyonu ve Müller hücre proliferasyonu, MNU uygulaması ile ortaya çıkabilmektedir ve retinal hasarı stabilize etmek için büyük önem taşımaktadır. Makrofaj-bağımlı temizlik, apoptotik süreç boyunca nöronal doku bakımı için esansiyeldir (122). Sunulan çalışmada, bu makrofaj ve Müller hücre infiltrasyonu ve proliferasyonunu ortaya koymak adına immunperoksidaz ve immunflorasan yöntemle PCNA ekspresyonuna bakıldı. Bahsedilen bilgilerle uyumlu bir şekilde, PCNA pozitifliğinin, fotoreseptör ölümünün üst düzeyde olduğu 48. saatte, İNK da

ki Müller hücreleri ve diğer glial hücrelerin pozitif boyanması ile başladığı, 72. saatte boyanmanın şiddetinin ve yaygınlığının arttığı, artık sınırları net ayırt edilemeyen, hasarın arttığı, DNK ve FK' nda da yoğun boyanmaların olduğu görüldü. Histopatolojik incelemede de bu hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu; çekirdekçikleri belirginleşmiş, mitoz gösteren ve bu iki katmana infiltre olmuş makrofajların ve Müller hücrelerinin görülmesiyle ortaya konuldu.

Minosiklin tedavi edici ajan olarak, MNU ile oluşturulan RD modellerinde daha önce kullanılmamış olup; ışık ile oluşturulan RD' da (51, 55, 57), retina dejenerasyonuna sebep veren genetik defekte sahip transjenik deney hayvanlarında (48, 53, 54), yaşa bağlı makuler dejenerasyona sahip hastalarda (56, 58), retinal dekolman oluşturulmuş farelerde (1), glakom modellerinde (59) ve subretinal kanama oluşturulmuş fare modellerinde (Zhao, 2011) kullanılmış, değişen derecelerde olumlu sonuçlar alınmıştır. RD çalışmaları dışında, multiple skleroz (123), amyotrofik lateral skleroz (52) serebral iskemi (47), travmatik beyin hasarı (124), Huntington hastalığı (125), Parkinson hastalığı (126, 127) ve Alzheimer hastalığı (128) gibi nörodejeneratif hastalıklarda ve hastalık modellerinde, nöroprotektif etkinliği ortaya konmuş bir ilaçtır. Bu çalışmalarda, minosiklinin antimikrobiyal etkinliğinden tamamen bağımsız olan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkinliği (129) ile kan-beyin bariyerini geçebilme yeteneği (130) ön plana çıkmaktadır. Özellikle nöroinflamasyonun, birçok kronik nörodejeneratif hastalığın patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (131). Geçmişte yapılan çalışmalar, mikrogial aktivasyonun, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı (132) ve kalıtsal retina dejenerasyonu (133) ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Minosiklinin tedavi gruplarında kullanıldığı RD çalışmalarında, ışık ile oluşturulan RD modelleri ve transjenik hayvanların kullanıldığı modeller daha çok tercih edilmektedir (51, 53, 55, 57).

Zhang ve ark. (57), 4-5 haftalık BALB-C fareleri, 2 gün karanlık adaptasyonu sağlandıktan sonra, 3 saat boyunca, 3,5 klux şiddetindeki yeşil-filtreli florasan ışığa maruz bırakarak, fotoreseptör ölümü sağladıkları çalışmalarında, tedavi grubu hayvanlara, ışığa maruziyetten 1 gün önce başlayarak, 7 gün boyunca, günde 2 kez 45 mg/kg periton içi minosiklin uygulamışlardır. Deney sonunda, morfometrik incelemede, ışığa maruz bırakılan hayvanların DNK' larının %62 oranında incelendiği görülürken, ışığa maruziyetle birlikte, minosiklin tedavisi uygulanan hayvanların DNK' larının %11 düzeyinde incelmeye gösterdiği görülmüştür. İmmunohistokimya ile, mikroglial aktivitenin dejenerasyonda ki rolünü belirlemek adına CD11b ekspresyonuna bakılmış, kontrol grubunda pozitifliğe rastlanılmazken, ışığa maruz bırakılan hayvanlarda yoğun pozitiflik görülmüş, minosiklin tedavi grubunda ise, bu pozitifliğin %17,5 seviyesinde bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak ise minosiklinin, ışıkla oluşturulan RD' da, DNK kalınlığını koruduğunu ve mikroglial aktiviteyi düşürdüğünü iddia etmişlerdir. Scholz ve ark. (51), 4-5 haftalık BALB-C fareleri, 16 saat karanlık adaptasyonu sağlandıktan sonra, 1 saat boyunca, 15 klux şiddetindeki beyaz ışığa maruz bırakarak, fotoreseptör ölümü sağladıkları çalışmalarında, tedavi grubu hayvanlara, ışığa maruziyetten 1 gün önce başlayarak, 4 gün boyunca, günde 2 kez 45 mg/kg periton içi minosiklin uygulamışlar ve Zhang ve ark. (57)' nin elde ettiği sonuçlara benzer sonuçlar elde etmişler ve minosiklinin ışıkla oluşturulan RD' u önlemede etkinliğinin olduğunu savunmuşlardır. Chang ve ark. (55), 35 günlük

albino Lewis ratlarını, 24 saat karanlık adaptasyonu uyguladıktan sonra, 3 klux şiddetindeki yeşil florasan ışığa 1, 6, 12 veya 24 saat maruz bırakılmışlardır. Tedavi gruplarında ise minosiklini 15, 30 ve 45 mg/kg dozda, dejeneratif ışık uygulamasından 30 dakika önce veya hemen sonra vermişlerdir ve 14 günlük deneyin belirli dönemlerinde ötenaziler uygulamışlardır. Elde ettikleri retina örneklerinin histopatolojik incelemelerinde, TUNEL boyamalarında ve kaspaz-3'ün immunperoksidaz analizlerinde, yüksek şiddetteki ışığa maruziyetten önce uygulanan minosiklinin, 30 ve 45 mg/kg dozlarda, DNK kalınlık ortalamalarını arttırdığı, TUNEL pozitifliğini ve kaspaz-3 ekspresyonunu ise düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Işıkla oluşturulan RD' da kaspaz-3'ün ve dolayısıyla apoptozisin rolü olduğunu, minosiklinin ise sadece ışığa maruziyetten önce ve doz bağımlı uygulamasının etkinliğinin olduğunu ifade etmişlerdir.

Peng ve ark. (53), RD' a sebep veren genetik defektli transjenik rd10 fareleri (Rd10 farelerinde rod-difosfoesteraz geninde ki spontane mutasyon nedeniyle postnatal 15-20. günler arasında kendiliğinden başlayan bir çubuk reseptör ölümü söz konusudur) ile yaptıkları çalışmalarında, minosiklinin rolünü araştırmışlardır. Rd10 farelerine postnatal 13. günden (p13) başlayarak 29. güne (p29) kadar günde iki kez periton içi 45 mg/kg minosiklin uygulamışlardır. Minosiklin uygulanmayan kontrol grubu rd10 farelerde, TUNEL boyamalarda, p19' dan itibaren pozitifliklere rastlanılmış, p22 de ise pozitifliklerin en yüksek düzeye ulaştığı görülmüştür. Minosiklin uygulanan rd10 farelerde ise TUNEL pozitifliklerinin p22 den itibaren başladığı ve kontrol grubuna göre daha düşük seviyede olduğunu belirtmişlerdir. DNK ölçümleri de (optik sinire 200 µm mesafeden) TUNEL verilerini doğrular şekilde, kontrol grubunda ortalama 5,9 µm iken, minosiklin grubunda 10,3 olarak

kaydedilmiştir. Bu durumda araştırmacılar minosiklinin, rd10 farelerinde, hem dejenerasyonu geiktirici hem de azaltıcı etkinliği olduğunu iddia etmişlerdir. Benzer şekilde, fotoreseptör dış segmentlerinin gelişimi için gerekli periferin-2 proteinini kodlayan prph-2 gen defekti bulunan rds farelerinde yapılan iki çalışmada (48, 54), minosiklinin 50 mg/kg dozada, p2 den p27' ye kadar uygulamanın retina dejenerasyonunu tamamen önlemediğini ancak geciktirdiğini, TUNEL pozitifliğini, kaspaz-3 ekspresyonunu ve CD11b pozitif mikroglial aktivasyonu belli ölçüde düşürdüğü belirtmişlerdir.

Bahsedilen bu çalışmalardan anlaşılacağı üzere, retina dejenerasyonu çalışmalarında minosiklin, dejenerasyon oluşturacak uygulamadan önce, sonra yada deney süresince günlük olarak uygulanmıştır. Sunulan çalışmada da bu modeller ışığında, MNU uygulamasından 24 saat önce ve hemen sonra olmak üzere 2 doz uygulandı ve 12. saatten itibaren ötenazi periyotları başlayacağı için günlük doz uygulama tercih edilmedi. Olası bir doz bağımlı etkinliği de gözardı etmemek için 50, 75 veya 100 mg/kg dozlarda uygulandı. Ancak, ışıkla oluşturulan RD' da ve transjenik hayvanlarda belirli ölçüde etkinlik gösteren minosiklinin, MNU ile oluşturulan modelde arzu edilen etkinliği göstermediği görüldü. Sunulan bu çalışmada, minosiklinin beklenen etkilerinden olan; DNK ve FK kalınlıkları üzerine, TUNEL pozitifliği üzerine, kaspaz-3, GFAP ve PCNA ekspresyonları üzerine bir etkinliğinin olmadığı görüldü. MNU ile oluşturulan RD modelinde, kaspaz-3,6,8 (79) kaspaz-9 ve 12 (87) gibi birden fazla kaspazın rolünün olması, MNU' nun DNA' yı 6-12 saat gibi kısa bir sürede alkillemesi (70), MNU ile oluşturulan RD' da kaspaz-bağımsız apoptozisin de etkinliğinin olması (87) gibi sebeplerden dolayı minosiklinin etkisiz kaldığı düşünölmektedir.

Sonuç olarak; sunulan bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, MNU ile oluşturulan RD modelinde, MNU uygulamasının, kısa sürede, şiddetli fotoreseptör apoptozisine neden olduğunu ve bu durumun, RD ile seyreden hastalıklar ile ilgili veriler toplayabilmek adına büyük fayda sağladığını söylemek mümkündür. Deney süresince hayvan kaybı yaşanmaması, hayvanların genel durumlarının çok bozulmaması, hayvanlara sadece tek doz periton içi uygulamanın yapılması ve deneyin kısa süresi, hayvanlara fazla acı çektirilmemesi yönünden önem taşımaktadır. Tedavi gruplarında kullanılan minosiklinin ise bahsedildiği üzere, nörodejeneratif hastalıklar için kıymetli bir ilaç olduğunu söylemek mümkün olsa da, MNU ile oluşturulan bu modelde, etkinlik göstermediği görüldü. Işık ile oluşturulan RD ve transjenik hayvanların kullanıldığı çalışmalarda, günlük minosiklin uygulamalarının fotoreseptör apoptozisini yavaşlattığı belirtilmiştir. MNU ile oluşturulan bu modelde 12. saattten itibaren periyodik ötenaziler başladığı için günlük minosiklin uygulanamadı. Yine MNU ile uygulanacak daha uzun süreli bir modelde, diğer modellerde olduğu gibi günlük 1-2 doz minosiklinin, yada minosiklin ile beraber başka ilaçların kombinasyonların, dejenerasyonu önleyip önlemeyeceğinin araştırılması gereken bir konu olduğu düşünülmektedir.

RD ile seyreden retinitis pigmentoza, yaşa bağlı maküler dejenerasyon ve diyabetik retinopati gibi hastalıkların, gelişmiş ülkelerde en önemli körlük sebepleri arasında yer alması, sadece retinitis pigmentoza hastalığından bile etkilenen 1 milyonun üzerinde insanın olduğu ve hala birkaç madde dışında efektif ilaçların olmadığı düşünüldüğünde, bu konu ile ilgili çalışmaların ve etkili yeni maddelerin bulunmasının önemi ve gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Yang L, Kim JH, Kovacs KD, Arroyo JG, Chen DF. 2009. Minocycline inhibition of photoreceptor degeneration. *Arch Ophthalmol* 2009; 127(11): 1475-1480.
2. Heller AR, Van Der Woerd A, Gaader JE, et al. Sudden acquired retinal degeneration in dogs: breed distribution of 495 canines. *Vet Ophthalmol* 2016; 1-4.
3. Wiik AC, Ropstad EO, Ekesten B, et al. Progressive retinal atrophy in Shetland sheepdog is associated with a mutation in the CNGA1 gene. *Anim Genet* 2015; 46(15): 515-521.
4. Raymond MM, David VA, Pflueger S, et al. Widespread retinal degenerative disease mutation (rdAc) discovered among a large number of popular cat breeds. *Vet J* 2010; 186: 32-38.
5. Aplin FP, Luu CD, Vessey KA, et al. ATP-induced photoreceptor death in a feline model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(12): 8319-8329.
6. Tsubara A, Yoshizawa K, Kiuchi K, Moriguchi K. N-methyl-n-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals. *Acta Histochem Cytochem* 2003; 36(4): 263-270.
7. Tsubara A, Yoshizawa K, Kuwata M, Uehara N. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU; disease progression, mechanisms and therapeutic trials. *Histol Histopathol* 2010; 25: 933-944.
8. Shintani K, Shechtman DL, Gurwood AS. Review and update: Current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry* 2009; 80: 384-401.
9. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis Pigmentosa. *Lancet* 2006; 368: 1795-1809.
10. Chen YY, Liu SL, Hu DP, Xing YQ, Shen Y. N-methyl-n-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice. *Exp Eye Res* 2014; 121: 102-113.
11. Emoto Y, Yoshizawa K, Uehara N, et al. Curcumin suppresses N-methyl-n-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in Sprague-Dawley rats. *In Vivo* 2013; 27(5): 583-90.
12. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, et al. Green tea extract suppresses N-methyl-n-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in Sprague-Dawley rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014; 252: 1377-1384.
13. Komeima K, Rogers BS, Lu L, Campochiaro PA. 2006. Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11300-11305.
14. Kim KA, Kang SW, Ahn, HR, et al. Leaves of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) ameliorate N-methyl-n-nitrosourea (MNU)- induced retinal degeneration in mice. *J Agric Food Chem* 2015; 63: 7750-7759.
15. Danulescu R, Costin D. Use of blood markers in early diagnosis of oxidative stress in age related macular degeneration. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2012; 116: 1136-1142.
16. Rösch S, Johnen S, Maturaga A, et al. Selective photoreceptors degeneration by intravitreal injection of N-methyl-n-nitrosourea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 54: 1711-1723.
17. Yan N, Qin Z, ChaoRan R. Functional evaluation of iodoacetic acid induced photoreceptor degeneration in the cat. *Sci China Life Sci* 2013; 56(6): 534-530.

18. Hildebrand GD, Fielder AR. Anatomy and physiology of the retina. In: Reynolds J, Olitsky S. (Editors). *Pediatric Retina. Part 2.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011; 39-65.
19. Cook C, Sulik KK, Wright KW. Embryology. In: Wright KW, Spiegel (eds.) *Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 2nd edn, Springer, Berlin, 2003; 3-38.
20. Panda-Jonas S, Jonas JB, Jakobczk-Zmija M. Retinal pigment epithelial cell count, distribution and correlations in normal human eyes. *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 181-189.
21. Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye* 2001; 15: 384-389.
22. Cunha-Vaz JG. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. Review. *Exp Eye Res* 2004; 78: 715-721.
23. Marmor MF. Retinal and retinal pigment epithelial physiology. In: Regillo CD, Brown GC, Flynn HW (eds.) *Vitreoretinal Disease*. Thime, New York 1999; 25-38.
24. Levin LA. Optic Nerve. In: Kaufman PL, Alm A (eds.) *Adler's Physiology of the Eye*, 10th edn., Mosby, St Louis 2003; 603-638.
25. Land M. "Photoreception". *Encyclopædia Britannica Online*. Encyclopædia Britannica Inc. <https://www.britannica.com/science/photoreception>. 15.02.2017.
26. Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ. Animal models of age related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012; 33: 487-509.
27. Radius RH, Anderson DR. The histology of retinal nerve fiber layer bundles and bundle defects. *Arch. Ophthalmol* 1979; 97: 948-950.
28. Wurtz RH, Kandel ER. Central visual pathways. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds.) *Principles of Neural Science*, 4th edn., McGraw-Hill, New York 2000; 523-547.
29. Saint- Geniez M, D' Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 1045-1058.
30. Pfeiffer RL, Marc RE, Kondo M, Terasaki H, Jones BW. Müller cell metabolic chaos during retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2016; 150: 62-70.
31. Provis JM. Development of the primate retinal vasculature. *Prog Ret Eye Res* 2001; 20: 799-821.
32. <http://www.deltagen.com/target/histologyatlas/HistologyAtlas.html>
33. Alm A, Bill A, Young FA. The effects of pilocarpine and neostigmine on the blood flow through the anterior uvea in monkeys: a study with radioactively labelled micro-spheres. *Exp Eye Res* 1973; 15(1): 31-36.
34. Zhu M, Madigan MC, Van Driel D, et al. The human hyaloid system: cell death and vascular regression. *Exp Eye Res* 2000; 70: 767-776.
35. <http://www.doctorc.net/EYE/RETINA.HTM>
36. Bunker CH, Berson EL, Bromley WC, Hayes RP, Roderick TH. Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. *Am J Ophthalmol* 1984; 97:357-365.
37. Birch DG, Anderson JL, Fish GE. Yearly rates of rod and cone functional loss in retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy. *Ophthalmology* 1999; 106: 258-268.

38. Saffhill R, Margison GP, Oconnor PJ. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochim Biophys Acta* 1985; 823: 111-145.
39. Lijinsky W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutant Res Genet Toxicol Environ Mutagen*; 1999; 443: 129-138.
40. Lijinski W. Interaction with nucleic acids of carcinogenic and mutagenic N-nitroso compounds. In: Cohn W, editor. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. USA: Academic; 1981; 17: 247-270.
41. Montgomery JA. The design of chemotherapeutic agents. *Acc Chem Res* 1986; 19: 293-300.
42. Faustino-Rocha AI, Ferreria R, Oliveira PA, Gama A. N-methyl-n-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. *Tumour Biol* 2015; 36(12): 9095-9117.
43. Kyrtopoulos SA. DNA adducts in humans after exposure to methylating agents. *Mutat Res Fundam Mol Mech* 1998; 405: 135-143.
44. Stephanou G, Vlastos D, Vlachodimitropoulos D, Demopoulos NA. A comparative study on the effect of MNU on human lymphocyte cultures in vitro evaluated by O-6-mdG formation, micronuclei and sister chromatid exchanges induction. *Cancer Lett* 1996; 109: 109-114.
45. Rapoport IA. 85-percent of mutations in sex chromosome under influence of nitrosoethylurea. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1962; 146: 1418-1421.
46. Bosland M. Chemical and hormonal induction of prostate cancer in animal models. *Urol Oncol* 1996; 2: 103-110.
47. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hökfelt H, Koistinaho J. Tetracycline inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15769-15774.
48. Yang L, Li Y, Zhu X, Tso MOM. Minocycline delayed photoreceptor death in the rds mice through inos-dependent mechanism. *Mol Vis* 2007; 13: 1073-1082.
49. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 2002; 417: 74-78.
50. Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, et al. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(23): 13496-13500.
51. Scholz R, Sobotka M, Caramoy A, Stempf T, Moehle C, Langmann T. Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J Neuroinflammation* 2015; 12(209).
52. Zhao L, Ma W, Fariss RN, Wong WT. Minocycline attenuates photoreceptor degeneration in a mouse model of subretinal hemorrhage: Microglial inhibition as a potential therapeutic strategy. *Am J Pathol* 2011; 179(3): 1265-1277.
53. Peng B, Xiao J, Wang K, et al. Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa. *Neurobiol Dis* 2014; 34(24): 8139-8150.

54. Hughes EH, Schlichtenbrede FC, Murphy CC, et al. Minocycline delays photoreceptor death in the rds mouse through a microglia-independent mechanism. *Exp Eye Res* 2004; 78: 1077-1084.
55. Chang CJ, Cherng CH, Liou WS, Liao CL. Minocycline partially inhibits caspase-3 activation and photoreceptor degeneration after photic injury. *Ophthalmic Res* 2005; 37: 202-213.
56. Wirotko E, Wirotko WC, Wirotko BM. Age related macular degeneration is an inflammatory disease possibly treatable with minocycline. *Acta Ophthalmol Scand* 2004; 82(2): 243-244.
57. Zhang C, Lei B, Lam TT, et al. Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(8): 2753-2759.
58. Sivaprasad S, Patra S, DaCosta J, et al. A pilot study on the combination treatment of reduced-fluence photodynamic therapy, intravitreal ranibizumab, intravitreal dexamethasone and oral minocycline for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 2011; 225(4): 200-206.
59. Bosco A, Inman DM, Steele MR, et al. Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(4): 1437-1446.
60. Verbin HL, Spierer O, Vander S, Dardik R. Similarities and differences between primary and secondary degeneration of the optic nerve and the effect of minocycline. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011; 249: 849-857.
61. Nambu H, Yuge K, Shikata N, Tsubara A, Matsuzawa A. Fas-independent apoptosis of photoreceptor cells in C3H mice. *Exp Anim* 1996; 45(4): 309-315.
62. Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, et al. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol* 2008; 38(3): 253-269.
63. Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I. Transient protective effect of caspase inhibitors in RCS rat. *Exp Eye Res* 2008; 86(3): 519-527.
64. Tsubara A, Yoshizawa K, Kuro M. Animal Models for Retinitis Pigmentosa. In: *Animal Models for the Study of Human Disease*. Chapter 6. Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands 2013; 117-142.
65. Tappeiner C, Balmer J, Igllicki M, et al. Characteristic of rod degeneration in a novel zebrafish retinal degeneration model using N-methyl-N-Nitrosourea (MNU). *Plos One* 2013; 8(8).
66. Herrold KM. Pigmentary degeneration of the retina induced by N-methyl-N-nitrosourea. An experimental study Syrian hamsters. *Arch Ophthalmol* 1967; 78: 650-653.
67. Nambu H, Taomoto M, Ogura E, Tsubara A. Time-specific action of N-methyl-N-nitrosourea in the occurrence of retinal dysplasia and retinal degeneration in neonatal mice. *Pathol Int* 1998; 48(3): 199-205.

68. Nambu H, Yoshizawa K, Yang J, Yamamoto D, Tsubara A. Age-specific and dose-dependent retinal dysplasia and degeneration induced by a single intraperitoneal administration of N-methyl-N-nitrosourea to rats. *J Toxicol Pathol* 1998; 11(2): 127-131.
69. Smith SB, Yielding KL. Retinal degeneration in the mouse. A model induced transplacentally by methylnitrosourea. *Exp Eye Res* 1986; 43(5): 791-801.
70. Ogino H, Ito M, Matsumoto K, et al. Retinal degeneration induced by N-methyl-n-nitrosourea and detection of 7-methyldeoxyguanosine in the rat retina. *Toxicol Pathol* 1993; 21(1): 21-25.
71. Ganesan N, Kato S, Bowman ED, Shields PG. N-7Alkyl-2'-Deoxyguanosine as surrogate biomarkers for N-nitrosamine exposure in human lung. *Int J Can Prev* 2007; 2(4): 265-277.
72. Kondo T, Ohshima T, Ishida Y. Age-dependent expression of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human pituitary gland. *Histochem J* 2001; 33: 647-651.
73. Kim CS, Park S, Chun Y, et al. Treadmill exercise attenuates retinal stress in naturally-aged mice: an immunohistochemical study. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 21008-21020.
74. Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Matsumura M, Tsubara, A. Nicotinamide prevents N-methyl-n-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in Sprague-Dawley rats and C57BL mice. *Exp Eye Res* 2002; 74: 383-392.
75. Chiarugi A. Poly (ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The "suicide hypothesis" revisited. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(3): 22-29.
76. Vermeulen L, De Wilde G, Notebaert S, Vanden Berghe W, Haegeman G. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappa B p65 subunit. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(5-6): 963-970.
77. Wenzel A, Grimm C, Marti A, et al. C-fos controls the "private pathway" of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J Neurosci* 2000; 20(1): 81-88.
78. Yang L, Li D, Chen J, et al. Microarray expression analysis of the early N-methyl-N-nitrosourea induced retinal degeneration in rat. *Neurosci Lett* 2007; 418(1): 38-43.
79. Yoshizawa K, Nambu H, Yang J, et al. Mechanisms of photoreceptor cell apoptosis induced by N-methyl-N-nitrosourea in Sprague-Dawley rats. *Lab Invest* 1999; 79: 1359-1367.
80. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev* 2003; 83(3): 731-801.
81. Doonan F, Donovan M, Cotter TG. Activation of multiple pathways during photoreceptor apoptosis in the rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(10): 3530-3538.
82. Oka T, Nakajima T, Tamada Y, Shearer TR, Azuma M. Contribution of calpains to photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated rats. *Exp Neurol* 2007; 204(1): 39-48.
83. Sanges D, Comitato A, Tammara R, Marigo V. Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(46): 17366-17371.

84. Yoshizawa K, Yang J, Senzaki H, et al. Caspase-3 inhibitor rescues N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in Sprague-Dawley rats. *Exp Eye Res* 2000; 71: 629-635.
85. Yang G, Xin-guo D, Qian-na S, Zhi-qiang Z. Ganoderma spore lipid inhibits N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal photoreceptor apoptosis in vivo. *Exp Eye Res* 2010; 90: 397-404.
86. McKay JS, Steele SJ, Ahmed G, Johnson E, Ratcliffe K. An antibody panel for immunohistochemical analysis of retina in Davidson's-fixed, paraffin-embedded eyes of rats. *Exp Toxicol Pathol* 2009; 61: 91-100.
87. Reisenhofer M, Balmer J, Zulliger R, Enzmann V. Multiple programmed cell death pathways are involved in N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor degeneration. *Graefes Arc Clin Exp Ophthalmol* 2015; 253: 721-731.
88. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981; 75(6) 816-821.
89. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29(4): 577-580.
90. Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, et al. Pak-1 Expression Increases with Progression of Colorectal Carcinomas to Metastasis. *Clin Can Res* 2004; 10: 3448-3456.
91. Rossmiller B, Mao H, Lewin AS. Gene therapy in animal models of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 2012; 18: 2479-2796.
92. Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. Heat shock protein 70 induction by valproic acid delays photoreceptor cell death by N-methyl-N-nitrosourea. *J Neurochem* 2014; 130(5): 707-719.
93. Smith SB, Hashimi W, Yielding KL. Retinal degeneration in mouse induced transplacentally by N-methyl-N-nitrosourea: effect of constant illumination or total darkness. *Exp Eye Res* 1988; 47: 347-359.
94. Kiuchi K, Kondo M, Ueno S, et al. Functional rescue of N-Methyl-N-Nitrosourea-induced retinopathy by nicotinamide in Sprague-Dawley rats. *Curr Eye Res* 2003; 26(6): 355-362.
95. Moriguchi K, Yuri T, Yoshizawa K, et al. Dietary docosahexaenoic acid protects aganist N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. *Exp Eye Res* 2003; 77: 167-173.
96. Kuro M, Yoshizawa K, Uehara N, et al. Calpain inhibition restores basal autophagy and suppresses MNU-induced photoreceptor cell death in mice. *In Vivo* 2011; 25(4): 617-623.
97. Paik SS, Jeong E, Jung SW, et al. Anthocyanins from the seed coat of black soybean reduce retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Exp Eye Res* 2012; 97(1): 55-62.
98. Xu H, Yang JN, Li XK, et al. Retina protective effect of acidic fibroblast growth factor after canceling its mitogenic activity. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008; 24(5): 445-451.
99. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997; 272: 19633-19636.

- 100.**Mecocci P, Fano G, Fulle S, et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA; lipids and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 303-308.
- 101.**Kohno H, Sakai T, Kitahara K. Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244: 90-95.
- 102.**Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2001; 81: 1461-1497.
- 103.**Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochem* 2004; 89: 1358-1367.
- 104.**Marinova Z, Ren M, Wendland JR, et al. Valproic acid induces functional heat shock protein 70 via Class I histone deacetylase inhibition in cortical neurons: a potential role of Sp 1 acetylation. *J Neurochem* 2009; 111: 976-987.
- 105.**Kimura A, Guo X, Noro T, et al. Valproic acid prevents retinal degeneration in a murine model of normal tension glaucoma. *Neurosci Lett* 2015; 588: 108-113.
- 106.**Mitton KP, Guzman AE, Deshpande M, et al. Different effects of valproic acid on photoreceptor loss in Rd1 and Rd10 retinal degeneration mice. *7Mol Vis* 2014; 20: 1527-1544.
- 107.**Kumar A, Midha N, Gogia V, et al. Efficacy of oral valproic acid in patients with retinitis pigmentosa. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014; 30(7): 580-586.
- 108.**Clemson CM, Tzekov R, Krebs M, et al. Therapeutic potential of valproic acid for retinitis pigmentosa. *J Ophthalmol* 2011; 95: 89-93.
- 109.**Huxlin KR, Dreher Z, Schulz M, Dreher B. Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glia* 1995; 15: 105-118.
- 110.**Tsurama K, Yamauchi M, Inokuchi Y, et al. Role of oxidative stress in retinal photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated mice. *J Pharmacol Sci* 2012; 118: 351-362.
- 111.**Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, Jain V, Dhingra K. Early remodelling in an inducible animal model of retinal degeneration. *Neuroscience* 2009; 160: 517-529.
- 112.**Gailard F, Kuny S, Sauve Y. Topographic arrangement of S-cone photoreceptors in the retina of the diurnal Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 5426-5434.
- 113.**Zhang W, Zeng YS, Wang Y, et al. Primary study on proteomics about *Ganoderma lucidum* spores promoting survival and axon regeneration of injured spinal motor neurons in rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2006; 4: 298-302.
- 114.**Cho WC. Application of proteomics in Chinese medicine research. *Am J Chin Med* 2007; 35: 923-928.

- 115.**Gao JJ, Nakamura N, Min BS, et al. Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of *Ganoderma* products. *Chen Pharm Bull* 2004; 52: 688-695.
- 116.**Nakajima M, Yuge K, Senzaki H, et al. Photoreceptor apoptosis induced by a single systemic administration of N-methyl-N-nitrosourea in the rat retina. *Am J Pathol* 1996; 148: 631-641.
- 117.**Anderson RE, Maude MB, Lewis RA, Newsome DA, Fishman GA. Abnormal plasma levels of polyunsaturated fatty acid in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res* 1987; 44: 155-159.
- 118.**Gong J, Rosner B, Rees DG, et al. Plasma docosahexaenoic acid levels in various genetic forms of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 2596-2602.
- 119.**Scott BL, Racz E, Lolley RN, Bazan NG. Developing photoreceptors from normal and mutant rd mouse retinas: altered fatty acid composition early in development of the mutant. *J Neurosci Res* 1988; 20: 202-211.
- 120.**Petrin D, Baker A, Coupland SG, et al. Structural and functional protection of photoreceptors from MNU-induced retinal degeneration by the X-linked inhibitor of apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2757-2763.
- 121.**Doonan F, Donovan M, Cotter TG. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration. *J Neurosci* 2003; 23: 5723-5731.
- 122.**Hisatomi T, Sakamoto T, Sonoda K, et al. Clearance of apoptotic photoreceptors. *Am J Pathol* 2003; 162: 1869-1879.
- 123.**Metz LM, Li DKB, Trabousee AL, et al. Trial of minocycline in a isolated syndrome of multiple sclerosis. *N Eng J Med* 2017; 376(22): 2122-2133.
- 124.**Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M, Friedlander RM. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery* 2001; 48(6): 1393-1399.
- 125.**Chen M, Ona VO, Li M, et al. Minocycline inhibits caspae-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 2000; 6(7): 797-801.
- 126.**Du Y, Ma Z, Lin S, et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease.
- 127.**Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, et al. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 2002; 22(5): 1763-1771.
- 128.**Budni J, Garcez ML, De Medeiros J, et al. The anti-inflammatory role of minocycline in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2016; 13(12): 1319-1329.
- 129.**Thomas M, Le WD, Jankovic J. Minocycline and other tetracycline derivates: A neuroprotective strategy in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Neuropharmacol* 2003; 26: 18-23.

- 130.**Bonelli RM, Heuberger C, Reisecker F. Minocycline for Huntington's disease: An open label study. *Neurology* 2003; 60: 883-884.
- 131.**Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010; 140: 918-934.
- 132.**Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 775-787.
- 133.**Langman T. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1345-1351.



8. ÖZGEÇMİŞ

Arş. Gör. Burak KARABULUT

Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya, 06.09.1986

İletişim : bkarabulut@firat.edu.tr
burakkarabulut44@outlook.com
+90 424 237 00 00/ 4045, +90 536 854 6012

Eğitim Bilgileri

Malatya Rahmi Akıncı İlköğretim Okulu	: 1992-2000
Malatya Hacı Ahmet Akıncı Lisesi (YDA)	: 2000-2004
Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi	: 2006-2012
Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü	: 2013-2018

9. YAYINLAR

Ulusal ve Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Eroksuz H, Yılmaz S, Eroksuz Y, Cevik A, Soylu S, **Karabulut B**. Case report: Persistent truncus arteriosus with intact ventricular septum and other cardiovascular malformations in a calf. *Revue Med Vet* 2015; 166(5-6): 122-126.
2. Murat Tanrısever, İbrahim Canpolat, Hatice Eröksüz **Burak Karabulut**. Bir köpekte kondrosarkom olgusu. *FÜ Sağ Bil Vet Der* 2015; 29(3): 195-198.
3. Timurkaan N, Eroksuz H, Cevik A, **Karabulut B**. Cutaneous leiomyosarcoma with osteoid metaplasia in a budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): a case report. *Vet Med (Praha)* 2016; 61(9): 533-537
4. Eroksuz Y, Gursoy NC, Karapınar T, **Karabulut B**, Incili CA, Yerlikaya Z, Toraman ZA, Timurkan MO, Eroksuz H. Systemic nocardiosis in a dog caused by *Nocardia cyriacigeorgica*. *BMC Vet Res* 2017; 13(30).
5. Timurkaan N, Eroksuz H, Ongor H, Cevik A, **Karabulut B**, Toraman ZA, Eroksuz Y, Incili CA. Concurrent occurrence of lower respiratory aspergillosis and pneumoconiosis in a turkey flock. *Acta Vet Beogr* 2017; 67(4): 562-571.

Ulusal ve Uluslararası Kongrelerdeki Bildiriler

1. Eroksuz H, Eroksuz Y, Timurkaan N, Cevik A, **Karabulut B**, Soylu S. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı 2010-2014 Yılları Arası Rutin Nekropsi ve Biyopsi Faaliyetleri. 7. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 8-10 Eylül 2014, Kars.
2. Timurkaan N, Eroksuz H, Cevik A, **Karabulut B**, Baydar E, Eroksuz Y, Yılmaz F, Yaman I. İki Koçta Rumende Yırtılma ve Bağırsakların Rumene Fıtıklaşması. 7. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 8-10 Eylül 2014, Kars.

3. Eroksuz Y, Cevik A, Eroksuz H, Timurkaan N, **Karabulut B**, Soylu S, Tanrısever M. Bir Kedi Yavrusunda Anterior Kamara Kollaps Sendromu. 7. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 8-10 Eylül 2014, Kars.
4. Canpolat I, Cakir S, **Karabulut B**. The Proximal Humerus Osteosarcom (Stage 4) With Pulmonary Metastasis in a Dog and Evaluated Clinically and Radiologically. 27. International Scientific Conference, 1-2 June 2017 Stara Zagora, Bulgaria.
5. Aytekin O, Kulualp K, **Karabulut B**. Bir Köpekte Memede Tubuler Adenokarsinom Olgusu. 1. Uluslararası Veteriner Cerrahi Kongresi, 11-14 Mayıs 2016, Erzurum.

