



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**KALITSAL RETİNAL DEJENERASYONLARDA
POLİ-ADP-RİBOZ POLİMERAZ (PARP)
İNHİBİTÖRLERİNİN OLASI NÖROPROTEKTİF
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

PAKİZE NUR AKKAYA

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANA BİLİM DALI

EKİM 2022



**KALITSAL RETİNAL DEJENERASYONLARDA POLİ-ADP-RİBOZ
POLİMERAZ (PARP) İNHİBİTÖRLERİNİN OLASI NÖROPROTEKTİF
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Pakize Nur AKKAYA

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Pakize Nur AKKAYA

03/10/2022

KALITSAL RETİNAL DEJENERASYONLARDA POLİ-ADP-RİBOZ POLİMERAZ (PARP) İNHİBİTÖRLERİNİN OLASI NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Pakize Nur AKKAYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2022

ÖZET

Poli-ADP-riboz polimeraz-1 (PARP1) enzimi hücrel fizyolojik koşullarda DNA tamirini gerçekleştirerek hücrenin genetik stabilitesinin korunmasında görev alan bir enzimdir. PARP1, DNA tamiri sürecinde, PARilasyon olayıyla, poli-ADP-riboz (PAR) polimerleri üretmekte; bu yapılar hedef proteine eklenerek kırık zincirin onarılması sağlanmaktadır. Retinitis pigmentosa gibi kalıtsal retinal dejenerasyonlarda genetik mutasyonlara bağlı olarak aşırı DNA hasarının gerçekleştiği, PARP aktivitesinin aşırı arttığı ve bu durumun PAR polimerlerinin birikimine neden olarak PARthanatos adı verilen bir ölüm yolağıyla fotoreseptör kaybına neden olduğu düşünülmektedir. PARP inhibitörleri ise klinikte kanser tedavilerinde kullanılan ya da klinik çalışmaları devam eden farmakolojik ajanlardır. Bu çalışmada PARP1 inhibitörlerinden Olaparib, Talazoparib (BMN-673) ve 3-Aminobenzamid' in (3AB) kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinden biri olan, *PRPH2* geni mutasyonlu *rd2* model (yavaş retinal dejenerasyon) farelerdeki nöroprotektif etkisi immünohistokimyasal, immünofloresan ve TUNEL yöntemleriyle araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal incelemelerde *rd2* modeliyle yapılan in vitro retina organ kültürlerinde aşırı PAR birikimi olduğu; buna karşın farklı dozlarda kullanılan her üç PARP inhibitöründen 100nM Olaparib, 3nM BMN-673 ve 10nM 3AB' nin PAR birikimini anlamlı şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. TUNEL yönteminde ise *rd2* in vitro retinal kültürlerdeki fotoreseptör hücre ölümü 100nM Olaparib, 3nM BMN-673 ve 10nM 3AB uygulanan gruplarda anlamlı şekilde azalmıştır. Her iki yöntemde de en etkili PARP inhibitörü BMN-673 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca fotoreseptör tabakasını ve Koni fotoreseptörlerini korumada, Müller hücre aktivitesini ve ekstrasellüler vezikül aktivitesini azaltmada, fotoreseptörlerdeki Rodopsin yoğunluğunu korumada da *rd2* model için bu inhibitörlerin nöroprotektif etkisi olduğu; en etkili olanın ise 3nM BMN-673 olduğu bulunmuştur. PARP inhibitörlerinin *PRPH2* geni mutasyonlu kalıtsal retinal dejenerasyonlarda fotoreseptörleri koruyarak görme kaybını önleyebileceği, gelecekte terapi yöntemi olabileceği düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : PARP, PAR, PARP İnhibitörleri, Kalıtsal Retinal Dejenerasyonlar

Sayfa Adedi : 168

Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

İkinci Danışman : Dr. Ayşe SAHABOĞLU

REPURPOSING POLY-ADP-RIBOSE POLYMERASE (PARP) INHIBITORS FOR
POSSIBLE NEUROPROTECTIVE EFFECTS IN HEREDITARY RETINAL
DEGENERATIONS

(Ph. D. Thesis)

Pakize Nur AKKAYA

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

October 2022

ABSTRACT

Poly-ADP-ribose polymerase-1 (PARP1) enzyme is involved in maintaining the cellular genetic stability by facilitating DNA repair process under physiological conditions. During the DNA repair process, PARP1 produces poly ADP-ribose (PAR) polymers, PARylates itself and other proteins to repair the broken chain. In hereditary retinal degenerations such as Retinitis pigmentosa, excessive DNA damage occurs due to genetic mutations, PARP activity increased excessively and this causes the accumulation of PAR polymers, resulting in photoreceptor loss through a death pathway called PARthanatos. PARP inhibitors are clinically used in cancer treatments or clinical studies. In this study, the neuroprotective effect of PARP1 inhibitors Olaparib, Talazoparib (BMN-673), 3-Aminobenzamide (3AB) was investigated in *rd2* model (slow retinal degeneration) with *PRPH2* gene mutation, a hereditary retinal degeneration model, by immunohistochemical, immunofluorescence and TUNEL methods. Excessive PAR accumulation in photoreceptors was observed in *rd2* in vitro retinal cultures, but the groups treated with 100nM Olaparib, 3nM BMN-673, 10nM 3AB significantly reduced PAR accumulation. According to the TUNEL method photoreceptor cell death reduced significantly in retinal cultures from *rd2* mice treated with 100nM Olaparib, 3nM BMN-673, 10nM 3AB. The most effective PARP inhibitor was BMN-673. In addition, it has been found that these inhibitors have neuroprotective effects in protecting photoreceptor layer and Cone photoreceptors, reducing Müller cell activity and extracellular vesicle activity and preserving rhodopsin density in photoreceptors, the most effective was 3nM BMN-673. PARP inhibitors could prevent vision loss by protecting photoreceptors in hereditary retinal degenerations with *PRPH2* gene mutation and may be therapeutic targets for the future.

Science Code : 1033

Key words : PARP, PAR, PARP Inhibitors, Inherited Retinal Degenerations

Page number : 168

Supervisor : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

Co-Supervisor : Dr. Ayşe SAHABOĞLU

TEŞEKKÜR

Her şeyin bir sahibi ve yöneticisi olduğuna daima inanıyordum; fakat bilimle ilgilendikçe bu konudaki hayranlığım ve merakım gün be gün güçlendi. Bu anlamda her şeyden önce tüm artılarım, eksilerimle; yanlışlarım ve doğrularımla; bugün olduğum kişi olmamı bana nasip eden yaratıcıma şükür ve bu süreçte hayatıma kattığı her bir insana da teşekkür ederim.

İki sayfa uzunluğundaki önceki Teşekkür yazım, maalesef ki biçimsel olarak uygun olamadı. Bana kattıklarını ayrıntılı açıklayamasam da isimlerini mutlaka anmak istediğim insanlar var. Gazi Üniversitesi'nden tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Çiğdem Elmas' a, sayın hocalarım Prof. Dr. Gülnur Take Kaplanoğlu' na, Prof. Dr. Neslihan Bukan' a ve Prof. Dr. Suna Ömeroğlu' na bana olan destekleri için çok teşekkür ediyorum. Tübingen Üniversitesi'nden ikinci tez danışmanım Sayın Dr. Ayşe Sahaboğlu' na ve Sayın Prof. Dr. Eberhart Zrenner' a üzerimdeki emekleri, yol göstericilikleri için gönül dolusu teşekkürler ediyorum. Ayşe Hocam' a burada kelimeleri yetiremiyorum, üzerimdeki hakkını asla ödeyemem.

Ayrıca Gazi Üni. Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı eski başkanımız Prof. Dr. Candan Özoğlu' a ve şuanki çalışma yerim olan Balıkesir Üni. Histoloji ve Embriyoloji AbD başkanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi F. Bahar Sunay' a vefa dolu teşekkürler ediyorum.

Gazi Üni. Erasmus Koordinatörlüğü' ne, YÖK YUDAB Birimi' ne ve Gazi Üni. Sağlık Bilimleri Enstitüsü' ne çok teşekkür ediyorum.

Gazi Üni.de, St Mark's Hastanesi' nde, Balıkesir Üniversitesi' nde ve Tübingen Üniversitesi' nde birlikte çalışma fırsatı bulduğum tüm özel insanlara, hayatıma acı-tatlı kattıkları, beni ben yapan her bir an için teşekkür ediyorum. Ayrıca çocukluğumu bile bilen gönlüme şifa dostlarıma, arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum.

Son olarak en kıymetlilerim fedakar ve alabildiğine özverili, şefkatli canım anneme ve akıllı, duyarlı, olgun canımın içi kardeşime varlıkları için, destekleri için, maddi - manevi her kararımı benim yanımda durarak değerlendirdikleri için; aslında nedensiz-sebepsiz sadece benim ailem oldukları için can-ı gönülden teşekkür ediyorum. Benim için kolay değildi, daha iyisi mutlaka olabilirdi; yine de hatalarımdan öğrenmeye ve telafilerine çalışarak elimden geleni yaptım, yapıyorum. İnancıma sarıldığım her bir an için kendime de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Retina Embriyolojisi	5
2.2. Retina Anatomisi.....	6
2.3. Retinanın Damarları	8
2.4. Retina Histolojisi.....	9
2.4.1. Bruch membranı.....	10
2.4.2. Retina pigment epiteli (RPE)	10
2.4.3. Dış kompartıman.....	12
2.4.4. İç kompartıman	13
2.4.5. Ganglioner tabaka	13
2.5. Özelleşmiş Retinal Alanlar	14
2.6. Retinal Hücreler	15
2.6.1. Retina pigment epiteli (RPE) hücreleri	16
2.6.2. Fotoreseptör hücreler	16

	Sayfa
2.6.3. İnternöronal hücreler	18
2.6.4. Ganglion hücreleri.....	19
2.6.5. Glial hücreler.....	20
2.6.6. Görsel olmayan fotoresptörler.....	21
2.7. Retina Fizyolojisi	21
2.8. PAR Metabolizması ve PARP Enzim Ailesi	23
2.8.1. PARP' ların kromatin modifikasyonu ve transkripsiyonun düzenlenmesindeki rolü	27
2.8.2. PARP' ların DNA-zincir kırıklarının onarılmasındaki rolü.....	29
2.8.3. PARP' ların hücre farklılaşması üzerindeki rolü	30
2.8.4. PARP' ların telomer fonksiyonu üzerindeki rolü	31
2.8.5. PARP' ların inflamasyondaki rolü	31
2.8.6. PARP' ların hücre ölümündeki rolü.....	33
2.9. Hücre Ölümü Mekanizmaları.....	33
2.9.1. Apoptotik hücre ölüm mekanizması	34
2.9.2. Apoptotik olmayan hücre ölüm mekanizmaları	36
2.10. PARP İnhibitörleri	39
2.10.1. Kanser tedavisinde PARP inhibitörleri	42
2.10.2. Nörodejeneratif hastalıklarda PARP inhibitörleri	43
2.10.3. Olaparib.....	44
2.10.4. Talazoparib.....	45
2.10.5. 3-Aminobenzamid.....	45
2.10.6. Doğal PARP inhibitörleri	45
2.11. Kalıtsal Retinal Dejenerasyonlar.....	46
2.12. Kalıtsal Retinal Dejenerasyonlarda Kullanılan Deney Hayvanı Modelleri	49
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	51

	Sayfa
3.1. Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar	51
3.2. Organotipik Retinal Doku Kùltürleri	52
3.3. Cryofiksasyon Yöntemi	54
3.4. İmmunohistokimyasal Yöntem ile PAR Birikiminin Belirlenmesi	55
3.5. TUNEL ile Fotoresptör Hücre Ölümünün Belirlenmesi	56
3.6. İmmunfloresan Yöntemler	56
3.6.1. DAPI ile retinanın DNT kalınlıklarının belirlenmesi.....	56
3.6.2. CAR (Cone-Arrestin) ile koni fotoresptörlerinin belirlenmesi	57
3.6.3. GFAP ile Müller hücre aktivasyonunun belirlenmesi.....	57
3.6.4. CD9 ile ekstrasellüler vezikül aktivitesinin belirlenmesi.....	58
3.6.5. RHO ile dış segmentteki rodopsin yoğunluğunun belirlenmesi	58
3.7. Kesitlerin Görüntülenmesi ve Analiz Edilmesi.....	59
3.8. İstatistiksel Analizler.....	60
4. BULGULAR	61
4.1. PAR Bulguları.....	61
4.2. TUNEL Bulguları.....	65
4.3. Dış Nükleer Tabaka Kalınlığı Bulguları	70
4.4. Cone-Arrestin Bulguları.....	71
4.5. GFAP Bulguları	78
4.6. CD9 Bulguları	79
4.7. Rhodopsin Bulguları	85
5. TARTIŞMA	121
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	137
KAYNAKLAR	139
EKLER.....	163
EK-1. Etik Kurul.....	164

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ	167
----------------	-----

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Görmenin gerçekleşmesi olayına ilişkin akış	22
Çizelge 2.2. PARP enzim üyeleri sınıflandırması	25
Çizelge 2.3. Yaygın PARP inhibitörlerine ilişkin spot bilgiler	40
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Olaparib PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki PAR birikimine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	61
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda BMN-673 PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki PAR birikimine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	62
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda 3AB PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki PAR birikimine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	63
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Olaparib PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki TUNEL pozitif hücre oranlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	65
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda BMN-673 PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki TUNEL pozitif hücre oranlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	66
Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda 3AB PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki TUNEL pozitif hücre oranlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	67
Çizelge 4.7. Her üç PARP inhibitörünün de en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplardaki Dış Nükleer Tabaka (DNT) kalınlıklarının ölçümüne ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	70
Çizelge 4.8. Sağlıklı WtBl6 PN18 ve retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 ile rd2 PN24 retinal grupları arasında Koni fotoreseptörlerinin yüzdece oranlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	72
Çizelge 4.9. Sağlıklı WtBl6 PN18 ve retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 ile rd2 PN24 retinal grupları arasında Koni fotoreseptörlerinin birim alandaki yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	72
Çizelge 4.10. Sağlıklı WtBl6 PN18 ve retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 grupları arasında Koni fotoreseptörlerinin retinadaki dağılımlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	73
Çizelge 4.11. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin yüzdesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	75

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.12. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin birim alandaki yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	76
Çizelge 4.13. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin TUNEL ile kolokalize boyanmalarının yüzdesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	77
Çizelge 4.14. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin TUNEL ile kolokalize boyanmalarının birim alandaki yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	78
Çizelge 4.15. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplardaki Müller hücre aktivasyonuna ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	79
Çizelge 4.16. PN15. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Dış Nüklear Tabaka’ da CD9 ifadenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	80
Çizelge 4.17. PN18. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Dış Nüklear Tabaka’ da, CD9 ifadenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	81
Çizelge 4.18. PN18. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Ganglioner Tabaka’ da, CD9 ifadenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	82
Çizelge 4.19. PN24. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Dış Nüklear Tabaka’ da, CD9 ifadenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	83
Çizelge 4.20. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplardaki CD9 pozitif alanların yüzdelere ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	84
Çizelge 4.21. PN18. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Dış Segment’ te, Rhodopsin ifadenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	85
Çizelge 4.22. Her iki PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplardaki Rhodopsin yoğunluğuna ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	86

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Gözün genel yapısı	7
Şekil 2.2. Retinanın histolojik yapısı	9
Şekil 2.3. PARilasyon	24
Şekil 2.4. PARP1' in şematik yapısı	26
Şekil 4.1. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve Olaparib tedavisi uygulanan gruplar arasında PAR birikiminin karşılaştırılması	62
Şekil 4.2. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve BMN-673 tedavisi uygulanan gruplar arasında PAR birikiminin karşılaştırılması	63
Şekil 4.3. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve 3AB tedavisi uygulanan gruplar arasında PAR birikiminin karşılaştırılması	64
Şekil 4.4. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ile 3 farklı PARP inhibitörü ile tedavi uygulanan tüm gruplar arasında PAR birikiminin karşılaştırılması	64
Şekil 4.5. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve Olaparib tedavisi uygulanan gruplar arasında TUNEL ile fotoreseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması	66
Şekil 4.6. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve BMN-673 tedavisi uygulanan gruplar arasında TUNEL ile fotoreseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması	67
Şekil 4.7. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve 3AB tedavisi uygulanan gruplar arasında TUNEL ile fotoreseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması	68
Şekil 4.8. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ile 3 farklı PARP inhibitörü ile tedavi uygulanan tüm gruplar arasında TUNEL yöntemi ile fotoreseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.9. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ile 3 farklı PARP inhibitörün en etkili bulunan doz grupları arasında TUNEL yöntemi ile fotoreseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.10. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ile 3 farklı PARP inhibitörün en etkili bulunan dozları ile tedavi uygulanan gruplar arasında DNT kalınlıklarının karşılaştırılması.....	71

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. Sağlıklı Wt PN18 retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 ve rd2 PN24. günlerdeki retinaların Koni fotoreseptör yüzdeleri bakımından karşılaştırılmaları	72
Şekil 4.12. Sağlıklı Wt PN18 retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 ve rd2 PN24. günlerdeki retinaların birim alanda içerdikleri Koni fotoreseptör yoğunlukları bakımından karşılaştırılmaları	73
Şekil 4.13. Sağlıklı (WtBl6) PN18 retinal dokuların birim alanda içerdikleri Koni fotoreseptörü yoğunluklarının optik sinire uzaklıkları bakımından karşılaştırılmaları	74
Şekil 4.14. Retinal dejenerasyonlu (rd2) PN18 retinal dokuların birim alanda içerdikleri Koni fotoreseptörü yoğunluklarının optik sinire uzaklıkları bakımından karşılaştırılmaları.....	74
Şekil 4.15. Sağlıklı (WtBl6) PN18 retina grubu ile retinal dejenerasyonlu (rd2) PN18 grubunun birim alanda içerdikleri Koni fotoreseptörü yoğunluklarının optik sinire uzaklıkları bakımından karşılaştırılmaları	75
Şekil 4.16. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin yüzdelerinin karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.17. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin birim alandaki yoğunluklarının karşılaştırılması	77
Şekil 4.18. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan TUNEL ile kolokalize Koni fotoreseptörlerinin yüzdelerinin karşılaştırılması	77
Şekil 4.19. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan TUNEL ile kolokalize Koni fotoreseptörlerinin birim alandaki yoğunluklarının karşılaştırılması	78
Şekil 4.20. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplara ait GFAP yoğunluklarının karşılaştırılması	79
Şekil 4.21. Post Natal 15. güne ait sağlıklı (WtBl6_PN15) retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN15) retinal dokuların, DNT' lerindeki CD9 ifadenmesinin karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.22. Post Natal 18. güne ait sağlıklı (WtBl6_PN18) retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN18) retinal dokuların, DNT' lerindeki CD9 ifadenmesinin karşılaştırılması.....	82
Şekil 4.23. Post Natal 18. güne ait sağlıklı (WtBl6_PN18) retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN18) retinal dokuların, GHT' lerindeki CD9 ifadenmesinin karşılaştırılması.....	82

Şekil	Sayfa
Şekil 4.24. Post Natal 24. güne ait sağlıklı (WtBl6_PN24) retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN24) retinal dokuların, DNT' lerindeki CD9 ifadenmesinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.25. Post Natal 15, 18 ve 24. günlere ait WtBl6 retinal dokularla rd2 retinal dokuların, DNT' lerindeki CD9 ifadenmesinin karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.26. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplara ait CD9 pozitif alan yüzdelерinin karşılaştırılmaları	85
Şekil 4.27. Sağlıklı (WtBl6) PN18 retinalar ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN18) retinaların dış segmentlerindeki Rhodopsin ifadenmesinin karşılaştırılması	86
Şekil 4.28. Her iki PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda birim alandaki Rhodopsin yoğunluğunun karşılaştırılması	87

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Rd2 grubuna ait immünohistokimyasal inceleme	88
Resim 4.2. Olaparib grubuna ait immünohistokimyasal incelemeler	89
Resim 4.3. BMN-673 grubuna ait immünohistokimyasal incelemeler	90
Resim 4.4. 3AB grubuna ait immünohistokimyasal incelemeler	91
Resim 4.5. Rd2 grubuna ait TUNEL incelemesi	92
Resim 4.6. Olaparib grubuna ait TUNEL incelemeleri	93
Resim 4.7. BMN-673 grubuna ait TUNEL incelemeleri	94
Resim 4.8. 3AB grubuna ait TUNEL incelemeleri.....	95
Resim 4.9. Rd2 grubuna ait DNT kalınlığı incelemesi.....	96
Resim 4.10. En etkili Olaparib grubuna ait DNT kalınlığı incelemesi	96
Resim 4.11. En etkili BMN-673 grubuna ait DNT kalınlığı incelemesi.....	97
Resim 4.12. En etkili 3AB grubuna ait DNT kalınlığı incelemesi	97
Resim 4.13. WtBl6_PN18 farelere ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmeleri.....	98
Resim 4.14. Rd2_PN18 farelere ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmeleri.....	99
Resim 4.15. Rd2_PN24 farelere ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmeleri.....	100
Resim 4.16. Rd2 grubuna ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	101
Resim 4.17. En etkili Olaparib grubuna ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	101
Resim 4.18. En etkili BMN-673 grubuna ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	102
Resim 4.19. En etkili 3AB grubuna ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	102
Resim 4.20. Rd2 grubundaki Müller hücre aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	103

Resim	Sayfa
Resim 4.21. En etkili Olaparib grubundaki Müller hücre aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	104
Resim 4.22. En etkili BMN-673 grubundaki Müller hücre aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	105
Resim 4.23. En etkili 3AB grubuna ait Müller hücre aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	106
Resim 4.24. WtBl6 farelerde post natal 15, 18 ve 24. günlerde DNT' de eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	107
Resim 4.25. Rd2 farelerde post natal 15, 18 ve 24. günlerde DNT' de eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	108
Resim 4.26. WtBl6_PN18 farelerde retinanın tüm tabakalarında eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	109
Resim 4.27. Rd2_PN18 farelerde retinanın tüm tabakalarında eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	110
Resim 4.28. Rd2 grubuna ait retinalarda eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	111
Resim 4.29. En etkili Olaparib grubuna ait retinalarda eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	112
Resim 4.30. En etkili BMN-673 grubuna ait retinalarda eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	113
Resim 4.31. En etkili 3AB grubuna ait retinalarda eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	114
Resim 4.32. WtBl6_PN18 farelerde rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	115
Resim 4.33. Rd2_PN18 farelerde rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	116
Resim 4.34. Rd2 grubuna ait farelerde rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	117
Resim 4.35. En etkili Olaparib grubunda rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	118
Resim 4.36. En etkili BMN grubunda rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi	119

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklamalar

α	Alfa
β	Beta
Cis	Sistein
His	Histidin
κ	Kappa
μm	mikrometre
μM	mikromolar
mm	milimetre
Na^+	Sodyum
nm	nanometre
nM	nanomolar

Kısaltmalar Açıklamalar

3AB	3-Aminobenzamid
ADP	Adenozin Difosfat
AIF	Apoptoz-İndükleyici Faktör
Apaf-1	Apoptoz Aktive Edici Faktör-1
ARBDs	ADP-Riboz Binding Domains (ADP-Riboz Bağlanma Bölgeleri)
ARH	ADP-Ribozil Hidrolaz
ART	ADP-Ribozil Transferaz
ARTC	ADP-Ribozil Transferaz Cholera
ARTD	ADP-Ribozil Transferaz Difteria
ATP	Adenozin Trifosfat
BER	Base Excision Repair (Baz Eksizyon Tamir Sistemi)
BMN-673	Talazoparib
BRCA	Breast Cancer Susceptibility Protein (Meme Kanseri Duyarlılık Proteini)

Kısaltmalar	Açıklamalar
cGMP	Cyclic Guanosin Monophosphate (Siklik Guanozin Monofosfat)
DAB	3,3'- Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNT	Dış Nükleer Tabaka
DSB	Double Strand Break (Çift Zincir DNA Kırığı)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ER	Endoplazmik Retikulum
eV	Ekstrasellüler Vezikül
FDA	The Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)
GAG	Glikozaminoglikan
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GHT	Ganglion Hücre Tabakası
H1	Histon 1
HAT	Histon Asetil Transferaz
HDAC	Histon Deacetylase (Histon Deasetilaz)
HPF1	Histon Parilasyon Faktör 1
HRR	Homolog Recombinant Repair (Homolog Rekombinant Tamir Sistemi)
IS	Inner Segment (İç Kompartıman)
İNT	İç Nükleer Tabaka
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cell (İndüklenmiş Pluriotent Kök Hücre)
LCA	Leber' s Congenital Amaurosis (Leber' in Konjenital Amarozi)
MDM2	Mouse Double Minute 2
NAD+	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NELF	Negative Elongation Factor (Negatif Uzama Faktörü)
NF- κB	Nükleer Faktör-Kappa B
NMN	Nikotinamid Mono Nükleotid
Olap	Olaparib
OS	Outer Segment (Dış Kompartıman)
PAR	Poli-ADP-Ribozil
PARG	Poli-ADP-Riboz Glikohidrolaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
PARP	Poli-ADP-Riboz Polimeraz
PDE	Phosphodiesterase (Fosfodiesteraz)
PK	Protein Kinaz
PKG	Protein Kinaz G
PN	Post Natal
PP	Protein Phosphotase (Protein Fosfataz)
PRPH2	Peripherin-2
rd2	Retinal Dejenerasyon 2
Rho	Rodopsin
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Ürünleri)
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	Retina Pigment Epiteli
SIRT	Sirtuin
SSB	Single Strand Break (Tek Zincir DNA Kırığı)
TARG	Terminal ADP-Ribozil Glikohidrolaz
TLR	Toll-Like Receptors (Toll-Benzeri Reseptörler)
TNF-α	Tumour Necros Factor- α (Tümör Nekroz Faktörü-Alfa)
TRF1	Telomeric Repeat-Binding Factor 1 (Telomerik Parçalar Bağlama Faktörü 1)
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling
Wt	Wild-Type (Sağlıklı, Genetik Defekt Taşımayan)
YBMD	Yaşa Bağlı Maküler Dejenerasyon

1. GİRİŞ

Görme engelliliği (kısmi körlük) ve körlük, insanları en çok zorlayan ve endişelendiren sağlık sorunlarından biridir. Kişilerin hayat kalitesini, bağımsızlıklarını ve özellikle çalışan nüfusu ciddi şekilde etkilemekte; aynı zamanda ağır psikolojik problemleri ve ekonomik yükleri de beraberinde getirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü' nün (DSÖ) yayınladığı, Eylül 2021 verilerine göre dünyada yaklaşık 284 milyon insan görme engellidir ve 39 milyon insan ise körlükle mücadele etmektedir. Yayımlanan rapora göre bu engelli nüfusunun %60' ının 65 yaş üstü olduğu bilinirken yaklaşık 19 milyonu ise çocuklardan oluşmaktadır [1].

Görme kaybına yol açan pek çok neden vardır. Akut travmalar, bir ya da birden fazla başka hastalığın daha eşlik ettiği patolojik süreçler ya da kalıtsal dejenerasyonlar gözün işlevini yitirmesine neden olabilirler. Retinal dejenerasyonlar pek çok farklı çeşitte olup periferik ya da merkezi veya her ikisini birden etkileyecek dejenerasyonlar şeklinde görülebilir. Periferik dejenerasyonlarda ağırlıklı olarak Rod (çubuk) fotoreseptör kaybı gözlenirken merkezi dejenerasyonlar Koni fotoreseptörlerinin kaybı ile karakterizedirler [2].

Kalıtsal retinal dejenerasyonlar; gece körlüğü (niktalopi), karanlığa adaptasyonda sorun, fotofobi, görme alanı daralması, merkezi görme kaybı, nistagmus ve pupiller anormaliteler gibi ilerleyici sorunlara neden olurlar [3]. Bu dejenerasyon tipi ortalama her 2000 kişide 1 yaygınlığa sahiptir ve dünya genelinde yaklaşık 2 milyon kişiyi etkilemektedir [4]. Genetik heterojenite gösterirler. Son yıllardaki artan teknoloji ve gelişmelerle birlikte kalıtsal retinal dejenerasyonlara neden olan pek çok gen ve bu genlerdeki mutasyonlar ortaya konmuştur. Günümüze dek bu hastalıkların oluşumunda 300' ün üzerinde farklı gen ve gen lokusunun yer aldığı tespit edilmiştir [5]. Bu genlerdeki mutasyonlar doğrudan fotoreseptörleri etkileyebildikleri gibi ve/veya retinal pigment epitelinin (RPE) fonksiyonunu da etkileyebilmektedirler. Genetik heterojenitenin vurgulanması bakımından; otozomal baskın, otozomal çekinik, X-kromozomu ilişkili, dijenik ve mitokondriyal kalıtımla aktarılan kalıtsal retinal dejenerasyonlar şeklinde sınıflandırılmışlardır [3, 6-9]. Ayrıca kalıtsal retinal dejenerasyonun görüldüğü patolojik tablolar non-sendromik, sendromik, stabil ve ilerleyici olarak da sınıflandırılabilir [10]. Nonsendromik vakalarda hastanın yalnızca gözleri etkileniyorken, sendromik vakalarda diğer nörosensörleri ya da sistemik organları da etkilenmektedir. Bu genlerdeki mutasyonların aynı ailedeki bireyler arasında bile çeşitlilik gösterebildiği ve farklı kombinasyonlar oluşturabildiği göz önüne alındığında hastalığa

neden olacak kalıtsal mutasyonların son derece çeşitli olabileceği dikkate alınmalıdır. Fenotipik çeşitlilik bakımından ise 20’ den fazla çeşit kalıtsal retinal dejenerasyon vardır [11]. Bunlar arasında Retinitis pigmentosa (RP), koni distrofileri, koni-rod distrofileri, Leber’in konjenital amaurosisi (LCA) ve yaşa-bağlı maküler dejenerasyon (YBMD) gibi hastalık grupları kalıtsal retinal dejenerasyonları oluşturan en temel sınıflamalardır [12].

Kalıtsal retinal dejenerasyonların büyük bir bölümünü oluşturan Retinitis pigmentosa için bugüne dek kesin bir tedavi metodu geliştirilememiş olması, bu alanda yapılan çalışmaların önemini artırmaktadır. Günümüzde Retinitis pigmentosa’ nın tedavisi ya da en azından ilerlemesinin durdurulması için genel olarak genel olarak; a) A vitamini ve retinoid desteklerin palyatif kullanımı, b) gen terapileri c) retina pigment epiteli ve fotoreseptör transplantasyonu ya da elektronik protezler gibi “replasman tedavileri” uygulanmaktadır. Son dönemlerde fotoreseptör ölüm mekanizmasının basamaklarının anlaşılmaya çalışılması üzerine yapılan araştırmalar; poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) inhibitörlerinin de kalıtsal retinal dejenerasyonlar için bir umut olabileceği fikrini doğurmuştur.

Poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) enzim ailesi; adenzin difosfat (ADP) ribozilasyonunu gerçekleştiren ve normal hücre fizyolojisi için son derece önemli olan bir enzim ailesi grubudur. ADP-ribozilasyonunu poli- ya da mono- olarak gerçekleştirebilme erkine sahiptir. En çok çalışılan üyesi PARP1 olup PARP1’ in poli-ADP-ribozilasyon gerçekleştirdiği ve bunun neticesinde poli-ADP-ribozil (PAR) polimerlerinin oluştuğu bilinmektedir [13]. PARP’ lar normal şartlarda deoksiribo nükleik asit (DNA) hasar tamir mekanizmasında görev alan ve hücrenin sağkalımından sorumlu enzimlerdir. Aynı zamanda hücresel sinyalizasyon, hücre döngüsünün düzenlenmesi, protein ve lipid metabolizmasının dengelenmesi, adaptif bağışıklık ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücresel yolda yer almaktadırlar [14]. PARP enzimleri temelde hafif genotoksik stres faktörlerine karşı hücreyi koruyarak DNA tamirinde görev alırlarken yoğun DNA bozunmasının gerçekleştiği durumlarda aşırı ifadelenecek, ironik bir şekilde, hücreyi ölüme götüren bir yolda yer alırlar. Tam bu noktada DNA’yı tamir edemeden hücre ölümüne neden olan PARP aktivitesi söz konusu olduğu için Berger bu durumu “PARP’ in intihar hipotezi” olarak adlandırmıştır [15]. Böylece PARP, kaspaz-bağımsız olan, fakat poli-ADP-riboz (PAR) birikimi ve apoptoz-indükleyici faktörün (AIF) mitokondriden nükleusa translokasyonunu içeren yeni bir hücre ölümü mekanizmasının temel aktörü olmuş olur [16]. Bu özel hücre ölümü mekanizması “PARthanatos” olarak isimlendirilmiştir [17]. Genetik mutasyonlu, kalıtsal

retinal dejenerasyonlu fare retinalarında PARP enziminin aşırı düzeyde var olduğu (over-ekspresyon) gösterilmiştir [18, 19]. Bu noktadan hareketle, hali hazırda klinikte meme, over ya da prostat kanserleri gibi bazı kanser türlerinde kullanılan [20-22], ayrıca Alzheimer gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda pre-klinik çalışmaları devam eden [23] PARP inhibitörlerinin kalıtsal retinal dejenerasyonlar için de tedavi edici bir ajan olabilecekleri hipotezi doğmuştur.

Memeli retinalarında PRPH2 (Peripherin-2) genindeki bazı mutasyonlara bağlı olarak fotoreseptörler olmaları gerektiği şekilde gelişmemektedirler [24, 25]. Bu mutasyonun varlığında, ışığın algılanarak elektrokimyasal iletiler şeklinde beyne iletilmesinde temel görevi olan fotoreseptörlerin dış segmenti olması gerektiği gibi gelişemez. Bu da kademeli şekilde fotoreseptör kaybına neden olarak nihayetinde tam körlük gelişmesine yol açmaktadır.

Yapılan çalışmalarda insan PRPH2 geni mutasyonunun rd2 model (retinal dejenerasyon-2/retinal dejenerasyon slow) farelerde homolog olarak çalışılabildiği gösterilmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak biz de çalışmamızda kalıtsal retinal dejenerasyonlu rd2 model fare retinalarında PARP inhibitörlerinden Olaparib, Talazoparib (BMN-673) ve 3-aminobenzamid' in (3AB) olası nöroprotektif etkisini araştırmayı planladık. Bu amaçla in vitro rd2 retinal kültürler doğum sonrası (Post natal/PN) onbirinci günde PARP inhibitörleri ile PN18' e dek tedaviye alındılar. Tedavi sonrası uygulanan TUNEL yöntemi ile fotoreseptör hücre ölümlerini; immünohistokimyasal yöntem olarak DAB eşliğinde kullandığımız PAR boyaması yöntemi ile Parthanatos hücre ölüm mekanizmasının temel göstergelerinden başlıcası olan PAR birikimini; Cone-Arrestin, Glial fibriler asidik protein (GFAP), CD9 (tetraspanin ailesinden bir transmembran proteini) ve Rho (Rhodopsin) immünfloresan boyamaları ile de sırasıyla koni fotoreseptörlerinin sağ kalım düzeylerini, bir oksidatif stres belirteci olarak kabul edilen Müller hücre aktivasyonunu, fotoreseptör ölümünde yer aldığı başka çalışmalarda gösterilmiş olan [26] ekstrasellüller vezikül (eV) aktivitesini ve çubuk fotoreseptörlerin (Rod' ların) dış segment gelişiminin bir göstergesi olan Rodopsin ifadelenmesini araştırdık. Aynı zamanda Cone-Arrestin boyamamızı, sağlıklı (Wt- Wild type) retinalar ile rd2 retinalar arasında da kalıtsal retinal dejenerasyona bağlı olarak gelişen koni fotoreseptör kaybı dağılımlarını gözlemlemek üzere gerçekleştirdik. CD9 ve RHO immünfloresan boyamalarımızda da sağlıklı (Wt) ve kalıtsal retinal dejenerasyonlu (rd2) fare retinaları arasındaki farkları araştırdık. TUNEL ve PAR

araştırmalarımız doza bağımlı şekilde, her bir inhibitör için farklı dozlarda gerekleştirilmişken diğer boyamalarımızda bu yöntemlerden elde ettiğimiz bulgulara dayanarak her bir inhibitör için en etkili dozları seçerek çalışmamızı sürdürdük.

Çalışmamızda PRPH2 geni mutasyonuna bağlı olarak, yavaş şekilde gelişen rd2 kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde Olaparib, BMN-673 (Talazoparib) ve 3-Aminobenzamid (3AB) olmak üzere üç farklı PARP inhibitörünün olası nöroprotektif etkileri immunohistokimyasal yöntemle, TUNEL yöntemiyle ve immunfloresan yöntemlerle araştırılmıştır. Bu amaçla PARilasyonun ortaya konması için DAB eşliğinde uyguladığımız PAR boyaması ve fotoreseptör hücre ölümünün araştırılması için uyguladığımız TUNEL yöntemi her üç PARP inhibitörünün de farklı dozlarında olmak üzere, kontrol grubu dahil, toplamda on iki farklı grupta araştırılırken; immunfloresan yöntem kullandığımız araştırmalarımız bu sonuçlardan elde edilen bulgulara dayanılarak her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları seçilerek sürdürülmüştür. Ayrıca Cone-Arrestin, CD9 ve Rhodopsin immunfloresan araştırmalarımız hem in vivo retinal preparatlarda hem de in vitro retinal kültür tedavi gruplarında gerçekleştirilmiştir. Tüm bulgular istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiş ve literatürle karşılaştırmalı olarak ele alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Retina Embriyolojisi

Gözler embriyonun yirmi ikinci gününde önbeynin Diencephalon hizasında, iki yanda, yüzeysel oluklar (optik yarıklar) şeklinde oluşmaya başlarlar. Nöral tüpün kapanmasıyla eş zamanlı olarak bu oluklar önbeyinden dışarıya doğru taşarak bir kabartı şeklinde optik vezikülü oluştururlar. Optik veziküller önce yüzey ektodermiyle birleşerek ‘lens’ oluşumunu başlatırlar sonra da invajine olarak çift duvarlı ‘Optik Kadeh’leri ve “optik sap”ı oluştururlar. Erken dönemde bu çift duvar yapısı arasında ‘intraretinal boşluk’ adı verilen bir lümen yapısı bulunsa da gelişim ilerledikçe bu boşluk kapanır. Yine de bu obliterasyondan arta kalan küçük bir alan çıkıntısı, aşağıya doğru retinal ayrılmayı oluşturmaktadır. Tüm bu bilgiler ışığında, en net şekilde ifade etmek gerekirse, gözün en iç tabakası olan Retina, embriyolojik olarak nöroektodermden gelişen optik kadehin iç ve dış tabakalarından köken almaktadır [27]. Göz gelişiminde PAX6 ve PAX2’ nin önemli bir yeri vardır. PAX6 esas homeotik gen olup temel olarak optik kadeh ve lens plağında ifadenirken PAX2 ise büyük çoğunlukla optik sapta ifadenmektedir [28].

Çift katmandan oluşan Optik kadehin dış tabakası, küçük pigment granülleriyle karakterizedir ve retina pigment epitelini (RPE) oluşturur. Optik kadehin iç tabakası ise nöral retinayı oluşturmaktadır. İç tabakanın 4/5’lik posterior bölümü ile 1/5’lik anterior bölümleri de farklı yapıları oluşturmak üzere gelişirler. Posterior kısım intraretinal boşluğu çevreler ve ‘pars optika retina’ olarak isimlendirilmektedir. Rod ve koni fotoreseptörleri ile diğer retinal nöron tipleri buradan gelişirler. Fotoreseptör tabakasının komşuluğunda ise nöronların ve destekleyici hücrelerin çekirdeklerini içeren ‘iç ve dış nükleer tabaka’ ile ‘gangliyon tabakası’ oluşur. Bu katmanların üzerinde sinir hücrelerinin aksonlarını içeren fibröz yapılı sinir lifleri tabakası vardır. Buradaki sinir lifleri, optik sap yönünde birleşerek ‘optik sinir’i meydana getirirler. Tabakalar halindeki bu yapısal düzenlenme, ışık iletilerinin rod ve koni fotoreseptörlerine ulaşmadan önce retinanın tüm bu tabakalarından geçmesini sağlamaktadır [27]. Optik kadehin 1/5’lik anterior bölümünden ise iris ve silier cisim oluşacaktır. İrisin epiteli de siliyer cismin epiteli de çift katlı silindirik epitel yapılarını ortaya koyar nitelikte; optik kadehin hem dış pigment tabakasından hem de iç nöral tabakasından gelişmektedirler. İristeki dilatatör pupilla ve sfinkter pupilla kasları dış pigmentli tabakadaki epitel

hücrelerinin değişerek kontraksiyon yeteneği kazanmasıyla oluşurlar. Siliyer kaslar ise koroid içinde mezodermden gelişirler.

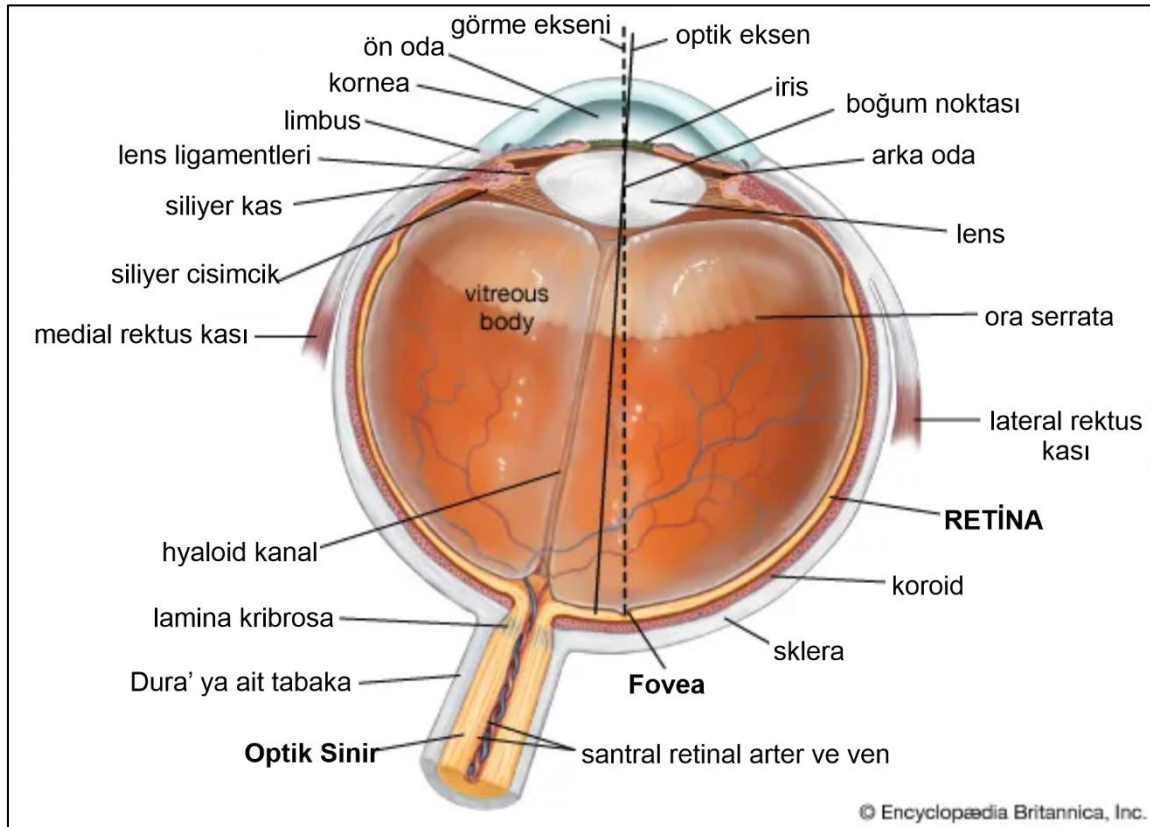
Lens ile retina arasındaki retinal boşluğu dolduran jelatinöz, şeffaf sıvı “vitreus sıvısı” (Vitröz cisim) olarak adlandırılmaktadır ve o da siliyer kaslar gibi koroid içine göç eden mezodermden gelişmektedir [28].

Retinanın gelişimi sırasında gerçekleşebilecek en yaygın malformasyonlar retina dekolmanı, genetik retinoblastom, retinosele ve retrolental fibroplazi’ dir. Retina dekolmanı postnatal olarak herhangi bir baş travması ya da patolojik durum nedeniyle gerçekleşebilecek olsa da konjenital retina dekolmanının kaynağı gelişim sırasında, optik kadehin iç ve dış tabakalarının birbirinden ayrılmasıdır. Bu ayrılma sonucu retina; koroid ve sklera’ dan ayrılarak işlevsiz hâle gelmiş olacaktır. Genetik retinoblastom, Retinoblastoma proteini üreten RB1 genindeki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. Otozomal dominant bir genetik hastalıktır. Çift görme, şaşılık, görme kaybı ya da göz küresi içinde gelişen malign tümörler ile karakterize olabilir. Retinosele’ de koroid fissürün kapanmaması ya da skleranın retina içine doğru gelişmesi söz konusu iken “prematüre retinopati” olarak bilinen Retrolental fibroplazi’ de prematüre bebeklerde suni oksijen tedavisi verilmesine bağlı olarak gelişen retinopati görülmektedir [28].

2.2. Retina Anatomisi

Retina anatomisini tanımlayabilmemiz için öncelikle gözün anatomisine değinmek yerinde olacaktır. Gözler ışığın beyindeki görme korteksine iletimini ve bu süreçte ışık iletilerinin elektrokimyasal iletilere dönüştürülerek algılanmasını sağlayan organlardır. Kendiliğinden odaklanabilme ve ışık yoğunluğuna uyum sağlayabilme özellikleri vardır. Gözler ışığın şiddetini (parlaklığını) ve dalga boyunu (rengini) algılayarak beyinde görüntünün oluşmasını sağlarlar. Omurgalı canlılar için görülebilir ışığın dalga boyu 400-750 nm aralığındadır [29]. Gözler, insanlarda orbital kemik içerisine gizlenmişlerdir ve orbital boşlukta adipoz doku ile sarılmış olarak bulunurlar. Gözün hareketlerini altı adet ekstrinsik kas sağlamaktadır. Gözler, yüzün her iki yanında yaklaşık 24 mm çaplı, bir çift küre şeklinde yer alırlar. En dış yüzeyleri dış dünyayla direkt temasta olup içeride ise optik sinir aracılığıyla beyinle bağlantıdadırlar. Göz küresi üç ana tabakadan oluşur: en dışta yer alan kornea ve sklera, orta tabaka ya da vasküler tabaka olarak bilinen uvea ve en iç tabaka olan retina [30] (Şekil 1).

Göz küresine ait bu tabakaların haricinde; konjonktiva, lakrimal sistem (gözyaşı sistemi) ve göz kapakları da gözün yapısına eşlik eden yapılardır [31]. En dış yüzey olan Kornea' nın merkezi, gözün ön kutbunu oluşturuyorken retinadaki çukur bir bölge olan fovea ve optik disk göz küresinin arka kutbunu oluşturur. İki kutbu birleştirdiği var sayılan çizgiye 'Anatomik eksen (optik aksis)' denir. Ön kutup ile fovea' nın tam merkezini birleştirdiği var sayılan çizgiye ise 'Görme ekseni' denir; bu eksen göz küresini nazal ve temporal olmak üzere iki yarı küreye böler.



Şekil 2.1. Gözün genel yapısı [32]

Göz; farklı ve birbiri ile bağlantılı üç oda ya da üç kamaradan oluşmaktadır. Bunlar; kornea ile iris arasında bulunan ön kamara, iris ile lens arasında bulunan arka kamara ve lensin arkasında yer alan, geri kalan tüm göz küresini oluşturan vitreus boşluğudur. Ön ve arka kamaralarda aköz hümör bulunurken vitreusta vitröz hümör bulunmaktadır. Bu sıvılarla birlikte orbital kemik, göz kapakları, konjonktiva ve lakrimal sistem (gözyaşı sistemi) gözün genel yapısını ve fizyolojik fonksiyonunu koruyan yapılardır [30].

Gözün beslenmesinden ve kanlanmasıdan sorumlu kan damarı A.carotis interna' nın bir dalı olan oftalmik arter' dir. Superior ve inferior orbital venler ise gözün drenajını sağlamaktan sorumludurlar ve intrakraniyal kavernöz sinus' a boşalırlar .

Gözün küresinin en iç tabakası olan, vitreus boşluğunu çepeçevre saran ve kendi içerisinde de çeşitli katmanlardan oluşan retinanın, sağlıklı şekilde beslenmesi ve kanlanması görme işlevinin sürdürülebilmesi açısından son derece önemlidir.

Retina; temelde morfolojik olarak retina pigment epiteli (RPE) ve nöral (duyusal) retina' dan oluşmaktadır. Nöral retina, ora serrata' ya kadar uzanır; bitiminde ora serrata pigmentasyon göstermeyen silli epitel ile devam eder. Retina normal şartlarda ince, saydam bir dokudur. En kalın olduğu bölge optik sinir yakınlarındaki alanda görülüp buradaki kalınlığı 0,56 mm' dir. Retinal kalınlık göz küresinin orta hattında 0,18 mm ortalamasındaiken ora serrata' daki kalınlığı 0,1 mm' ye kadar düşer. Benzeri şekilde foveal alandaki kalınlığı da 0,2 mm civarlarındadır [2].

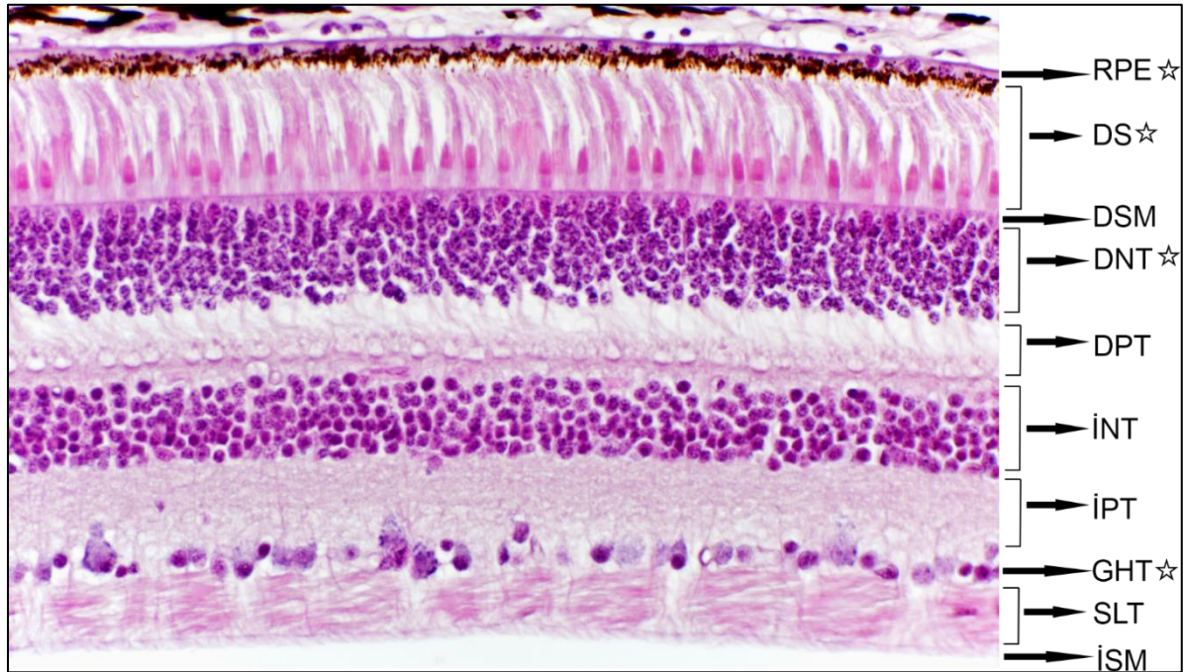
2.3. Retinanın Damarları

Retina yapısal olarak hem dış tarafındaki Koroid' de bulunan koryokapiller kan damarları aracılığıyla hem de iç tarafındaki merkezi arter ve ven aracılığıyla kanlanmaktadır. Koryokapiller pleksustaki kan difüzyon yoluyla retinanın dış kompartımanının tamamını besler. Santral arter ve santral ven ise optik sinirin ortasından geçip optik diskten göz küresine girer. Santral arter alt ve üst dallara, hemen sonrasında da nazal ve temporal dallara ayrılarak retinanın alt segmentlerinin beslenmesini sağlar. Ancak santral artere ait olan bu dalların birbirleriyle anastomozlaşmadıkları bilinmektedir. Bu nedenle santral retinal arterin dallarına “anatomik uç arterler” de denilmektedir. Santral vende de artere benzer bir dallanma görülür. Optik disk ve yakınında yalnızca vitröz hümör ve iç sınırlayıcı membran arasında bulunan damarlar, perifere doğru gidildikçe retinanın daha üst segmentlerine doğru, iç nükleer katmana dek ilerlerler. Burada kapiller pleksuslar oluştururlar.

Retina damarlarının oftalmoskopi sırasında ayrıntılı şekilde değerlendirilmesi diyabetik retinopati, glokom ya da kafa içi basınç artışı gibi patolojik durumların tespiti açısından oldukça önemli bulgular içermektedir [33].

2.4. Retina Histolojisi

Gözün en iç tabakası olan ve göz yuvarını en içten çepeçevre saran retina; retina pigment epiteli (RPE) ve nöral retina (retina proper) olmak üzere iki bölümden oluşur. Görme olayının gerçekleşmesini sağlayan fotoreseptörleri de içeren tabaka, nöral tabakadır. Bu tabaka optik diskten ora serrata' ya kadar uzanmaktadır. Retina pigment epiteli ise koroid komşuluğunda yer alan, Bruch membranı aracılığıyla koroidin koryokapiller vasküler katmanına sıkıca tutunan bölümdür [31]. Daha ayrıntılı incelendiğinde nöral tabakayı da dıştan içe olmak üzere dış kompartıman (Outer segment - OS), iç kompartıman (Inner Segment - IS) ve Ganglioner tabaka şeklinde sınıflandırmak mümkündür [34]. Tam bir histolojik sınıflandırma yapıldığında ise dış kompartımanın a) fotoreseptör tabakası, b) dış sınırlayıcı membran, c) dış nüklear tabaka d) dış pleksiform tabaka; iç kompartımanın a) iç nüklear tabaka, b) iç pleksiform tabaka; Ganglioner tabakanın a) Ganglion hücre tabakası, b) optik sinir lifleri tabakası, c) iç sınırlayıcı membran' ı içerdiği görülür [33] (Şekil 2).



Şekil 2.2. Retinanın histolojik yapısı RPE: Retina pigment epiteli, DS: Dış segment, DSM: Dış sınırlayıcı membran, DNT: Dış nüklear tabaka, DPT: Dış pleksiform tabaka, İNT: İç nüklear tabaka, İPT: İç pleksiform tabaka, GHT: Ganglion hücre tabakası, SLT: Sinir lifleri tabakası, İSM: İç sınırlayıcı membran (Yıldız işaretli tabakalar bu çalışmada en çok bahsedilenlerdir) (Bu şekil [35] numaralı kaynaktan modifiye edilerek hazırlanmıştır)

Görme olayı esnasında; gözün ön kamarasından lens ve mercek yardımıyla gelen ışık, retinanın katmanlarından geçerek dış segmentteki fotoreseptörler tarafından tespit edilir. Görülebilir ışığın farklı nesneler tarafından yansıtılan dalga boylarının fotoreseptörler aracılığıyla belirlenmesiyle ışık; elektrokimyasal iletiler olarak optik sinir aracılığıyla merkezi sinir sistemine (beyindeki görme korteksine) iletilmek üzere kodlanmış olur. Tüm bu sürecin gerçekleşmesini sağlayan ana unsurlar olan fotoreseptörler; Rod' lar (Çubuk fotoreseptörleri) ve Koni fotoreseptörleri olmak üzere iki çeşittir. İnsan retinasında yaklaşık 120 milyon rod bulunurken 6 milyona yakın da koni fotoreseptörü bulunmaktadır. Rodlar gece görüşü gibi az ışıktaki görmeyi ve periferik görüşü sağlıyorlarken koniler parlak ve renkli ışığın algılanmasında görev alırlar ve merkezi görüşten sorumludurlar [34].

2.4.1. Bruch membranı

Retinanın beslenmesini sağlayan fenestralı kapiller kan damarlarından oluşan koryokapiller tabaka ile retina pigment epiteli arasında bir geçiş bölgesi olarak uzanır. Optik diskten ora serrata'ya kadar 1 - 4 µm kalınlığında yer almaktadır. Bazı uzmanlar ve yazarlar bu amorf, ince tabakanın koroidal stromaya ait olduğunu ifade etmiş olsalar da koryokapiller endotel ile retina pigment epitelinin bazal membranı bu tabakanın her iki sınırını oluşturmaktadır. Bu iki sınır arasında ise sırayla kollajen fiberler - elastik fiberler - kollajen fiberler şeklinde bir "sandviç modeli" ni andıran üç tabaka daha bulunmaktadır. Böylece toplamda beş farklı tabakadan oluşan ve "lamina vitrea" olarak da isimlendirilen Bruch membranı, ora serrata' dan itibaren kollajenöz ve elastik tabakalarını kaybederek siliyer stroma içinde görünmez hâle gelir [33].

2.4.2. Retina pigment epiteli (RPE)

Retinanın en dış tabakasıdır ve retinanın duysal olmayan bölümüdür. Bu özelleşmiş epitel tipi tek katlı kübik ya da alçak prizmatik hücrelerden oluşmuştur ve retina boyunca düzensiz yoğunlukta yer alır [2, 36]. RPE, yaklaşık üç buçuk milyon retina pigment epiteli hücresi içermektedir ve bu hücrelerin her biri 14 µm genişliğinde, 10-14 µm uzunluğundadır [33, 37]. Fovea ve komşuluğundaki alanlarda en uzun epitel hücreleri bulunmakta, bu durum da epitel hücrelerindeki pigment içeriği nedeniyle bu alanların daha koyu renkli görünmesine neden olmaktadır. RPE; koroidin koryokapiller tabakasına Bruch membranı aracılığıyla sıkıca tutunmuştur. Diğer tarafında ise nöral / duysal retina yer almaktadır [33]. Nöral

retinanın ilk tabakası olan fotoreseptör hücre tabakası ile RPE hücrelerinin birbirlerine tutunmalarını sağlayan, amorf şekilli ekstrasellüler matrikse “interfotoreseptör matriks” adı verilmektedir [30]. Bazı patolojik koşullar Retina pigment epitelinin nöral retinadan ayrılmasına neden olabilirler. Bu duruma “retina dekolmanı” adı verilmektedir ve retina pigment epitelinin metabolik desteğinden yoksun kalan nöral retinanın bir süre sonra işlevsizleşmesiyle sonuçlanan bir tablodur. Hızla lazer ya da cerrahi tedavinin uygulanması prognoz açısından olumludur [2, 36].

Retina pigment epiteli hücrelerinin histolojik yapısı, bu retinal tabakanın görmenin olaylanmasına sunduğu büyük katkıyı yansıtır niteliktedir. RPE hücrelerinin apikalinde sitoplazmik uzantılar vardır ve bu uzantılarda silindirik kılıflar içerisinde melanin granülleri bulunmaktadır. Çubuk ve koni fotoreseptörlerine direkt temas etmeyen fakat onlarla ilişki içerisinde olan bu yapıların içindeki melanin pigmenti granülleri, fotoreseptörlere en yakın alanlarda birikmişlerdir. Nöral retinadan geçen ışığın absorpsiyonunu gerçekleştirerek parlamının engellenmesini sağlarlar. RPE hücrelerinin bazalinde ise çok sayıda kıvrımlı çöküntü ile karakterize hücre çekirdeği bulunmaktadır. Ayrıca bazalde hücre membranı, mitokondri ile ilişki içinde olan birçok katlantıya sahiptir. RPE hücrelerinin sitoplazmasında ise çekirdeğin hemen üzerinde yer alan bir Golgi aygıtı, yaygın bir düz Endoplazmik retikulum ağı, rezidüel cisimcikler, sekonder lizozomlar ve fagozomlar gözlemlemek mümkündür. Rezidüel cisimcikler ve fagozomlar içerisinde fototransdüksiyon sonrası artık metabolit hâline gelen, fotoreseptörlere ait membranöz disklerin kalıntıları bulunmaktadır. Bu durum RPE hücrelerini görme olayının devamlılığının sağlanması bakımından son derece önemli bir konuma taşır. Çünkü fotoreseptörlerin yenilenmesini sağlayan, görme pigmentlerinin fotosensitivitesini yeniden kazandıran, bu rezidüel cisimcikler ve fagozomlar sayesinde, RPE hücreleri olmaktadır. Ek olarak RPE hücreleri serbest radikalleri ortadan kaldırma yoluyla bir antioksidan olarak görev yaparlar. Adenozin trifosfat (ATP), çeşitli büyüme faktörleri ve immünmodülatörler sentezleyerek nöral retinanın sağlığını korur ve onları metabolik olarak desteklerler. Aynı zamanda RPE hücreleri arasında zonula okludensler, zonula adherensler ve oluklu bağlantılar bulunmaktadır. Bu kompleks bağlanma yapıları, kan-retina bariyerini oluşturarak retinanın sağlığını ve canlılığını koruyan temel aktörlerden biri olmuş olur [33, 36].

2.4.3. Dış kompartıman

“Retina Histolojisi” başlığı altında belirtildiği üzere, Dış kompartıman (Outer segment / OS) nöral retinanın başladığı alandır. Fotoreseptör tabakası, dış sınırlayıcı membran, dış nüklear tabaka ve dış pleksiform tabaka’ dan oluşur.

Fotoreseptör tabakası; çubuk (Rod) ve koni fotoreseptör hücrelerinin membranöz disklerini ve çekirdeğe kadar olan hücre gövdelerini içeren tabakadır. Bu alanda yer alan 600 ila 1000 adet membranöz disk, morfolojileri itibariyle fotoreseptörlerin çubuk ya da koni şeklinde adlandırılmasını sağlayan yapılar olup nöral retinanın ışığa esas duyarlı alanlarıdır. Fototransdüksiyon işlemi bu disklerde gerçekleşmektedir. Disklerin düzenlenme biçimleri nedeniyle ışık mikroskobunda fotoreseptör tabakasını dikey çizgilenmeler şeklinde görürüz. Görmenin gerçekleşebilmesi için bu katmanda üretilen sinyaller diğer tüm retina tabakalarından geçerek beyne iletilmektedir [33, 38].

Dış sınırlayıcı membran; fotoreseptör tabakası ile fotoreseptör hücre çekirdeklerinin yer aldığı dış nüklear tabaka arasında konumlanan, soluk renkli gözlemlenen, esasen gerçek bir membran olmayan yapıdır. Dev şekilli Müller hücrelerinin uzantıları ile fotoreseptörler arasındaki zonula adherens bağlantıları tarafından oluşturulmuştur. Bu membran sınırı, büyük moleküllerin retinanın iç tabakalarına geçişini önleyen bir bariyer olarak görev yapar [33, 36]. Işık mikroskobu için bu tabakanın yeri, Müller hücrelerinin sonlandığı alan olarak işaretlenebilir ki; bu da fotoreseptör hücre gövdelerinin bazaline, fotoreseptör hücre çekirdeklerinin ise hemen apikaline denk gelmektedir.

Dış nüklear tabaka; Rod ve Koni fotoreseptörlerinin hücre çekirdeklerinin bulunduğu tabakadır. Foveal alanda en ince kalınlıktadır. Fotoreseptörlerin dış segmentlerinde olduğu gibi çekirdekleri arasında da histolojik farklar mevcuttur. Rod fotoreseptör çekirdeklerinin olduğu sitoplazma alanı, iç segmentteki sitoplazmadan daha ince ve az iken Koni fotoreseptörlerinin çekirdeklerinin etrafını saran sitoplazmada böyle bir incelme ya da miktarca azalma söz konusu değildir. Ayrıca Koni çekirdekleri Rod’ larınki ile karşılaştırıldığında daha açık renk boyanırlar, daha geniş ve daha ovaldirler [33, 37].

Dış pleksiform tabaka; fotoreseptör hücreler ile retinada yer alan diğer nöronal hücrelerin uzantıları ve sinaps yaptıkları alanlar bu tabakada bulunmaktadır. Bu uzantılar sayesinde fotoreseptör hücrelerde üretilen sinyaller retinal nöronlara iletebilmektedir. Rod ve koni fotoreseptörlerinin çekirdeklerinden çıkan ince bir uzantı lateralde birkaç dallanma yaparak genişlemiş bir parçaya uzanır. Bu genişlemiş parça rodlarda “sferül”, konilerde “pedikül” olarak isimlendirilmektedir. Birçok Rod fotoreseptörünün uzantısı tek bir bipolar nöronla sinaps yapabiliyor ve ağlar oluşturabiliyorken Koni fotoreseptörlerinin birçoğu bipolar nöronlarla bire bir ilişki kurmaktadır. Özellikle foveada, bir Koni fotoreseptörü direkt bir adet bipolar nöron ile bağlantı halindedir. Bu tabakada yer alan nöral retinal hücreler (bipolar nöronlar, horizontal hücreler, internöron hücreleri ve Amakrin hücreler) bölüm 2.6’ da ayrıntılı olarak incelenmiştir.

2.4.4. İç kompartıman

“Retina Histolojisi” başlığı altında belirtildiği üzere, İç kompartıman (İnner segment / IS); iç nüklear tabaka ve iç pleksiform tabaka’ dan oluşur.

İç nüklear tabaka; fotoreseptör hücreler haricindeki nöral retinal hücrelerin çekirdeklerinin yer aldığı tabakadır. Bu hücre tipleri olan horizontal hücreler, bipolar nöronlar, Amakrin hücreler, internöronlar ve Müller hücrelerinin özellikleri bölüm 2.6’ da ayrıntılı olarak incelenmiştir. İç nüklear tabakanın dış kısmına yakın alanda Horizontal hücreler yer alırken Amakrin hücreler iç pleksiform tabakanın komşuluğunda bulunurlar. Müller hücreleri ve bipolar nöronlar ise iç nüklear katmanın herhangi bir pozisyonunda görülebilirler [33, 39].

İç pleksiform tabaka; fotoreseptör haricindeki nöral retinal hücrelerin akson ve dendrit uzantılarının birbirleriyle etkileşimde bulunarak sinapslar yaptıkları tabakadır. İç sınırlayıcı membrana paralel bir seyir gösterir ve bu durum nedeniyle ışık mikroskopisinde yatay çizgili bir görünümü vardır [33].

2.4.5. Ganglioner tabaka

“Retina Histolojisi” başlığı altında belirtildiği üzere, Ganglioner tabaka nöral retinanın en iç tabakası olup optik sinir aracılığıyla beynin görme merkeziyle bağlantı halindedir. Bu

tabaka; Ganglion hücre tabakası, sinir lifleri tabakası ve iç sınırlayıcı membran başlıkları altında incelenmiştir.

Ganglion hücre tabakası; çapları 30 μm ' ye kadar ulaşabilen, büyük multipolar nöron gövdelerinin oluşturduğu tabakadır. Gangliyon hücrelerinin yanı sıra yer yer koyu boyanan, küçük nöroglial hücreler de bu tabakada yer almaktadır. Ganglion hücre tabakası retinanın oldukça büyük bir bölümünde tek tabakalı iken makulada sekiz-on tabakaya kadar ulaşabilir [33].

Sinir lifleri tabakası; Ganglion hücrelerinin aksonlarını içeren, yassı bir tabakadır. Buradaki aksonlar ince ve miyelinsizdir. Retina düzenlenmesine paralel şekilde seyreden bu tabakada, süperfasiyal kapillerleri de içeren retinal damarlar da primer olarak bulunmaktadır. Sinir lifleri tabakasının kalınlığı, periferik bölgelerde oldukça ince iken aksonların biraraya geldiği optik disk alanında belirgin şekilde artmıştır [33, 40].

İç sınırlayıcı membran; Müller hücrelerinin bazal laminaları tarafından oluşturulan, retinanın en iç sınırındır. Retina ile vitröz cismi birbirinden ayırır [33].

2.5. Özelleşmiş Retinal Alanlar

Retinayı periferik ve merkezi retina olarak sınıflandırdığımızda yalnızca konum olarak değil yapısal özellikler bakımından da farklılık gösteren alanlar vardır. Bunlar Fovea (fovea santralis) ve Makula lutea' dır. Ek olarak retina dokusuna ait olmamasına rağmen retinal fonksiyon açısından son derece önemli olan ve nöral retinanın son bulduğu alandan itibaren göz küresini dolduran Vitröz hümör (vitreus sıvısı) da bu başlık altında ele alınmıştır.

- a) Optik disk: Retinanın arka tarafında yer alan bu alan “kör nokta” olarak da bilinir; çünkü burada hiç fotoreseptör ve dolayısıyla sinyal iletici nöron yoktur. Ganglion hücrelerinin aksonları bu alanda birleşerek optik siniri oluşturmaktadırlar. Optik disk, optik sinir aracılığıyla görme sinyalinin beyne doğru iletilmesini sağlayan bir çıkış yolu iken santral retinal arter ve ven için de retinaya giriş yolu olarak görev yapar [36].
- b) Fovea (fovea santralis): Optik eksenin arka kutbunda, küçük bir çöküntü şeklindedir. Çapı yaklaşık 1,5 mm' dir. Bu çöküntünün merkezi yaklaşık 200 μm çapındaki “foveola” dır. Bölgenin en tipik özelliği fotoreseptör tabakasında yalnızca Koni fotoreseptörlerini

içermesidir, Rod' lar bu alanda bulunmamaktadırlar. Ayrıca bu alandaki Koni fotoreseptörleri diğer Koni' lere göre daha ince ve uzundurlar. Bazı kaynaklarda yalnızca Koni fotoreseptörlerinin yer aldığı küçük tümseklik şeklinde görülen bu alan “umbo” olarak da isimlendirilmiştir. Fovea' da temel olarak fotoreseptör tabakası, Ganglion hücreleri ve Retina pigment epiteli görülür; diğer retina tabakaları bu alanda ya bulunmamaktadır ya da çok incelmıştır. Ek olarak Fovea' da ışığın engellenmeden Koni fotoreseptörlerine ulaşabilmesi için retinal damarlar da bulunmaz; fakat koryokapillerler ise kalınlaşmıştır [2, 33].

- c) Makula lutea: Fovea' nın çevresinde yer alan, yaklaşık 5,5 mm çaplı alandır. “lutea” isimlendirmesi bu alanda bulunan sarı renkli bir ksantofil pigmentten gelmektedir. Bazı kaynaklarca “sarı nokta” olarak da adlandırılır. Retinanın en duyarlı alanıdır. Fovea gibi ağırlıklı olarak Koni fotoreseptörlerini içeren bu bölgenin periferinde, foveadan farklı olarak Rod fotoreseptörleri de yer almaya başlamıştır. Foveaya benzer şekilde, bu alanda da gelen ışığın engellenmemesi amacıyla retinal damarlar bulunmaz. Fotoreseptör hücreler haricinde ağırlıklı olarak Ganglion hücrelerini ve bu hücrelerin uzantılarını içermektedir [33].
- d) Vitroz hümör (vitreus sıvısı): Bu sıvı gözün üçüncü kamarası olan lens ile retina arasındaki kamarayı dolduran; jel kıvamlı, saydam, homojen bir sıvıdır. Yaklaşık hacmi $3,9 \text{ mm}^3$ ten biraz azdır ve göz küresinin hemen hemen $\frac{3}{4}$ ' ünü doldurur. Yapısında büyük oranda su, kollajen fibriller, başta hyaluran olmak üzere glikozaminoglikanlar (GAG' lar) ve bu fibriller ile GAG' ların sentezini gerçekleştiren hücreler olan hiyalositler bulunmaktadır. Hiyalositler tipik şekilde iyi gelişmiş granüllü Endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtına sahiptirler ancak rutin histolojik boyama preparatlarında görülmeleri zordur. Özellikle periferde olmak üzere yer yer fibroblastlara ve histiyositlere de (doku makrofajları) rastlamak mümkündür. Ayrıca her zaman görülemese de vitroz hümörün merkezinden hiyaloid arterin kalıntısı geçmektedir. Bu kalıntı bir kanal şeklindedir ve optik disk ile lensin arka kapsülü arasında uzanmaktadır. Hiyaloid kanal ya da Cloquet kanalı olarak isimlendirilir [2, 33].

2.6. Retinal Hücreler

Retinadaki hücreleri; pigmentli retinada yer alan Retina Pigment Epiteli hücreleri ve nöral retinada yer alan; Fotoreseptör hücreler (Rod ve Koni' ler), İnternöronal hücreler (Bipolar nöronlar, Horizontal hücreler, Amakrin hücreleri, İnterpleksiform hücreler), Ganglion

hücreleri, Glial hücreler (Müller hücreleri, Astrositler, Oligodendrositler, Mikroglialar) ve görsel olmayan fotoreseptörler şeklinde sınıflandırılabiliriz.

2.6.1. Retina pigment epiteli (RPE) hücreleri

Nöroektodermden köken almaktadırlar [27]. Retinanın koroide en yakın tabakasında yer alırlar. Tek katlı kübik ya da alçak prizmatik hücrelerdir. Apikallerinde sitoplazmik uzantılar bulunur. Bu uzantıların içinde de kılıfla kaplı şekilde, melanin pigmenti granülleri vardır. RPE hücrelerindeki melanin pigmentasyonu, gebeliğin 5.haftasında başlayıp yaklaşık olarak 6.haftanın başında tamamlanmaktadır. Bu pigment granülleri RPE hücrelerinin koyu kahverengi görünmesine neden olurlar. Ayrıca bu alandaki pigmentasyon ırk ve genetik yapıdan bağımsızdır, genel olarak ışık mikroskopunda her bireyde benzer renklerde izlenir [41]. Hücrelerin bazalinde ise hücre membranı çok sayıda katlantıya sahiptir. Çekirdekleri bazale yakın yerleşimlidir birçok kıvrımlı çöküntü içerir. Çekirdeğe yakın yerleşimli bir Golgi aygıtı ve düz Endoplazmik retikulum söz konusudur. Ayrıca sekonder lizozomlar, fagozomlar ve rezidüel cisimcikler ile karakterize bir sitoplazmaya sahiptir. Kan-retina bariyerini oluşturan temel hücre grubudur. Özellikle optik sinire yakın olan alanlarda bu bariyerin çok daha gelişmiş bir yapı sergilediğini söylemek mümkündür [42]. RPE hücreleri arasındaki zonula okludens, zonula adherens ve oluklu bağlantılar da bu bariyerin yapıtaşlarındandır. RPE hücreleri koroid ile retina arasındaki iyon alışverişini düzenlemekle, fagositoz yeteneği sayesinde fotoreseptörlerin devamlılığını sağlamakla ve retinal ortamda immünmodülatörleri sentezlemekle yükümlüdürler [33, 36].

2.6.2. Fotoreseptör hücreler

RPE tabakasının altında yer alan ve RPE hücreleri ile ilişki içinde olan hücrelerdir. Görmenin olaylanmasından sorumlu olan nöronlardır. Nöral retinanın ışığa esas duyarlı yapıları olup fototransdüksiyonun gerçekleştiği hücrelerdir. Rod (çubuk) ve Koni olmak üzere iki tip fotoreseptör hücre vardır. Her iki hücre tipinde de membranöz disklerden oluşan bir dış segment, nöron gövdesinin ve sitoplazmasının yer aldığı bir iç segment, bir çekirdek ve alt tabakada yer alan nöronlara sinyallerin iletilmesine aracılık eden sitoplazmik uzantılar ortaktır. Rod fotoreseptörlerinin dış segmenti çubuk ya da çomak şekline sahiplerken Koni fotoreseptörlerinin dış segmenti konik yapıdadır.

Retinada yaklaşık 6-7 milyon Koni fotoreseptörü bulunuyorken 120-125 milyon Rod (çubuk) fotoreseptörü bulunmaktadır. Koniler ağırlıkla merkezi retinada (foveada) yer alırlar, Rodlar ise bu alanda oldukça az sayıdadırlar. Rodların da konilerin de boyları retinanın merkezine doğru gidildikçe artış gösterirken periferde ise kısalmaktadır.

Rod ve koni fotoreseptörlerinin morfolojik ve yerleşimsel farkları haricinde işlevsel farklılıkları da bulunmaktadır. Rodlar ışığa karşı daha duyarlı olup az ışıktaki görmeyi sağlayan, periferik (çevresel) görüşten sorumlu olan ancak aynı zamanda yalnızca grinin tonları şeklinde bir görüntü algılanmasına aracılık eden fotoreseptörlerdir. Rod fotoreseptörlerinin sahip oldukları görme pigmenti “Rodopsin” olarak isimlendirilmiştir. Koniler ise günışığı gibi parlak ışıktaki çalışabilen, merkezi görüşten sorumlu olan ve renkli görmeyi sağlayan fotoreseptörlerdir. Koniler ışığın farklı dalga boylarında absorpsiyon yapma özelliklerine göre L (long), M (medium) ve S (short) olmak üzere üçe ayrılırlar; sırasıyla mavi, yeşil ve kırmızı ışığın algılanmasından sorumludurlar. Bu ışıkların algılanmasını sağlayan Koni fotoreseptörlerine özgü görme pigmenti “İodopsin” olarak isimlendirilmiştir. Her üç tip koni fotoreseptörüne de sahip olan bireylere “trikromat” adı verilirken bu koni tiplerinden birine sahip olamayan bireyler “dikromat” olarak isimlendirilirler ve renk körüdürler [33, 36]. Rod fotoreseptörlerinin, ışığa Koni’lerden daha duyarlı oldukları için, Koni fotoreseptörlerine oranla daha fazla görme pigmenti içerdikleri bilinmektedir [29].

Fotoreseptörlerin membranöz diskleri bir “bağlantı sapı” aracılığıyla fotoreseptörün hücre gövdesi ile birleşir. Bu bağlantı sapı fotoreseptörün iç ve dış parçalarını birleştiren, daralmış bir bölge şeklinde görülür ve aslında bir bazal cisimcikten çıkan 9+2 mikrotübül sistemi şeklinde düzenlenmiş bir silyum içermektedir. Bu durum fotoreseptörün dış segmentinde yer alan membranöz disklerden oluşan yapının, ileri düzeyde gelişmiş bir silyum olarak da kabul edilmesine neden olmaktadır. Ek olarak bağlantı sapı bölgesinde, iç parçadan çıkan ve “kaliseal uzantı” adı verilen bir uzantı membranöz diskin etrafını sarmaktadır. İç parça ise tipik şekilde aktif olarak protein sentezleyen bir hücre gövdesi / sitoplazması karakterindedir. Belirgin bir Golgi aygıtı, granüllü Endoplazmik retikulum, serbest ribozomlar ve sitoplazmaya dağılmış mikrotübüller bu alanın temel yapılarındandır. Mitokondriler özellikle bağlantı sapına yakın yerleşim gösterirler.

Fototransdüksiyonun gerçekleştiği ve fotoreseptör hücre gövdesinin aktivitelerine destek olan metabolik mekanizmanın olaylandığı membranöz diskler, fotoreseptör hücre membranı tarafından çevrelenmişlerdir. Her fototransdüksiyon sonrası proksimalden (bağlantı sapına yakın olan alan) distale doğru (Retina Pigment Epiteli' ne doğru) kayarak yıkıma uğrarlar. Gün içinde yaklaşık doksan adet membranöz diskin yıkıma uğradığı ve yenisinin yapıldığı bilinmektedir. Yapımları ise Rod fotoreseptörlerinde plazma membranının içe katlanması yoluyla ömür boyu devam ederken Koni fotoreseptörlerinde düzenli olarak gerçekleşmez. Ayrıca Rod' ların membranöz diskleri, yapım aşamasından sonra, plazma membranından tamamen ayrı kompartımanlar olarak yer alırken Koni' lerdeki diskler yapım aşamasından sonra da plazma membranından ayrılmazlar. Yeni bir membranöz diskin üretilmesi, distale doğru ilerlemesi ve yıkıma uğramak üzere RPE hücrelerine iletilmesi yaklaşık on gün sürmektedir [33, 36].

2.6.3. İnternöronal hücreler

a) Bipolar nöronlar; bir akson ve bir dendrite sahip olan duyu nöronlarıdır. Fotoreseptör hücrelerle sinapslar yaparlar ve bu sinapslar aracılığıyla fotoreseptörlerde üretilen sinyaller retinanın iç tabakalarına ve nihayetinde Ganglion hücreleri üzerinden optik sinire iletilir. Akson ve dendrit uzantıları hem iç hem dış pleksiform tabakaya ulaşmaktadır. Bir adet Bipolar nöron 70 kadar Rod fotoreseptörü ile sinaps yapabiliyorken yalnızca bir adet Koni fotoreseptörü ile sinaps yapabilmektedir. Ancak bu durum retinanın Fovea alanı hariç olan bölgelerinde geçerlidir; çünkü foveada bipolar hücrelerin her biri yalnızca bir adet Ganglion hücresi ile bağlantı kuracak şekilde konumlanmışlardır. Böylece Fovea' daki çok yüksek çözünürlüklü görme keskinliği sağlanmış olur [33, 37]. Bipolar hücreleri, bağlandıkları fotoreseptör tipine göre, Rod bipolar hücreler ve Koni bipolar hücreler şeklinde sınıflamak mümkündür. Koni bipolar hücreler de kendi aralarında “cüce koni bipolar hücreleri” ve “diffüz (yaygın) koni bipolar hücreleri” şeklinde sınıflandırılabilir. Cüce koni bipolar hücresi optik sinirin tek bir Koni hücresi ile ilişki kuruyorken diffüz bipolar hücrelerin sinyal alma ve iletme ağı daha geniş ve yaygındır [30].

b) Horizontal hücreler; bipolar hücrelere benzer fonksiyon gösterirler. Bu hücre tipi de fotoreseptör hücreler ile Ganglion hücreleri arasında yer alırlar. Görme sinyalinin fotoreseptörlerden optik sinire iletilmesine aracılık eden nöronlardandır. Akson ya da dendritleri yoktur; bunun yerine hem fotoreseptörlerle hem de Ganglion hücreleriyle

bağlantı halinde olan nöritik çıkıntıları vardır [30]. Genelde yayvan hücre formuna sahip, geniş hücrelerdir ve dış pleksiform tabakasına yakın yerleşim gösterirler. Çekirdekleri ise iç nüklear tabakadadır. Bir horizontal hücre birkaç fotoreseptör ile bağlantı halindedir. Rod fotoreseptörlerinin sferül adı verilen uçlarıyla, Konilerin pedikülleriyle ve bipolar hücrelerle kurdukları bağlantılar sayesinde fotoreseptörler ve bipolar hücreler arasındaki elektriksel eşik değeri, fonksiyonel olarak düzenlenmektedir [33, 37].

- c) Amakrin hücreler; diğer internöronlar gibi fotoreseptörler ile Ganglion hücreler arasındaki bölgede yer alarak görme sinyalinin iletilmesine katkı sağlarlar. Bipolar hücrelerin aksonları ve Ganglion hücrelerinin dendritleri ile bağlantılar kurarlar. Horizontal hücreler gibi, Amakrin hücrelerin de aksonları ya da dendritleri yoktur, bunların yerini nöritik çıkıntılar almıştır [30]. Genellikle iç pleksiform tabakasına yakın yerleşim gösterirler ve fonksiyonları çok net bilinmemektedir. Karmaşık dallanmalara sahiptirler. Bir Amakrin hücre, dallanmış çıkıntıları sayesinde birden çok Ganglion hücresi ile bağlantı halindedir [33, 37]. Fizyolojik fonksiyon anlamında da bazı Amakrin hücrelerinin aksiyon potansiyelleri üretebildikleri tespit edilmiş olsa da bunun nedeni henüz net şekilde bilinmemektedir [29].
- d) İnterpleksiform hücreler; isimleriyle özdeş şekilde, dış ve iç olmak üzere, her iki pleksiform tabaka arasında sinaps bağlantıları bulunan hücrelerdir. Elektriksel sinyallere çevrilecek olan ışık içerikli iletiyi, Ganglion hücre tabakası yönünden fotoreseptör hücre tabakasına doğru taşımakla görevlidirler [33].

2.6.4. Ganglion hücreleri

Büyük, multipolar nöronlardır. Fotoreseptörlerden gelen sinyallerin önce optik sinire, buradan da beyin görmeye korteksine iletilmesini sağlarlar. Nöron gövdeleri retinanın en iç nüklear tabakasında yer alırlar. Yaklaşık 1,2 milyon civarında olan Ganglion hücreleri aktif protein üretme karakteristiği ile uyumlu şekilde, belirgin bir çekirdekçiğe ve açık renk boyanma özelliği gösteren bir çekirdeğe sahiptirler. Ayrıca sitoplazmada Nissl cisimcikleri de gözlenmektedir. Ganglion hücreleri birer multipolar nöron oldukları için her bir Ganglion hücresinden çıkan bir akson uzantısı ve çok sayıda dendrit vardır. Akson uzantıları retinadaki diğer nöronlara kıyasla daha uzundur ve retinanın daha iç alanında yer alan sinir lifleri tabakasına doğru uzanarak optik siniri oluştururlar. Dendritler ise tam tersine retinanın daha dış tabakasına doğru ilerleyerek iç pleksiform tabakaya doğru yol alıp burada dallanmalar yaparlar. Ganglion hücrelerinin bipolar nöronlarla bağlantısı ise retinanın periferinde ve

merkezi retinada farklılıklar göstermektedir. Periferde bir Ganglion hücresi ile yüz kadar bipolar nöronun sinaps yaptığı gözlenirken foveada bu durum bire bir ilişki şeklindedir. Normalde 20 farklı çeşit Ganglion hücresi tanımlanmış olsa da bunların büyük çoğunluğu *midget* (cüce) ve *parasol* hücrelerdir. Fovea ve makuladaki bipolar nöronlarla ilişki halinde olan Ganglion hücreler, daha küçük yapılı olup bunlar “cüce (*midget*) Ganglion hücreleri” olarak adlandırılırlar. [33, 36, 38]. Bu Ganglion hücreleri dendritleri aracılığıyla bir adet cüce bipolar koni hücresiyle bağlantıdadırlar, böylece sinyalleri yalnızca Koni hücrelerinden almış oldukları görülür [30]. Ayrıca kabaca bir tarifle görsel iletinin retinadan beyne kadar taşınmasına aracılık eden Ganglion hücreleri, bu görevin gerçekleştirilebilmesi için aksiyon potansiyeli üretmek zorunda olan hücrelerdir [29].

2.6.5. Glial hücreler

- a) Müller hücreleri; nöral retinada yer alan dev hücrelerdir. Apikaldeki uzantıları dış sınırlayıcı membranı oluştururken bazaldeki uzantıları iç sınırlayıcı membranı oluşturmaktadır. Bu iki membran arasında uzanacak kadar büyük hacimleri vardır. Böylece nöral retinanın temel iskeletini oluştururlar, hücreler arası boşlukların büyük bir kısmını doldururlar ve uzantıları sayesinde diğer hücreleri çevrelerler. Çekirdekleri iç nükleer tabakada yer almaktadır. Apikallerinde yer alan mikrovillusları, fotoreseptör hücrelerin arasından uzanmaktadır [33]. Aslında retinanın temel nöroglial hücreleridirler. Retinal hücrelerin korunması ve işlevlerinin devamlılığı açısından; glikoz taşınımı, aminoasit döngüsünün gerçekleştirilmesi, retinal dokuda potasyum iyonlarının dengelenmesi ve amonyak türevlerinin ortadan kaldırılması gibi pek çok önemli biyolojik fonksiyonun gerçekleştirilmesinden sorumludurlar [43]. Retinitis pigmentosa ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon (YBMD) gibi retinal dejenerasyon hastalıkları sırasında, Müller hücre sayılarının arttığı tespit edilmiştir [44].
- b) Diğer nöroglial hücreler; *Astrositler*, *Oligodendrositler* ve *Mikroglialar*’dır. Astrositler yıldız şekilli, büyük nöroglial hücreler olup daha çok nöral retinanın yüzeye yakın tabakalarında yer alırlar. Özellikle kapillerlerin, sinir liflerinin ve Ganglion hücrelerinin çevrelerinde bulunmaktadır [31, 45]. Oligodendrositler yuvarlak, oval şekilli nöroglial hücrelerdir ve periferik sinir sisteminde sinir liflerinin etrafında miyelin kılıf oluşturmaktan sorumludurlar. Normal şartlarda retinal sinir liflerinin miyelinsiz oldukları bilinmektedir; ancak bazı durumlarda retinada miyelinli sinir liflerine de rastlanması Oligodendrositlerin nöral retinadaki varlıklarına da bir işaret olarak kabul edilmektedir

[37]. Mikroglialar ise en küçük nöroglial hücrelerdir, virgül benzeri şekilli çekirdek görünüşleri ile karakterizedirler. Mononükleer fagositik sistemden (MNFS) köken alan hücreler olmaları dolayısıyla fagositoz yapma yetenekleri vardır. Retinaya kan dolaşımı yoluyla gelirler. Retinadaki sayıları çok fazla olmamasına karşın hareketli hücreler oldukları için retinanın her tabakasında bulunabilirler [31, 45].

2.6.6. Görsel olmayan fotoreseptörler

Ganglioner kompartımanda yer alan bazı Ganglion hücrelerinin esasen görme olayında bir fonksiyonları olmasa da 24 saat boyunca gün ışığının miktarını ve kalitesindeki değişimleri algılayabilme yetenekleri vardır. Algıladıkları ve işledikleri sinyaller, retinohipotalamik aksonlar üzerinden geçerek suprakiazmatik çekirdeklere ve oradan da nihayetinde hipofiz bezine ulaşır. Hipofiz bezi ise sirkadiyen ritmi ayarlayarak fizyolojik olarak gece-gündüz ritminin korunmasını sağlamaktadır. Bu hücrelere “görsel olmayan fotoreseptörler” adı verilmiştir; çünkü Rod ve Koni fotoreseptörlerinin benzeri olacak şekilde *11-cis-retinal* içerirler. Fakat görsel olmayan fotoreseptörlerdeki bu *11-cis-retinal*, melanopsin proteinine bağlıdır [36].

2.7. Retina Fizyolojisi

Nöral retinanın fotoreseptör tabakasında yer alan Rod ve Koni fotoreseptörleri, retinadaki fizyolojik değişimler sonucunda gerçekleşen “görme” nin olaylanması”nın temel aktörleridirler. Daha önce de bahsedildiği üzere fotoreseptörlerde membranöz disklerden oluşan bir dış segment bulunmaktadır ve bu diskler ışığı en yüksek oranda alabilecek şekilde, retinal yüzeye paralel konumlanmışlardır. Bu disklerin lipid yapılı dış yüzeyinde, Rod fotoreseptörlerinde globüler halde Rodopsin molekülü (vizüel mor) bulunuyorken Koni fotoreseptörlerinde İodopsin molekülü vardır [33]. Rodopsin ya da İodopsin de kendi içerisinde “Opsin” adı verilen bir transmembran proteini bulundurur. Rod’lara özgü olan opsin “Skotopsin” olarak isimlendirilirken Koni’lere özgü olan “fotopsin” dir [33]. Skotopsine de bağlı olan küçük bir kromofor molekülü vardır. Bu ışığa duyarlı küçük molekül de A vitamini türevi olan retinal’ dir [36]. Görme olayının gerçekleşebilmesi için tüm bu yapıların var olması ve sağlıklı şekilde görevlerini sürdürüyor olmaları gerekmektedir. Bu anlamda A vitamini yetersizliğinin uzun sürmesi retinal fonksiyona zarar vererek “gece körlüğü” adı verilen ve loş ışıkta görmeyi engelleyen bir patolojiye neden

olmaktadır [33]. Aynı zamanda görme olayının devamlılığı açısından RPE hücreleri de son derece önem teşkil ederler; çünkü kullanılan ve trans-retinol haline gelmiş olan fotopigmentin yeniden retinale dönüştürülerek fotoreseptör disklerine iletilmesi RPE hücreleri aracılığıyla olmaktadır. Aşağıda “Fototransdüksiyon” adı verilen, “görme” nin olaylanması” na ilişkin çizelgede, retinanın Rod fotoreseptöründeki fizyolojik süreçleri özetlenmiştir [36]. Bu süreç esasen fotoreseptörlere gelen ışığın burada elektriksel sinyallere dönüştürülerek karmaşık bir nöronal ağ tarafından beyne iletilmesidir. Fotoreseptörlerde yer alan görme moleküllerinin farklı olması haricinde, bu süreç her iki fotoreseptörde de benzer şekilde ilerlemektedir. Ek olarak Koni fotoreseptörlerinde fototransdüksiyonun Rod’ lara kıyasla daha hızlı gerçekleştiği bilinmektedir [29]. Yine de Rod fotoreseptörlerinde bu sürecin nasıl ilerlediği, daha çok çalışılmış olan bir konudur.

Çizelge 2.1. Görmenin gerçekleşmesi olayına ilişkin akış [36]

1. Işık retinaya ulaşır ve fotoreseptörlerin membranöz disklerine çarpar
2. Membranöz disklerdeki Rodopsin’ e bağlı olan Retinal, ışık fotonunu emer
3. Retinal, bir pikosaniye içinde <i>11-cis-retinal</i> ’ i <i>trans-retinal</i> ’ e oradan da <i>retinol</i> ’ e çevirir
4. Bu durum sürecinde Opsin’ de şekil değişikliği oluşur
5. Bu şekil değişikliği membrana bağlı bir G proteini olan Transducin’ i aktifleştirir
6. Transducin aktifleştğinde α alt birimi serbest kalır ve yana doğru hareket eder
7. Bu birimin yana doğru hareketiyle bir diğer membran proteini olan Fosfodiesteraz (PDE) aktifleşir
8. Fosfodiesteraz, cGMP’ yi hidrolize eder
9. cGMP hidrolizasyonu, cGMP-kapılı Na^+ kanallarını kapatır
10. Bu durum hiperpolarizasyon oluşturur
11. Böylece nörotransmitterlerin (glutamat) bipolar nöronlara doğru olan sinaptik salınımı azalır
12. Bipolar nöronlar depolarize olurlar
13. Bipolar nöronlar Ganglion hücreleri üzerinden optik sinire aksiyon potansiyelleri gönderirler (Görme iletileri elektriksel sinyaller olarak beyin görme korteksine doğru akmaya başlar ve beyinde görüntü oluşumu sağlanır!)
14. Eş zamanlı olarak disklerde retinal’ in opsin’ den ayrılması “solma” sürecini başlatır
15. Serbest haldeki trans-retinal fotoreseptörden RPE hücresine doğru taşınır
16. Burada 11-cis-retinale geri dönüştürülür ve yeniden kullanılmak üzere membranöz diske tekrar taşınır

2.8. PAR Metabolizması ve PARP Enzim Ailesi

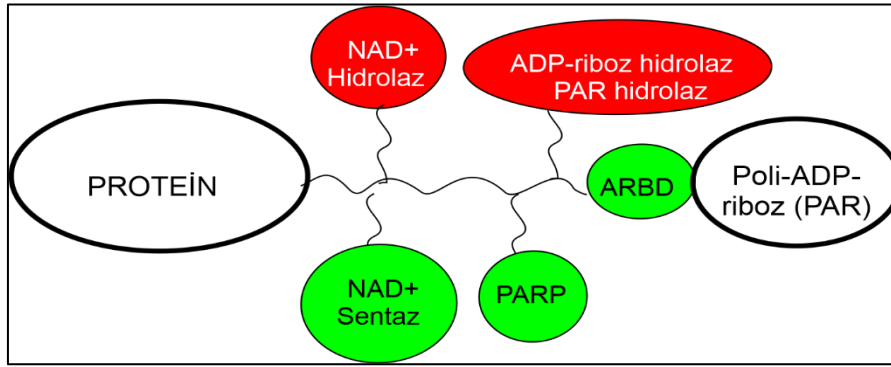
ADP-ribozilasyonu (Adenozin difosfat-ribozilasyonu) bir transkripsiyon sonrası modifikasyon olup en özet şekliyle bir proteine bir ya da birden daha fazla ADP-riboz segmentinin eklenmesini ifade eder. Bu durum, diğer post-translasyonel modifikasyonlara benzer şekilde, translasyona uğramış proteinlerin enzimatik aktivitelerinin modifikasyonlarını, ubikutinlenmelerini ve daha sonra hedeflenen proteinlerin bozunmasına kadar giden yolu içermektedir. Bu olay, patojenik olmayan bakterilerde, bitkilerde ve hayvanlarda görüldüğü gibi; insan ve hayvan patojenik türlerinde de görülür. ADP-ribozilasyonu hücrel sinyalizasyon, DNA tamiri ve hücre ölümü gibi pek çok hücrel yolda yer almaktadır [10, 46, 47].

Proteinlere birden fazla ADP-riboz eklenmesi poli-ADP-ribozilasyon ya da daha yaygın isimiyle PARilasyon olarak adlandırılırken tek bir ADP-riboz eklenmesi ise mono-ADP-ribozilasyon (MARilasyon) olarak isimlendirilir. PARilasyon işlemi neticesinde üretilen PAR (poli-ADP-riboz) üniteleri; proteinleri yakalayıp tutan, bir araya getiren, onlar için yapısal bir iskele oluşturan anyonik bir matriks olarak nitelendirilmektedirler [48]. PAR zincirleri birbirlerine glikozidik bağlarla bağlanan 200' e kadar PAR ünitesinin bir araya gelmesiyle oluşurlar [49]. Öte yandan bu işlemi gerçekleştiren enzimler ise ADP-ribozil-transferazlar (ART' ler) ya da çok daha yaygın kullanılan isimiyle poli-ADP-ribozil-polimeraz (PARP)' lardır [50]. Nadiren asetat veya fosfat gibi bazı küçük kimyasal gruplarda da sırasıyla sirtuinler ve KptA/Tpt1 gibi RNA fosfotransferaz enzimleri ADP-ribozilasyon işlemini gerçekleştirebilirler [51].

Temelde ART' ler de iki sınıftan oluşmaktadır; ARTD' ler (ADP-ribosil transferaz diphteria) difteri toksini ile benzerlik gösterip orijinal PARP enzim ailesini oluşturlarken ARTC' ler (ADP-ribosil transferaz cholera) ise kolera toksini ile benzerlik gösterirler [52]. PARP' ların ADP-ribozilasyonunu gerçekleştirirken ADP-ribozilleri proteinlerin serin, lizin, glutamat, aspartat, arjinin veya sistein kalıntılarına ya da DNA/RNA uçlarına ekleyerek gerçekleştirdikleri bilinmektedir [53]. Protein kalıntılarına ya da uçlarına eklenen bu ADP-riboziller, PARP' ların NAD⁺ yı (Nikotinamid adenin dinükleotid) ADP-riboz ve Nikotinamid' e ayırması ve ADP-ribozları seçerek proteinlere bağlaması sayesinde elde edilirler [50].

ADP-ribozilasyon sürecinde PARP' ların ADP-ribozilleri proteinlere doğru şekilde ekleyebilmeleri için proteinlerin doğru noktalarını tespit etmelerini sağlayan yardımcı proteinler de vardır. Bunlara ADP-riboz bağlanma alanları (ADP-riboz binding domains/ARBDs) adı

verilmektedir. ARDB' ler hedef proteinin daha önceden PARilasyona ya da MARilasyona uğramış olan bölgesini tespit ederek yeni PAR polimerlerinin bu doğru alana eklenmesini sağlamaktadırlar. PARilasyona ya da MARilasyona uğramış proteinler, ADP-riboz bağlama motiflerine sahip proteinler tarafından özel olarak tanınırlar. Bu bağlanma motifleri PARilasyon için; makrodomainler, PAR-binding motifi, PAR-binding Zinc finger, WWE domain ve RNA ya da DNA binding motifleridir [51]. Fakat MARilasyonda yalnızca makrodomainler yer almaktadır [54]. Benzer şekilde, yine bu süreçte ADP-ribozillerin oluşmasına katkı sunan NAD⁺ sentaz' lar da ADP-ribozilasyonunun yardımcı proteinlerindendir [51]. Öte yandan ADP-ribozilasyonunu sona erdirmek üzere görev alan poli-ADP-riboz glikohidrolazlar (PARG), ADP-ribozil hidrolazlar (ARH1, ARH3), terminal ADP-riboz protein glikohidrolaz-1 (TARG1) ile bazı fosfodiesterazlar (PDE), NAD⁺ hidrolazlar, MacroD1 - MacroD2 enzimleri de PAR zincirlerini hedef proteinden ayırarak ADP-ribozilasyon dengesinin korunmasını sağlarlar (Şekil 2.3) [55].



Şekil 2.3. PARilasyon; hedef proteine PAR' ın PARP enzimi aracılığıyla eklenmesidir. Bu süreçte NAD⁺ sentaz, PAR moleküllerinin oluşmasını sağlarken ARBD' ler ise (ADP-ribozil bağlanma bölgeleri) PAR' ın doğru şekilde bağlanmasına yardımcı olurlar; PARilasyonun sonlanmasında NAD⁺hidrolaz ve ADP-riboz hidrolaz ile PAR hidrolaz yer almaktadır [55]

ART' lerin ARTD sınıfı olan PARP' lar, temelde bir enzim ailesi grubudurlar. Bu enzim ailesinin farklı yapısal etki alanları, aktiviteleri, hücre altı konumlanmaları ve işlevleri olan 17 üyeden oluştuğu bilinmektedir [47, 53, 56, 57]. 2004 yılına ait orijinal çalışmada PARP enzimlerinin 18 üyeden oluştuğu ifade edilmiş olsa da daha sonradan PARP üyelerinden biri olarak kabul edilen Tankyrase 3' ün Tankyrase 2' nin daha kısa bir ek varyantı olduğu ortaya çıkmıştır [56]. PARP' ların hedef proteine doğru şekilde bağlanmalarını sağlayan alanları/motifleri üzerinden yapılan sınıflandırmaya göre; PARP 1, 2, ve 3 DNA-bağımlı PARP' lar iken PARP-5a ve 5b ise Tankyrase' lardır [56]. PARP3 dışındaki bu PARP üyeleri PARilasyon gerçekleştiriyorlarken PARP3, MARilasyonda görev alır. PARP 1, 2 ve 3' ün temel olarak DNA hasar bölgelerinin tamirinden sorumlu oldukları bilinirken, Tankyrase 1 ve 2 temel olarak telomerlerin

bütünlüklerinin korunmasında rol oynamaktadırlar [58, 59]. Sınıflandırmaya devam edildiğinde PARP 7, 12, 13.1 ve 13.2' nin Cis-Cis-Cis-His Zinc-finger (CCCH) (Cis: Sistein, His: Histidin, Zinc finger: çinko parmak) içeren ya da WWE PAR-bağlanma bölgesi içeren PARP' lar olduğu görülür. PAR-bağlanma makro alanları içerenler ise "makro PARP' lar" olarak isimlendirilip bunlar PARP 9, 14 ve 15' tir [53, 56]. PARilasyon ile PAR üreten PARP enzim üyeleri daha çok çalışılmış olmasına rağmen MARilasyonda görev alanlar hakkında da son yıllarda yapılan çalışmalar vardır. Buna göre PARP 3, 7 ve 14 transkripsiyonun düzenlenmesinde [60-62]; PARP 10 ve 14 sinyal transdüksiyon yollarında [63-65]; PARP16 katlanmamış protein yanıtında [66]; PARP14 hücre iskeletini oluşturan aktin filamanlarının yapısında [57] ve JNK1' i (c-Jun N-terminal kinaz) düzenleyerek hücre metabolizmasında [67]; PARP 8 ve 16 ise organellerin membran yapılarında [57] rol oynamaktadırlar. PARP 9 ve 13' ün ise zayıf da olsa, NAD⁺ bağlanması için küçük alanlar içermelerine rağmen, katalitik aktivite göstermedikleri, MARilasyon ya da PARilasyonda yer almadıkları, inaktif oldukları gösterilmiştir [53, 68]. Bu verilerden yola çıkılarak hazırlanmış olan aşağıdaki Çizelge 2.2' de, PARP enzim ailesi üyelerini incelemek mümkündür [51, 53, 69].

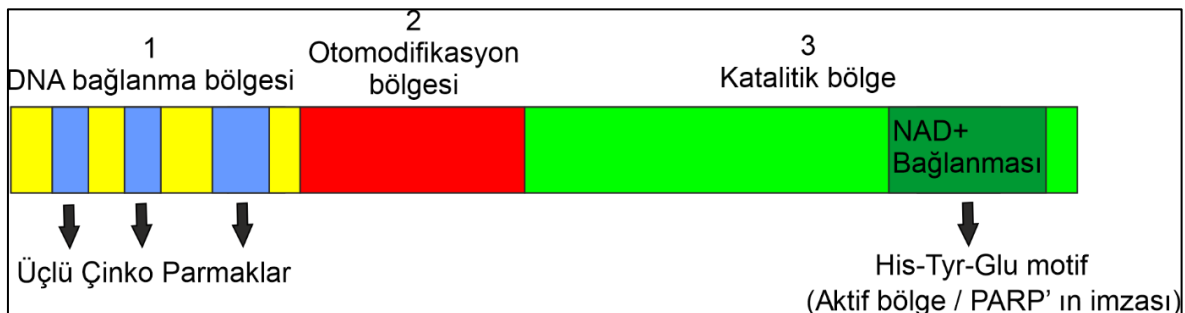
Çizelge 2.2. PARP enzim üyeleri sınıflandırması [51, 53, 69]

<u>Sınıflandırma:</u>	<u>PARP/ ARTD/ Diğer Adlandırmalar:</u>	<u>Ribozilasyon (Katalitik Aktivite):</u>
DNA-bağımlı	PARP1 (ARTD1) PARP2 (ARTD2) PARP3 (ARTD3)	PARilasyon PARilasyon MARilasyon
Tankyrase' lar	PARP5a (TNKR1 / ARTD5) PARP5b (TNKR2 / ARTD6)	PARilasyon PARilasyon
CCCH (Cis-Cis-Cis-His zinc finger) ya da WWE PAR-bağlanma bölgesi içerenler	PARP7 (ARTD14 / TIPARP) PARP12 (ARTD12 / ZC3HDC1) PARP13.1 (ARTD13 / ZAP1) PARP13.2(ARTD13/ZC3HAV1)	MARilasyon MARilasyon İnaktif İnaktif
Makro PARP' lar (Makro PAR-bağlanma bölgesi içerenler)	PARP9 (ARTD9 / BAL1) PARP14 (ARTD8 / BAL2) PARP15 (ARTD7 / BAL3)	İnaktif MARilasyon MARilasyon
Diğer PARP' lar	PARP4 (ARTD 4 / vaultPARP) PARP6 (ARTD17) PARP8 (ARTD16) PARP10 (ARTD10) PARP11 (ARTD11) PARP16 (ARTD15)	PARilasyon MARilasyon MARilasyon MARilasyon MARilasyon MARilasyon

Yaklaşık 60 sene önce Chambon ve arkadaşları tarafından DNA bağımlı olarak, nikotinamid mononükleotit (NMN) tarafından aktive edilen bir enzimin araştırılması sırasında, Poli-ADP-riboz' un keşfi gerçekleştirilmiştir. Böylece bu keşif sayesinde; Poli-ADP-riboz-polimeraz (PARP) enzim ailesinin ve onların katalizlediği ADP-ribozilasyonunun aydınlatılması sağlanmıştır [13].

PARP enzim üyeleri sınıflandırılmalarına göre farklı bölümlerden oluşuyor olsalar da hepsi bir “katalitik bölüm” e sahiptir. Bu katalitik alan PARP’ ların aktif bölgesi olup “imza motifi” olarak da adlandırılmaktadır. ADP-ribozilasyonunda substrat olarak kullanılan NAD⁺ bu bölgeye bağlanmakta ve burada katalizlenmektedir. Ayrıca PAR sentezi de burada gerçekleştirilir. PARP’ ların birçoğunun katalitik bölgesinde Histidin-Tirozin-Glutamat (H-Y-E) motifi yer alır. Histidin ve Tirozin NAD⁺’ nin doğru şekilde PARP’ ın katalitik alanına bağlanmasını sağlıyorlarken Glutamat da katalitik aktivitenin gerçekleştirilmesi için gerekmektedir. PARP 3 ve 4 istisnai olmak üzere, MARilasyon yapan PARP’ larda ise glutamatın yerini izolösin, lösün ya da tirozin almıştır. Bu durum da bu PARP’ larda, polimerizasyon aktivitesini durdurarak onların MARilasyon gerçekleştirmelerine neden olur. PARP 9 ve 13’ te ise Histidin bulunmadığı için katalitik aktivite hiç gerçekleşmemekte, o nedenle bu PARP’ lar “inaktif” olarak sınıflandırılmaktadırlar [53].

Tüm bu PARP enzim ailesi içerisinde PARP1, birinci ve en çok çalışılan PARP üyesidir. DNA hasarı ile birlikte gelişen ADP-ribozilasyonunun %85’ inden sorumlu olduğu ortaya konmuştur [70]. Bu enzimi kodlayan gen ilk kez 1987’de klonlanmıştır [71]. PARP1, maya dışında çoğu ökaryotta bulunan, bol miktarda nükleer kromatinle ilişkili bir enzimdir. DNA hasarı ve tamirinde çalışarak bu mekanizmalar üzerinde etkili olduğu anlaşılmıştır [56, 72, 73]. PARP1 temel olarak üç ana bölgeden oluşmaktadır: üçlü Zinc fingers’ tan oluşan DNA-bağlanma bölgesi, otomodifikasyon bölgesi ve katalitik bölge [53]. DNA-bağlanma bölgesindeki üçlü çinko parmaklardan birinci ve ikincisi (Zn1 ve Zn2) DNA’ ya tutunmayı gerçekleştiriyorlarken üçüncüsü ise (Zn3) katalitik aktivitenin başlamasını sağlamak üzere kromatinin sıkıştırılmasını (kompaktzasyonunu) meydana getirmektedir [74]. Zn1, Zn3 ve WGR alanları, DNA hasarı bölgelerinde PARP-1’in aktivasyonu için gereklidirler [75]. Zn1 ve Zn2’ nin yardımıyla DNA bağlanmasının gerçekleşmesi ile PARP1’ den bir otoinhibitör sarmal bölgenin (*helical domain* / *HD*) açılması indüklenmiş olur. Bu bölgenin açılması ile birlikte de NAD⁺ bağlanması ve PARP1’ in katalitik aktivasyonu başlamaktadır (Şekil 2.4) [76].



Şekil 2.4. PARP1’ in şematik yapısı. (His-Tyr-Glu motif: Histidin-Tirozin-Glutamat motifi)

Farklı yapısal etki alanları, aktiviteleri ve işlevleri olan, 17 üyeden oluşan PARP enzim ailesinin normal hücrel fizyolojik yollarda çok önemli görevlere sahip olmakla birlikte yakın zamanda yapılan çalışmalarla çeşitli patolojilerde ve hücre ölümü mekanizmalarında da yer aldığı belirlenmiştir. Bu bölümün alt başlıklarında PARP' ların normal hücrel yollardaki görevleri ele alınırken bölüm 2.9.2' de ise PARP' ların neden olduğu patolojik hücre ölümü mekanizması incelenmiştir.

2.8.1. PARP' ların kromatin modifikasyonu ve transkripsiyonun düzenlenmesindeki rolü

Kromatin modifikasyonu aslında DNA çevresindeki Histon proteinlerinin modifikasyonunu ifade eden bir anlatımdır. Histonlar gen aktivitesinin dinamik düzenleyicileri olup asetillenmeleri genleri aktive ediyorken, deasetilasyonları ise inaktivasyon sağlar. Bu tür bir modifikasyon ile birlikte DNA' nın metilasyonu, temelde “Epigenetik” adı verilen biyolojik, kalıtılabilir değişimleri doğurmaktadır. Epigenetik mekanizmalarda DNA dizisi değişmemekte fakat çevresel uyarılar ve epigenetik modifikasyonlar rol almaktadır. Bu mekanizmalar transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. DNA metilasyonu ve kromatin modifikasyonları (Histon modifikasyonları) transkripsiyonel mekanizmada yer almaktadırlar. Histon modifikasyonları da kendi aralarında “asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, Ubikütinasyon ve Poli-ADP-ribozilasyon” şeklinde sınıflandırılırlar. Kısaca; asetilasyonda histonların lizin uçlarına histon asetil transferazlar (HAT) tarafından asetil grupları eklenir, kromatin transkripsiyona açık hale getirilmiş olur. Deasetilasyonda histonlar histon deasetilazlar (HDAC' lar) tarafından deasetillenir ve böylece transkripsiyonun baskılanması sağlanmış olur [77]. Metilasyonda histona metiltransferaz enzimleri aracılığıyla 1, 2 ya da 3 adet metil grubu eklenmekte ve böylece o genin ifade edilip edilmeyeceği belirlenmektedir [78]. Fosforilasyonda histon deasetilazlara Protein Kinazlar (PK) ve Protein Fosfatazlar (PP) tarafından fosfat grupları eklenmektedir [79]. Ubikütinasyonda lizin parçacığı tarafından histona bağlanan, küçük bir protein olan Ubikutin söz konusudur. Bu durum proteinlerin degradasyonu ile sonuçlanmaktadır [80].

PARP' lar, özellikle de üzerinde en çok çalışılmış olan ve ADP-ribozilasyonunun %85' inden sorumlu olduğu ortaya konan PARP1, DNA hasarı durumunda DNA' nın uç kısımlarına eklenerek buradaki histonları ve diğer proteinleri modifiye etmektedir [70, 81, 82]. Aynı zamanda “NAD⁺ bağımlı deasetilazlar” olarak bilinen Sirtuin sınıfı protein ailesiyle de karşılıklı olarak çalışma prensibi içinde olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur [83-85]. PARP' ların gerçekleştirdiği modifikasyonun üç şekilde yapılabileceği ortaya konmuştur; ilkinde PARP1, doğrudan kromatine

bağlanır; ikincisinde PARP1, çeşitli yardımcı ve aksesuar faktörler aracılığıyla kromatine bağlanır; üçüncüsünde ise PAR zincirleri ve bu zincirlerin uzunlukları-karmaşıklıkları sayesinde kromatine bağlanan PARP1 söz konusudur [86]. PARP1' in nükleozomun temel yapısal birimi olan Histonları modifiye etmesiyle birlikte kromatin yapısında değişiklikleri indüklediği, PAR ünitelerinin bağlanmış olduğu alanlarda kromatin yapısının da gevşediği gösterilerek, ortaya konmuştur. Bu anlamda *bağlayıcı Histon H1*, PAR' ın ana alıcısı olarak tanımlanmıştır [87]. PARP1' in kromatine bağlanması ile birlikte aktive olan modifikasyonların özellikle Serin kalıntılarında gerçekleştiği ve HPF1 (*Histone PARylation factor 1*) benzeri yardımcı faktörleri içerdiği belirtilmiştir [88, 89]. Benzer şekilde PARP1' in homolog rekombinasyonun E2F1 (*E2F Transcription factor 1*) ile ilişkili mekanizmalarını güçlendirme yoluyla transkripsiyonel düzenleme üzerinde çok önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur [90]. E2F1, hücre döngüsünü düzenleyen ve hücre proliferasyonunu aktive eden transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. PARP' ların kromatin modifikasyonu üzerinde etkili olduklarını ortaya koyan bir başka çalışmada ise hormon tedavisi nedeniyle aşırı PARP ifadenmesi gösteren bireylerde PARP1, H1' in yer değiştirmesine neden olarak kromatini progesterona duyarlı bölgelerin yeniden şekillenmesi için açık ve duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir [91].

Bir transkripsiyon faktörü olan ve DNA-hasar yanıtlarında da görev alarak DNA' nın tamir edilmesine katkı sunan, hücrenin hayatta kalıp kalmayacağına dair en önemli öğelerden biri olan p53 [92] üzerinde de PARP' ın etkisi vardır. Normal şartlarda çekirdekten atılarak MDM2 (*E3 ubiquitin-protein ligaz*) tarafından parçalanarak p53, DNA hasarı durumunda PARP1' in bloke edici aktivitesi ile çekirdekte tutulur ve p53' e bağlı genlerin aktivasyonu sağlanmış olur [93]. Ayrıca PARP1' in, bir transkripsiyon faktörü olan SIRT1 aktivitesini de etkilemekte ve SIRT2 aktivasyonunu da direkt düzenlemekte olduğu bilinmektedir. Sirtuinler üzerindeki bu etkisini, Sirtuinler için de bir ko-faktör olan NAD⁺ yı substrat olarak kullanıp tüketiyor olması ile göstermektedir [94]. Son yapılan çalışmalara göre ise PARP1, transkripsiyonu düzenlemede NELF proteinini (Negatif uzama faktörü) ADP-ribozilleyerek uzamanın indüklenmesini teşvik etmekte ve böylece transkripsiyona olumlu yönde etki etmektedir [95].

Özetle PARP tarafından gerçekleştirilen bu işlem sırasında, DNA' nın nükleozomuna bağlanan PARP, buradaki histonları ve diğer proteinleri modifiye ederek PAR (poli-ADP-riboz) ünitelerinin üretilmesini indüklemiş olur. PAR üniteleri de birbirlerine eklenerek 200 birime dek uzanabilen PAR zincirlerini oluştururlar ve transkripsiyonu indükleyici etki gösterirler. PAR zincirleri aynı zamanda, DNA hasarı durumunda, DNA' nın kopan tek iplikçliğini tamir ederek

genomik kararlılığın ve hücre diferansiyasyonunun korunmasını ve kanserin önlenmesini de sağlamış olurlar [96]. Ek olarak RNA ve DNA'ya benzer bir sarmal ikincil yapı oluşturdıklarından üçüncü nükleik asit olarak kabul edilebilmektedirler [97].

2.8.2. PARP' ların DNA-zincir kırıklarının onarılmasındaki rolü

PARP1 ve PARP2 hem tek zincir DNA kırıklarında (*Single strand break-SSB*) hem de çift zincir DNA kırıklarında (*Double strand break-DSB*) DNA hasarını onaran temel enzimlerdendirler [98]. DNA üzerindeki genotoksik hasarı takiben hemen DNA' nın kırık uçlarına bağlanarak hasarı algılar ve PARilasyonu indüklerler. Eş zamanlı şekilde, hasar tamir yanıtında görev alacak genlerin de aktive olmalarını sağlayarak kromatin yapısını yeniden düzenler ve DNA' nın onarılmasını sağlarlar [99]. DNA-hasar yanıtında PARP 1 ve 2' nin önemi in vivo olarak kanıtlanmıştır; iyonize radyasyona ve diğer genotoksik faktörlere maruz kalan Parp1 -/- ve Parp2 -/- farelerde artmış genomik kararsızlık ve genotoksik faktörlere aşırı hassasiyet tespit edilmiştir [100]. Ayrıca PARP 1 ve 2 enzimlerinin sinerjetik etki ile çalıştıkları da düşünülmektedir; çünkü yalnızca PARP1 ya da yalnızca PARP2' den yoksun olan fareler hayatta kalabiliyorlarken her iki enzimin de yokluğunda, embriyonik dönemde ölümler söz konusu olmuştur [101].

DNA zincir kırılmalarında PARP aktivasyonunun moleküler temeli ile ilgili yapılan çalışmalar göstermiştir ki; bu süreçte, PARP1' in çinko parmak (Zinc-finger) DNA bağlanma alanları, DNA' nın N-terminal uçlarına bağlanır [102]. Bu bağlanma sırasında PARP' ın temel olarak nükleozomları tercih ettiği de gösterilmiştir [103]. PARP1 aktive edildiğinde ve PAR zincirlerini sentezlediğinde, DNA onarım komplekslerinin alımı için yapı iskelesi oluşmuş olur ve PAR bağlama bölgelerini içeren proteinler, bu kompleksleri PAR üretim bölgelerine alır [104]. Bu şekilde PAR' a dahil edilen ilk onarım yapılarından birinin DNA kırıklarının onarımı için ligazları organize eden XRCC1 olduğu bilinmektedir [105]. ALC1 ve APLF gibi kromatin düzenleyiciler ve Histon şaperonları da PAR' a bağlanan ve böylece DNA onarımına yardımcı olan moleküllerdendir [106, 107]. Yine PAR ile etkileşime giren ve daha sonra PARP1 tarafından PARilasyona uğrayarak modifiye edilen bir transkripsiyon faktörü olan p53 proteininin de DNA hasar onarımında önemli bir yeri olduğu bilinmektedir [108, 109].

DNA zincir kırılmalarının tamir mekanizmasında görev aldığı bilinen bir başka PARP üyesi de PARP3' tür. PARP3' ün, hücre çekirdeğinde yer alan heterokromatin alanlarında, DNA-hasar onarım faktörleriyle birlikte yer aldığı gösterilmiştir [110]. Aynı zamanda PARP5a (Tankyrase

1) ve bir mitotik faktör olan NuMA ile de etkileşime girdiği bilinmektedir. PARP3' ün NuMA' nın ADP-ribozillenmesini hem direkt hem dolaylı olarak Tankyrase-1 aracılığıyla uyarması sayesinde mitotik ilerlemeler, telomer fonksiyonları ve genomik kararlılık sürdürülebilmektedir [111]. Son yıllarda PARP3' ün PARP1 ile sinerjetik çalışarak DNA' nın çift zincir kırıklarının onarımında göre aldığı ortaya konmuştur [112].

PARilasyon gerçekleştiren ve DNA-bağımlı olan diğer PARP enzimi ailesi üyeleri PARP5a ve PARP5b' dir. Bu üyeler aynı zamanda Tankyrase 1 ve 2 olarak da adlandırılmaktadırlar. Özellikle Wnt sinyal yollarını ve telomer fonksiyonlarını düzenlemekte görevleri olsa da [113] homolog rekombinasyonu düzenleyerek DNA çift zincir kırıklarının tamirinde de görev aldıkları bilinmektedir [114].

Özetle PARP enzimleri hafif (mild) genotoksik stres faktörlerine karşı hücreyi koruyarak DNA tamirinde görev alırlar [115]. DNA sarmalının tek iplikçiğinin kopması ile aktive olurlar. Kopan tek iplikçiğe bağlanarak ve dallanmış negatif yüklü PAR' ları polimerize ederek otomatik modifikasyonu gerçekleştirirler. PARP' lar tarafından negatif elektrostatik yük oluşumunun gerçekleştirilmesinin, DNA tamir enzimlerini bir araya getirdiği hipotezi vardır. Özellikle de DNA ile ilişkili histonların poli(ADP)-ribozilasyona katılması, kromatin yapısının gevşemesine neden olur. Bu da DNA onarım enzimlerinin iplik kopması bölgesine erişmesine izin vererek DNA onarım işlemini kolaylaştırır [116, 117].

2.8.3. PARP' ların hücre farklılaşması üzerindeki rolü

Somatik hücrelerin uyarılmış kök hücrelere yeniden programlanması (iPSC) çalışmalarında PARP1 enziminin hücrelerin yeniden programlanmasını, hücre diferensiyasyonunu sağlayan önemli bir faktör olduğu ortaya konmuştur. Fare embriyonik fibroblastları üzerinde yapılan bu çalışmada Parp -/- olan hücrelerde pluripotens lokuslarında erken aktive edici Histon işaretleri oluşmamasına bağlı olarak transkripsiyonun gerçekleşmediği ve hücre farklılaşmasının başarısız olduğu gösterilmiştir. PARP1' in varlığında ise normal şartlarda iPSC için gerekli olan diğer dört molekülden üçü (Sox9, Klf-4 ve c-Myc) ortamda bulunmasa bile yalnızca Oct4 ile PARP' ın hücre farklılaşmasını bir nebze indüklemeye yettiği ifade edilmiştir [118]. Bir başka çalışmaya göre ise hücre farklılaşmasında Sox2' nin PARilasyonu, bu farklılaşma için son derece önemli olan Fgf4 ifadenmesini indüklemektedir [119]. Nöral kök hücreler üzerinde yapılan plastisite çalışmasında ise

PARilasyon, nöral kök hücrelerin farklanmasını baskılayan bir faktörün promotor bölgeden çıkarılmasına neden olarak transkripsiyonun düzenli şekilde devamını ve farklanmanın gelişmesini sağlamıştır [120] PARP1 gibi PARP7' nin de hücrel farklanmaya ve plastisiteye katkıda bulunduğu bilinmektedir [121].

2.8.4. PARP' ların telomer fonksiyonu üzerindeki rolü

Kromozomların uç kısımlarında yer alan ve o hücrenin canlılığından, yaşam süresinden sorumlu olan Telomerler en özet şekliyle kromozomların koruyucu yapılarıdır. TRF1 (Telomerik parçaları bağlama faktörü 1) ve TRF2, telomer fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alan temel faktörlerdir. PARP1 ve PARP2' nin bu faktörlerle etkileşime girerek telomer bütünlüğünün korunmasında ve telomerlerin onarılmasında etkili oldukları bilinmektedir. Bu konudaki çalışmalar devam etmekle birlikte PARP1 için henüz yeterli ve tatmin edici kanıtın elde edilemediği düşünülmektedir [122, 123]. PARP2 ile TRF2 arasındaki ilişki ve PARP2' nin telomer onarım mekanizmasına katkısı ise daha aşıkardır [124]. Ayrıca telomer fonksiyonun düzenlenmesinde Tankyrase' lar da (PARP-5a ve 5b) fonksiyon göstermektedirler. Tankyrase1' in TRF1'e bağlanarak onun PARilasyona uğramasını sağladığı, PARillenmiş TRF1' in ise telomere bağlanamamasından kaynaklı telomer uzunluklarının arttığı gösterilmiştir [125]. Bu da açıkça hücre yaşam döngüsünün uzamış olması anlamına gelmektedir.

2.8.5. PARP' ların inflamasyondaki rolü

Şuana dek PARP enzimlerinin normal hücrel fizyolojik koşullar altındaki rolleri incelenmiştir. PARP' ların protein-nükleik asit etkileşimlerinin düzenlenmesini de içeren geniş kapsamlı bir regülatör olduğu ortaya konmuştur. Bu anlamda PAR homeostazının sağlanması; PARP' lar tarafından NAD⁺' nin substrat olarak kullanılmasıyla üretilen PAR miktarı ile PAR glikohidrolazlar (PARG) ya da ARH3 gibi enzimler tarafından katalizlenen PAR miktarının doğru şekilde ayarlanması hücre sağlığının ve canlılığının korunmasında son derece önemli olmaktadır.

2.8.6 ve 2.9.2. 'nci bölümlerde ise PARP' ların hücredeki belirli bazı fizyolojik olmayan koşullar nedeniyle hücreyi yıkıma götürdükleri yollar incelenmiştir. Bu koşulların

yarattığı ilk sonuç, PARP enzim aktivitesi ile PARG aktivitesinin olması gerektiği şekilde orantılı olmaması, PARP enzim aktivitesinin aşırı gerçekleşmesidir.

Hücreyi yıkıma götürecek cinsten bir yolağın ilk adımını, hücrede inflamasyon süreci ile birlikte görürüz. PARP' lar temelde pro-inflamatuar sinyal yollarını indükleyerek inflamasyonun artmasına neden olurlar. İnflamasyon ve hücre nekrozu süreçleri birbiriyle iç içedir ve bir döngü oluşturarak PARP aktivasyonunun indüklediği nörodejenerasyon ve fibrozis gibi daha patofizyolojik süreçlerin gelişmesine neden olmaktadır [126, 127]. İnme, şok, romatoid artrit, ülseratif kolit gibi inflamatuvar hastalıklarda aşırı PARP aktivasyonu gerçekleştiği bilinmektedir [128]. Normal şartlarda hücre ya da doku hasarı / kaybı sonrası Mikroglia ve Monositik fagositoz aktivitesi gelişerek dokuyu temizleme / onarma işlevi gerçekleştirmektedir. Genotoksik faktörlere bağlı olarak aşırı PARP aktivitesinin geliştiği bilinen olgularda ise bu fagositik hücre aktivasyonunun da aşırı artmış olduğu ve bunun da hücreleri yıkıma götürdüğü gösterilmiştir [129]. Benzer şekilde kemoterapinin ve oksidatif stresin de aşırı PARP aktivitesine neden olduğu bilinmektedir [130].

PARP' larla ilişkili olan inflamasyon sürecinde temel olarak iki farklı yolak vardır. İlkinde DNA hasarına bağlı olarak hücrenin yıkıma gittiği süreçte, inflamasyonun ürettiği oksijen radikallerine karşı endotelial hücrelerin geçirgenlikleri artmaktadır. İkincisinde ise pro-inflamatuar mediatörlerin üretimi ve NF- κ B aktivasyonu söz konusudur [131]. Doku hasarı sonrası bu kimyasal sinyallerin üretimi dokunun onarılması için bir yanıt oluşturmakta böylece lökositler aktive edilerek hasarlı doku bölgesine göç etmektedirler [132]. Akut inflamasyonda ilk olarak vasküler geçirgenlikte artış, bölgeye lökosit göçü, vazodilatasyon, ödem ve mast hücreleri ile makrofajlarca serbest bırakılan bazı kemotaktik faktörlerin (Nitrik oksit, trombosit aktive edici faktör, interlökinler, sitokinler ve reaktif oksijen ürünleri/ROS) dokuda birikmesi gözlenmektedir [133-135]. Bu süreçte aşırı ROS birikimi, protein ve lipidler gibi makromolekülleri oksidatif hale getirerek DNA üzerinde hasarlar oluşturmalarına neden olur [131]. Ayrıca aktive edilmiş nötrofiller de hasarlı DNA zincirlerine neden olmaktadır. Tam bu sırada da hidroksil radikali PARP' ın aktivasyonunu indükler [135]. PARP kendi aktivitesinin haricinde NF- κ B ile de ilişkilidir ve onun da aktivasyonu için bir kofaktör olarak işlev görmektedir [136]. Bu anlamda, ratlarda çalışılan bir inme modelinde Taurin' in PARP ve NF- κ B ile ilgili inflamatuvar reaksiyonları baskılayarak inflamasyonun neden olduğu doku hasarını azalttığı ve iskemik

inmeye karşı koruduğu gösterilmiştir [137]. PARP1 ayrıca inflamasyon ve karsinogenezde rol oynadıkları bilinen TLR'lerin (Toll-benzeri reseptörler) de aktivasyonunu sağlamaktadır [138]. Böylece hücrel inflamasyonun artmasına ve sürdürülmesine katkı sağlamakla kalmaz, doku hasarı nedeniyle kendi aktivasyonu da sürekli artacağı için hücrel yıkıma doğru hızla giden bir kısır döngünün baş aktörlerinden biri olmuş olur.

2.8.6. PARP'ların hücre ölümündeki rolü

PARP'ların hücre sağlığı ve döngüsü için çok önemli görevleri olmasının yanı sıra; bazı hastalıklarda yoğun DNA bozunması, artmış oksidatif stres ya da artmış TNF- α (*Tümör nekroz faktörü- α*) ifadelenmesi, aşırı bir PARP aktivasyonu yaratarak, hücrel metabolizmayı ciddi şekilde zorlayabilir [139]. Çünkü PARP, aktivasyonu sırasında, NAD⁺'yı (*Nikotinamid adenin dinükleotidi*) substrat olarak kullanmaktadır. PARP'ın aşırı aktivitesine bağlı olarak azalan NAD⁺ seviyelerinin yeniden yapılandırılması iki veya dört adet ATP (*Adenosin-5'-trifosfat*) molekülü gerektirir. Sonuç olarak, hücrel ATP seviyeleri tükeneyeceği için enerji kaybı, hücrel fonksiyon bozukluğu ve sonunda hücre ölümüne yol açan bir süreç gerçekleşir [16, 46]. Berger bunu "PARP'ın intihar hipotezi" olarak adlandırmıştır; çünkü burada DNA'yı tamir edemeden hücre ölümüne neden olan PARP aktivitesi söz konusudur [15]. Böylece PARP, kaspaz-bağımsız olan, fakat poli-ADP-riboz (PAR) birikimi ve Apoptoz-indükleyici faktörün (AIF) mitokondriden nükleusa translokasyonunu içeren yeni bir hücre ölümü mekanizmasının temel aktörü olmuş olur [46]. Bu hücre ölüm mekanizması bazı kaynaklarca programlanmış nekroz olarak ifade edilebilse de burada nekrozdaki farklı olarak apoptotik cisimcikler indüklenmemekte; bunun yerine genel hücre membran bütünlüğünü bozulmaktadır.

Aşırı PARP aktivitesine bağlı olarak gelişen bu özel hücre ölüm mekanizması "PARthanatos" olarak adlandırılmış olup bir sonraki başlığın son bendinde (2.9.2.) konuyla ilgili daha ayrıntılı bilgiler verilmiştir.

2.9. Hücre Ölümü Mekanizmaları

Pek çok hastalıkta olduğu gibi, kalıtsal retinal dejenerasyonlarda da hücrenin nasıl ve hangi yolak üzerinden ölüme gittiğini anlamak, aydınlatabilmek hastalığın durdurulması ve olası tedavi yöntemlerinin belirlenmesi açısından son derece önemlidir. Bu tez çalışması kalıtsal

retinal dejenerasyonlar odaklı olduğu için konunun devamında nöronal hücre ölümleriyle, özellikle de fotoreseptör hücre ölümleriyle ilişkili hücre ölüm mekanizmaları üzerinde durulmuştur.

2.9.1. Apoptotik hücre ölüm mekanizması

Apoptoz’ un nöronal hücre ölümüne neden olan bir yolak olduğu yapılan çalışmalarla defalarca gösterilmiştir [140, 141]. Programlı, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri bir hücre ölümü mekanizması olarak bilinen Apoptoz, normal şartlarda organizmayı korumaya yönelik çalışan bir ölüm yolağıdır. Organizmadaki “homeostaz” adı verilen iç dengenin korunmasının ana aktörlerinden biri olmakla birlikte [142], embriyogenez döneminde olduğu gibi, gelişimsel basamaklarda ve hayat boyu organizmanın bağışıklığı üzerinde de etkisi olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte bazı durumlarda oksidatif stres ya da radyasyon gibi DNA hasarı meydana getiren çevresel etkenlere bağlı olarak da gelişebilmektedir [143]. Apoptotik ölüm yolağına işaret eden temel bulgular hücrenin hacimce küçülmesi, hücre çekirdeğinin ve hücre membranının büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu ve nihayetinde hücrenin apoptotik cisimlere parçalanarak makrofajlar tarafından elimine edilmeye hazır hâle gelmesidir [143]. Makrofajların bu aktivasyonunun herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşturmaksızın gerçekleşmesi apoptozda inflamasyonun söz konusu olmadığına işaret ettiği gibi, aynı zamanda apoptozu nekrozdan ayıran başlıca unsurlardan biridir [144].

Avustralyalı patolog J.F.K. Kerr ve arkadaşları tarafından ilk defa 1972’ de tanımlanmış olan bu hücre ölümü [145] daha sonra nematodlar üzerinde de çalışılmış ve araştırmacılarına Nobel ödülü getirmiş bir mekanizmadır. Nematodlar üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde bu hücre ölümünün genler tarafından düzenlendiği anlaşılmıştır [146]. Nematodlarda apoptozla direkt ilişkili olduğu bulunan üç ayrı gen, daha sonraki çalışmalarla insanlarda apoptotik yolakların temel düzenleyicileri olan kaspazların, Apaf-1’ in (Apoptoz aktive edici faktör) ve Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) geninin tanımlanmasına ışık tutmuştur [147].

Kaspazlar insanlarda apoptozu düzenleyen en temel unsurlar olarak kabul edilip sistein-aspartile özgü proteazların bir ailesidir. En az on dört üyeden oluşurlar. Apoptoz sürecinin başlangıcında inaktif olarak sentezlenip daha sonra proteolitik işlemeye uğrayarak aktif hâle gelirler. Bu proteolitik süreç oldukça karmaşıktır ve kaspazların birbirlerini tetiklemeleriyle

gerçekleşmektedir [148]. Kaspazların sınıflandırılmasında öncelikle sitokin işlenmesine yardımcı olanlar (Kaspaz-1 gibi) ve hücre ölüm mekanizmasına katılan diğer tüm kaspazlar şeklinde bir sınıflandırma yapmak mümkündür [149]. Hücre ölüm mekanizmasında yer alan kaspazlar ise kendi aralarında hücre ölümü için aktivasyonu başlatanlar (Kaspaz -2, 8, 9, 10, 12) ve bu aktivasyonun artarak sürmesini, böylece hücrenin kendi kendini öldürmesini sağlayan efektör kaspazlar (Kaspaz -3, 6, 7) olarak ikiye ayrılmaktadır. Hücrenin ölümüne giden süreçte uyarılara yanıt olarak aktivatör kaspazların aktivasyonu başlatılmakta, akabinde bu aktivasyon efektör kaspazları harekete geçirmekte ve hedef proteinin kesilmesini gerçekleştirmektedir [150]. Özellikle Kaspaz-3' ün direkt DNA ya da Laminler gibi pek çok önemli hücresel proteinin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir [151].

Apoptoz üç farklı yolak üzerinden gerçekleşebilmektedir. İlkinde hücre içi strese bağlı olarak gelişen (intrinsik) ölüm sinyalleri sonrası mitokondri zarının yapısının bozulması söz konusudur. Strese bağlı gelişen ölüm sinyalleri kaspaz aktivasyonunu başlatmakta, bu da mitokondri zarının yapısını bozarak bu zardan Sitokrom-c salınımını başlatmaktadır. Sitokrom-c de Apaf-1' e bağlanarak Kaspaz-9' u aktive edecek olan kompleksi oluşturmuş olur ve böylece hücreyi ölüme götüren süreç başlar [152]. Bu ölüm yolağında Sitokrom-c' nin yanı sıra MOMP (Mitokondriyel dış zar geçirgenliği) gibi proapoptotik faktörler de söz sahibidirler ve bu faktörler apoptozu hem indüklemeye hem inhibe etme özellikleri taşıyan değişik faktörleri bünyesinde barındıran Bcl-2 gen ailesi tarafından kontrol edilmektedirler [153]. Hücre dışı uyarılara bağlı olarak gerçekleşen ekstrinsik ölüm yolağında ise dış sinyallerin hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak, ligandlar aracılığıyla, hücre içine iletilmesi ve apoptozu başlatması söz konusu olmaktadır. Hücre yüzeyindeki bu ligandlar Fas ya da TNFR-1 (Tümör nekroz faktör reseptör-1)' dir. Bu ligandların ölüm sinyalini hücre içine taşımasıyla birlikte Kaspaz-8 aktivasyonu gerçekleşmekte ve ölüm süreci başlamaktadır [152]. Bir diğer Apoptoz yolağı ise yine intrinsik bir yolak olup Endoplazmik retikulum (ER) aracılı olarak gerçekleşir. Çeşitli etkenlerle hücre içi kalsiyum seviyesinin artmasına bağlı olarak ER etkilenmekte ve Kaspaz-12 aktivasyonunu başlatmaktadır. Aktive olan Kaspaz-12, Kaspaz-9' u harekete geçirerek hücreyi ölüme götüren süreci başlatmaktadır [154].

Homeostazı sağlamak ya da organizmayı immün olarak korumak gibi, genel anlamda, organizmanın yararına olacak şekilde gerçekleştiği bilinen Apoptoz ölüm yolağının, bazı çalışmalarda nörodejeneratif hastalıklarla, hatta Retinitis pigmentosa gibi kalıtsal retinal

dejenerasyonlarla da ilişkili olabileceği gösterilmiştir [155-157]. Buna rağmen uzun senelerdir üzerinde titizlikle çalışılan ve neredeyse her bir basamağı aydınlatılmış olan Apoptozu inhibe edecek kaspaz inhibitörleri gibi ajanların kullanılmasına rağmen, nörodejeneratif bu hastalıklarda yol kat edilememiş olması bu hastalıklardaki ölüm mekanizmalarının Apoptoz’ dan farklı olabileceği düşüncesini ve tezini yükseltmekte ve araştırmacıları nörodejeneratif hastalıkların altında yatan, kaspaz-aracılı olmayan diğer ölüm mekanizmalarını araştırmaya daha da çok motive etmektedir.

2.9.2. Apoptotik olmayan hücre ölüm mekanizmaları

Özellikle son 15 yıldır yapılan çalışmalarla, nörodejeneratif hastalıklar özelinde kalıtsal retinal dejenerasyonlarda, apoptotik olmayan hücre ölüm yollarının etkin olduğu ortaya konmaya başlanmıştır. Bu yollar henüz tüm basamakları aydınlatılmamış olan “Kalpain-aracılı ölüm yolağı” ve “PARP-aracılı ölüm yolağı”dır.

Nörodejenerasyonda kalpain-aracılı hücre ölümü

Kalpains de kaspazlar gibi proteaz ailesinin bir üyesidirler. Fakat hücreyi ölüme götüren mekanizmada rol aldıklarında bu mekanizma kaspaz-aracısız şekilde gerçekleşmekte [158], buna ek olarak da Kalpainlerin kaspazlar üzerinde de etkili oldukları bilinmektedir [159].

Kalpains, hepsi memelilerde bulunmayan, 15 farklı izoforma sahiptirler. Katalitik ve düzenleyici alt birimlerden oluştukları ve kalsiyum bağlama bölgeleri sayesinde kalsiyum ile aktive oldukları bilinmektedir. Endojen inhibitörleri “kalpastatin”dir ve onunla birlikte organizmadaki retinal doku da dahil olmak üzere, hemen hemen her hücrede faaliyet göstermektedirler. Normal şartlarda organizma için zararlı olmayan, hatta aksine hücre içi sinyal iletimi, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, trombosit aktivasyonu gibi son derece önemli süreçlerde görev almaktadırlar [160]. Fakat bu uyumlu sürecin devam ettirilebilmesi, hücre kalsiyum seviyeleri ile yakından ilişkilidir. Hücre içi yüksek kalsiyum seviyelerinin fotoreseptör hücreler de dahil olmak üzere nöronal ölümlerde etkin olduğu zaten bilinmektedir [161, 162]. Bununla birlikte yüksek kalsiyum seviyelerinin kalpain aktivasyonu üzerinden Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi ciddi patolojilere sahip nörodejenerasyonlara neden olduğu [163, 164]; Retinitis pigmentosa gibi kalıtsal

retinal dejenerasyonlardaki şiddetli patolojilerin altında yatan mekanizmada da yer aldığı gösterilmiştir [165].

Kalpainlerin yer aldığı nöronal hücre ölüm mekanizmasında özetle; yüksek hücre içi kalsiyum seviyelerine bağlı olarak kalpainin kalpastatinden ayrılmasını takiben, nöronlarda aşırı ATP kaybıyla korele gerçekleşen nöron ölümü söz konusudur [158, 164]. Bu anlamda hem kalpastatinin azaldığı hem de kalpain aktivasyonunun arttığı durumlarda kalıtsal ve kalıtsal olmayan retinal dejenerasyonların görüldüğü, kalpainlerin hem fotoreseptör ölümleriyle [163, 165, 166] hem de Ganglion hücre ölümleriyle [167, 168] ilişkili oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Nörodejenerasyonda PARP-aracılı hücre ölümü

Bölüm 2.8' in genelinde bahsedildiği üzere, PARP (Poli-ADP riboz polimeraz) enzimleri, normal şartlarda, hücrenin devamlılığı ve hayatta kalabilmesi için son derece önemli görevlere sahip, 17 farklı üyeden oluşan bir enzim ailesidir [56]. Hafif ve orta şiddetteki DNA hasarları durumunda, ifadenmeleri artarak PAR (Poli-ADP riboz) polimerlerini ya da histonlar veya diğer DNA onarım proteinlerini üretmek suretiyle hasarlı DNA zincirinin tamir edilmesini sağlamaktadırlar. Özellikle PARP-1 enziminin patolojik sinyaller ya da artmış oksidatif stres sonucunda bu hasar tamir mekanizmalarında rol aldığı net şekilde gösterilmiştir [126]. Aynı zamanda bu çalışmalarda PARP-1 enziminin bu tamir işlevini yerine getirmek için hücredeki β -NAD⁺' yı substrat olarak kullanarak PAR polimerlerinin üretimini sağladığı anlaşılmıştır. Hücre içi NAD⁺' nın substrat olarak kullanılması yoluyla yeni poli-ADP ribozların üretilmesi de hücre için ATP tüketimi anlamına gelmektedir.

Çeşitli genotoksik faktörler ya da aşırı artmış hücre içi oksidatif stres söz konusu olup aşırı DNA hasarı gelişen durumlarda siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) ifadenmesinin artmasına bağlı olarak onunla direkt ilişkili olan PKG (protein kinaz G) aktivitesinin arttığı bilinmektedir [19]. Buna bağlı olarak hücresel DNA' daki bu hataları onarabilmek için PARP' ın ifadenmesi ve aktivasyonu yoğun şekilde artmaktadır. Eş zamanlı olarak, normal şartlarda DNA' nın stabilitesinin korunmasında da görev alan PARP enziminin aşırı aktivasyonunun, HDAC (histon deasetilaz) aktivitesini de artırdığı, PARP aktivitesi ile HDAC aktivitesi arasında karşılıklı bir geribildirim olduğu kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde ifade edilmiştir [169]. Aşırı aktivasyon gösteren PARP-1 enziminin, normal

fizyolojik davranışın çok ötesinde, aşırı PAR üniteleri ürettiği pek çok çalışma ile gösterilmiştir [19]. Nörodejenerasyonda ve kalıtsal retinal dejenerasyonların patolojisinde bu aşırı üretilen PAR ünitelerinin birikimi söz konusudur. Hücre içerisinde çok miktarda bulunan PAR ünitelerinin nörotoksositeye yol açarak hücre ölümüne neden olabilecekleri çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [17]. Aynı zamanda hasar tamir mekanizmasının çalışabilmesi için çok sayıda PAR ünitesi üretme davranışını gösteren PARP-1 enzimi, bu işlemi gerçekleştirirken substrat olarak NAD⁺’ı kullandığı ve çok sayıda ATP molekülü harcadığı için hücre içerisinde enerjetik anlamda da bir dengesizlik yaşanmakta ve yine hücre ölümüne doğru giden yol aktive olmaktadır. Çünkü mitokondride bulunan NAD⁺’ın aşırı kullanımı ve hücresel enerjide yaşanan dengesizlik, mitokondri membranının yapısını bozarak membranın depolarizasyona uğramasına neden olmaktadır. Bu durum da AIF (Apoptoz indükleyici faktör) gibi bazı mitokondriyel proteinlerin sitosole sızmasına neden olarak kromatin yoğunlaşması ve zaten hasarlı olan DNA’ın daha da fazla parçalanmasına ve hücrenin ölüme gitmesine yol açabilmektedir [16, 46]. Bu hücre ölüm mekanizması da süreçte PAR birikimi gerçekleştiği için “PARthanatos” olarak adlandırılmıştır [170].

Kalıtsal retinal dejenerasyonlarda PARP1’ in aşırı ifadenmesinin rol aldığını açıkça ortaya koyan çalışma 2007’ de gerçekleştirilmiş olup PDE6 β (fosofodiesteraz β) mutasyonu içeren rd1 model fareler ile PARP Knock Out farelerin karşılaştırılmasıyla ortaya konmuştur. Burada PDE6 β mutasyonuna bağlı olarak gelişen aşırı artmış PARP1 aktivasyonunun fotoreseptör hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [18]. Bunu takiben 2010 yılında yapılan bir başka çalışmada ise sağlıklı (Wild type) fareler cGMP ile indüklenerek, yine PARP KO fare retinalarıyla karşılaştırılmış ve PARP KO fare retinalarındaki fotoreseptör ölümünün anlamlı şekilde az olduğu gösterilmiştir [171]. Daha sonraki bir başka kapsamlı çalışma sayesinde de on farklı fare modeli üzerinde PARP1 enziminin aşırı aktivasyonunun fotoreseptör hücre ölümüne neden olduğu anlaşılmıştır [19].

Bununla birlikte kalıtsal retinal dejenerasyonlarda, fotoreseptör hücre ölümünde, artmış oksidatif stresin de fotoreseptör hücre ölümüne neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [172].

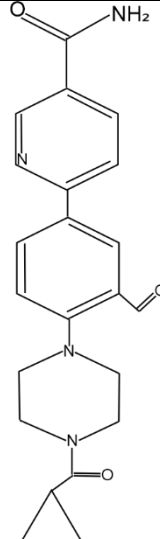
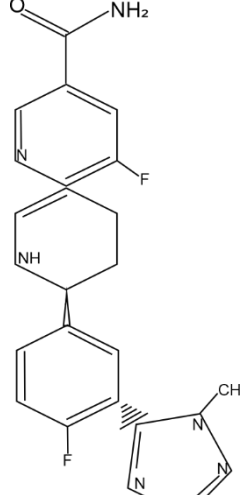
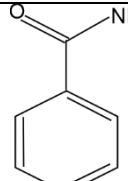
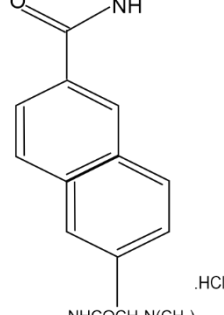
Tüm bu bilgiler ışığında, kalıtsal retinal dejenerasyonlarda PARP enzimini inhibe ederek tedavi sağlama hipotezi daha da güçlenmiş olmaktadır.

2.10. PARP İnhibitörleri

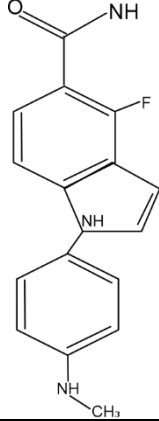
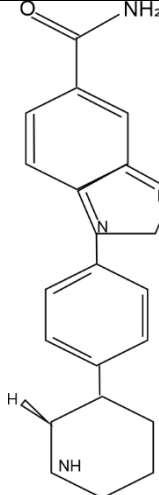
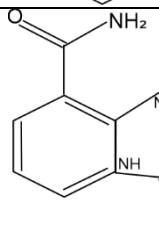
Normal şartlarda temel görevlerinden biri DNA tamiri yoluyla, DNA' nın yapısı ve kararlılığının korunmasını sağlamak olduğu için, PARP enzimlerine “genom bekçileri” adı verilmiştir [72]. Ancak bazı genotoksik faktörler ve oksidatif stresin etkisiyle çeşitli hastalıkların da başlıca nedeni hâline gelebilmektedirler. Bölüm 2.8.2’ de belirtildiği üzere normal şartlarda hücre döngüsü ve proliferasyonunda yer alıyor oldukları için, genotoksik faktör ya da oksidatif stres gibi olumsuz etkenlerin varlığında kanserogenezi tetikleyebilmektedirler [173]. Benzer şekilde bölüm 2.8.4’ te belirtildiği üzere telomerlerin fonksiyonunda yer alıyor oldukları için genotoksik şartlar altında yaşlanma üzerinde daha fazla etkili olmaktadır [83]. Nörodejeneratif hastalıklar söz konusu olduğunda ise bölüm 2.8.1’ de bahsedildiği üzere DNA tamiri görevlerini yerine getiremeyip aşırı aktivasyon gösterdikleri için hücresel substratların tüketimine neden olarak hücreyi “PARthanatos” adı verilen ölüm mekanizmasıyla yok ettikleri bilinmektedir [174-176]. Ayrıca bölüm 2.8.3’ te belirtildiği üzere inflamasyonda da görev alıyor olmaları da nörodejeneratif hastalıklar ve fibrozis gibi inflamatuvar hastalıklar bakımından önemlidir. Bu anlamda, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar haricinde; diyabet, ateroskleroz gibi vasküler hastalıklar ile fibrozis, artrit, astım, kolit gibi inflamatuvar hastalıklarda da PARP enzimlerinin, özellikle de DNA üzerinde yoğun etkisi olduğu bilinen PARP1’ in, inhibe edilmesine yönelik deneysel çalışmalar yapılmaktadır [177-179]. Ayrıca PARP inhibitörlerinin insanlardaki etkisini daha doğruya yakın şekilde belirleyebilmek, etkin dozları hesaplayabilmek adına, inme modellerinde [180], akut nörolojik hasarlarda [181], sepsiste [182], akut akciğer hasarında [183] büyük hayvan modelleri ile yapılan PARP inhibitörü çalışmaları da vardır.

İlk defa 1971’de, HeLa hücrelerinin Timidin ve Nikotinamid’e tabi tutulmasıyla PARP inhibisyonunun geliştiği tespit edilmiştir [184]. Günümüzde, bazıları FDA tarafından onaylanan PARP inhibitörleri ile bir süredir klinikte de bu tedavi yöntemlerinin kullanımları sağlanmakta ve bazı PARP inhibitörlerinin de pre-klinik çalışmalarına devam edilmektedir. clinicaltrials.gov adresinde tüm bu çalışmalar yer almaktadır. Temmuz 2022 tarihi itibarıyla şuan yürütülmekte olan da dahil olmak üzere PARP inhibitörleri ile yapılan 400’ den fazla klinik deneme çalışması yer alırken bunların çok büyük bir kısmı kemoterapiye dirençli germ line’ lar ya da meme kanseri duyarlılık proteini 1-2 (BRCA1-2) mutasyonu ile oluşan over, meme, pankreas ve akciğer kanserleri hakkında olsa da glioblastoma ya da beyin metastazları gibi nörodejeneratif hastalıklarda, çeşitli inflamasyon ve enfeksiyonlarda da PARP inhibitörlerinin etkisini klinik olarak araştıran çalışmalar bulunmaktadır (*Çizelge 2.3*).

Çizelge 2.3. Yaygın PARP inhibitörlerine ilişkin spot bilgiler

PARP İnhibitörü	Kimyasal Yapısı	Hedeflediği Öncelikli PARP Enzimi / Enzimleri [185]	Etkinliği	FDA Onay Durumu
Olaparib		PARP 1	BRCA mutasyonları [186]	2014
Talazoparib (BMN-673)		PARP1 - PARP 2	BRCA mutasyonları, PTEN (meme tümörü) mutasyonları [187]	2018
3AB (3-Aminobenzamid)		PARP1 PARP2	Nörotoksisite deneysel çalışmaları [188]	-
PJ34		PARP 1	İnme ve kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinde nöroproteksiyon oluşturan deneysel çalışmalar [189, 190]	-

Çizelge 2.3. (devam) Yaygın PARP inhibitörlerine ilişkin spot bilgiler

PARP İnhibitörü	Kimyasal Yapısı	Hedeflediği Öncelikli PARP Enzimi / Enzimleri [185]	Etkinliği	FDA Onay Durumu
Rucaparib		PARP 1	BRCA mutasyonları [191]	2016
Niraparib		PARP 2	BRCA mutasyonları [192]	2017
Veliparib (Abt-888)		PARP 1	Gliomal ve melanomal tümörlerde deneysel çalışmalar [193, 194]	-

PARP inhibitörlerinin etkisinin yaşa, cinsiyete ve hedef dokudaki hücrelerin çoğalma hızlarına göre değişiklik gösterebilecekleri unutulmamalıdır. PARP inhibitörlerinin post-mitotik, çoğalmayan ya da yavaş çoğalan hücrelerde etki gösterebilmeleri [195, 196]; PARP inhibitörü tedavisi alan yaşlı kanserli hastalardaki progresyonun genç hastalara oranla daha yavaş seyretmesinin bir açıklaması olabilir. Ayrıca bazı PARP inhibitörleri ile östrojen reseptörü- α arasında negatif bir ilişki olduğu ve bu nedenle bu inhibitörlerin kadınlarda daha az etkin oldukları da gösterilmiştir [197]. Kullanılan PARP inhibitörünün etkili olup olmadığını anlamak üzere yapılan çalışmalar BRCA 1-2 mutasyonlarının varlığına bakmak [198], homolog rekombinant gen tamir sistemi (HRR) düzeyi testi yapmak [199], PARP aktivitesini ölçmek,

periferik monositik kan hücrelerinde [200] ya da kaş kılı foliküllerinde [186] PARP-bağımlı fosforilasyonu ex-vivo olarak göstermek şeklinde özetlenebilir.

2.10.1. Kanser tedavisinde PARP inhibitörleri

PARP' ın DNA onarımındaki rolünün tanımlanmasıyla birlikte, kemoterapi ya da radyoterapi gibi ajanlara maruz bırakılan kanser hücrelerinde PARP inhibisyonu gerçekleştirilirse, bu hücrelerin kendilerini tamir etmekten yoksun kalacakları için daha kolay ölebilecekleri; böylece kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavilerinin hastalar için daha kısa sürede ve daha olumlu sonuçlar verebileceği hipotezi doğmuştur [126, 201-203].

Kanser tedavisinde PARP inhibisyonunun kullanılmasına yönelik ilk çalışmalar, 2005 ve 2006 yıllarında gerçekleştirilmiş olup, bunlar BRCA geni (*Breast cancer gene*) mutasyonuna sahip over ve meme kanseri üzerinde çalışılmış ve olumlu sonuçlar vermiştir [204, 205]. Herhangi bir inhibisyonun gerçekleştirilmediği durumlarda; BRCA mutasyonlu hücrelerde, kemoterapi ve radyoterapi gibi genotoksik ajanların kullanımıyla birlikte PARP enzimleri harekete geçmekte ve “baz eksizyon onarım sistemi” (BER) adı verilen mekanizma üzerinden çalışarak kanser tedavisi nedeniyle hasar görmüş, tek iplikçik kopuşları yaşamış olan kanserli hücreleri yeniden onarmaktadır [206]. PARP inhibisyonunun gerçekleştirildiği durumlarda ise BER onarım sistemi çalışmamakta, buna bağlı olarak da tek iplikçik kopuşları devam ederek çift DNA iplikçığının kopmasına imkan tanımaktadır. Normal şartlarda çift iplikçik kopuşları “Homolog rekombinant tamir sistemi” (HRR) tarafından onarılıyor olsalar da BRCA geni mutasyonlu kişilerde bu sistem genetik olarak bozuk olduğu için DNA çift iplikçikleri PARP inhibisyonu uygulanmış hastalarda geri dönüşsüz olarak kopmakta, bu da kemoterapi ya da radyoterapi alan hastalarda kanserli hücrelerin başarılı bir şekilde ölmesi anlamına gelmektedir.

Son yıllarda kanser tedavilerinde daha yüksek başarı sağlayabilmek adına PARP inhibitörleri ile Topoizomeraz inhibitörlerinin [207] ya da kinaz inhibitörlerinin kombine kullanımı da söz konusu olmuştur [208].

Pek çok farklı ilaç firması tarafından üretilen birçok PARP inhibitörü günümüzde klinikte kullanılmaya ya da pre-klinik olarak çalışılmaya devam edilmektedir. Temelde Nikotinamid' i taklit ederek hücredeki NAD⁺ substratı ile PARP enziminin birbirine bağlanmasını engelleme yoluyla çalışan PARP inhibitörleri, oldukça çeşitli bir skalada ele alınabilen farmakolojik

formlardırlar [209]. Üretilen PARP inhibitörleri kanser tedavisinde etkili olabildikleri doz aralıklarına göre birinci nesil, ikinci nesil ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılırlar. Üçüncü nesil PARP inhibitörleri klinik aşamaya kadar ilerlemiş -ve bazıları FDA (*Food and Drug Administration*) onayı almış-, pek çok açıdan etkili olabilen PARP inhibitörleri olup kanser tedavisindeki kullanımları yüksek nanomolar ile düşük mikromolar dozlarındadır. Bu grup içerisinde yer alan PARP inhibitörleri Olaparib, Rucaparib ve Talazoparib ile türevleridir. İkinci nesil PARP inhibitörlerinin orta mikromolar dozlarda aktif oldukları bilinmektedir. 3-Aminobenzamid (3AB) gibi birinci nesil PARP inhibitörleri ise milimolar konsantrasyon dozlarında aktiftirler [210]. PARP inhibitörlerinin bu denli düşük dozlarda etki gösterebilme erklerinin, oral kullanımdan çok intravenöz olarak kullanımlarında açığa çıktığı gösterilmiştir [211]. Bu anlamda, en düşük doz ile aktivasyonun sağlanabildiği üçüncü nesil PARP inhibitörleri daha düşük toksisiteye neden olacakları için daha tercih edilebilir konumdadırlar. Ek olarak PARP inhibitörlerinin kanser tedavisinde kullanımı, kemoterapi veya radyoterapiyle kombine edilip edilmediğine bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterse de non-onkolojik modellerde PARP inhibitörü olan Olaparib' in etkili dozlarının kanser modellerinde kullanılan dozlardan yaklaşık elli katı kadar daha düşük olduğu bilinmektedir [212]. Bu da PARP inhibitörlerini nörodejeneratif hastalıklarda kullanılması açısından oldukça avantajlı hâle getirmektedir.

2.10.2. Nörodejeneratif hastalıklarda PARP inhibitörleri

PARP enzimlerinin aşırı aktivasyonlarının PARthanatos hücre ölümü mekanizmasına yol açıyor olması ve inme, Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı, ALS (amyotrofik lateral skleroz), retinal dejeneratif hastalıklar gibi nörodejeneratif hastalıkların hücrel NAD⁺ substratlarının tükenmesi [213] ve DNA çift ipliklerinin kopmasıyla gelişen hücre ölümüne bağlı olarak gerçekleşiyor olduğunun bilinmesi [128], PARP inhibitörlerini nörodejeneratif hastalıklar bağlamında da oldukça potansiyel bir tedavi edici ajan konumuna getirmektedir. Hem tüm bu nörodejeneratif hastalıklarda hem de nöroinflamatuvar bir hastalık olan MS' te (Multiple skleroz) PARP-1 aşırı aktivasyonu olduğu gösterilmiştir [214].

Nörodejeneratif hastalıklarda PARP inhibitörlerinin kullanılmasına ilişkin ilk çalışmalar 1990' lı yıllarda inme modelinde gerçekleştirilmiştir [215, 216]. Bu çalışmalarda NO (nitrik oksit) ya da PARP genine müdahale edilerek nörodejenerasyonun önlenmeye çalışıldığı görülmektedir. Günümüzde ise farmakolojik PARP inhibitörleri ile inme modelinde gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar neticesinde artmış hücrel ATP ve NAD⁺ seviyeleri, azalmış

inflamasyon ve hücre ölümü, nörolojik hasarlarda iyileşmeler gibi sonuçlar elde edilmiştir [217-219]. Çok çeşitli PARP inhibitörleri bu nörodejeneratif hastalıklarda çalışılırken Olaparib ALS modelinde denenip nöronal hücre ölümünü azalttığı ifade edilmiş [220], Talazoparib ise Parkinson modelinde çalışılarak nöron kaybını azaltmada başarılı olduğu gösterilmiştir [221]. 3AB ise yine Parkinson modelinde çalışılmış ve hareket kabiliyetlerinin düzeltilmesinde katkısı olduğu gösterilmiştir [222].

Farmakolojik PARP inhibitörlerinin direkt retinal doku dejenerasyonları üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. Örneğin neovaskülarizasyon göstermeyen yaşa-bağlı maküler dejenerasyonlu (YBMD) hastaların RPE doku örneklerinden üretilen hücre hatlarında ve ayrıca in vivo olarak da YBMD' lu hayvan modellerinde PARP-1' in etkisi araştırılmış ve PARP inhibitörlerinden Olaparib' in bu dejenerasyonlarda RPE hücre ölümünü engelleyebildiği gösterilmiştir [223]. Benzer şekilde yine Olaparib PARP inhibitörü kullanılarak retinal dokularda oluşan iskemi/reperfüzyon hasarının azaltılabileceğinin gösterilmesi de literatür açısından oldukça önemli olmuştur [224]. Bunun haricinde kalıtsal retinal dejenerasyonlarda çeşitli PARP inhibitörlerinin, çeşitli hayvan modellerinde araştırıldığı çalışmalar da vardır [18, 26, 190, 225-230] ve tüm bu çalışmalar bu tezin Tartışma bölümünde daha ayrıntılı ele alınmıştır.

2.10.3. Olaparib

AstraZeneca ilaç firması tarafından üretilen ve ticari adı olan Lynparza olarak da bilinen Olaparib' in, daha az yaygın kullanılmakla birlikte diğer isimleri; AZD-2281, MK-7339 ve KU0059436' dır. Kimyasal formülü $C_{24}H_{23}FN_4O_3$ tür. Üçüncü nesil, ultrapotent bir PARP inhibitörüdür. Düşük mikromolar ile yüksek nanomolar konsantrasyonlarda etkili olabildiği bilinmektedir [210]. En etkin şekilde PARP1 enzimini inhibe ettiği bilinirken PARP enzim ailesinin diğer formları üzerinde de etkili olabilmektedir [231]. İlk üretilen ve dolayısıyla en çok çalışılan PARP inhibitörüdür. 2014' te FDA onayı almış olup ilk olarak over kanserinde kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra Tuba uterina kanseri, meme kanseri, metastatik pankreatik kanser, peritoneal kanser ve kastrasyon dirençli prostat kanserinde de tedavi edici ajan olarak kullanımı onaylanmıştır. Tüm bu kanser türlerinin ortak özellikleri BRCA 1-2 mutasyonlarına sahip olmalarıdır. Oral yolla kullanılmaktadır. Mart 2022' de ise BRCA germ hattı mutasyonlu, meme kanseri açısından yüksek risk taşıyan kişilerde koruyucu tedavi olarak ya da kemoterapi ile meme kanserini atlatmış kişilerde koruyucu tedavi olarak kullanımı onaylanmıştır [232].

2.10.4. Talazoparib

Pfizer ilaç firması tarafından üretilen ve ticari adı olan Talzenna olarak da bilinen Talazoparib' in bir diğer ismi de BMN-673 (kısaca BMN) olup, kimyasal formülü $C_{19}H_{14}F_2N_6O$ ’ dur. O da Olaparib gibi üçüncü nesil, ultrapotent bir PARP inhibitörüdür. Düşük mikromolar ile yüksek nanomolar konsantrasyonlarda etkili olabildiği bilinmektedir [210]. PARP enzim ailesi üyeleri üzerinde geniş bir etkiye sahiptir [233]. Olaparib ile kıyaslandığında PARP enzimlerini yakalayabilmesi, onlara tutunabilmesi (*trapping etkisi*); yaklaşık yüz kat daha fazla bulunmuştur [234]. Ekim 2018’ de ilerlemiş meme kanseri tedavisinde kullanımı için FDA onayı almıştır. Olaparib gibi, BRCA mutasyonlu germ hatları üzerinde etkilidir [187]. Oral yolla kullanılmaktadır.

2.10.5. 3-Aminobenzamid

İlk nesil PARP inhibitörlerinden olan 3-Aminobenzamid’ in diğer isimleri “meta-benzamide” ya da “3-ABA” olup yaygın kullanılan isim formu ise 3AB’ dir. Kimyasal formülü $C_7H_8N_2O$ ’ dur. Henüz pre-klinik çalışmaları devam eden bir PARP inhibitörüdür. Yapısı NAD^+ ’ ya oldukça benzer olduğu için PARP inhibitörü olarak etkin kullanılma potansiyeli yüksek görülmekle ve bu konudaki çalışmalar devam etmekle birlikte Olaparib ve Talazoparib ile kıyaslandığında daha yüksek bir doz sayılan milimolar konsantrasyonlarda kullanımının gerekmesi bu PARP inhibitörü için bir dezavantajdır [210].

2.10.6. Doğal PARP inhibitörleri

Normal şartlarda hücrenin hayatta kalması ve devamlılığının sağlanması açısından son derece önemli görevleri olduğu bilinen PARP enzimlerinin [115], normal fizyolojik koşullar altında dinamik olarak düzenlenmekte oldukları ve her hücrenin kendine ait bir bazal PARP aktivitesi olduğu bilinmektedir [235]. Bu aktivitenin normal akışında korunabilmesini sağlamak üzere, farmakolojik olmayıp fizyolojinin kendi doğasında var olan PARP inhibitörleri mevcuttur. Doğal PARP inhibitörleri arasında; Vitamin B₃ (nikotinamid), kafein, hipoksantin, Vitamin A öncülleri, Vitamin D’ nin aktif formu, taurin, kinurenik asit ve ginsenositler bulunmaktadır [236, 237].

Ayrıca başta Minosiklinler olmak üzere Tetrasiklin grubu antibiyotikler ile Daktinomisin ve Novobiosin grubu antibiyotiklerin de PARP inhibisyonu yapabildikleri, diyabetik retinopati modelini de içeren bazı in vivo deneysel çalışmalarda gösterilmiştir [238-240].

Bununla birlikte hücrelerin sahip olduğu bazal PARP aktivitelerinin hücre farklılaşması sırasında da azalabildikleri; örneğin miyositlerin miyotüplere farklandıkça PARP1 aktivitelerinin azaldığı [241], benzer şekilde dendritik hücrelerin olgunlaşma süreçlerinde farklı PARP seviyelerine sahip oldukları [242], lenfositlerin inaktif formlarında aktif formları ile karşılaştırıldıklarında daha düşük PARP seviyelerinin bulunduğu bilinmektedir [243].

Ek olarak bazal PARP enzimi seviyelerinin kişiden kişiye değişebileceği, bu farkın kişilerin metabolizmalarına bağlı olarak iki yüz kata kadar ulaşabileceği ortaya konmuştur [244].

2.11. Kalıtsal Retinal Dejenerasyonlar

Retinal doku; retina pigment epitel (RPE) tabakası haricinde, nöronal dokudan oluştuğu için kalıtsal retinal dejenerasyonlar nörodejeneratif hastalıklar sınıfında yer almaktadırlar. Klinik seyirleri ve genetik alt yapıları bakımından oldukça çeşitlilik gösteren bu hastalıklar, fotoreseptörlere zarar vererek insanlarda ilerleyici görme kayıplarına ve nihayetinde körlükle sonuçlanan süreçlere yol açarlar. Kalıtsal retinal dejenerasyonların bu ilerleyici süreçlerinde; karanlığa adaptasyonda sorun, niktalopi (gece körlüğü), fotofobi, görme alanında daralma, nistagmus (şaşıklık) ve pupillada anormallikler ile son olarak merkezi görme kayıpları gelişmektedir [3]. Bu durum da kişilerin hayat kalitesini, bağımsızlıklarını ve özellikle çalışan nüfusu ciddi şekilde etkilemekte; aynı zamanda ağır psikolojik problemleri ve ekonomik yükleri beraberinde getirmektedir [11].

Kalıtsal retinal dejenerasyonlar ortalama her iki bin kişiden birinde görülme sıklığına sahip olup dünya genelinde yaklaşık iki milyon kişiyi etkilemektedirler [4]. Yoğun şekilde genetik heterojenite gösterirler; bugüne dek kalıtsal retinal dejenerasyonların oluşumunda üç yüzün üzerinde gen ve gen lokusu olduğu tespit edilmiştir [5]. Bu genlerdeki mutasyonlar direkt fotoreseptörlerin gelişimini engelleyecek türde olabilecekleri gibi, fotoreseptörlerin çalışma mekanizmasını engelleyerek de kalıtsal retinal dejenerasyonlara neden olabilecekleri bilinmektedir. Örneğin RPE’deki RPE65 genine ait mutasyon, RPE hücrelerinin fonksiyonlarını etkileyerek görmenin gerçekleşmesi olayında kullanılmış olan artık görme kromotoforunun olması

gerektiği şekilde fagosite edilmesini önlediği için retinal fonksiyonu doğrudan etkilemektedir [245]. Kalıtsal retinal dejenerasyonlarda, her ne kadar oldukça karmaşık bir örüntüyle genetik çeşitlilik görülüyor olsa da genetik bakımdan belirli başlıklar altında sınıflandırılmalar; otozomal dominant, otozomal çekinik, X-kromozomu ilişkili, dijenik ve mitokondriyal kalıtımla aktarılan kalıtsal retinal dejenerasyonlar şeklinde yapılmaktadır [3, 6-9].

Kalıtsal retinal dejenerasyonlar fenotipik olarak sınıflandırıldığında ise yirmiden fazla çeşit hastalık ve hastalık grubu bizi karşılamaktadır. Bunlar arasında en bilinenleri; Retinitis pigmentosa, Leber' in konjenital amorozu, Stargardt hastalığı, koroideremi ve Rod-koni distrofileridir [11]. Bu hastalık gruplarını da sendromik olanlar ve non-sendromik olanlar şeklinde sınıflamak mümkündür. Non-sendromik kalıtsal retinal dejenerasyonlarda yalnızca retina ve görme yetisi etkileniyorken sendromik kalıtsal retinal dejenerasyonlarda, sistemik olarak diğer organların ve özellikle kulak gibi diğer nörosensörlerin etkilenmesi söz konusudur [4].

Kalıtsal retinal dejenerasyonlar arasında en bilinen ve en yaygın olan hastalık grubu, Retinitis pigmentosa olup bu adlandırma 1875'te Franciscus C. Donders tarafından yapılmıştır [246]. Oldukça kompleks bir yapısı olan bu retinal dejenerasyon hastalık grubunda, atipik özelliği nedeniyle, doğru ve kesin bir teşhis yapmanın zor olduğu belirtilmiştir. Son zamanlardaki çalışmalara göre erken başlangıçlı, yüksek miyopili olguların yaklaşık %25' i Retinitis pigmentosa ile ilişkili olarak gerçekleşiyor olabilmektedir [247]. Retinitis pigmentosa, kalıtsal retinal dejenerasyonların genetik altyapısal sınıfları arasından hepsinde kendine yer bulmaktadır. Bu alt sınıflardan X-kromozomu ilişkili Retinitis pigmentosa' da en hızlı ve şiddetli ilerleyişle birlikte en kötü prognoz oranları görülürken; otozomal dominant Retinitis pigmentosa' da merkezi görüşün uzun süre korunabildiği bilinmektedir [248, 249].

Yine de tüm Retinitis pigmentosa alt tiplerinde, süreç içinde mutlaka periferik görüş daralarak küçülmektedir. Buna neden olan patolojik mekanizma, Retinitis pigmentosa' da öncelikle periferik görüşten sorumlu olan Rod fotoreseptörlerinin dejenere olması; bunu takiben Koni fotoreseptörlerinin dejenere olmalarıdır [250]. Rod fotoreseptörlerinin ölümü ile birlikte Retinitis pigmentosa' lı hastalarda "tünel görüşü" adı verilen, yalnızca merkezi görüşün var olduğu ve onun da süreç içinde küçülerek yok olduğu tipik bulgular yaşanmaktadır. Tünel görüşünün genellikle genç erişkinlikte yaşandığı bilinirken zaman içinde bu alan tamamen daralmakta ve körlük gelişmektedir [251]. Öte yandan başlangıçta renkli görme ile ilgili herhangi bir sorun yaşanmazken hastalığın ilerleyen evrelerinde diskramatopsi (renklerin doğru şekilde ayırt edilememesi) ya da

akranotopya (renklerin hiç algılanmaması) gelişmektedir [252]. Retinitis pigmentosa' da Koni fotoreseptörlerinin Rod' ların dejenerasyonundan daha sonra ölüyor olmalarına dair; Rod' ların kaybı nedeniyle retinal dokuda O₂ tüketiminin azalması, böylece retinal dokuda var olan yüksek O₂ seviyesinin ROS (Reaktif oksijen ürünleri) üretimini artırarak retinal dejenerasyonu, Koni fotoreseptörlerinin de kaybına neden olacak şekilde ilerletiyor olmaları hipotezi vardır [251]. Aynı zamanda Retinitis pigmentosa' nın patolojisinin açıklanması adına, hastalığa yol açan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak kan-retina bariyerinin bozulması ve retinal damarların kalınlaşması nedeniyle de fotoreseptör dejenerasyonları oluşabildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [253, 254]. Bununla birlikte 2021 yılında gerçekleştirilen bir çalışmaya göre Retinitis pigmentosa patogenezinde oksidatif stres ve inflamasyonun da yer aldığı gösterilmiştir [172].

Tüm bu bilgilere ve yapılan kapsamlı çalışmalara rağmen, Retinitis pigmentosa' nın mekanizması ve dolayısıyla uygun tedavi şekli hâla net şekilde aydınlatılamamıştır. Yine de ağırlıklı olarak hastalığın ilerleyişini yavaşlatabilmeyi ya da seyrini hafifletebilmeyi hedefleyen tedavi yöntemleri mevcuttur. Bunlar arasında A vitamini ve retinoid desteklerin palyatif kullanımı ilk sırada gelmektedir. İlerlemiş vakalarda gen terapileri ve cerrahi yaklaşımlar da uygulanmaktadır .

Fotoreseptörlerin dejenerasyonunda artmış oksidatif stres ve DNA hasarlarının yer aldığını gösteren çalışmalar bulunduğu için, kalıtsal retinal dejenerasyonlarda vitamin A, vitamin E ve çeşitli antioksidanlar yaklaşık yirmi yıldır önerilmektedirler [255, 256]. Yine de bu şekilde fotoreseptörleri destekleyen ve antioksidanları içeren klasik nöroprotektif yaklaşım, özellikle hücre ölümü mekanizmaları devreye girmeye başladığında, dejenerasyonu önlemede yetersiz kalmaktadır. Ayrıca özellikle vitamin A kullanımında oldukça dikkatli olmak gerektiği, A vitaminin yüksek dozda ve uzun süre kullanımda birikerek toksik etki oluşturabileceği unutulmamalıdır.

Fotoreseptör dejenerasyonunun ve ölümünün önüne geçebilmek ya da retinal dokuda endojen sağ kalım mekanizmalarını çalıştırabilmek adına uygulanan nöroproteksiyon yaklaşımında ise; siliyer nörotrofik faktör (CNTF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) kullanılmaktadır [257-261].

Tedavi seçeneklerinde teorik olarak kalıtsal retinal dejenerasyona neden olan genin, gen tedavisi ile düzeltilmesi en ideal yol gibi görünse de Retinitis pigmentosa gibi yüksek genetik heterojenite gösteren vakalarda bunu gerçekleştirmek oldukça güç olmaktadır. Ayrıca gen tedavisinin olumlu

sonuçlar verebilmesi için hastanın fotoreseptörleri henüz çok fazla dejenere olmadan önce müdahale etmek gerekmektedir. Kalıtsal retinal dejenerasyonlarda rol oynayan genleri ele alan bir başka tedavi metodunda ise optogenetik yaklaşım sayesinde viral transdüksiyonla hedef gen dağıtımı yapılarak bipolar hücreler, ganglion hücreleri veya henüz dejenere olmamış koni fotoreseptörleri gibi retina hücrelerinde ışık hassasiyetini indüklemek amacıyla çalışmalar yapılmaktadır [262].

Bu durumda mutasyondan bağımsız olarak gerçekleştirilen, genetik defekt taşımayan insan embriyonik ya da pluripotent kök hücrelerinin dejenere olmuş fotoreseptörlerin yerine transplante edilmesi gibi tedavi seçenekleri olumlu sonuçlar verebilmektedir [263-266]. Benzer şekilde son yıllarda üzerinde daha da çok çalışılan retinal protezler de mutasyondan bağımsız bir tedavi seçeneği olmakla birlikte [267-271] gen tedavileri de dahil olmak üzere, bu tür yöntemlerde cerrahi müdahaleler gerektiği ve bu durum da görme yetisi açısından bir risk oluşturduğu için genellikle yüksek oranda fotoreseptörler geri dönüşsüz olarak dejenere olduktan sonra denenilen tedavi yöntemleridir.

2.12. Kalıtsal Retinal Dejenerasyonlarda Kullanılan Deney Hayvanı Modelleri

İnsanlarda belirli bazı genetik mutasyonlar nedeniyle gelişim gösteren kalıtsal retinal dejenerasyonları çalışmak için, bu mutasyonlarla homolog mutasyonlara sahip oldukları belirlenen bazı fare ve rat modelleri kullanılmaktadır.

İlk defa 1924’ te C. E. Keeler adlı araştırmacı bazı farelerin fotoreseptörlerinin olmadığını keşfederek bu farelere “rodless” (r) adını vermiştir [272]. Daha sonra ise 1951’ de Brückner adlı bir başka araştırmacı, yaşamakta olduğu Basel şehrindeki farelerin yaklaşık yarısının Keeler’ in bahsettiği gibi fotoreseptörleri olmayan fareler olduğunu keşfederek onlara “retinal degeneration” teriminin kısaltması olacak şekilde “rd fareler” demiştir [273]. Eş zamanlı olarak aynı fenotipik özellikleri gösteren ve otozomal resesif şekilde kalıtılan fare suşları üretilerek PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile bu suşların orijinal rodless (fotoreseptörlerden yoksun) fareler olduğu da gösterilmiştir [274]. Böylece PDE6- β geninin alt biriminde mutasyon ile oluşturulan rd fareler, “rd1” ismini alarak Retinitis pigmentosa çalışmaları için ana hayvan modellerinden biri olmuşlardır. Benzer şekilde aynı mutasyon tipini taşıyan bir başka fare modeli de rd10 olup o da otozomal resesif Retinitis pigmentosa için iyi bir çalışma modeli oluşturmuştur ve 2002’ de Chang tarafından keşfedilmiştir [275]. Rd1 ve rd10 fare modelleri arasındaki fark ise fotoreseptör hücre

ölümü pikinin yaşandığı gün bakımından olmuştur. Rd1 modelinde fotoreseptör hücrelerin ölümünün pik yaptığı gün; retinal yapıların tamamen gelişimlerini tamamlamamış oldukları doğum sonrası (Post natal / PN) on üçüncü gün olarak belirlenmişken, rd10 modelinde fotoreseptör ölümünün pik yaptığı günden önce retinal gelişimin tamamlandığı görülmekte ve fotoreseptör ölümünün pik yaptığı gün PN23 olarak bilinmektedir [276, 277]. PDE6- α geninde mutasyon oluşturularak üretilen fareler de vardır. Bu fare modelleri de V685M, R562W ve D670G' dir [278]. Otozomal resesif akromotopsi gibi özellikle koni fotoreseptörlerindeki hücre ölümüne bağlı dejenerasyonları incelemek üzere üretilen ve “Koni fotoreseptör fonksiyon kaybı-1” olarak isimlendirilen cpfl-1 model farelerde ise PDE6C geni mutasyonu bulunmaktadır [279].

P23H fare modelleri ise otozomal dominant Retinitis pigmentosa çalışılmasına uygun, rodopsin geni mutasyonu sayesinde rod fotoreseptörlerindeki opsin pigmentinin görevini yerine getiremeyeişine bağlı olarak kalıtsal retinal dejenerasyonlarda özellikle Rod fotoreseptörleri üzerinde çalışmaya elverişli bir deney hayvanı modelidir [280]. Ona oldukça benzer şekilde “S334ter rat modeli” nde de rodopsin geni mutasyonu ve Rod fotoreseptörleri işlevsizliği görülmektedir [281].

Peripherin (PRPH2) genindeki bir mutasyon nedeniyle fotoreseptörlerin dış segmentlerinin gelişimi baskılanan ve bu nedenle kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinde kullanılan fare modeli ise “rd2 fareler” dir. Bizim çalışmamızda da bu fare modeli kullanılmış olup “yavaş gelişen fotoreseptör dejenerasyonu modeli” olarak da bilinmektedir. Çünkü yukarıda da bahsedildiği üzere, rd1 modelindeki fotoreseptör dejenerasyon piki PN13' te görülürken rd2 modelinde fotoreseptör dejenerasyon pikinin PN18 olduğu bilinmektedir [190].

Öte yandan in vivo retinal preparatlarda kullanılmak üzere belirlenen, herhangi bir mutasyon içermedikleri için sağlıklı retinal dokulara sahip olan fare modelleri de vardır. Bunlar C3HBl6 ve WtBl6 (Wild type Black 6)' dir. Esasen genetik mutasyona sahip, retinal dejenerasyonun çalışılmasına imkan veren deney hayvanı modelleri de bu iki sağlıklı fare modelinden birinin transgenik hâle getirilmesiyle üretilmektedirler. Bu tez çalışmasında da in vivo retinal preparatlarda sağlıklı retinal yapının da araştırılmasını ve niteliğinin belirlenmesini istediğimiz alanlarda WtBl6 fareler kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar

a) PB (Phosphate Buffer - 20X)

A solüsyonu: 6,89 gr NaH_2PO_4 , 250 ml distile suyla karıştırılır (0,2 M; pH=4)

B solüsyonu: 14,19 gr NaH_2PO_4 , 500 ml distile suyla karıştırılır (0,2 M; pH=11)

A ve B solüsyonları karıştırılıp pH' ı 7,4' e ayarlanır.

b) PBS (Phosphate Buffer Saline)

PB stok solüsyonu (20X) distile su ile dilue edilir (1:20). 0,1M PB elde edilir.

0,1M PB' ye 9 gr/L NaCl eklenir (0,1 M; pH=7,4)

c) TBS (Tris Buffer Saline) (50mM)

6,06 gr Tris, 900 ml distile suya eklenir. pH' ı 7,6' ya ayarlanır.

Son hacmi 1000 ml oluncaya dek distile su eklenmeye devam edilir.

9 gr NaCl eklenir.

d) PFA (Paraformaldehyde)

0,1 M PB içinde %4' lük 100 ml PFA hazırlamak için:

4 gr paraformaldehit, 0,1M' lık 50 ml PB içinde, çözündürülür.

Magnetle karıştırılması sağlanarak 60 santigrat derecede 45 dakika ısıtılır.

10 damlaya yakın NaOH eklenir (solüsyon berrak görününceye dek)

Son hacmi 100 ml yapmak üzere, 50 ml 0,1M PB eklenir.

pH' ı 7,4' e ayarlanır.

e) Blok Solüsyonu (50 ml)

%100' lük 5 ml normal keçi serumu (NGS) ile

%10' lik 5 ml sığır serum albumini (BSA)

%0,1' lik 40 ml PBST' de (PBS + %0,1 ya da %0,3 Triton) dilue edilir.

f) Proteinaz-K Solüsyonu:

pH' ı 7,6 olan 50mM Tris ya da TBS' ten 42 ml,
Proteinaz K' dan 6µl alınarak küçük bir şalede karıştırılır.

g) Alkol - Asetik Asit Solüsyonu:

%70' lik Etanolden (EtOH) 49 birim,
%30' luk Asetik asitten 9 birim,
H₂O' dan 21 birim alınarak karıştırılır.

h) TUNEL Yöntemi İçin Blok Solüsyonu (50 ml):

%100' lük 5 ml normal keçi serumu (NGS),
%10' lik 5 ml sığır serum albumini (BSA),
%0,1' lik 1,5 ml PBST (PBS + %0,1 ya da %0,3 Triton),
1250 µl balık jelatini; hepsi karıştırılıp homojen hâle getirilip,
Üzerine, 50 ml' ye tamamlanıncaya kadar PBS eklenir.

3.2. Organotipik Retinal Doku Kültürleri

Bu çalışma Eberhart Karls Üniversitesi (Tübingen Üniversitesi / Almanya) Oftalmik Araştırmalar Enstitüsü' nde gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan sağlıklı (WtBl6) ve kalıtsal retinal genetik mutasyonlu hayvanlar (rd2) Prof. Dr. Per Extröm' den (Lund Üniversitesi) temin edilmiş olup deneyin gerçekleştirilmesi için gerekli etik izin ve beyanlar Tübingen Üniversitesi Deney Hayvanları Koruma Komitesi' nden alınmıştır. Temin edilen bu hayvanlar Tübingen Üniversitesi Oftalmik Araştırmalar Enstitüsü' nde çoğaltılarak toplamda 6 sağlıklı WtBl6 ve 63 adet de rd2 model genetik mutasyonlu fare deneysel çalışmalara dahil edilmiştir. Deneyde kullanılan tüm prosedür ve yöntemler, oftalmik ve görme ile ilgili tüm araştırmalar deney hayvanlarının kullanımına yönelik ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) beyanına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. (*Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlicher Dienst und Labortierkunde directed by Dr. Franz Iglauer - Dr. Franz Iglauer tarafından yönetilen hayvan refahı, veterinerlik hizmeti ve laboratuvar hayvan bilimi kurumu*).

Deneyde kullanılmak üzere çoğaltılan hayvanlar standart 12 saat gece/12 saat gündüz olacak şekilde ışık/zaman ayarına maruz bırakılarak suya ve beslenmeye serbest erişimleri sağlanmıştır. Deneyde kullanılan hayvanlarda cinsiyet gözetilmemiş olup deneysel modelin tamamında mümkün olabilecek en az hayvan sayısında kalabilmek için azami çaba sarf edilmiştir.

9 günlük (PN9) Wt ve rd2 fareler yeterli CO₂ diffüzyonu ve servikal dislokasyon uygulanarak ötenazileri gerçekleştirildikten sonra steril koşullara uyularak gözleri alındı. Çıkarılan organlar 5 dakika boyunca Bazal Medium' da (R16 mediumu) yıkanarak %0,12' lik Proteinaz K' da, 37 santigrat derecede (°C) 15 dakika inkübasyona bırakıldılar. Daha sonra Bazal Medium (R16) ve FCS (fetal inek serumu) içeren serum sıvısında yıkandılar. Akabinde yeniden yalnızca Bazal Medium' da (R16) yıkanıp yine medium içerisindeyken mikroskop altına alındılar. Mikroskop altında gözlerin ön segmenti (kornea), sklerası, lensi, koroidi ve vitreusları (vitröz sıvı) çıkarıldıktan sonra RPE (retinal pigment epitelyum) ve nöral retina kalmış oldu. Hâla oval şeklini koruyan RPE ve retina, dört köşesinden kesilerek yonca şeklini alması sağlandı. Bu şekle getirilmiş ve tamamen düz konuma gelmiş olan retinal dokular 6'lı-well plate kültür membranları (Milipore, Katalog No: PIHA03050) üzerine pipetlenerek alındılar. Bu noktada fotoreseptörlerin aşağıya doğru, Ganglion hücrelerinin ise yukarıya doğru konumlanmış olmalarına dikkat edildi. Her bir retinal dokunun yerleştirilmiş olduğu her bir well-plate, Complete Medium (R16 + supplementler) adı verilen bir besleme mediumu ile doldurularak, 37°C ve %5 CO₂ koşullarına ayarlanmış olan inkübatöre yerleştirildi ve iki gün boyunca kültür adaptasyonuna bırakıldı (PN9 - PN11. günler). Complete Medium' un içinde R16-Bazal Medium haricinde; B12 vitamini, C vitamini, BSA, Progesteron, Glutatyon, Linolik asit ve insülin gibi supplementler bulunmaktaydı.

İki günlük kültür adaptasyonu sürecinden sonra PN11' den itibaren PARP inhibitörleri ile tedavilerine başlanan retinal kültürlerin toplamda 20 tanesi PARP inhibitörlerinden Olaparib tedavisi grubunda, 16 tanesi PARP inhibitörlerinden BMN-673 tedavisi grubunda ve 20 tanesi PARP inhibitörlerinden 3AB tedavisi grubunda yer almış oldu. Hiçbir tedavi grubuna dahil edilmeyen ve rd2 retinal dejenerasyon modelinin karakteristiğini gözlemlemek üzere kullandığımız 7 adet rd2 retinal kültür ise “in vitro retinal kültür kontrol grubu” olarak bırakıldı.

PARP inhibitörleri ile tedavileri PARP inhibitörünün (Olaparib, BMN-673 ya da 3-Aminobenzamid) DMSO (Sigma, D2650) ile çözünmesini takiben retinal doku kültürlerinin bulunduğu well-platelere eklenmesi şeklinde gerçekleşti. İn vitro retinal doku kültürlerinin tamamı için tedavi süreci PN11' de başlayıp PN18' de sona erdirildi ve bu süreç boyunca her iki günde bir retinal dokunun içerisinde bulunduğu medium (R16+Supplementler+PARP inhibitörü) değiştirilerek ait olduğu gruba ilişkin PARP inhibitörü eklenmiş oldu. Bununla birlikte PARP inhibitörlerinden Olaparib için toplamda 4 farklı dozla tedavi (10nM, 100nM, 1µM, 10µM); BMN-673 için toplamda 3 farklı dozla tedavi (1nM, 3nM, 10nM); 3AB için toplamda 4 farklı dozla tedavi (1nM, 10nM, 100nM, 1µM) gerçekleştirilmiş oldu. PN18. günde tedavi süreçleri sonlandırıldı.

3.3. Cryofiksasyon Yöntemi

PARP inhibitörleriyle tedavi süreçleri sonlanan ya da hiç PARP inhibitörü tedavisi uygulanmadan yalnızca Complete Medium' ları değiştirilerek PN18' e dek gelen kontrol grubuna ait rd2 in vitro retinal kültürlerine Cryofixation yöntemi uygulanarak kryokesitleri alındı. Cryofiksasyon için %4' lük Paraformaldehit solüsyonu fiksatif olarak kullanıldı ve dokular 45 dakika boyunca Paraformaldehite konuldular. Daha sonra 10 dakika PBS' le yıkanarak artan sükröz serilerinden geçirildiler. Bu aşamada %10' luk sükrözde 10 dakika, %20' lik sükrözde 20 dakika ve %30' luk sükrözde 30 dakika ile 2 saat arasında bekletildiler. Bunu takiben ise aliminyum folyodan hazırlanmış ve TissueTek (OCT) (Jung, Leica Instruments) ile doldurulmuş olan kutucukların içine mikroskop altında dikkatlice yerleştirilerek ve bu kutucukların da sıvı azot dolu kap içine konulup 2 saat kadar bekletilmesiyle retinal dokular kesit almaya uygun bloklar hâline getirilmiş oldular. Bloklar -20°C' de saklanarak Cryomikrotom ile (Leica CM3050S Microtome, Leica Biosystems) 12µm kalınlığında, her bir denek için 15 lam ve her bir lamın üzerinde 4 ayrı doku olacak şekilde, aynı zamanda lamlar üzerine gelen doku dağılımlarının normale yaklaşabilmesi için her 15 doku kesiti 15 farklı lama gidecek şekilde alındılar (Örneğin ilk lamda; ilk alınan (1.), 16. alınan, 31. alınan ve 46. alınan doku parçası bulunuyordu). Doku örnekleri ile dolu olan lamlar yaklaşık 1 saat 37°C 'de kurutularak boyamaları; ve ağırlıklı olarak Dış Nükleer Tabaka' da (DNT) olmak üzere, Dış Segment (DS) ve Ganglion Hücre Tabakası' nda da (GHT) incelemeleri yapılmak üzere -20°C 'de saklandılar.

İn vivo retinal doku çalışmaları için de in vitro çalışmadakilerle aynı organotipik kültür basamakları uygulandı. Toplamda 12 adet WtBl6 sağlıklı fare retinal dokusu ile 14 adet rd2 kalıtsal genetik mutasyonlu fare retinal dokusu için; PN9’ da başlayan retinal preparasyon süreci her iki günde bir Complete Medium’ larının değiştirilmesiyle birlikte; bazıları için PN15’ te, bazıları için PN18’ de ve bazıları için de PN24’ te sonlandırıldı. Ve sonlanan in vivo retinal preparatlar direkt Cryosectioning yapılmak üzere TissueTek (OCT) dolu kutucukların içine gömülerek bloklar hâline getirildiler ve ince kesitleri alındı. Her bir deney hayvanı için 15 lam üzerine toplamda 45 adet doku örneği (in vivo preparatlarda bir lama üçer adet doku örneği yerleştirildi) alınarak -20°C’ de saklandı ve ilgili boyamaları yapıldı.

3.4. İmmunohistokimyasal Yöntem ile PAR Birikiminin Belirlenmesi

PAR immünohistokimyasal yöntemi 3,3’-Diaminobenzidin (DAB) boyaması olarak da bilinen, hücre çekirdeklerinde biriken PAR (Poli-ADP-riboz)’ ı hücre çekirdeğini siyah-koyu kahverengi renge boyayarak ifade eden bir yöntemdir. Süreçte, peroksidaz ve hidrojen peroksit varlığında oksitlenen ve enzimatik aktivite bölgesinde; kahverengi, alkolde çözünmeyen bir çökelti oluşturan, hem immünohistokimya hem de blotting uygulamalarında kullanılabilen DAB görev almaktadır. Bu yöntemin gerçekleştirilmesi için; -20 santigrat dereceden çıkarılan kesitler 1 saat 37 °C ‘de inkübatörde bekletilip 5 dakika PBS’ te yıkandılar. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak, spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için 20 dakika boyunca, oda sıcaklığında (%40 Metanol + %0,1’ lik PBST içinde hazırlanan %3 Hidrojen peroksit) solüsyonunda tutuldular. Üç kez beşer dakika olmak üzere yeniden PBS’ le yıkayıp Blok Solüsyonu’ na alındılar. 1 saat boyunca oda sıcaklığında blok solüsyonu içinde bekleyen kesitlere, yine Blok Solüsyonu içinde 1:200 oranında dilue edilen PAR primer antikoru (Enzo Life Sciences, Katalog No:ALX-804-220-R100) uygulandı ve +4°C ‘de bir gece boyunca bırakıldılar. Ertesi sabah üç kez onar dakika PBS’ le yıkanan kesitlere biotinlenmiş sekonder antikor (anti-mouse) (Vector laboratories) 1:100 oranında Blok Solüsyonu ile dilue edilerek uygulandı. Yeniden üç kez onar dakika PBS ile yıkanan kesitler, Avidin-Biotin horseradish peroxidase’ a oda sıcaklığında, 1 saat tabi tutuldular. Bu aşama için A ve B reaktifleri (Vector Laboratories) 1:150 oranında PBS’ te, ışık almamasına dikkat ederek hazırlandı. Daha sonra PB ile üç kez onar dakika yıkanan kesitler, 5-10 dakika boyunca DAB (3,3’-Diaminobenzidin) (DCS-Inovative) boyasına tabi tutuldular. Boya solüsyonunun hazırlanması için 0,1M PB, %20 Glikoz, Glikozoksidaz, %0,4 NH₄Cl, %1 Nikel amonyum sülfat ve DAB kullanıldı. Bu aşama; DAB’ ın aşırı boyamasını önlemek ve

kesitin karakteristiğini kaybetmemesi için ikinci dakikadan itibaren hızlı aralıklarla mikroskop altında kesitlerin kontrolleri yapılarak gerçekleştirildi. Mikroskop altında spesifik reaksiyon görüldüğünde kesitler PBS ile yıkanarak reaksiyon durduruldu. Yeniden üç kez onar dakika PBS ile yıkanan kesitler Aquatex (Merck) ile kapatılarak -20°C 'de saklandılar.

3.5. TUNEL ile Fotoreseptör Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Hücre ölümü TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) ile DNA fragmentasyonunun tespiti üzerinden belirlenebilmektedir. Biz de çalışmamızda fotoreseptör hücre ölümlerini belirlemek üzere bu yöntemi kullandık. İn situ TUNEL kiti yardımıyla gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, -20°C 'den çıkardığımız kesitleri 1 saat 37°C 'de bekletip 10 dakika PBS' te yıkadık. Önceden 1:7 oranında hazırlayıp ılıtmış olduğumuz Proteinaz K-Tris karışımını, 5 dakika 37°C 'de kesitlere uyguladık. Kesitleri iki kez beşer dakika ile Tris-Buffer' la (TBS) yıkayıp 5 dakika boyunca Alkol-Asetik asit karışımının içinde beklettik. Yeniden iki kez beşer dakika TBS ile yıkadığımız kesitlere 1 saat boyunca, oda sıcaklığında TUNEL Blok Solüsyonu uyguladık. Ardından TUNEL kitindeki (Roche, Referans No: 11684795910) referanslara uyarak (kitin içerisinde Enzim ve İşaretleyici yer alıyor; bunları TUNEL Blok Solüsyonu ile karıştırmak gerekiyor) hazırlamış olduğumuz TUNEL Karışım Solüsyonunu kesitlere uygulayıp gece boyunca, oda sıcaklığında inkübasyonlarını sağladık. Ertesi gün tekrar iki kez beşer dakika PBS' le yıkadığımız kesitleri Vectashield/DAPI ile kapatarak -20°C 'de muhafazalarını sağladık.

3.6. İmmunfloresan Yöntemler

3.6.1. DAPI ile retinanın DNT kalınlıklarının belirlenmesi

Tedavi gruplarımız ve hiçbir tedavi uygulanmamış olan kalıtsal retinal dejenerasyonu olan rd2 retinal kültürler arasında, fotoreseptör hücre kayıplarının ne oranlarda olduğunu anlamak üzere fotoreseptör hücre çekirdeklerini içeren Dış Nükleer Tabaka ölçümlerini gerçekleştirmek istedik. Bu nedenle retinal dokunun tabakalarını ayırt etmemize olanak sağlayacak şekilde DAPI ile kesitleri boyadık. Aslında bu araştırmamız için özel olarak kesit boyamadık. Diğer immünboyama yöntemlerinde kullandığımız primer ve sekonder

antikorlardan sonra DAPI' li kapama solüsyonu (Linaris, Katalog No: H-1200) ile kesitleri kapatarak bu bulgu hakkındaki sonuçlarımızı elde etmiş olduk.

3.6.2. CAR (Cone-Arrestin) ile koni fotoreseptörlerinin belirlenmesi

Koni fotoreseptörlerini işaretlemek üzere gerçekleştirdiğimiz Cone-Arrestin indirekt immünfloresan boyama yöntemimiz için; -20°C 'den çıkardığımız kesitleri 1 saat 37°C 'de bekletip 10 dakika PBS' te yıkadık. Ardından spesifik olmayan bağlanmayı önlemek amacıyla; bir lam için en az 200 µl olmak üzere kullandığımız Blok Solüsyonunu kesitlere uygulayarak 1 saat oda sıcaklığında beklettik. Daha sonra Blok Solüsyonu içinde 1:100 oranında dilue ettiğimiz Cone-Arrestin (CAR) primer antikorunu (Milipore, Katalog No: AB15282) kesitlere uygulayarak gece boyunca, +4°C 'de inkübasyonlarını sağladık. Kontrol kesiti olarak seçtiğimiz bir kesite ise primer antikor uygulamayarak yalnızca Blok Solüsyonu uyguladık. Ertesi sabah üç kez onar dakika PBS' le yıkadığımız kesitlerimize sekonder antikor (Alexa 568) 1:350 oranında PBS ile dilue ederek uyguladık ve 1 saat, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyonlarını sağladık. Ardından üç kez onar dakika PBS ile yıkadığımız kesitlere DAPI+Vectashield uygulayarak lamellerini kapatıp -20°C 'de muhafaza ettik. CAR boyamasını in vitro retinal kültür çalışmalarında TUNEL ile kolokelize olarak gerçekleştirdik.

3.6.3. GFAP ile Müller hücre aktivasyonunun belirlenmesi

GFAP retinadaki Müller hücreleri tarafından üretilen Glial fibriler asidik protein' dir. Ayrıca kalıtsal fotoreseptör dejenerasyonlarında miktarının arttığı bilinmektedir [282]. Biz de çalışmamızda Müller hücre aktivasyonunu belirlemek üzere GFAP antikorunu ile indirekt immünfloresan boyama gerçekleştirdik. Bu amaçla -20°C 'den çıkardığımız kesitleri 1 saat 37°C 'de bekletip 10 dakika PBS' te yıkadık. Ardından spesifik olmayan bağlanmayı önlemek amacıyla kullandığımız Blok Solüsyonunu kesitlere uygulayarak 1 saat oda sıcaklığında beklettik. Daha sonra Blok Solüsyonu içinde 1:100 oranında dilue ettiğimiz GFAP primer antikorunu (Abcam, Katalog No: ab190288) kesitlere uygulayarak gece boyunca, +4°C 'de inkübasyonlarını sağladık. Kontrol kesiti olarak seçtiğimiz bir kesite ise primer antikor uygulamayarak yalnızca Blok Solüsyonu uyguladık. Ertesi sabah üç kez onar dakika PBS' le yıkadığımız kesitlerimize sekonder antikor (Alexa 488) 1:350 oranında PBS ile dilue ederek uyguladık ve 1 saat, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyonlarını sağladık.

Ardından üç kez onar dakika PBS ile yıkadığımız kesitlere DAPI+Vectashield (Linaris, Katalog No: H-1200) uygulayarak lamellerini kapatıp -20°C 'de muhafaza ettik.

3.6.4. CD9 ile ekstrasellüler vezikül aktivitesinin belirlenmesi

CD9' un Tetraspanin ailesinden bir protein olduğu ve hücre membranlarının yüzeyi ile dokuya ait artık maddeleri taşımakla görevli olduğu bilinen ekstrasellüler veziküllerin yüzeyinde bulundukları bilinmektedir [283]. Biz de çalışmamızda rd2 kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde hem in vivo retinal preparatlarda hem in vitro kültürlerde CD9 ifadenmesini araştırdık. Bu amaçla; -20°C 'den çıkardığımız kesitleri 1 saat 37°C 'de bekletip 10 dakika PBS' te yıkadık. Ardından spesifik olmayan bağlanmayı önlemek amacıyla kullandığımız Blok Solüsyonunu kesitlere uygulayarak 1 saat oda sıcaklığında beklettik. Daha sonra Blok Solüsyonu içinde 1:50 oranında dilue ettiğimiz CD9 primer antikoru (Abcam, Katalog No: ab92726) kesitlere uygulayarak gece boyunca, +4°C 'de inkübasyonlarını sağladık. Kontrol kesiti olarak seçtiğimiz bir kesite ise primer antikor uygulamayarak yalnızca Blok Solüsyonu uyguladık. Ertesi sabah üç kez onar dakika PBS' le yıkadığımız kesitlerimize sekonder antikor (Alexa 488) (İnvitrogen) 1:350 oranında PBS ile dilue ederek uyguladık ve 1 saat, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyonlarını sağladık. Ardından üç kez onar dakika PBS ile yıkadığımız kesitlere DAPI+Vectashield (Linaris, Katalog No: H-1200) uygulayarak lamellerini kapatıp -20°C 'de muhafaza ettik.

3.6.5. RHO ile dış segmentteki rodopsin yoğunluğunun belirlenmesi

Rodopsin, Rod fotoreseptörlerinin Dış Segment' lerinde bulunan ve fotoreseptörlerin fototransdüksiyon kaskadını doğru şekilde çalıştırıp görme olayını gerçekleştirebilmelerini sağlayan bir reseptör proteindir. Daha önce rd2 retinal kültürlerde, kalıtsal retinal dejenerasyon nedeniyle azalmış olduğu gösterilmiştir [190]. Biz de çalışmamızda Rodopsin' in ifadenmesini in vivo retinal dokularda ve in vitro retinal kültürlerde incelemek amacıyla; -20°C 'den çıkardığımız kesitleri 1 saat 37°C 'de bekletip 10 dakika PBS' te yıkadık. Ardından spesifik olmayan bağlanmayı önlemek amacıyla kullandığımız Blok Solüsyonunu kesitlere uygulayarak 1 saat oda sıcaklığında beklettik. Daha sonra Blok Solüsyonu içinde 1:50 oranında dilue ettiğimiz RHO primer antikoru (Merck Milipore, Katalog No: MAB5316) kesitlere uygulayarak gece boyunca, +4°C 'de inkübasyonlarını sağladık. Kontrol kesiti olarak seçtiğimiz bir kesite ise primer antikor uygulamayarak yalnızca Blok

Solüsyonu uyguladık. Ertesi sabah üç kez onar dakika PBS' le yıkadığımız kesitlerimize sekonder antikoru (Alexa 488) (İnvitrogen) 1:350 oranında PBS ile dilue ederek uyguladık ve 1 saat, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyonlarını sağladık. Ardından üç kez onar dakika PBS ile yıkadığımız kesitlere DAPI+Vectashield (Vector Lab.) uygulayarak lamellerini kapatıp -20°C 'de muhafaza ettik.

3.7. Kesitlerin Görüntülenmesi ve Analiz Edilmesi

Tüm bu yöntemlerle işaretlenmiş ve boyanmış olan kesitler, ApoTome2 ataçmanı bulunan Axiocam 506 monokameralı ve HXP-120V floresan lambalı Zeiss Imager Z.2 floresan mikroskopu ile (Carl Zeiss Microscopy) görüntülendi. 12µm kalınlığındaki kesitlere ait fotoğraflar Z-stack özelliği kullanılarak, 8-12 Apotome katmanının üst üste gelmesiyle, derinlemesine ve 20X ile 63X (bazı CD9 incelemeleri için) objektifleriyle çekildi ve Zen 3.1 Blue Edition programı kullanılarak analiz edildi. Temel olarak PAR birikimi, fotoreseptör hücre ölümü, fotoreseptör tabakası kalınlıkları ölçümü ve Koni fotoreseptörlerine dair araştırmaların hepsi retinanın Dış Nüklear Tabakası' nda (DNT) gerçekleştirilirken; GFAP yoğunlukları hem DNT hem İNT' de (İç Nüklear Tabaka) ImageJ programı ile alan ölçümleri yapılarak; CD9 hem DNT' de hem Ganglion Hücre Tabakası' nda (GHT) ImageJ ile alan ölçümleri yapılarak; RHO yoğunlukları da retinal dokuların Dış Segment' lerinde (DS) ImageJ programı ile alan ölçümleri yapılarak analiz edildi. PAR, TUNEL ve CAR yöntemlerinden elde edilen görüntülerde yapılan sayımlar manuel olarak gerçekleştirildi. Her bir boyama için her bir fareye ait en az 3 kesitte, toplam 12 retinal doku örneğinden; her bir doku örneğinden üçer adet olmak üzere, en az 36 adet görüntü alınarak analiz edilmiş oldu.

TUNEL ile kolokalize olarak gerçekleştirilen CAR (Cone-Arrestin) boyamalarındaki analiz Koni fotoreseptörlerinin hem yüzdelerinin hem de yoğunluklarının hesaplanması için gerçekleştirildi. Bu amaçla Zen Blue 3.1. programında görüntülediğimiz dokunun Dış Nüklear Tabakası' nın ortasından, yere paralel bir çizgi çekip bu çizginin üzerinden geçen Koni fotoreseptörü çekirdeği ya da uzantılarını saydık. Daha sonra o dokuya ait saymış olduğumuz Koni fotoreseptörü sayısını, program üzerinden ölçtüğümüz o dokuya ait toplam alanı ve yere paralel çizdiğimiz çizginin program üzerinden ölçtüğümüz uzunluğunu (µm) sitolojik yöntemlerle elde edilmiş olan Excel tablomuza girdiğimizde “toplam Koni fotoreseptörü sayısı/µm” formülü üzerinden Koni fotoreseptörlerinin yoğunluğunu; “toplam

Koni fotoreseptörü sayısı/toplam hücre sayısı” formülü üzerinden Koni fotoreseptörlerinin yüzdesini hesapladık. Görsellere ilişkin figürleri CorelDraw 2020 programı kullanarak oluşturduk.

3.8. İstatistiksel Analizler

Elde edilen tüm veriler GraphPad Prism 8.4.2 programında istatistiksel olarak analiz edildi. İkili karşılaştırmalar arasında öncelikle normal dağılım testi yapılarak normal dağılıma uygun olanlar için bağımsız t-testi; normal dağılıma uygun olmayanlar için Mann Whitney testi uygulandı. İki'den daha çok grubun karşılaştırmalarında ise tek yönlü ANOVA (varyans analizi) kullanıldı. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart hata (SEM) değerleri baz alınarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

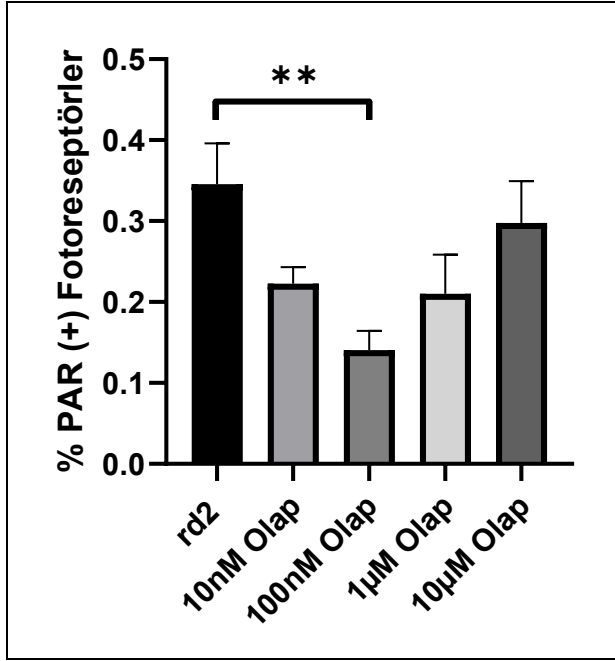
4.1. PAR Bulguları

Fotoreseptörlerdeki PAR (Poly-ADP riboz) birikimi PARilasyonun doğrudan bir işareti olduğu için öncelikli olarak ele alındı. Doğum sonrası 18. güne ait olan (Post natal/PN18) rd2 fare retinalarının dış nüklear katmanları incelenerek PAR birikimi açısından değerlendirildi. Bu değerlendirmede tüm tedavi gruplarında farklı konsantrasyonlardaki PARP inhibitörlerinin PAR birikimi üzerindeki etkisi incelendi. DAB boyaması uygulanan retinalardaki PAR birikimi, retinaların dış nüklear tabakalarındaki fotoreseptör çekirdeklerinde birikerek kahverengi - siyah noktalar şeklinde izlendi. Herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 grubundaki PAR birikimi, PARP inhibitörleri ile tedavi uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında Olaparib için 100 nM, BMN-673 için 3 nM ve 3AB için 10 nM en etkili dozlar olarak belirlendi. rd2 grubundaki PAR birikimi bu en etkili dozlardaki PAR birikimi ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha yüksek bulundu (Resim 4.1).

Olaparib grubundaki PAR birikimi dört farklı konsantrasyonda değerlendirildi. Bu konsantrasyonlar 10 nM, 100 nM, 1 μ M ve 10 μ M' dı. Fotoreseptör çekirdeklerindeki PAR birikimi dış nüklear tabakada siyah noktalar şeklinde izlendi (Resim 4.2). Herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 grubu ile 100 nM Olaparib uygulanan grup karşılaştırıldığında, PAR birikiminin rd2 grubunda anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlendi. Olaparib' in diğer konsantrasyonlarında ise PAR birikimi rd2 grubuna göre düşük olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Olaparib tedavisi uygulanan rd2 retinalar ile herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 retinalar arasındaki istatistiksel veriler Çizelge 4.1.' de verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.1. 'de istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Olaparib PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki PAR birikimine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	0,34	0,05	-
10 nM Ola	0,22	0,02	0,1503
100 nM Ola	0,14	0,02	0,0033
1 μ M Ola	0,21	0,04	0,1466
10 μ M Ola	0,29	0,05	0,8381

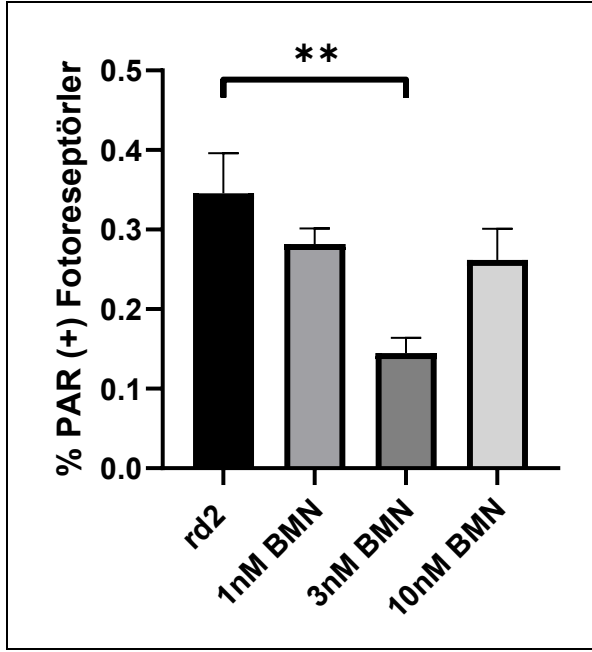


Şekil 4.1. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve Olaparib tedavisi uygulanan gruplar arasında PAR birikiminin karşılaştırılması ($p^{**}<0.01$)

BMN-673 grubundaki PAR birikimi üç farklı konsantrasyondaki tedavi gruplarında değerlendirildi. Bu konsantrasyonlar 1 nM, 3nM ve 10 nM' dı. Fotoreseptör çekirdeklerindeki PAR birikimi dış nükleer tabakada siyah noktalar şeklinde izlendi (Resim 4.3). Herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 grubu ile 3nM BMN-673 uygulanan grup karşılaştırıldığında, PAR birikiminin rd2 grubunda anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlendi. BMN-673' in 1 nM ve 10 nM olduğu tedavi gruplarında ise PAR birikiminin tedavi uygulanmayan rd2 grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. BMN-673 tedavisi uygulanan rd2 retinalar ile herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 retinalar arasındaki istatistiksel veriler Çizelge 4.2' de verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.2 'de istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda BMN-673 PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki PAR birikimine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	0,34	0,05	-
1 nM BMN-673	0,28	0,02	0,4670
3 nM BMN-673	0,14	0,02	0,0029
10 nM BMN-673	0,26	0,04	0,3780

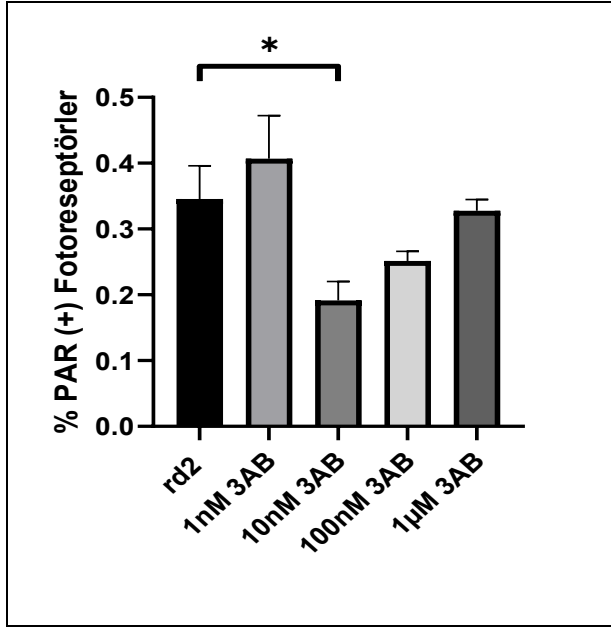


Şekil 4.2. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve BMN-673 tedavisi uygulanan gruplar arasında PAR birikiminin karşılaştırılması ($p^{**}<0.01$)

3AB grubundaki PAR birikimi dört farklı konsantrasyondaki tedavi gruplarında değerlendirildi. Bu konsantrasyonlar 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1 μ M' dı. Fotoreseptör çekirdeklerindeki PAR birikimi dış nüklear tabakada siyah noktasal birikimler şeklinde izlendi (Resim 4.4). Herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 grubu ile 10 nM 3AB PARP inhibitörü uygulanan grup karşılaştırıldığında, PAR birikiminin rd2 grubunda anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlendi. 100 nM 3AB' ın uygulandığı tedavi grubunda, rd2 grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da PAR birikimi açısından bir düşüş tespit edilirken 1 nM ve 1 μ M 3AB uygulanan tedavi gruplarındaki sonuç hiç tedavi uygulanmayan rd2 grubu ile hemen hemen aynı ya da ondan da bir miktar yüksekti. 3AB tedavisi uygulanan rd2 retinalar ile herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 retinalar arasındaki istatistiksel veriler Çizelge 4.3' te verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.3 'te istatistiki grafik olarak gösterildi.

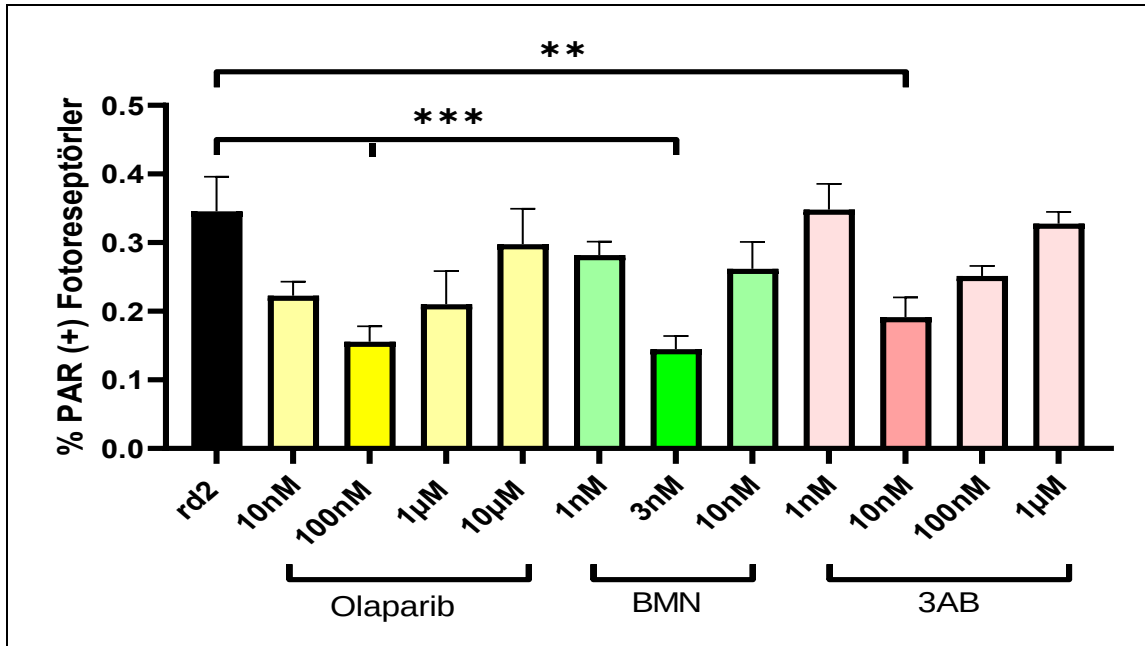
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda 3AB PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki PAR birikimine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	0,34	0,05	-
1 nM 3AB	0,40	0,06	0,70
10 nM 3AB	0,19	0,02	0,05
100 nM 3AB	0,25	0,01	0,34
1 μ M 3AB	0,33	0,02	0,89



Şekil 4.3. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve 3AB tedavisi uygulanan gruplar arasında PAR birikiminin karşılaştırılması ($p^* < 0.05$)

Tedavi uygulanmayan rd2 retinalar ile PARP inhibitörü tedavisi uygulanan tüm konsantrasyonlardaki rd2 retinaların PARilasyon belirteci olan PAR birikimi bakımından karşılaştırıldığı istatistiksel grafik Şekil 4.4' te verildi. Buna göre 100nM Olaparib, 3nM BMN-673 ve 10nM 3AB, PAR birikimini azaltmada anlamlı şekilde başarıyla Olaparib ve BMN-673' ün bu konuda 3AB PARP inhibitörüne göre daha etkili oldukları bulundu.



Şekil 4.4. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ile 3 farklı PARP inhibitörü ile tedavi uygulanan tüm gruplar arasında PAR birikiminin karşılaştırılması ($p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.0001$)

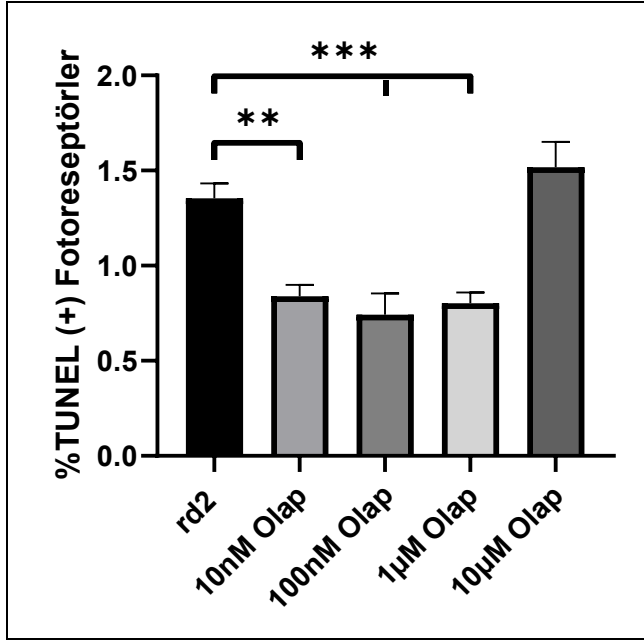
4.2. TUNEL Bulguları

Fotoreseptör hücre ölümlerinin değerlendirilmesi amacıyla uygulanan TUNEL yöntemi rd2 PN18 retinal kültürlerde gerçekleştirildi. Hem herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 grubunun hem de PARP inhibitörleriyle tedavi uygulanan rd2 retinaların dış nükleer tabakalarındaki TUNEL pozitif hücreler sayılarak istatistikleri oluşturuldu. Bu istatistikler hem her üç PARP inhibitörüne ait farklı konsantrasyonlarda hem de her bir PARP inhibitörünün en etkili bulunan dozları arasında yapılan karşılaştırmalarla belirlendi. Görüntülerdeki TUNEL pozitif fotoreseptör çekirdekleri fosforlu yeşil boyanmış noktalar olarak izlendi (Resim 4.5).

PARP inhibitörlerinden Olaparib ile tedavi edilen retinalardaki fotoreseptör hücre ölümü Olaparib' in dört farklı konsantrasyon grubunda değerlendirildi. Bu konsantrasyonlar 10 nM, 100 nM, 1 μ M ve 10 μ M' dı. Ölmüş fotoreseptörlere ait çekirdekler, retinanın dış nükleer tabakasında, fosforlu yeşil boyanmış noktalar olarak izlendi (Resim 4.6). Hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubu ile 10 nM, 100 nM ve 1 μ M Olaparib tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında Olaparib tedavisi uygulanan bu gruplarda TUNEL pozitif hücreler istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az bulundu. Bununla birlikte 100 nM Olaparib ve 1 μ M Olaparib uygulanan gruplarda anlamlılık daha da yüksekti. Buna karşın 10 μ M Olaparib uygulanan gruptaki TUNEL pozitif hücre yüzdesinin, hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 retina grubundaki TUNEL pozitif hücre yüzdesinden daha fazla olduğu tespit edildi. Olaparib tedavisi uygulanan rd2 retinalar ile herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 retinalar arasındaki istatistiksel veriler Çizelge 4.4' te verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.5 'te istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Olaparib PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki TUNEL pozitif hücre oranlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	1,35	0,07	-
10 nM Ola	0,83	0,06	0,0016
100 nM Ola	0,74	0,11	0,0001
1 μ M Ola	0,80	0,05	0,0008
10 μ M Ola	1,51	0,13	0,5812

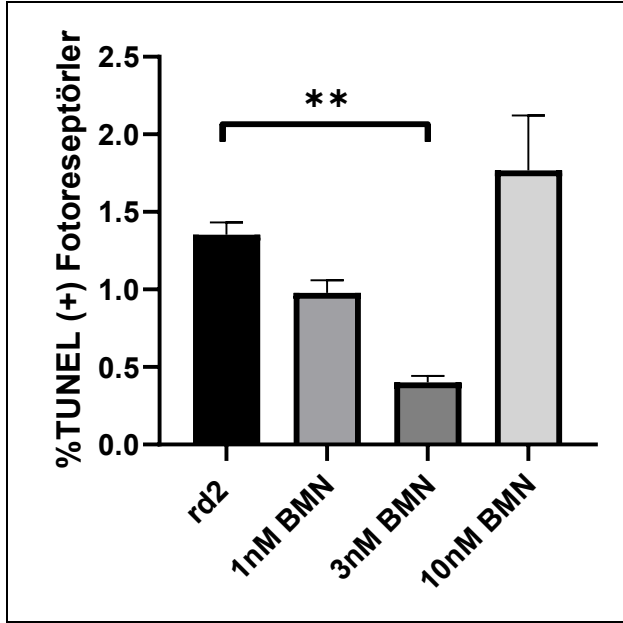


Şekil 4.5. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve Olaparib tedavisi uygulanan gruplar arasında TUNEL ile fotorseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması ($p^{**}<0.01$, $p^{***}<0.001$)

PARP inhibitörlerinden BMN-673 ile tedavi edilen retinalardaki fotorseptör hücre ölümü BMN-673' ün üç farklı konsantrasyon grubunda değerlendirildi. Bu konsantrasyonlar 1 nM, 3 nM ve 10 nM' dı. Ölmüş fotorseptörlere ait çekirdekler, retinanın dış nükleer tabakasında, fosforlu yeşil boyanmış noktalar olarak izlendi (Resim 4.7). Hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubu ile 3 nM BMN-673 tedavisi uygulanan grup karşılaştırıldığında 3 nM BMN-673 tedavisi uygulanan grupta TUNEL pozitif hücreler istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az bulundu. Fotorseptör hücre ölümü 1 nM BMN-673 uygulanan grupta da bir miktar azalmış olsa da anlamlı bir fark belirlenmedi. Buna karşın 10 nM BMN-673 grubunda hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubundan bile daha fazla oranda TUNEL pozitif hücre bulgusu saptandı. BMN-673 tedavisi uygulanan rd2 retinalar ile herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 retinalar arasındaki istatistiksel veriler Çizelge 4.5' te verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.6 'da istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda BMN-673 PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki TUNEL pozitif hücre oranlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	1,35	0,07	-
1 nM BMN-673	0,97	0,08	0,4130
3 nM BMN-673	0,40	0,04	0,0070
10 nM BMN-673	1,76	0,35	0,2986

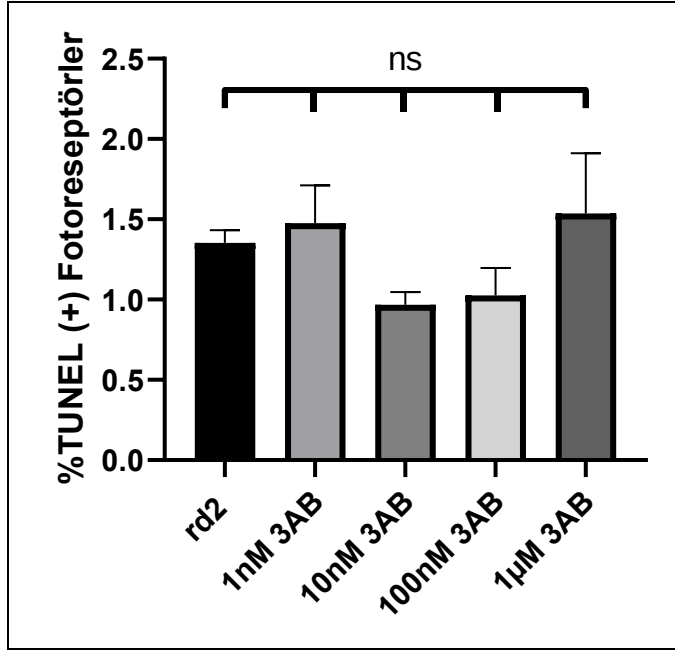


Şekil 4.6. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve BMN-673 tedavisi uygulanan gruplar arasında TUNEL ile fotorseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması ($p^{**}<0.01$)

PARP inhibitörlerinden 3AB ile tedavi edilen retinalardaki fotorseptör hücre ölümü 3AB' nin dört farklı konsantrasyon grubunda değerlendirildi. Bu konsantrasyonlar 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1 μ M' dı. Ölmüş fotorseptörlere ait çekirdekler, retinanın dış nükleer tabakasında, fosforlu yeşil boyanmış noktalar olarak izlendi (Resim 4.8). Hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubu ile 3AB tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında 10 nM 3AB PARP inhibitörü ile tedavi edilen grupta TUNEL pozitif hücreler belirgin şekilde daha az bulunurken istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. 100 nM 3AB ile tedavi edilen grup da TUNEL pozitif fotorseptör hücreleri azaltmada 10 nM grubuna yakın sonuçlar verdi. Buna karşın 1 nM ve 1 μ M dozlardaki tedavi gruplarında ölmüş fotorseptör hücre yüzdesi hemen hemen hiç tedavi uygulanmamış rd2 grubu ile aynıydı. 3AB PARP inhibitörü tedavisi uygulanan rd2 retinalar ile herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 retinalar arasındaki istatistiksel veriler Çizelge 4.6' da verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.7 'de istatistiki grafik olarak gösterildi.

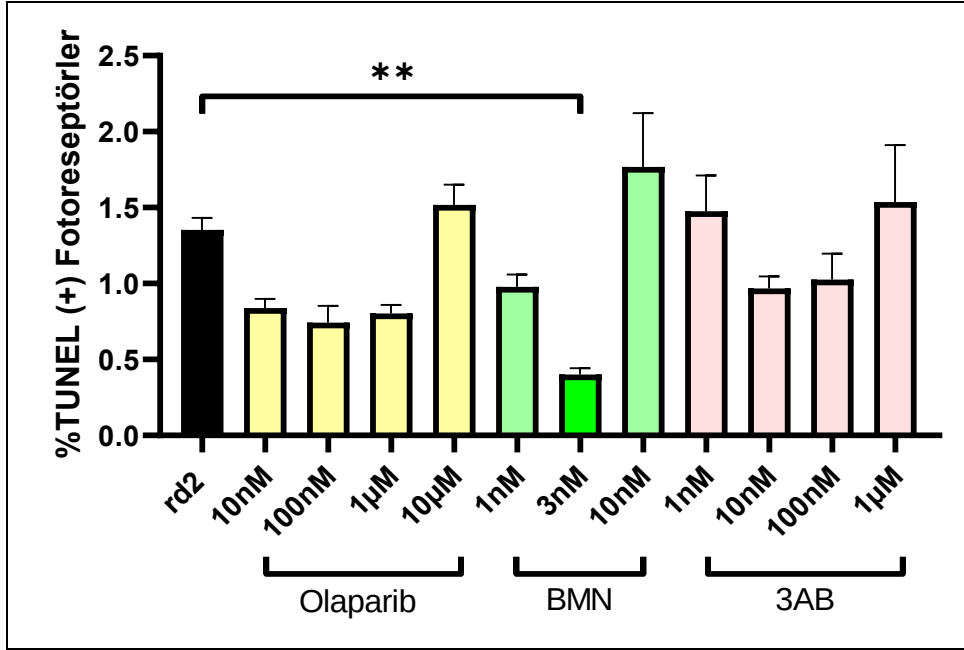
Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda 3AB PARP inhibitörü tedavisi uygulanan gruplardaki TUNEL pozitif hücre oranlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	1,35	0,07	-
1 nM 3AB	1,47	0,23	0,9712
10 nM 3AB	0,96	0,08	0,3881
100 nM 3AB	1,02	0,17	0,4885
1 μ M 3AB	1,53	0,37	0,9098

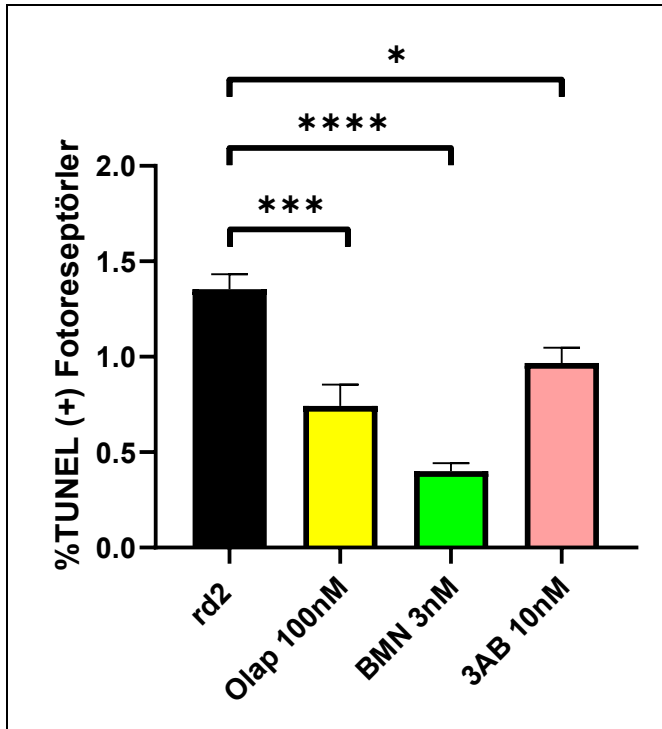


Şekil 4.7. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ve 3AB tedavisi uygulanan gruplar arasında TUNEL ile fotorseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması (ns>0.05 / no significance)

Tedavi uygulanmayan rd2 retinalar ile PARP inhibitörü tedavisi uygulanan tüm konsantrasyonlardaki rd2 retinaların fotorseptör hücre ölümü yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığı istatistiksel grafik Şekil 4.8’ de verildi. Bu veriye göre her bir PARP inhibitörü için en etkili dozlar 100 nM Olaparib, 3 nM BMN-673 ve 10 nM 3AB olarak görünmekle birlikte yalnızca 3 nM BMN-673’ ün istatistiksel olarak anlamlı şekilde fotorseptör hücre ölümünü azaltmada başarılı olduğu bulundu. Bununla birlikte PARP inhibitörlerinin tüm konsantrasyonları değil de yalnızca en etkili görünen konsantrasyonları olan 100 nM Olaparib, 3 nM BMN-673 ve 10 nM 3AB, hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 retinalarla karşılaştırıldığında her üç PARP inhibitörünün de fotorseptör hücre ölümünü anlamlı şekilde azalttığı görüldü. Ayrıca bu karşılaştırmada TUNEL pozitif hücre yüzdesini en anlamlı şekilde azaltan PARP inhibitörlerinden BMN-673 olurken, onu Olaparib ve sonra da 3AB takip etti (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ile 3 farklı PARP inhibitörü ile tedavi uygulanan tüm gruplar arasında TUNEL yöntemi ile fotorseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması ($p^{**}<0.01$)



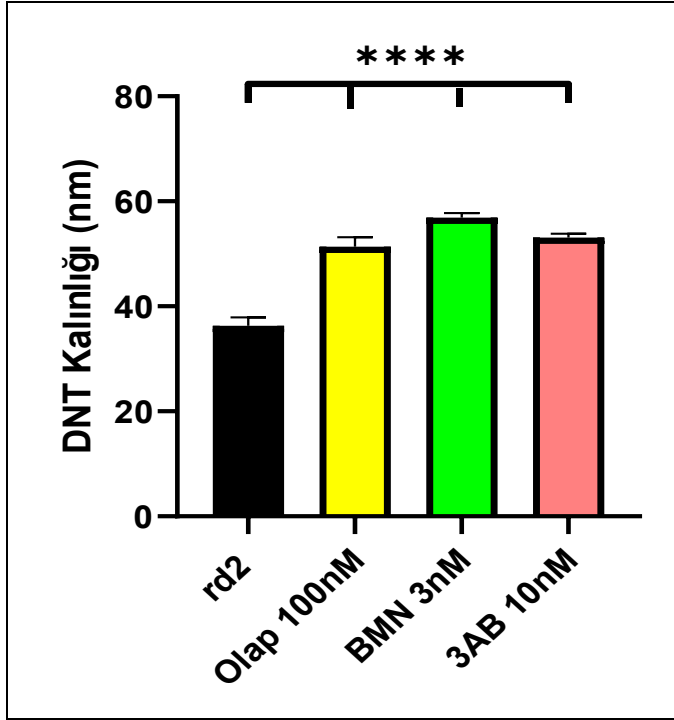
Şekil 4.9. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ile 3 farklı PARP inhibitörün en etkili bulunan doz grupları arasında TUNEL yöntemi ile fotorseptör hücre ölümlerinin karşılaştırılması ($p^{*}<0.05$, $p^{***}<0.001$, $p^{****}<0.0001$)

4.3. Dış Nükleer Tabaka Kalınlığı Bulguları

Dış nükleer tabaka, fotoreseptör çekirdeklerini içeren tabaka olduğu için tedavi uygulanmayan ve uygulanan gruplar arasında bu tabakadaki kalınlık farkları ölçüldü. PAR ve TUNEL bulgularından sonra gerçekleştirilen bu çalışmaya her üç PARP inhibitörünün de tüm konsantrasyonları değil, yalnızca fotoreseptörleri korumada en etkili bulunan dozları dahil edildi. rd2 PN18 retina grubu ve 100 nM Olaparib, 3 nM BMN-673, 10 nM 3AB ile tedavi edilen rd2 PN18 retina gruplarının karşılaştırıldığı bu ölçümde, her üç PARP inhibitörünün de dış nükleer tabaka kalınlığını herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 grubuna göre anlamlı şekilde artırmayı başardığı bulundu (Resim 4.9, 4.10, 4.11, 4.12). Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozlarının fotoreseptörleri korumada anlamlı şekilde başarılı oldukları gösterildi. Bununla birlikte 3nM BMN-673 ile tedavi edilen retinalarda dış nükleer tabaka kalınlığı en yüksek bulundu. Bunu önce 100nM Olaparib grubu, sonra da 10nM 3AB grubu izledi. PARP inhibitörleri ile tedavi edilen rd2 retinalar ile herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 retinalar arasındaki istatistiksel veriler Çizelge 4.7’ de verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.10 ‘da istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.7. Her üç PARP inhibitörünün de en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplardaki Dış Nükleer Tabaka (DNT) kalınlıklarının ölçümüne ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	36,29	1,61	-
100 nM Olaparib	51,40	1,77	<0,0001
3 nM BMN-673	56,87	0,88	<0,0001
10 nM 3AB	53,08	0,75	<0,0001



Şekil 4.10. Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 retinal kültürler ile 3 farklı PARP inhibitörün en etkili bulunan dozları ile tedavi uygulanan gruplar arasında DNT kalınlıklarının karşılaştırılması ($p^{****}<0.0001$, DNT: Dış Nüklear Tabaka)

4.4. Cone-Arrestin Bulguları

Retinaların dış nüklear tabakasındaki Koni fotoreseptörlerinin, kesitin genelindeki hem yüzdece oranlarını hem de yoğunluklarını karşılaştırmak üzere yaptığımız çalışmada hem in vivo doku preparatları hem de in vitro kültürler kullanıldı.

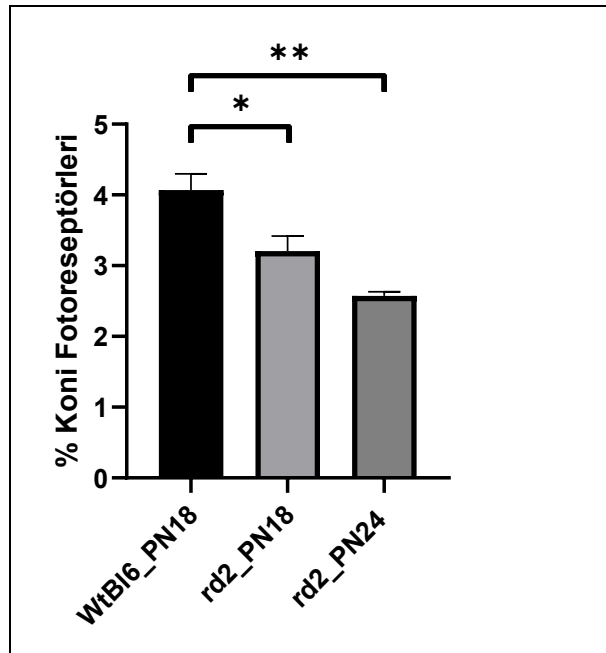
İn vivo çalışmasında herhangi bir defekt taşımayan, sağlıklı WtBl6 PN18 retinalar ile herhangi bir tedavi uygulanmamış rd2 PN18 retina grubu ve rd2 PN24 retina grubu karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmada retinaların dış nüklear tabakalarındaki Koni fotoreseptörlerine odaklanıldı.

Wt PN18 retinalarda Cone-Arrestin ile boyanan Koni fotoreseptörlerinin çekirdek ve uzantıları belirgin şekilde Arrestin boyası ile kırmızı renk boyanmışken rd2 PN18 ve rd2 PN24 retinalarda Arrestin ile boyanan Koni fotoreseptörleri daha az miktarda görüldü (Resim 4.13, Resim 4.14, Resim 4.15). Dış nüklear tabakanın ortasına paralel şekilde bir çizgi çekildiğinde çizginin tam üstüne ya da alt kadrajına ulaşabilen toplam Koni fotoreseptörü yüzdesinin Wt PN18 retinalarda rd2 PN18 ve rd2 PN24 retinalara göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu bulundu. Bu çalışma ile ilgili istatistiksel veriler Çizelge 4.8' de

verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.11 'de istatistiki grafik olarak gösterildi. Bununla birlikte Koni fotoreseptörlerinin kesitlerin genelindeki yoğunluğu bakımından incelendiği; Wt PN18 retinalar ile rd2 PN18 ve rd2 PN24 retinalar arasındaki istatistiksel veriler Çizelge 4.9' da verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.12 'de istatistiki grafik olarak gösterildi. Kesitlerin genelinde Koni fotoreseptörü yüzdesi ve yoğunluğu incelendiğinde rd2 PN18' deki koni fotoreseptörü varlığının rd2 PN24' ten daha fazla olduğu tespit edilirken gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çizelge 4.8. Sağlıklı WtB16 PN18 ve retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 ile rd2 PN24 retinal grupları arasında Koni fotoreseptörlerinin yüzde oranlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

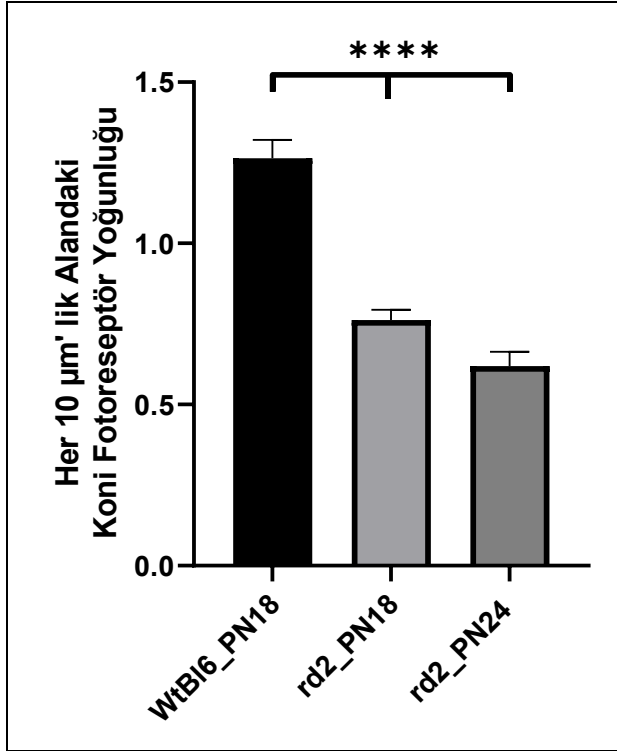
Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
WtB16 PN18	4,07	0,22	-
Rd2 PN18	3,20	0,21	0,02
Rd2 PN24	2,57	0,05	0,0020



Şekil 4.11. Sağlıklı Wt PN18 retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 ve rd2 PN24. günlerdeki retinaların Koni fotoreseptör yüzdeleri bakımından karşılaştırılmaları ($p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$)

Çizelge 4.9. Sağlıklı WtB16 PN18 ve retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 ile rd2 PN24 retinal grupları arasında Koni fotoreseptörlerinin birim alandaki yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
WtB16 PN18	1,26	0,05	-
Rd2 PN18	0,76	0,03	<0,0001
Rd2 PN24	0,61	0,04	<0,0001

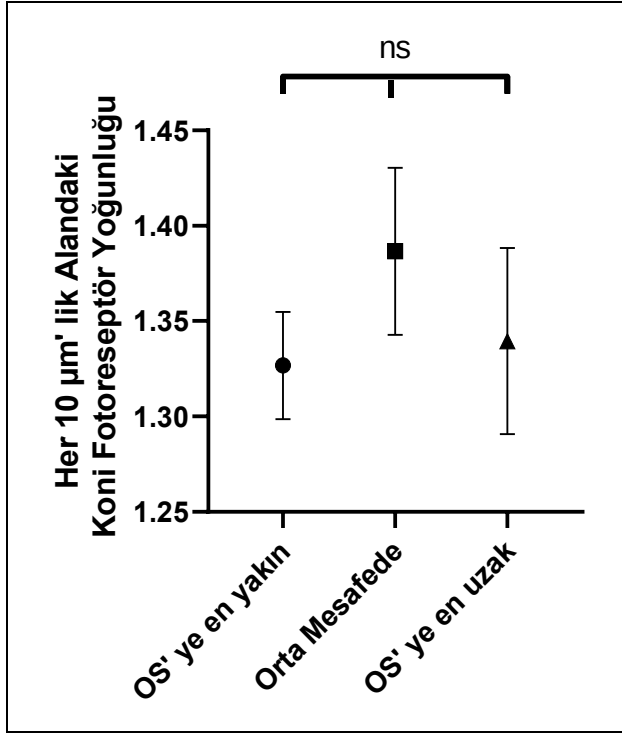


Şekil 4.12. Sağlıklı Wt PN18 retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 ve rd2 PN24. günlerdeki retinaların birim alanda içerdikleri Koni fotoreseptör yoğunlukları bakımından karşılaştırılmaları ($p^{****}<0,001$)

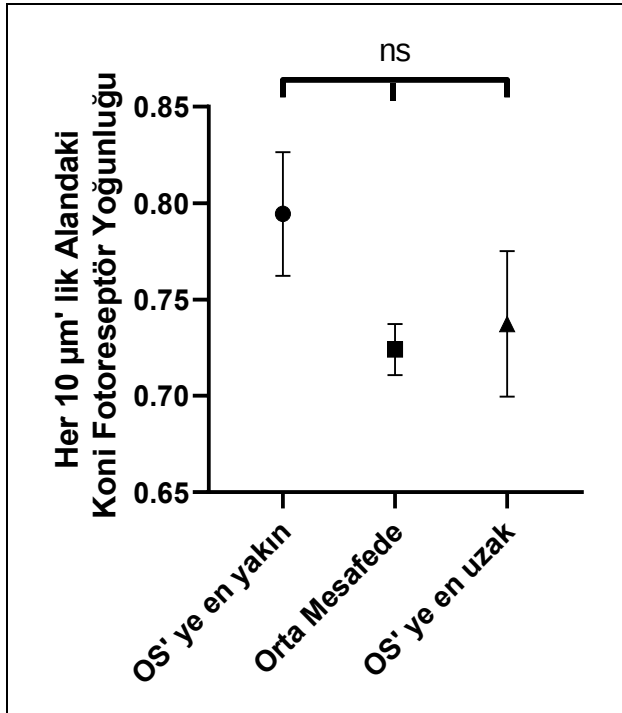
Ayrıca WtBl6 PN18 ve rd2 PN18 retinalar arasında Koni fotoreseptörlerinin dağılımı bakımından da bir inceleme ve ölçüm yapıldı. Buna göre retina optik sinir (OS) ortada olacak şekilde toplamda altı bölgeye ayrılarak incelendi. Wt PN18 retinalarda Koni fotoreseptörleri istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en yoğun şekilde optik sinirden orta mesafe uzaklıktaki alanda yer alıyorlarken, rd2 PN18 retinalardaki Koni fotoreseptörü kaybının en çok bu bölgede gerçekleştiği, ancak yine de bu bulgunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Koni fotoreseptörlerinin Wt PN18 retinalar ile rd2 PN18 retinalardaki bölgesel yoğunluk dağılımları bakımından ölçülen istatistiksel verileri Çizelge 4.10' da verildi ve karşılaştırmalar Şekil 4.13 'te, Şekil 4.14' te ve Şekil 4.15' te istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.10. Sağlıklı WtBl6 PN18 ve retinal dejenerasyonlu rd2 PN18 grupları arasında Koni fotoreseptörlerinin retinadaki dağılımlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

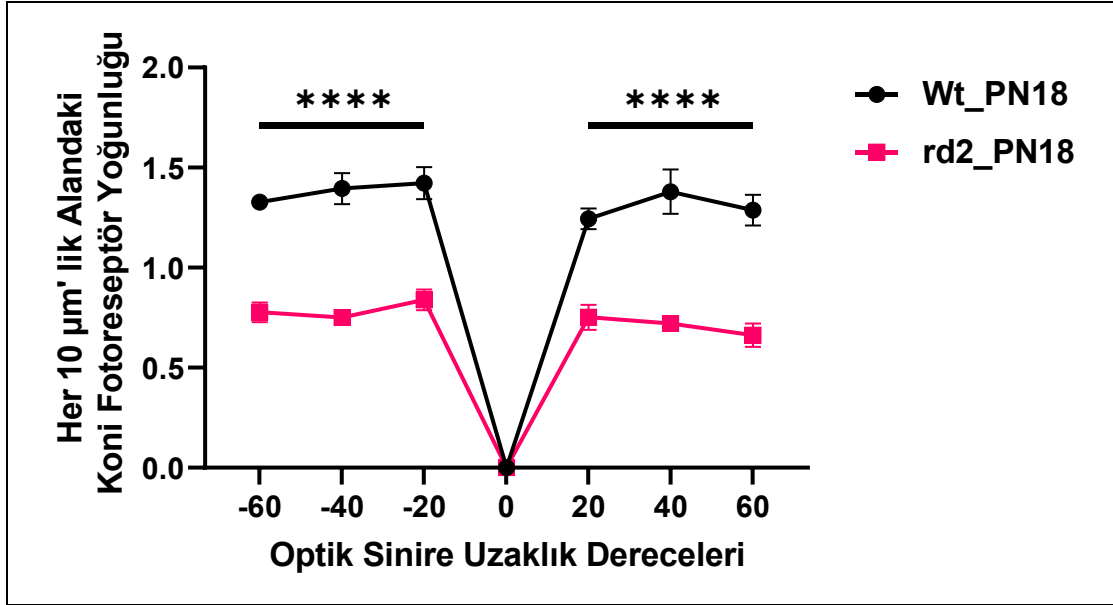
Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
WtBl6 PN18 (OS' ye en yakın)	1,32	0,02	0,53
WtBl6 PN18 (Orta mesafede)	1,39	0,04	0,97
WtBl6 PN18 (OS' ye en uzak)	1,33	0,04	0,70
Rd2 PN18 (OS' ye en yakın)	0,79	0,03	0,26
Rd2 PN18 (Orta mesafede)	0,72	0,01	0,39
Rd2 PN18 (OS' ye en uzak)	0,73	0,03	0,94



Şekil 4.13. Sağlıklı (WtBl6) PN18 retinal dokuların birim alanda içerdikleri Koni fotoreseptörü yoğunluklarının optik sinire uzaklıkları bakımından karşılaştırılmaları ($ns < 0,05$; OS: Optik Sinir)



Şekil 4.14. Retinal dejenerasyonlu (rd2) PN18 retinal dokuların birim alanda içerdikleri Koni fotoreseptörü yoğunluklarının optik sinire uzaklıkları bakımından karşılaştırılmaları ($ns < 0,05$; OS: Optik Sinir)



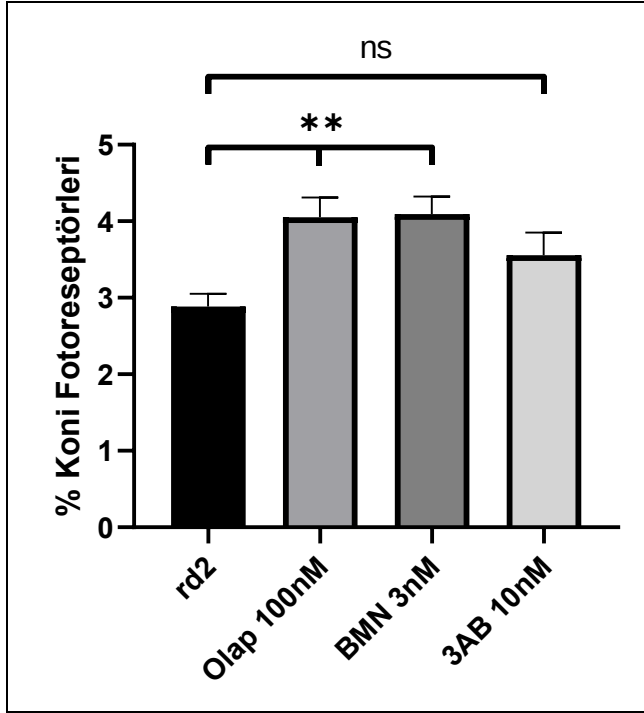
Şekil 4.15. Sağlıklı (WtBl6) PN18 retina grubu ile retinal dejenerasyonlu (rd2) PN18 grubunun birim alanda içerdikleri Koni fotoresptörü yoğunluklarının optik sinire uzaklıkları bakımından karşılaştırılmaları ($p^{****}<0,001$)

İn vitro kültürlerde yapılan Cone-Arrestin çalışması ise herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 PN18 retinalar ile her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları olarak belirlenen 100 nM Olaparib, 3 nM BMN-673 ve 10 nM 3AB grupları arasında gerçekleştirildi.

PARP inhibitörlerinden 100 nM Olaparib ve 3 nM BMN-673 uygulanan grupta, herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 retinalara göre, dış nüklear tabakada yer alan Koni fotoresptörü yüzdesinin anlamlı şekilde artmış olduğu bulundu. Arrestin ile boyanan Koni fotoresptörlerinin çekirdekleri ve uzantıları kırmızı renkte, açık bir şekilde gözlemlendi (Resim 4.16, 4.17, 4.18). Buna karşın 10 nM 3AB PARP inhibitörü ile tedavi edilen gruptaki Koni fotoresptörü yüzdesi, hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubundan daha yüksek bulunsada bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Resim 4.19). Bu bulguya ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.11’ de verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.16’ da istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.11. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoresptörlerinin yüzdesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	2,88	0,16	-
100 nM Olaparib	4,05	0,25	0,0040
3 nM BMN-673	4,09	0,22	0,0046
10 nM 3AB	3,55	0,29	0,1407

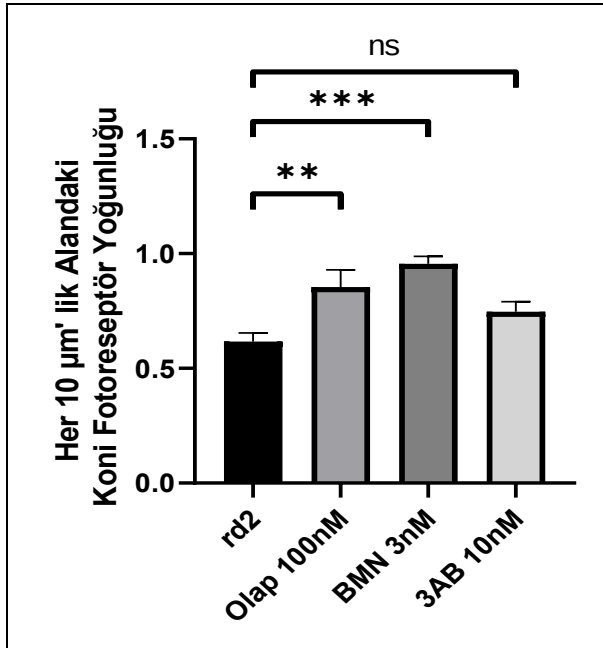


Şekil 4.16. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoresseptörlerinin yüzdelерinin karşılaştırılması ($p^{**}<0,01$)

Koni fotoresseptörlerinin yoğunluklarına ilişkin yapılan in vitro kültür çalışmalarında ise 100 nM Olaparib ve 3 nM BMN-673 tedavisi uygulanan retinalardaki Koni fotoresseptörü yoğunluğunun, hiçbir tedavi uygulanmamış rd2 retina grubuna göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu; bu anlamlılığın 3 nM BMN-673 grubunda belirgin şekilde daha yüksek olduğu bulundu. Buna karşın 10 nM 3AB PARP inhibitörü ile tedavi edilen gruptaki Koni fotoresseptörü yoğunluğu, hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubundan daha yüksek bulunsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulguya ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.12’ te verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.17 ‘te istatistiki grafik olarak gösterildi. Ayrıca TUNEL ile kolokalize olarak gerçekleştirilen CAR boyamasında her üç PARP inhibitörünün de Koni fotoresseptörü hücre ölümlerini azaltmada başarılı oldukları ortaya kondu. Bu bulguya ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.13 ve 4.14’ te verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.18 ve 4.19’ da istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.12. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoresseptörlerinin birim alandaki yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

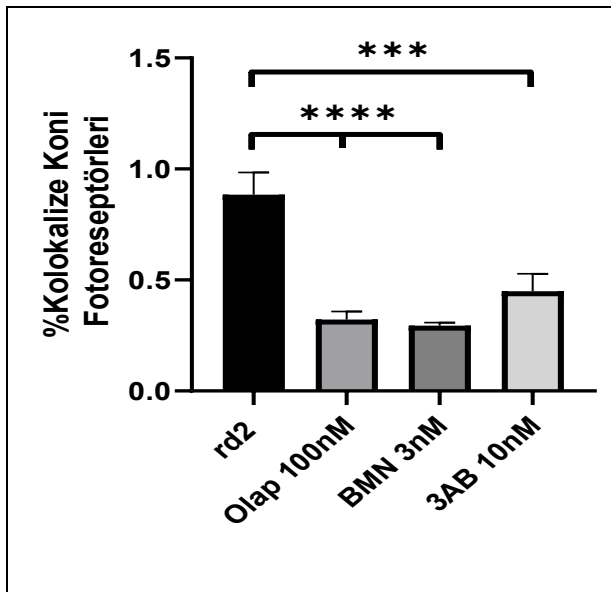
Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	0,61	0,03	-
100 nM Olaparib	0,85	0,07	0,0070
3 nM BMN-673	0,95	0,03	0,0005
10 nM 3AB	0,74	0,04	0,2077



Şekil 4.17. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin birim alandaki yoğunluklarının karşılaştırılması ($p^{**}<0,01$, $p^{***}<0,001$, $ns>0,05$)

Çizelge 4.13. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin TUNEL ile kolokalize boyanmalarının yüzdesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

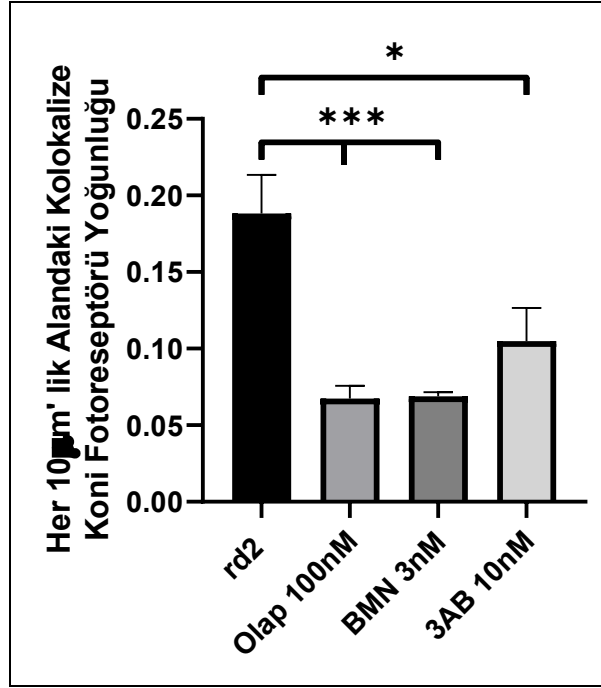
Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	0,88	0,09	-
100 nM Olaparib	0,32	0,03	<0,0001
3 nM BMN-673	0,29	0,01	<0,0001
10 nM 3AB	0,44	0,07	0,0009



Şekil 4.18. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan TUNEL ile kolokalize Koni fotoreseptörlerinin yüzdelерinin karşılaştırılması ($p^{***}<0,001$, $p^{****}<0,0001$)

Çizelge 4.14. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan Koni fotoreseptörlerinin TUNEL ile kolokalize boyanmalarının birim alandaki yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	0,18	0,025	-
100 nM Olaparib	0,06	0,002	0,0002
3 nM BMN-673	0,06	0,008	0,0005
10 nM 3AB	0,10	0,021	0,0102



Şekil 4.19. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda yer alan TUNEL ile kolokalize Koni fotoreseptörlerinin birim alandaki yoğunluklarının karşılaştırılması ($p^{***}<0,001$, $p^{*}<0,01$)

4.5. GFAP Bulguları

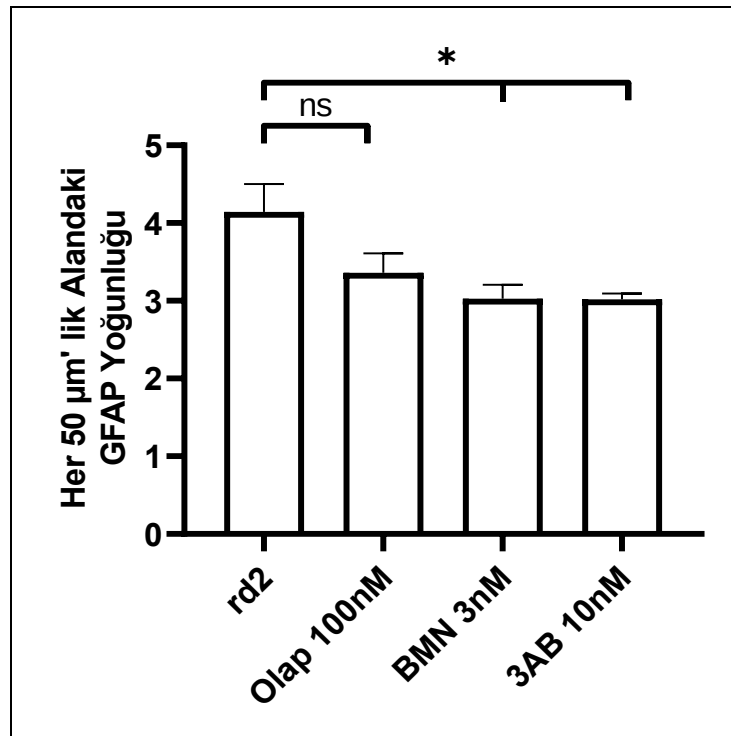
GFAP (Glial fibriler asidik protein) Müller hücreleri tarafından üretilen ve kalıtsal retinal dejenerasyonlarda arttığı bilinen bir proteindir [282]. Retinadaki Müller hücrelerinin aktivasyonunu gözlemlemek amacıyla GFAP antikoruna ile gerçekleştirdiğimiz çalışmada, hiçbir tedavi uygulanmamış rd2 PN18 retinalar ile PAR ve TUNEL bulguları sayesinde, her üç PARP inhibitörünün de en etkili dozları olarak belirlemiş olduğumuz 100 nM Olaparib, 3 nM BMN-673 ve 10 nM 3AB gruplarını karşılaştırdık.

Buna göre her üç PARP inhibitörü de Müller hücre aktivasyonunu azaltıyor olmakla birlikte bu sonuç 3 nM BMN-673 ve 10 nM 3AB gruplarında istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu gruplara ait mikroskopik görüntülerde, Müller hücrelerin retinanın neredeyse tüm tabakaları

boyunca yer alan uzantıları, fosforlu yeşile boyanmış olarak görüntülendi (Resim 20, 21, 22, 23). GFAP ile işaretlenen birim alandaki yoğunluk, hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 PN18 retina grubunda belirgin şekilde daha fazla iken 3 nM BMN-673 ve 10 nM 3AB gruplarında anlamlı şekilde daha azdı. Bununla birlikte bu iki PARP inhibitörü ile tedavi edilen gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Bu bulgulara ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.15’ te verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.20 ‘de istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.15. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplardaki Müller hücre aktivasyonuna ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	4,14	0,35	-
100 nM Olaparib	3,35	0,25	0,1352
3 nM BMN-673	3,02	0,17	0,0192
10 nM 3AB	3,01	0,07	0,0410



Şekil 4.20. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplara ait GFAP yoğunluklarının karşılaştırılması ($p^* < 0,05$, $ns > 0,05$, GFAP: Glial fibriller asidik protein)

4.6. CD9 Bulguları

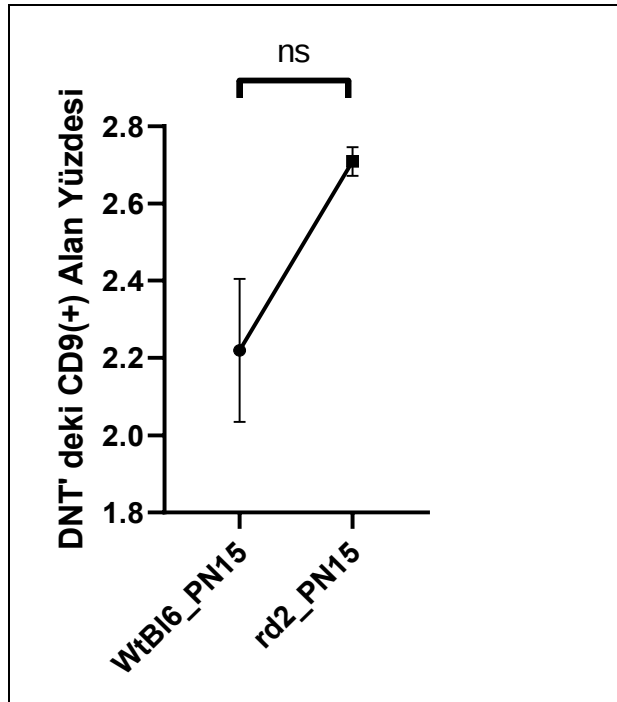
Retinadaki ekstrasellüler vezikül (eV) aktivitesini gözlemlemek üzere CD9 antikoruna ile in vivo retinal preparatlarda ve in vitro retinal kültürlerde immünfloresan boyamalar yapıldı.

İn vivo retinal preparatlarda sağlıklı Wild type (WtBl6) fare retinaları ile kalıtsal mutasyonlu rd2 fare retinaları Post Natal (PN) 15, PN18 ve PN24. günlerde olmak üzere karşılaştırıldı (Resim 4.24 ve Resim 4.25).

PN15. günde rd2 retinaların fotoreseptör çekirdeklerini içeren Dış Nükleer Tabakasındaki (DNT) CD9 immünreaktivitesi, Wt retinalara göre artmıştı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. İmmünpozitifliğin izlendiği alanlarda CD9 antikorunun tutulumu yoğun kırmızı alanlar olarak izleniyordu. İmmünreaksiyonun gözlendiği retinalarda CD9 tutulumu, RPE tabakasında daha diffüz şekilde izleniyorken özellikle Ganglioner tabakada daha net, yoğun tutulumlu kırmızı noktacıklar şeklinde görülüyordu. Bu bulgulara ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.16’ te verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.21’ da istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.16. PN15. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Dış Nükleer Tabaka’ da CD9 ifadelenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
WtBl6_PN15	2.22	0,18	0,25
Rd2_PN15	2.70	0,03	0,25

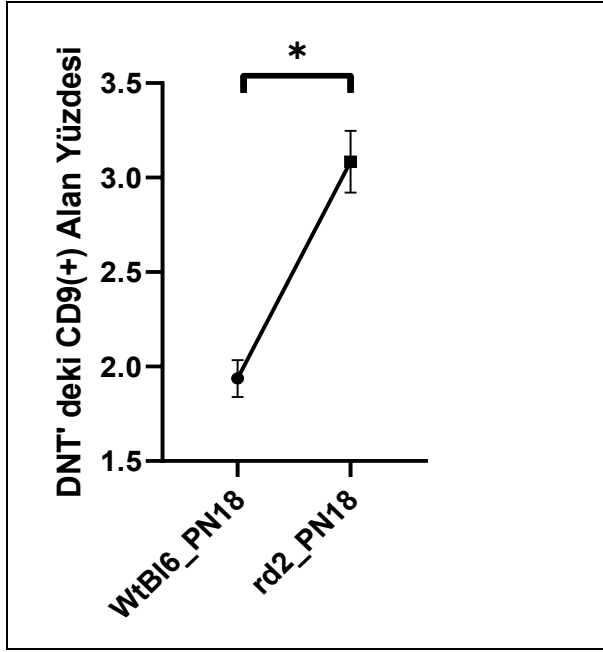


Şekil 4.21. Post Natal 15. güne ait sağlıklı (WtBl6_PN15) retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN15) retinal dokuların, DNT’ lerindeki CD9 ifadelenmesinin karşılaştırılması (ns>0,05, DNT: Dış Nükleer Tabaka)

PN18. günde rd2 retinaların fotoreseptör çekirdeklerini içeren Dış Nüklear Tabakasındaki CD9 immünreaktivitesi, Wt retinalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı. İmmünpozitifliğin izlendiği alanlarda CD9 antikorumun tutulumu yoğun kırmızı alanlar olarak izleniyordu. WtBl6 PN18 retinalarda ise bu kırmızı alanların yalnızca RPE tabakası ile sınırlı kaldığı, dış nüklear tabakada neredeyse hiç tutulum görülmezken iç nüklear tabakada ise oldukça az alanda CD9 immünpozitif alanların olduğu gözlemlendi. PN18. güne ait retinalarda Ganglion hücre çekirdeklerini içeren Ganglioner Tabaka' da da CD9 immünreaktivitesi karşılaştırmaları yapıldı. Buna göre rd2 retinaların Ganglioner tabakasındaki CD9 tutulumu da Wt retinaların Ganglioner tabakasındaki tutulum ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı. PN18' e ait tüm retinalarda da CD9 immünreaksiyonu RPE tabakasında daha dağınık ve diffüz görünümdeyken Ganglion hücre tabakasında daha net, sınırları belirli, kırmızı noktalar şeklinde izlendi (Resim 4.26 ve Resim 4.27). Bu bulgulara ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18' de verilirken gruplar arası karşılaştırmalar da Şekil 4.22 ve Şekil 4.23' de istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.17. PN18. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Dış Nüklear Tabaka' da, CD9 ifadelenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

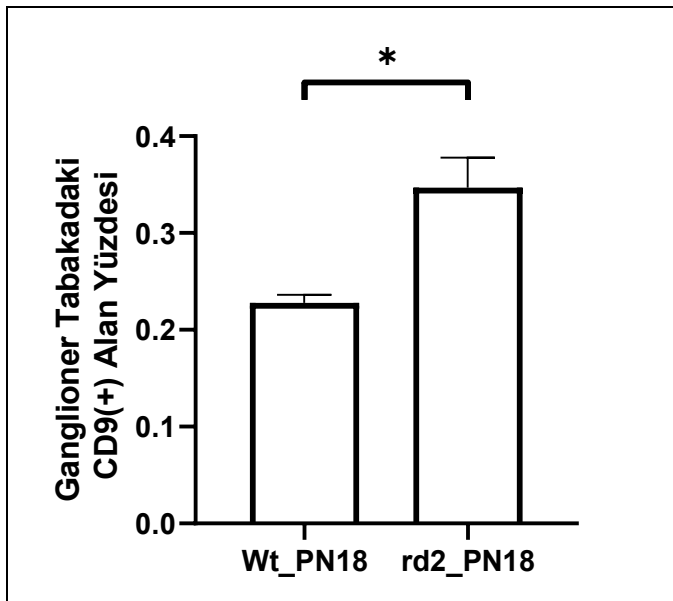
Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
WtBl6_PN18	1.93	0,09	0,03
Rd2_PN18	3.08	0,16	0,03



Şekil 4.22. Post Natal 18. güne ait sağlıklı (WtBl6_PN18) retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN18) retinal dokuların, DNT' lerindeki CD9 ifadeleneşinin karşılaştırılması ($p^* < 0,05$; DNT: Dış Nükleer Tabaka)

Çizelge 4.18. PN18. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Ganglioner Tabaka' da, CD9 ifadeleneşine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
WtBl6_PN18	0,22	0,008	0,02
Rd2_PN18	0,34	0,030	0,02

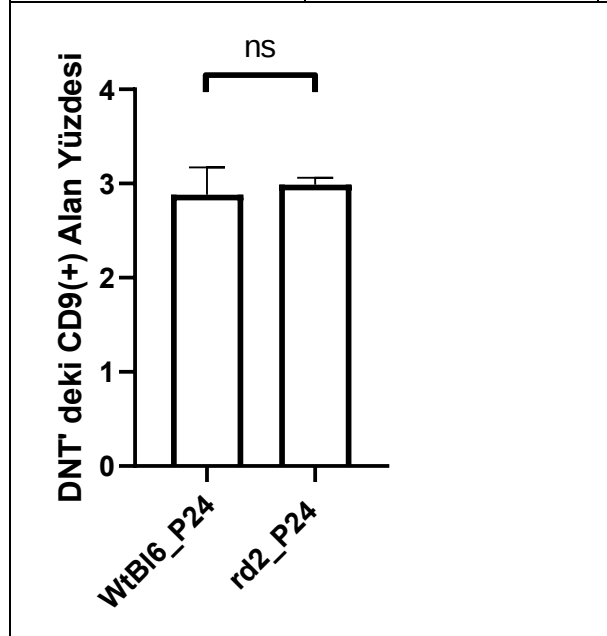


Şekil 4.23. Post Natal 18. güne ait sağlıklı (WtBl6_PN18) retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN18) retinal dokuların, GHT' lerindeki CD9 ifadeleneşinin karşılaştırılması ($p^* < 0,05$; GHT: Ganglioner Hücre Tabakası)

P24. günde in vivo retinal dokulara ait WtBl6 retinalar ile rd2 retinalar, Dış Nüklear Tabakaları göz önüne alınarak karşılaştırıldı. Buna göre Wt retinalar ile rd2 retinalar arasında CD9 immünreaktivitesi bakımından hem niteliksel hem de niceliksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Her iki grubun da CD9 immünpozitifliği birbirine oldukça yakındı. Bu bulgulara ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.19’ de verilirken gruplar arası karşılaştırmalar da Şekil 4.24 ‘te istatistiki grafik olarak gösterildi.

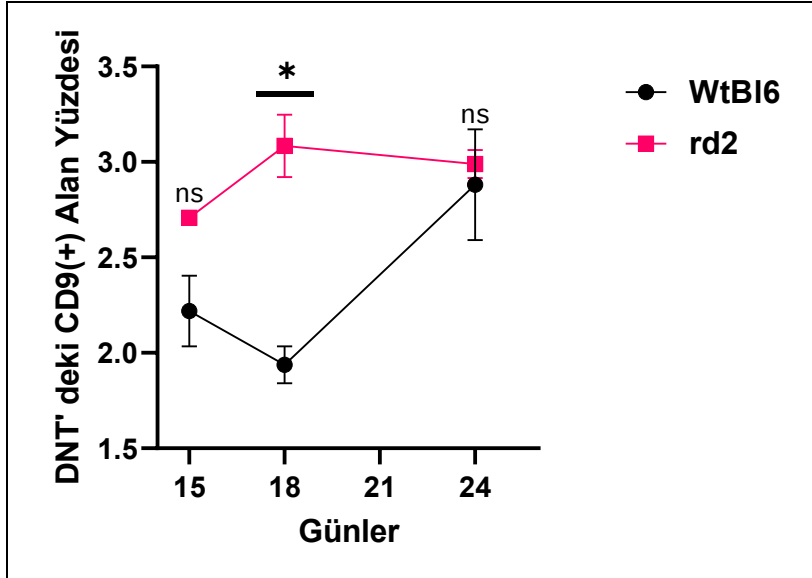
Çizelge 4.19. PN24. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Dış Nüklear Tabaka’ da, CD9 ifadelenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
WtBl6_PN24	2,88	0,28	>0,99
Rd2_PN24	2,98	0,07	>0,99



Şekil 4.24. Post Natal 24. güne ait sağlıklı (WtBl6_PN24) retinal dokular ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN24) retinal dokuların, DNT’ lerindeki CD9 ifadelenmesinin karşılaştırılması (ns>0,05; DNT: Dış Nüklear Tabaka)

Bununla birlikte PN15, PN18 ve PN24’ e ilişkin WtBl6 ve rd2 retinalarının fotoreseptör çekirdeklerini içeren tabakalarındaki (Dış Nüklear Tabaka) CD9 tutulumu için PN15, PN18 ve PN24 verilerinin bir arada değerlendirildiği karşılaştırmalı istatistiksel grafik Şekil 4.25’ te gösterildi.

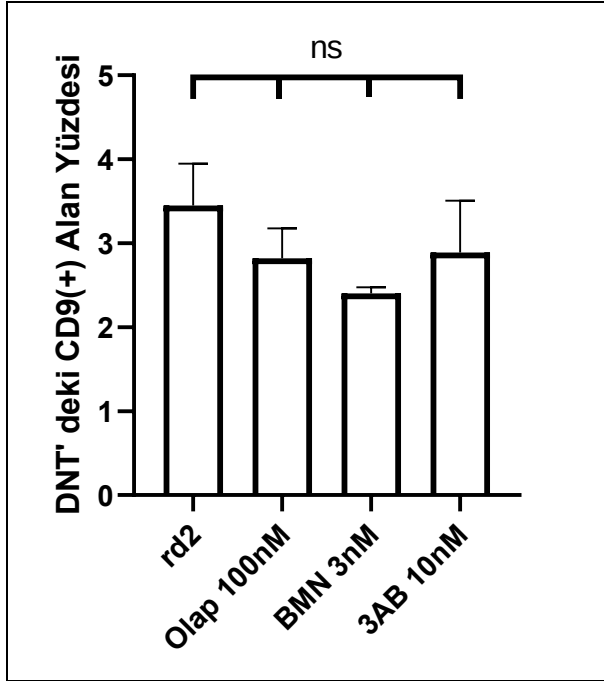


Şekil 4.25. Post Natal 15, 18 ve 24. günlere ait WtBl6 retinal dokularla rd2 retinal dokuların, DNT' lerindeki CD9 ifadenmesinin karşılaştırılması (ns>0,05, p*<0,05, DNT:Dış Nükleer Tabaka)

İn vitro kültürlerde CD9 immünreaksiyonunun araştırıldığı çalışmada ise hiçbir tedavi uygulanmamış olan rd2 retinalar ile; PARP inhibitörlerinin en etkili dozları olduğu PAR ve TUNEL bulguları ile saptanan, 100 nM Olaparib, 3 nM BMN-673 ve 10 nM 3AB tedavisi uygulanan rd2 fare retinaları karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma retinalara ait fotoreseptör çekirdeklerini içeren Dış Nükleer Tabaka' daki verilerle gerçekleştirildi. Tüm gruplarda CD9 immünpozitifliği retinaya ait neredeyse tüm tabakalarda parlak kırmızı boyanma ile karakterize şekilde yer alıyordu (Resim 4.28, 4.29, 4.30, 4.31). Yapılan karşılaştırmalara göre hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubunda CD9 immünpozitifliği, diğer tedavi uygulanan gruplara göre daha yüksekken her üç PARP inhibitörünün de bu immünpozitifliği azalttığı ancak bu farkın hiçbir grupta anlamlı olmadığı görüldü. Yine de CD9 immünpozitifliğini azaltmada en etkin grup 3 nM BMN-673 tedavisi uygulanan grup oldu. Bu bulgulara ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.20' de verilirken gruplar arası karşılaştırmalar da Şekil 4.26 'da istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.20. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplardaki CD9 pozitif alanların yüzdelere ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	3,45	0,49	-
100 nM Olaparib	2,81	0,35	0,6177
3 nM BMN-673	2,40	0,07	0,1443
10 nM 3AB	2,88	0,61	0,4101



Şekil 4.26. Her üç PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplara ait CD9 pozitif alan yüzdelерinin karşılaştırılmaları (ns>0,05)

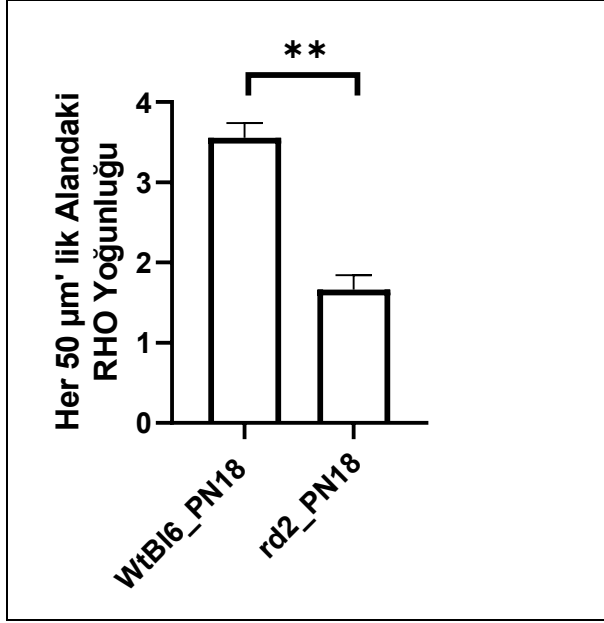
4.7. Rhodopsin Bulguları

Retinalardaki dış katman (Outer segment) gelişimini incelemek üzere hem in vivo retinal preparatlarda hem in vitro retinal kültürlerde Rhodopsin antikoru ile boyamalar yapıldı.

İn vivo retinal doku preparatlarında Post Natal (PN) 18. güne ait sağlıklı retinalar (Wt PN18) ile retinal dejenerasyonlu (rd2 PN18) retinalar karşılaştırıldı. Wt PN18 retinal kültürlerin Dış Segment'indeki (DS) Rhodopsin immünreaksiyonu, rd2 PN18 retinal dokuların dış segmentindeki immünreaktiviteye göre anlamlı şekilde daha fazlaydı. Pozitif immünreaktivitenin görüldüğü alanlar fosforlu yeşil ile boyanmış olarak izlendi (Resim 4.32 ve Resim 33). Bu bulgulara ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.21' de verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar da Şekil 4.27 'de istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.21. PN18. güne ait sağlıklı (WtBl6) retinal dokular ile retinal dejenerasyon (rd2) grubu arasında, Dış Segment' te, Rhodopsin ifadenmesine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
WtBl6_PN18	3,55	0,18	0,0018
Rd2_PN18	1,66	0,17	0,0018

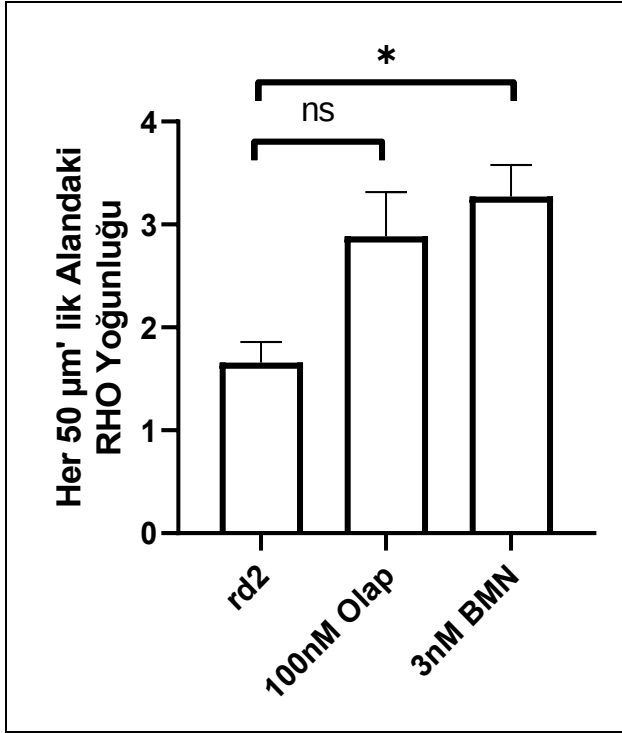


Şekil 4.27. Sağlıklı (WtBl6) PN18 retinalar ile retinal dejenerasyonlu (rd2_PN18) retinaların dış segmentlerindeki Rhodopsin ifadenmesinin karşılaştırılması ($p^{**} < 0,01$)

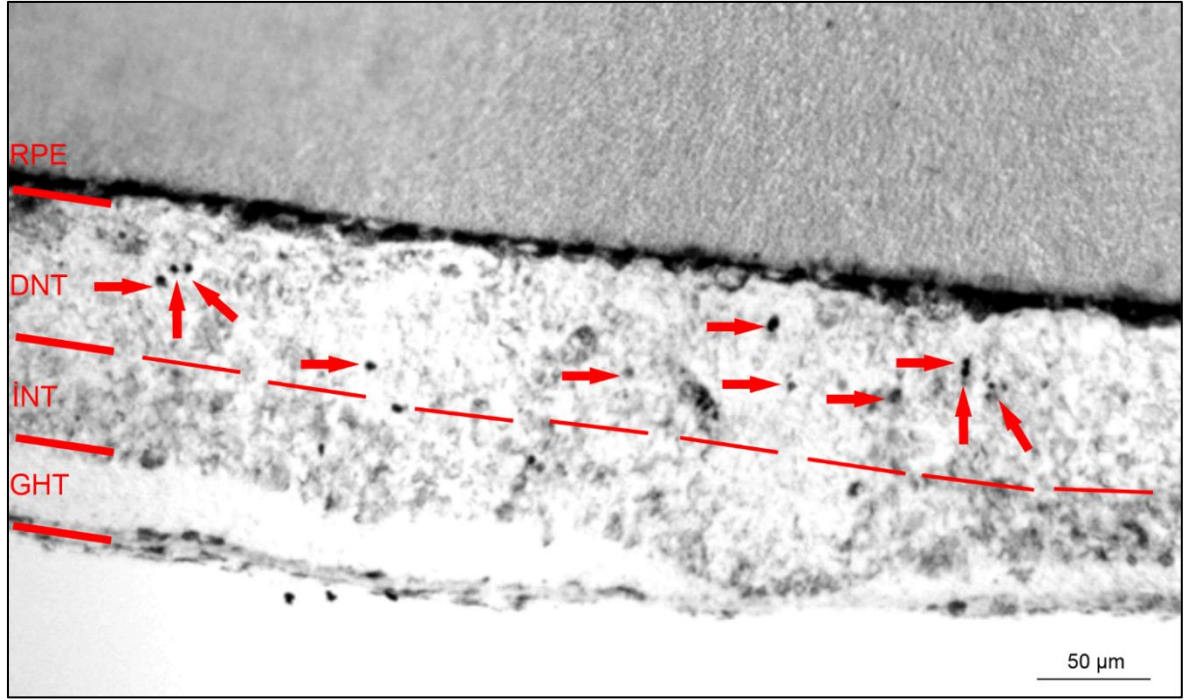
İn vitro kültürlerde ise hiçbir tedavi uygulanmayan rd2_PN18 kültürler ile 100nM Olaparib ve 3nM BMN-673 tedavileri uygulanan retina grupları karşılaştırıldı. Tüm retinaların RPE tabakasındaki Rhodopsin antikoru tutulumu incelendi. Buna göre hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 PN18 retinaların RPE tabakasındaki Rhodopsin immünreaksiyonu zayıf tutulum gösteriyordu. 100nM Olaparib tedavisi uygulanan retinaların RPE tabakasındaki Rhodopsin immünreaktivitesi rd2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazlaydı (Resim 4.34 ve Resim 4.35). 3nM BMN-673 tedavisi uygulanan grupta ise hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubuna göre oldukça belirgin ve istatistiksel olarak da anlamlı olacak şekilde dış segmentteki Rhodopsin immünreaktivitesinde bir artış söz konusuydu (Resim 4.36). Herhangi bir tedavi uygulanmayan rd2 grubu ile birlikte her iki tedavi grubunun da dahil olduğu istatistiksel karşılaştırmada tedavi gruplarının Rhodopsin immünpozitifliğini arttırdığı, fakat bu artışın yalnızca 3nM BMN-673 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu gösterildi. Tüm bu bulgulara ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.22’ de verildi ve gruplar arası karşılaştırmalar da Şekil 4.28 ‘de istatistiki grafik olarak gösterildi.

Çizelge 4.22. Her iki PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplardaki Rhodopsin yoğunluğuna ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler

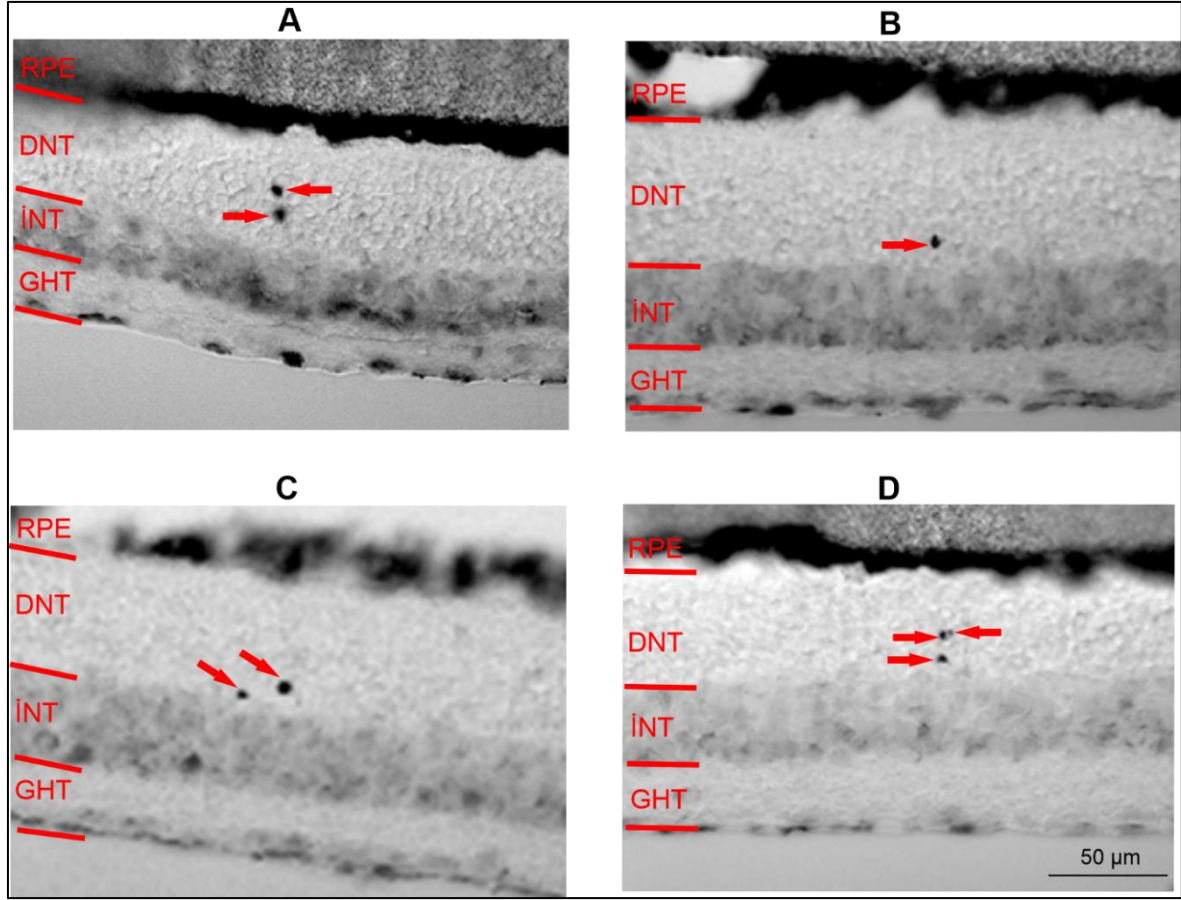
Grup	Ortalama Değer	Standart Hata (SEM)	p Değeri
rd2 (Kontrol)	1,66	0,19	-
100 nM Olaparib	2,88	0,43	0,06
3 nM BMN-673	3,27	0,30	0,02



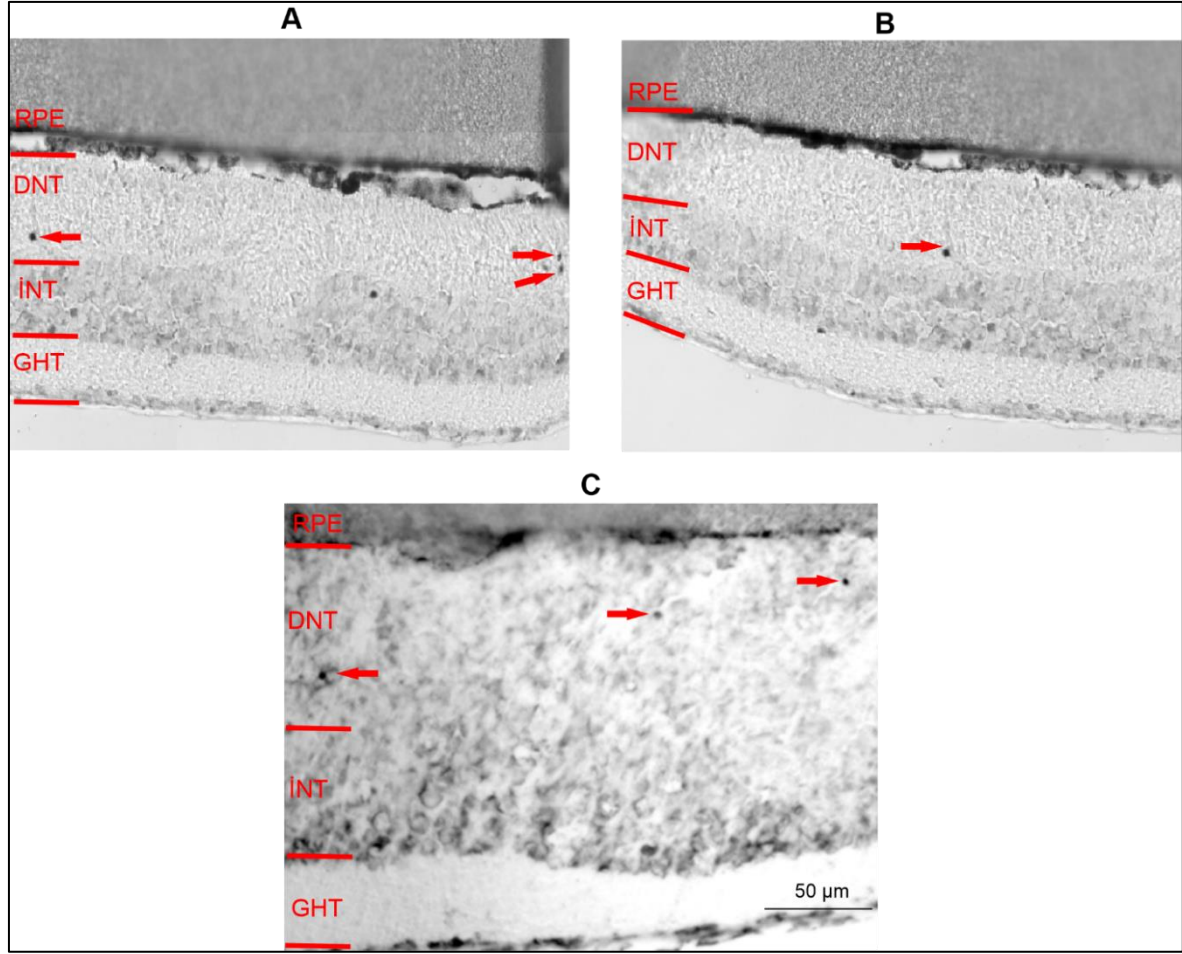
Şekil 4.28. Her iki PARP inhibitörünün en etkili dozları ile tedavi uygulanan gruplarda birim alandaki Rhodopsin yoğunluğunun karşılaştırılması (ns>0,05, p*<0,05)



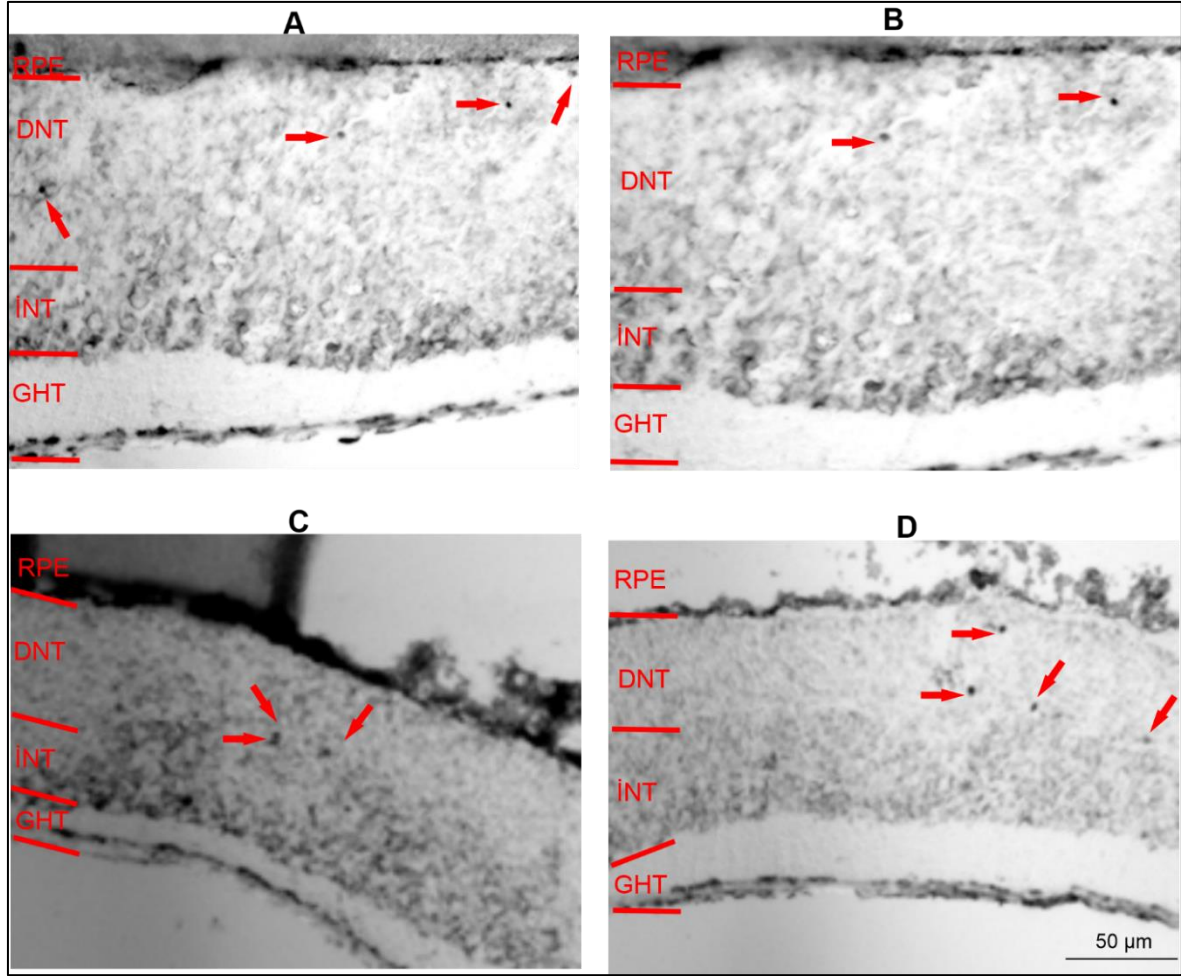
Resim 4.1. Rd2 grubuna ait immünohistokimyasal inceleme İn vitro rd2 grubuna ait retinal kesitlerde PAR immünreaksiyonu gerçekleşen siyaha boyanmış fotoreseptör hücre çekirdekleri (→) yoğun olarak izleniyor RPE: Retina Pigment Epiteli, DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (PAR antikoru, DAB boyaması X200)



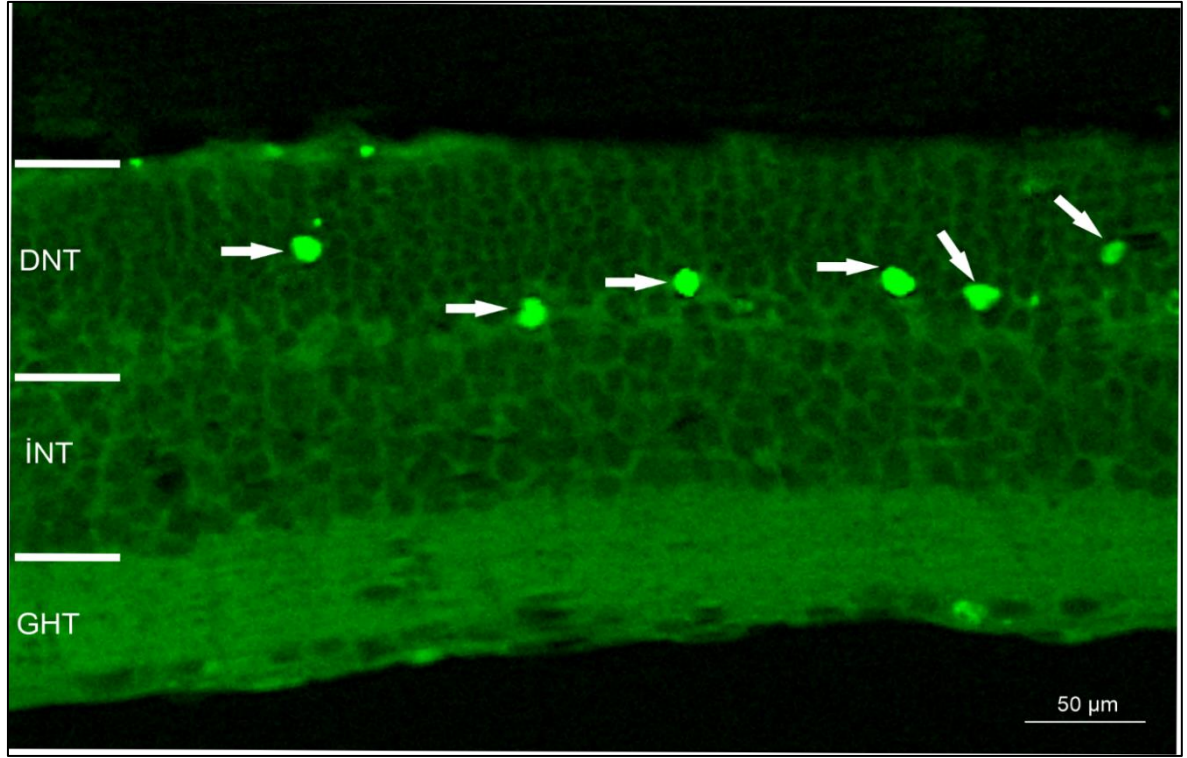
Resim 4.2. Olaparib grubuna ait immünohistokimyasal incelemeler İn vitro Olaparib tedavisi uygulanan retinal kesitlerde PAR immünreaksiyonu gerçekleşen siyaha boyanmış fotoreseptör hücre çekirdekleri (→) izleniyor (A) 10 nM Olaparib grubunda ve (C) 1 μM Olaparib grubunda orta yoğunlukta PAR birikimi mevcutken (D) 10 μM Olaparib grubunda Olaparib tedavisi uygulanan gruplar arasında en yoğun PAR birikimi izleniyor (B) 100 nM Olaparib tedavisi uygulanan grupta ise PAR immünreaktivitesi en az şekilde izleniyor RPE: Retina Pigment Epiteli, DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (PAR antikoru, DAB boyaması X200)



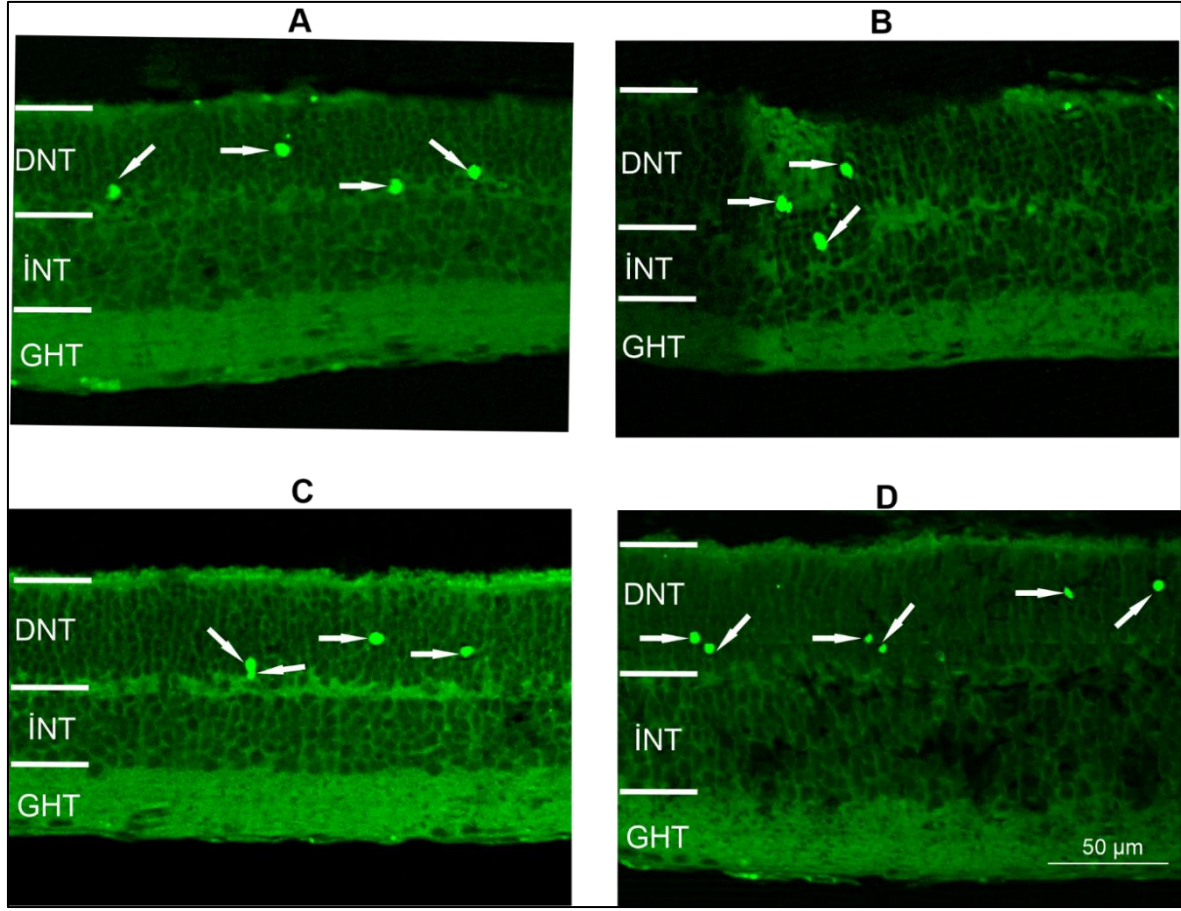
Resim 4.3. BMN-673 grubuna ait immünohistokimyasal incelemeler İn vitro BMN-673 tedavisi uygulanan retinal kesitlerde PAR immünreaksiyonu gerçekleşen siyaha boyanmış fotoreseptör hücre çekirdekleri (→) (A) 1nM BMN-673 grubunda ve (C) 10nM BMN-673 grubunda ortadan şiddetliye doğru yoğunlukta, (B) 3nM BMN-673 grubunda belirgin şekilde daha az izleniyor RPE: Retina Pigment Epiteli, DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (PAR antikoru, DAB boyaması X200)



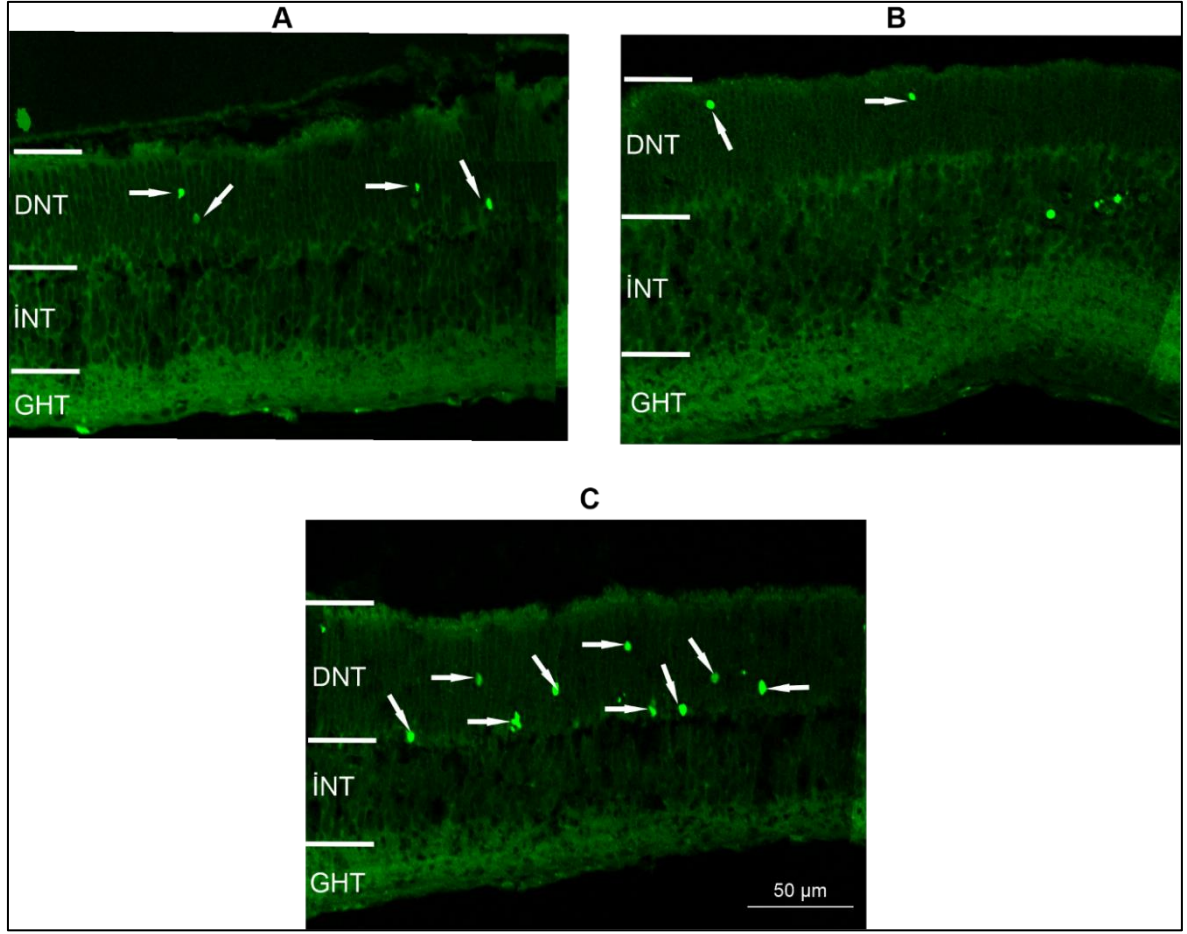
Resim 4.4. 3AB grubuna ait immünohistokimyasal incelemeler İn vitro 3AB PARP inhibitörü tedavisi uygulanan retinal kesitlerde PAR immünreaksiyonu gerçekleşen siyaha boyanmış fotoreseptör hücre çekirdekleri (➡) (A) 1nM 3AB grubunda ve (D) 1µM 3AB grubunda en yoğun şekilde, (B) 10nM 3AB grubunda ise belirgin şekilde azalmış olarak izleniyor (C) 100nM 3AB PARP inhibitörü ile tedavi edilen grupta ise PAR pozitif hücre çekirdeklerinin A ve D gruplarından daha az, fakat B grubundan ise daha fazla olduğu izleniyor RPE: Retina Pigment Epiteli, DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (PAR antikoru, DAB boyaması X200)



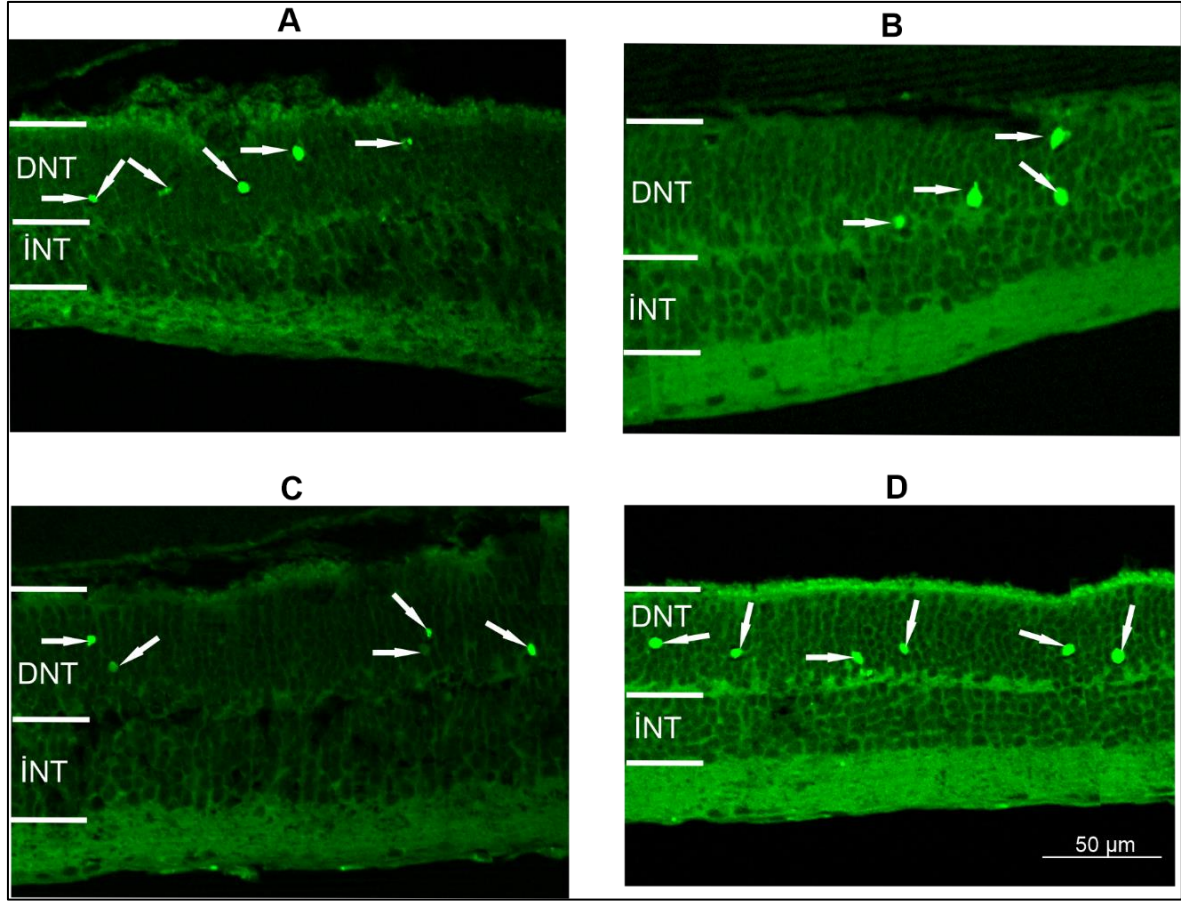
Resim 4.5. Rd2 grubuna ait TUNEL incelemesi İn vitro rd2 grubuna ait retinal kesitlerde TUNEL pozitif fotoreseptör hücre çekirdekleri (➡) fosforlu yeşile boyanmış olarak izleniyor DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (TUNEL metodu, X200)



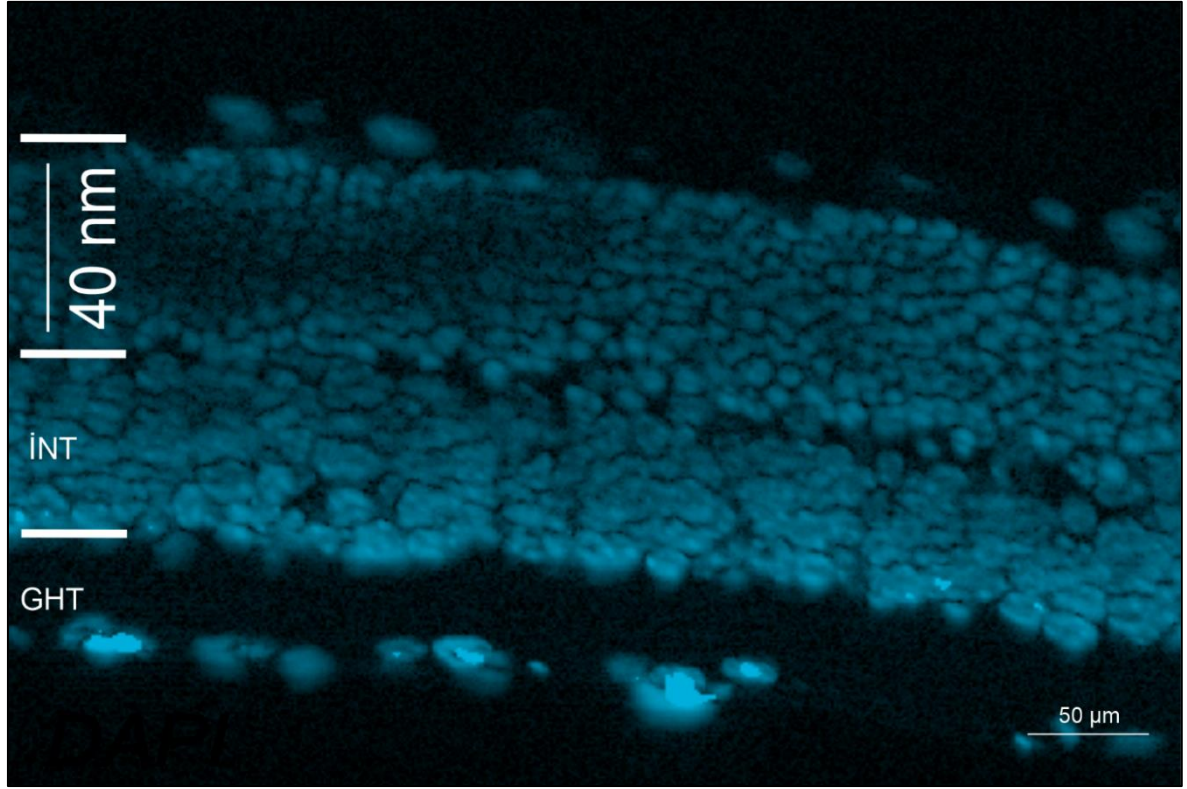
Resim 4.6. Olaparib grubuna ait TUNEL incelemeleri İn vitro Olaparib tedavisi uygulanan retinal kesitlerde TUNEL pozitif fotoreseptör hücre çekirdekleri (→) fosforlu yeşile boyanmış şekilde izleniyor (D) 10µM Olaparib uygulanan grupta hiçbir tedavi uygulanmayan rd2 grubuna yakın yoğunlukta TUNEL pozitif fotoreseptörler mevcutken, (B) 100nM Olaparib tedavisi uygulanan grupta fotoreseptör hücre ölümünün en az olduğu ve (C) 1µM Olaparib uygulanan grupta ise TUNEL ile işaretlenen fotoreseptör hücre ölümünün (B) grubuna yakın olduğu izleniyor (A) 10nM Olaparib tedavisi uygulanan grupta ise göreceli karşılaştırmaya göre orta seviyede fotoreseptör hücre ölümü izleniyor DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (TUNEL metodu, X200)



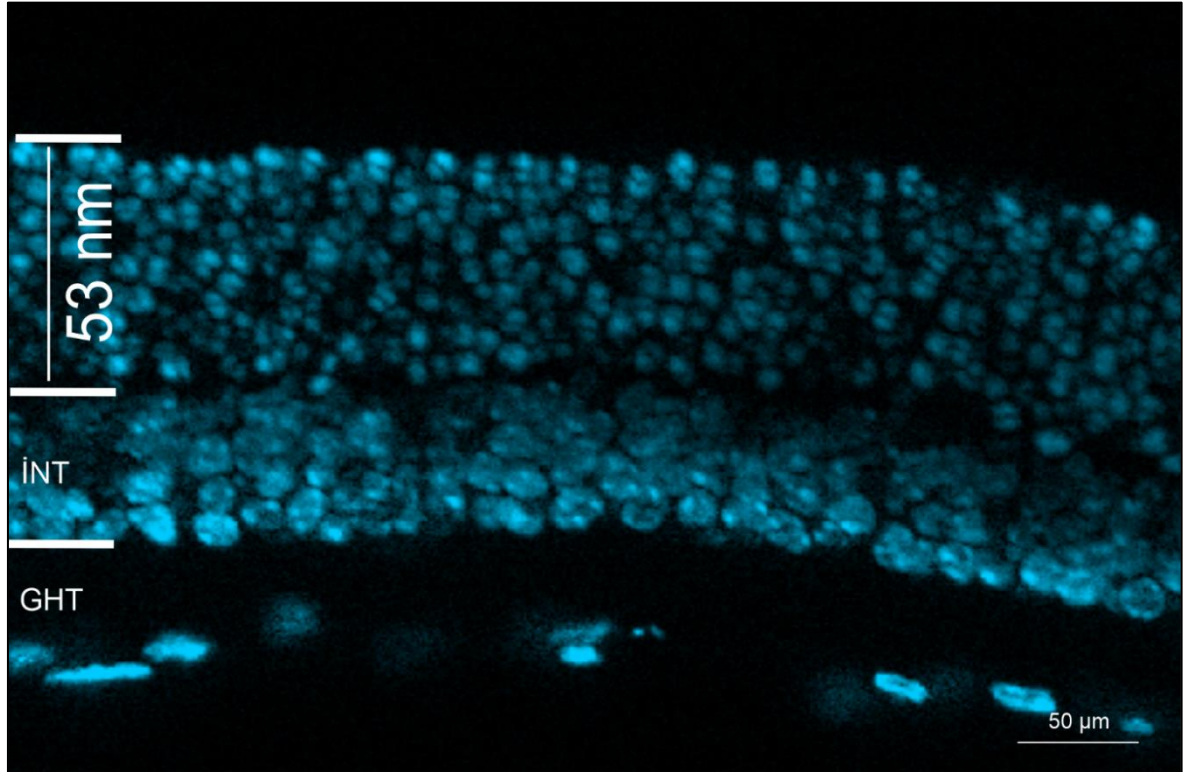
Resim 4.7. BMN-673 grubuna ait TUNEL incelemeleri İn vitro BMN-673 tedavisi uygulanan retinal kesitlerde TUNEL pozitif fotoreseptör hücre çekirdekleri (➡) fosforlu yeşile boyanmış şekilde (A) 1nM BMN-673 grubunda orta yoğunlukta, (B) 3nM BMN-673 grubunda görece çok daha az, (C) 10nM BMN-673 grubunda ise çok belirgin bir artışla izleniyor DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (TUNEL metodu, X200)



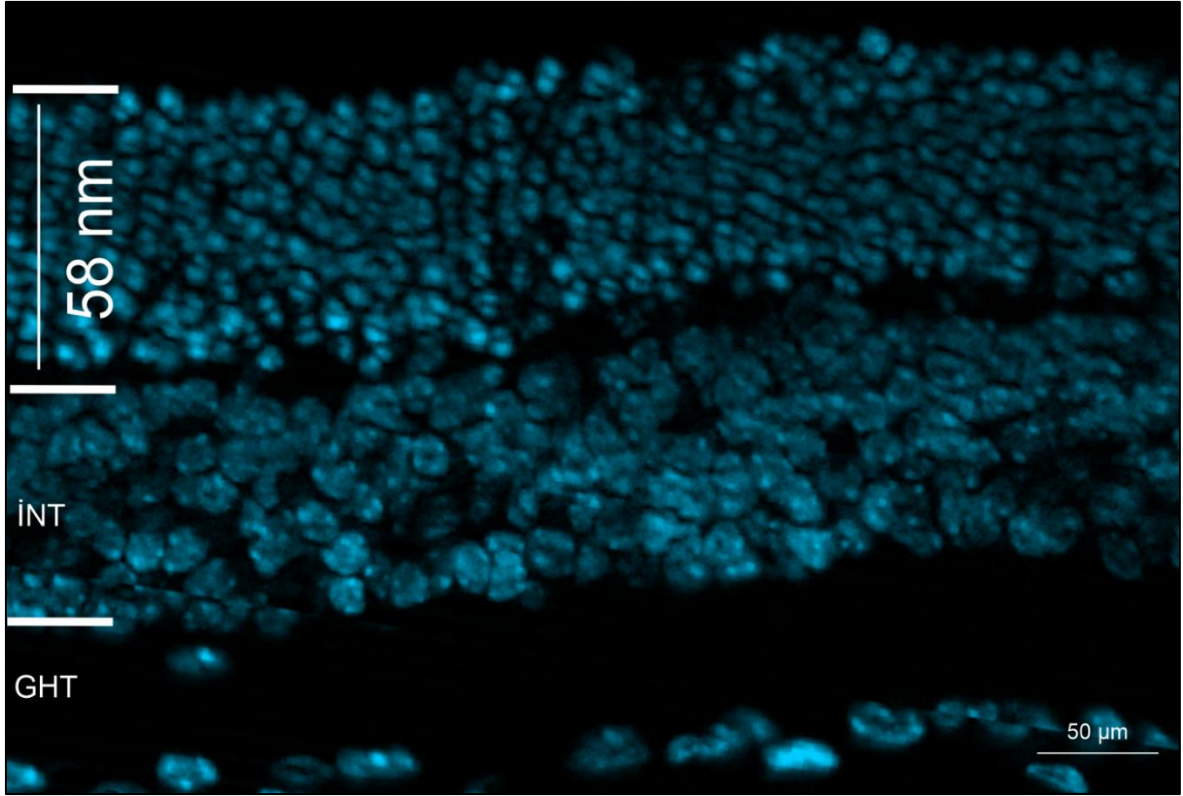
Resim 4.8. 3AB grubuna ait TUNEL incelemeleri İn vitro 3AB PARP inhibitörü tedavisi uygulanan retinal kesitlerde TUNEL pozitif fotoreseptör hücre çekirdekleri (→) fosforlu yeşile boyanmış şekilde (A) 1nM BMN-673 grubunda ve (D) 1µM 3AB grubunda yoğun şekilde, (B) 10nM 3AB grubunda görece çok daha az, (C) 100nM 3AB grubunda ise orta yoğunlukta izleniyor DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (TUNEL metodu, X200)



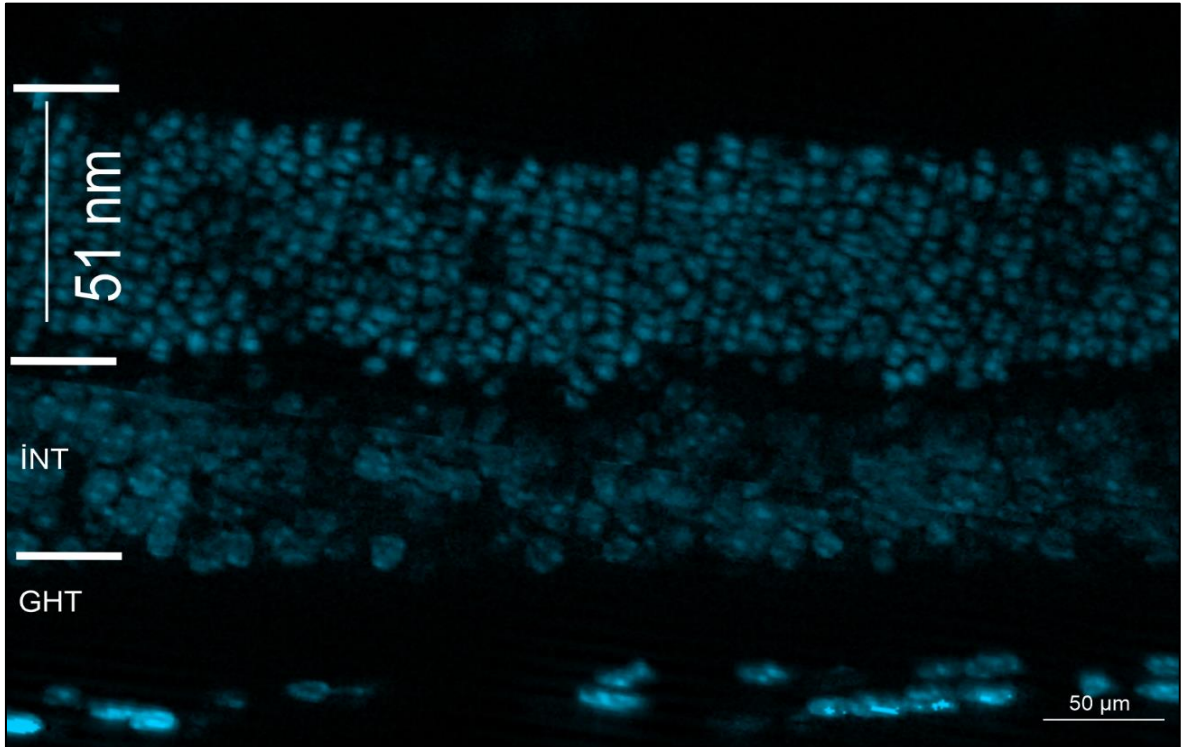
Resim 4.9. Rd2 grubuna ait DNT kalınlığı incelemesi İn vitro rd2 retinal kesite ait Dış Nükleer Tabaka (DNT) kalınlığı 40 nm olarak izleniyor İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (DAPI, X200)



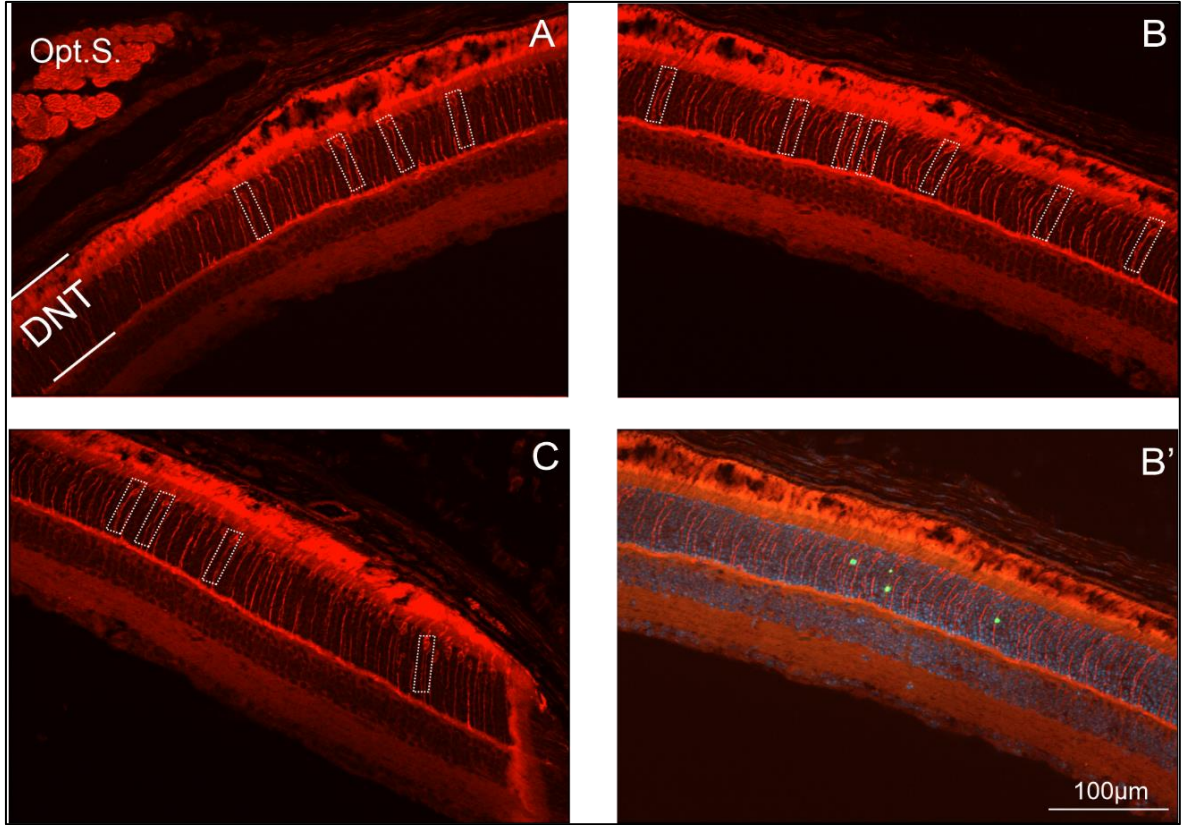
Resim 4.10. En etkili Olaparib grubuna ait DNT kalınlığı incelemesi İn vitro 100 nM Olaparib grubundaki retinal kesite ait Dış Nükleer Tabaka (DNT) kalınlığı 53 nm olarak izleniyor İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (DAPI, X200)



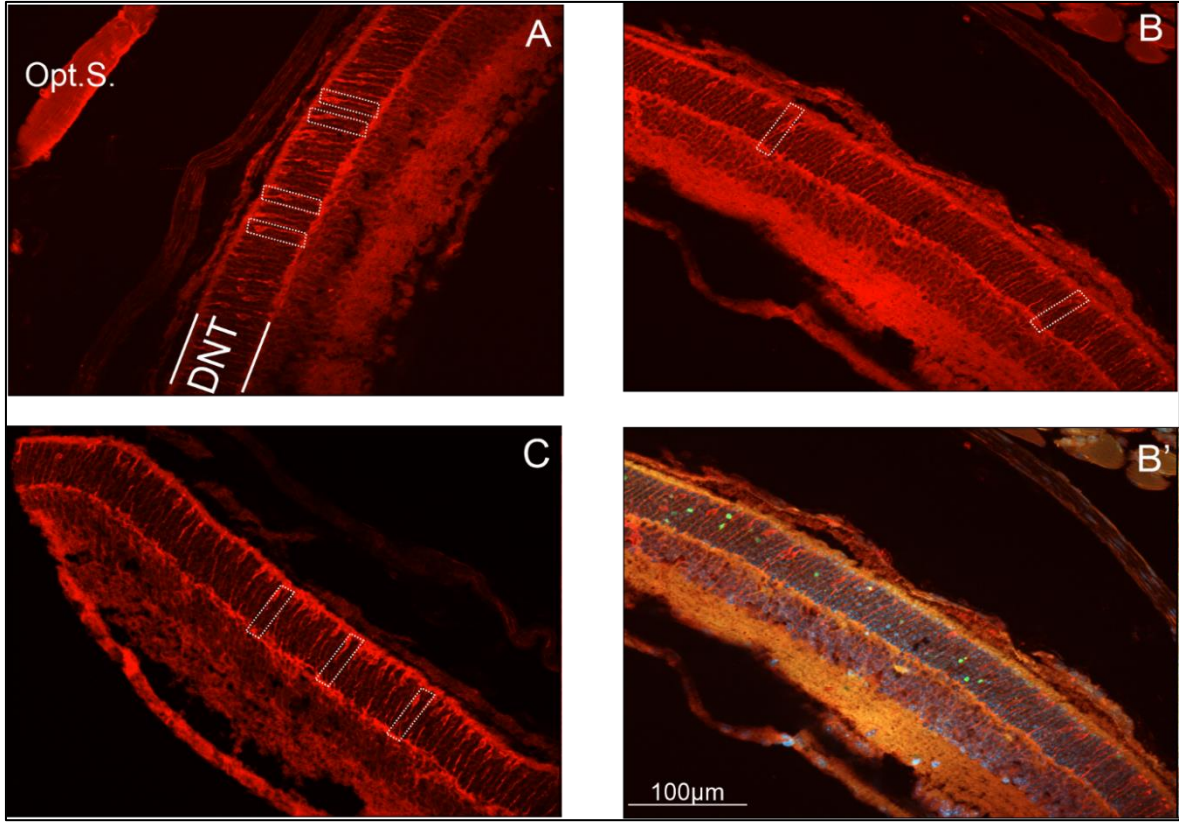
Resim 4.11. En etkili BMN-673 grubuna ait DNT kalınlığı incelemesi İn vitro 3 nM BMN-673 grubundaki retinal kesite ait Dış Nüklear Tabaka (DNT) kalınlığı 58 nm olarak izleniyor İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (DAPI, X200)



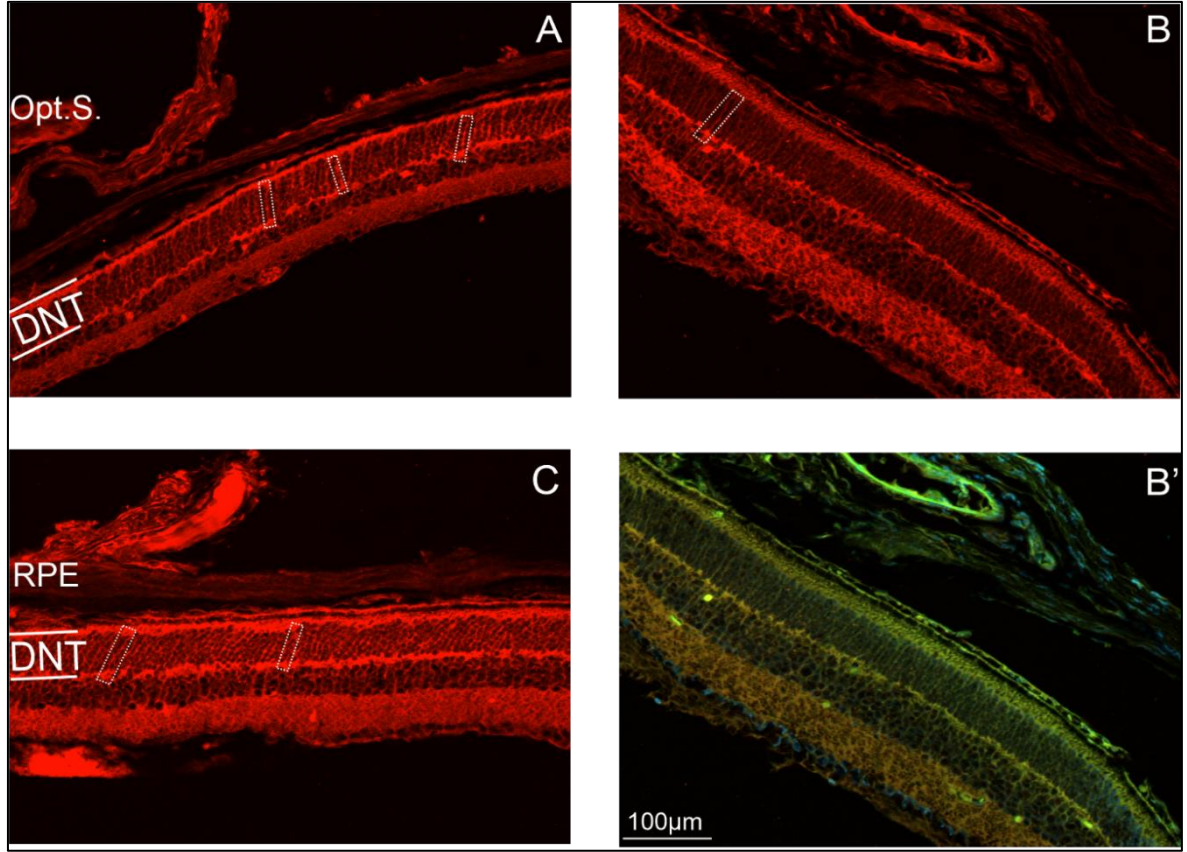
Resim 4.12. En etkili 3AB grubuna ait DNT kalınlığı incelemesi İn vitro 10 nM 3AB grubundaki retinal kesite ait Dış Nüklear Tabaka (DNT) kalınlığı 51 nm olarak izleniyor İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (DAPI, X200)



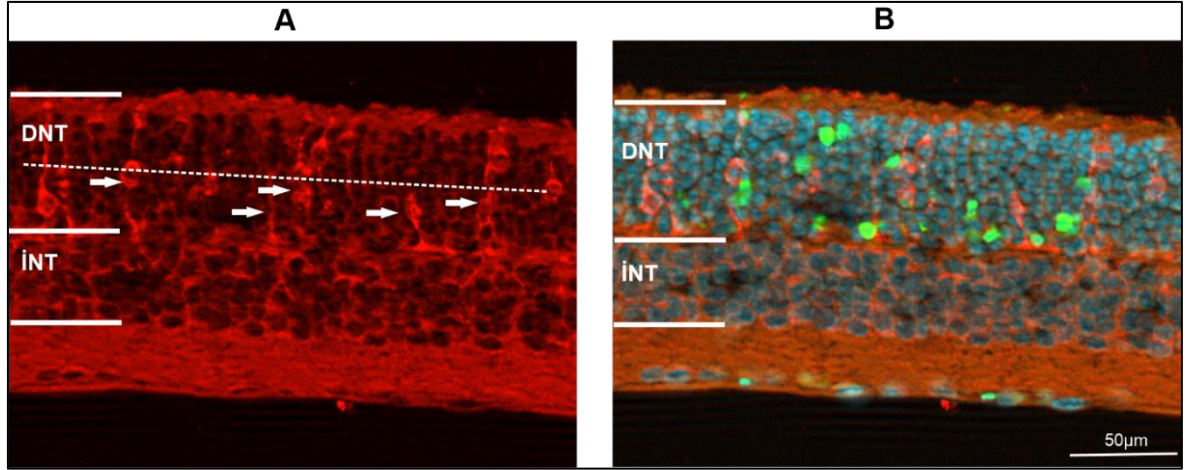
Resim 4.13. WtBl6_PN18 farelere ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmeleri İn vivo WtBl6 grubuna ait Post Natal (PN18) günündeki retinal kesitlerde (A) Optik sinire en yakın alandaki, (B) Optik sinire orta mesafe uzaklıktaki, (C) Optik sinire en uzak alandaki Cone-Arrestin boyaması ile immünreaktivite gösteren Koni fotoreseptörleri izleniyor WtBl6 in vivo retinal kültürlerde en yoğun Cone-Arrestin immünreaktivitesi Optik sinire orta mesafe uzaklıktaki alan olan (B) grubunda izlenirken, (B') grubunda ise Optik sinire orta mesafe uzaklıktaki retinal kesitin Cone-Arrestin, DAPI ve TUNEL ile kolokalize boyanması izleniyor Opt.S: Optik Sinir, DNT: Dış Nüklear Tabaka (Cone-Arrestin antikoru, X200)



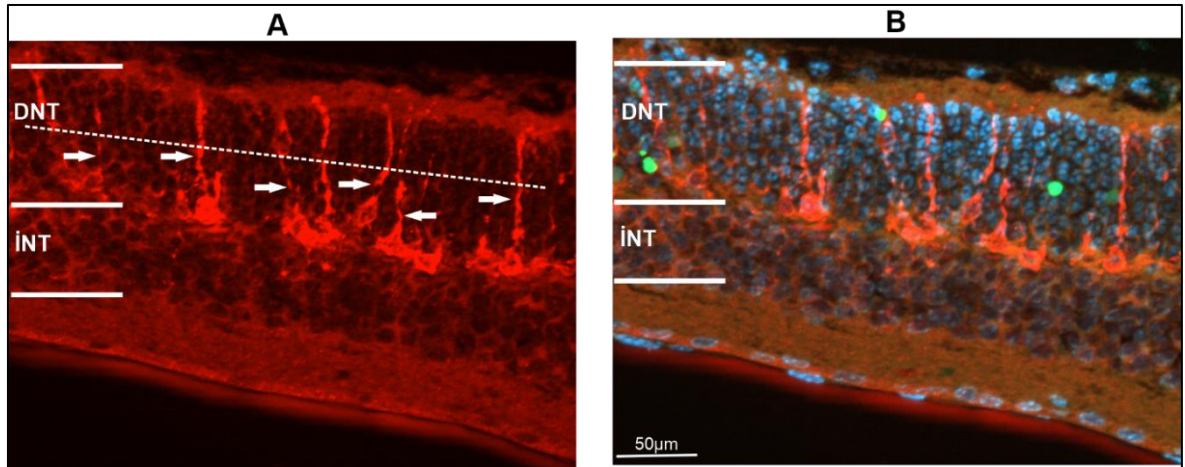
Resim 4.14. Rd2_PN18 farelere ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmeleri İn vivo rd2 grubuna ait Post Natal (PN18) günündeki retinal kesitlerde (A) Optik sinire en yakın alandaki, (B) Optik sinire orta mesafe uzaklıktaki, (C) Optik sinire en uzak alandaki Cone-Arrestin boyaması ile immünreaktivite gösteren Koni fotoreseptörleri izleniyor Rd2 in vivo retinal dokularda görece en yoğun Cone-Arrestin immünreaktivitesi Optik sinire en yakın alan olan (A) grubunda izlenirken, optik sinire orta mesafe uzaklıktaki (B) grubunda ise Koni fotoreseptörlerinin belirgin şekilde azalmış oldukları, optik sinirin en uzağındaki alanda yer alan kesitlerden oluşan (C) grubunda ise Koni fotoreseptörlerinin A grubundan belirgin şekilde daha az olduğu, B grubuna ise yakın olduğu izleniyor (B') grubunda ise Optik sinire orta mesafe uzaklıktaki retinal kesitin Cone-Arrestin, DAPI ve TUNEL ile kolokelize boyanması izleniyor Opt.S: Optik Sinir, DNT: Dış Nükleer Tabaka (Cone-Arrestin antikoru, X200)



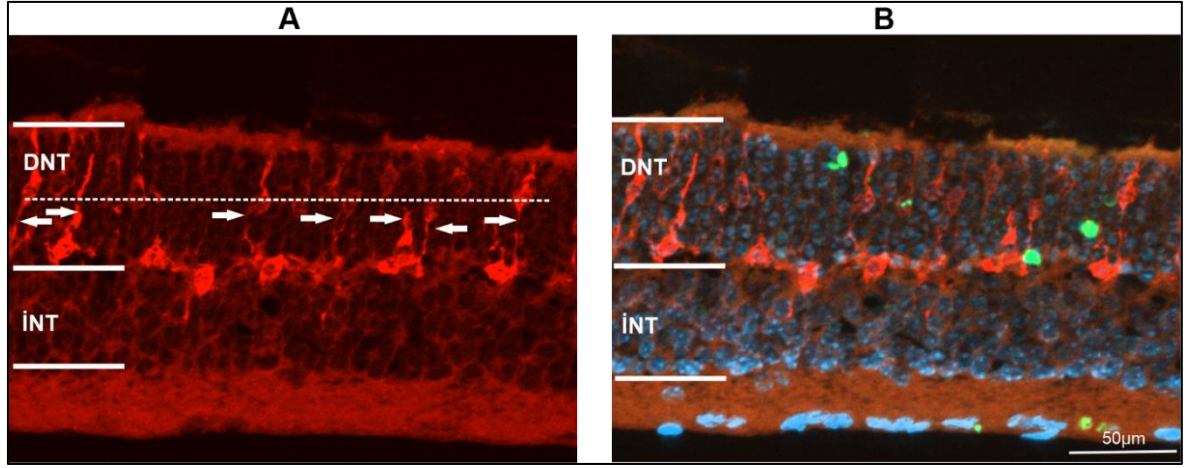
Resim 4.15. Rd2_PN24 farelere ait Koni fotoreseptörlerinin immünfloresan yöntemle incelenmeleri İn vivo rd2 grubuna ait Post Natal (PN24) günündeki retinal kesitlerde (A) Optik sinire en yakın alandaki, (B) Optik sinire orta mesafe uzaklıktaki, (C) Optik sinire en uzak alandaki Cone-Arrestin boyaması ile immünreaktivite gösteren Koni fotoreseptörleri izleniyor Rd2 PN24 in vivo retinal dokularda Cone-Arrestin immünreaktivitesinin WtBl6 in vivo ve rd2 PN18 in vivo gruplarına göre belirgin şekilde azalmış olduğu, (B') grubunda ise Optik sinire orta mesafe uzaklıktaki retinal kesitin Cone-Arrestin, DAPI ve TUNEL ile kolokalize boyanması izleniyor Opt.S: Optik Sinir, RPE: Retina Pigment Epiteli, DNT: Dış Nükleer Tabaka (Cone-Arrestin antikoru, X200)



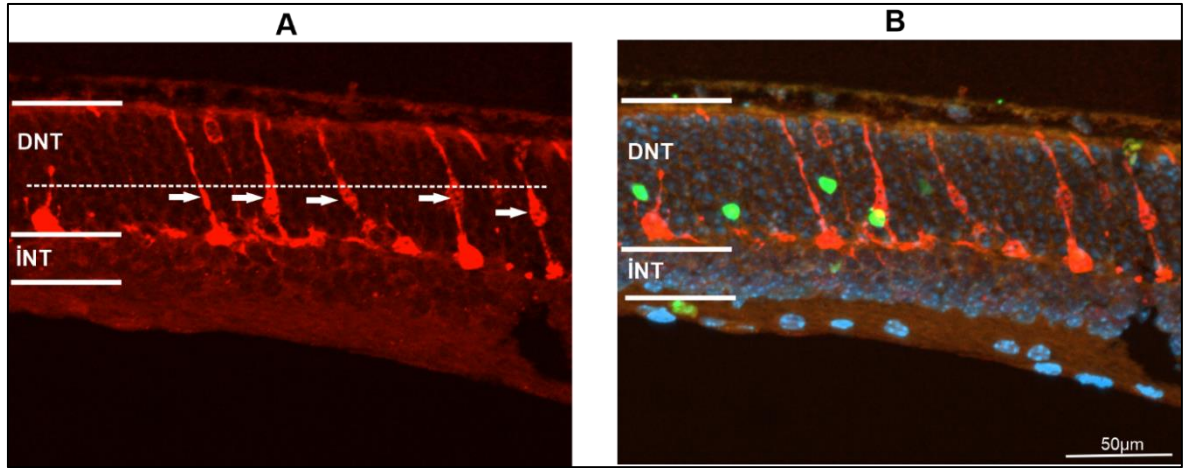
Resim 4.16. Rd2 grubuna ait Koni fotoreseptörlerinin immüno Floresan yöntemle incelenmesi. İn vitro rd2 PN18 grubuna ait retinal kesitlerde (A) Cone-Arrestin immünoaktivitesi ile gösterilen Koni fotoreseptörleri (→), (B) aynı kesite ait DAPI, TUNEL ve Cone-Arrestin kolokalize immüno Floresans görüntüsü izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka (Cone-Arrestin antikoru, X200)



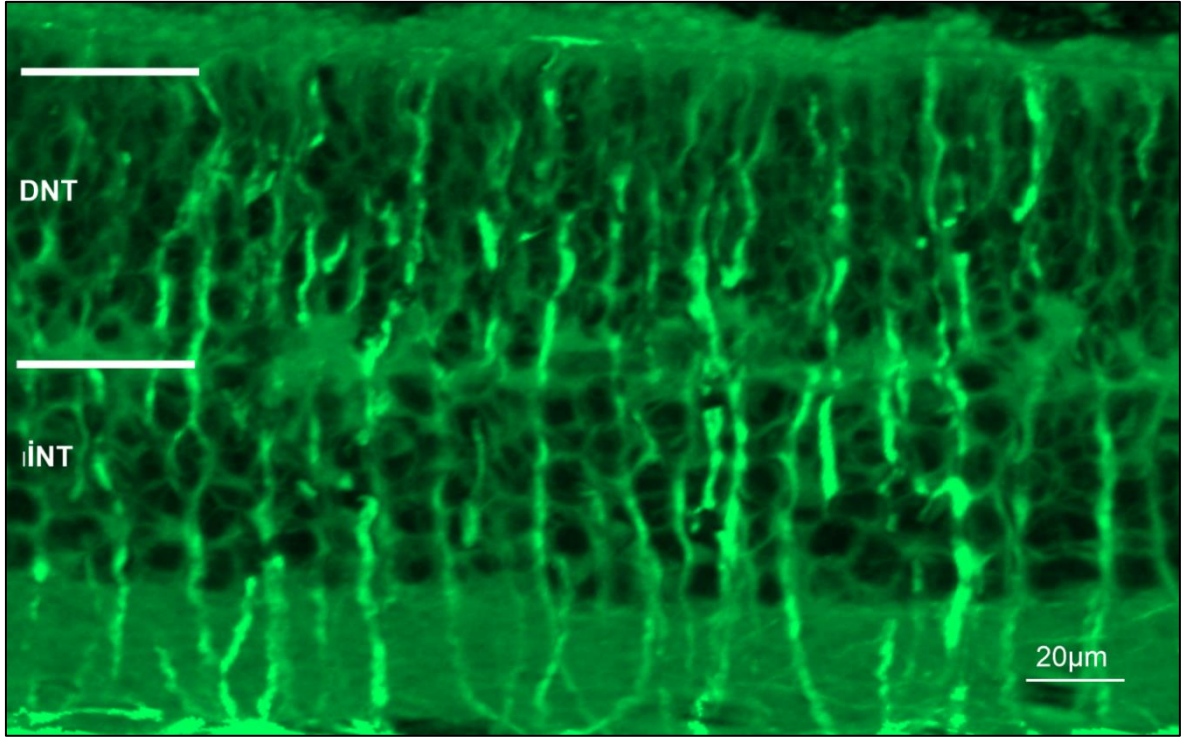
Resim 4.17. En etkili Olaparib grubuna ait Koni fotoreseptörlerinin immüno Floresan yöntemle incelenmesi. İn vitro 100nM Olaparib tedavisi uygulanan gruba ait retinal kesitlerde (A) Cone-Arrestin immünoaktivitesi ile gösterilen Koni fotoreseptörleri (→), (B) aynı kesite ait DAPI, TUNEL ve Cone-Arrestin kolokalize immüno Floresans görüntüsü izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka (Cone-Arrestin antikoru, X200)



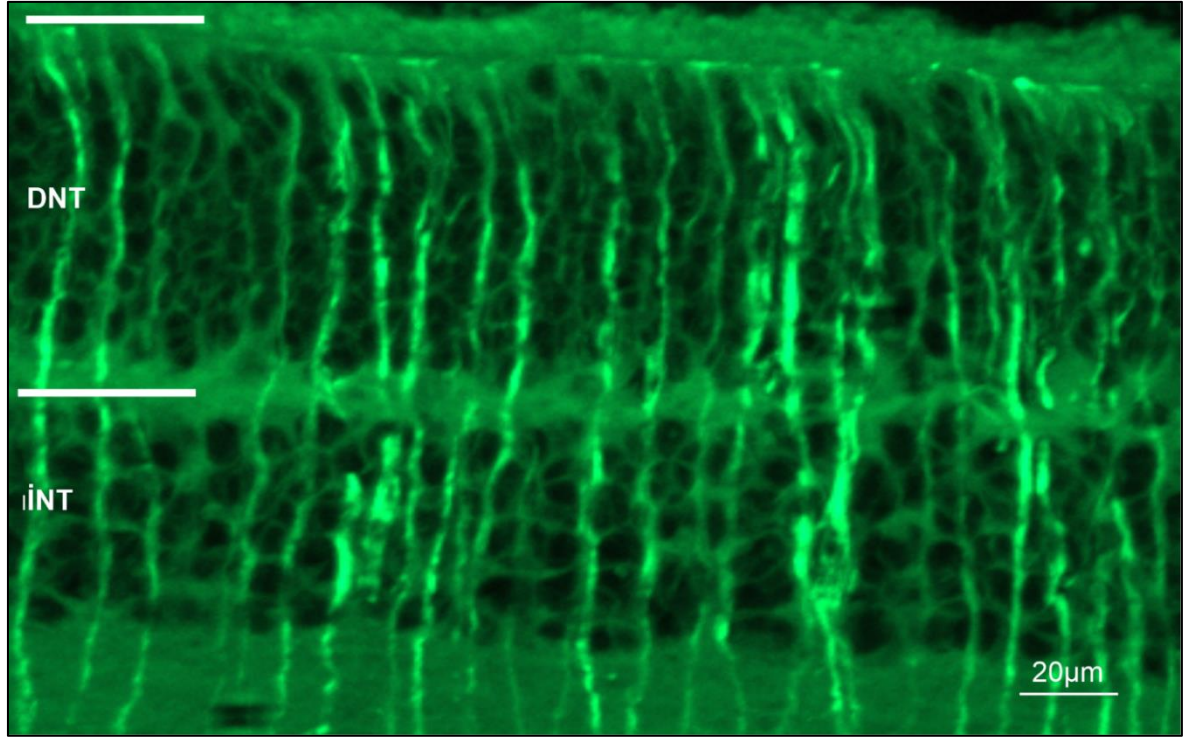
Resim 4.18. En etkili BMN-673 grubuna ait Koni fotoreseptörlerinin immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi. İn vitro 3nM BMN-673 tedavisi uygulanan gruba ait retinal kesitlerde (A) Cone-Arrestin immünoaktivitesi ile gösterilen Koni fotoreseptörleri (→), (B) aynı kesite ait DAPI, TUNEL ve Cone-Arrestin kolokalizasyonu immünohistokimyasal görüntüsü izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka (Cone-Arrestin antikoru, X200)



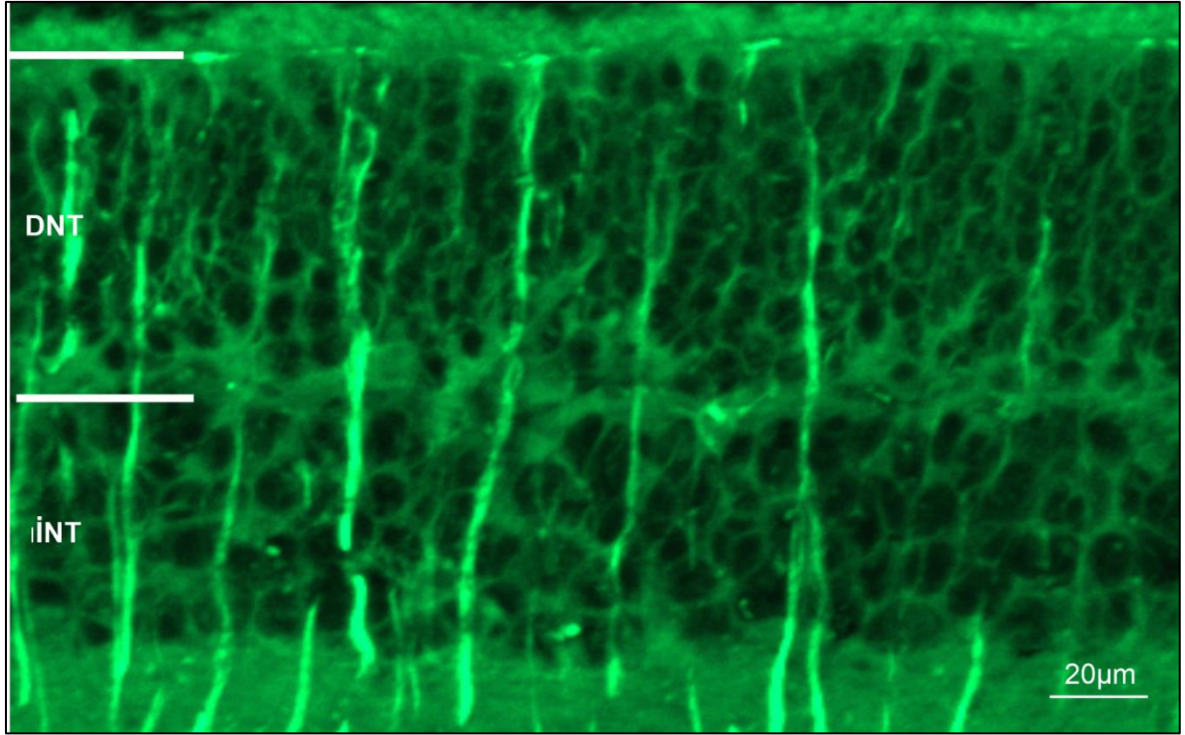
Resim 4.19. En etkili 3AB grubuna ait Koni fotoreseptörlerinin immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi. İn vitro 10nM 3AB tedavisi uygulanan gruba ait retinal kesitlerde (A) Cone-Arrestin immünoaktivitesi ile gösterilen Koni fotoreseptörleri (→), (B) aynı kesite ait DAPI, TUNEL ve Cone-Arrestin kolokalizasyonu immünohistokimyasal görüntüsü izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka (Cone-Arrestin antikoru, X200)



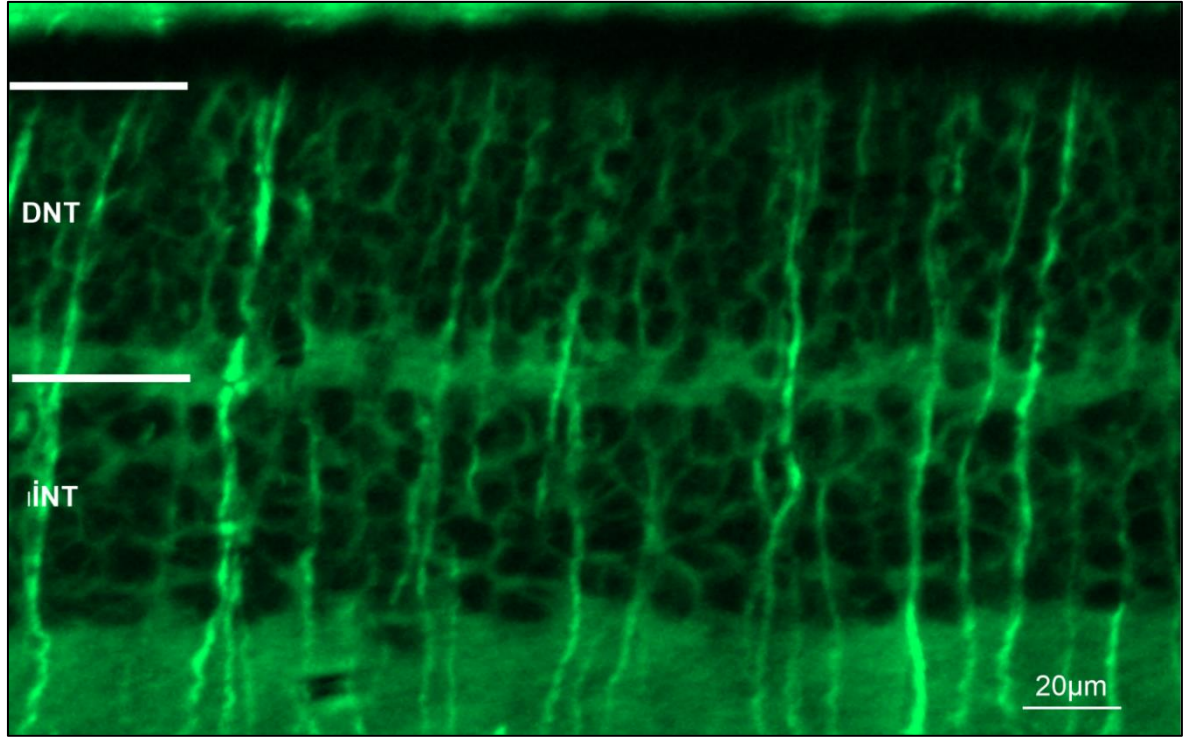
Resim 4.20. Rd2 grubundaki Müller hücre aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi İn vitro rd2 PN18 grubuna ait retinal kesitlerde, kesitin tüm tabakaları boyunca dikey yayılım gösteren Müller hücre aktivitesi, fosforlu yeşil görünen GFAP immünfloresans görüntüsü ile izleniyor DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka (GFAP antikoru, X200)



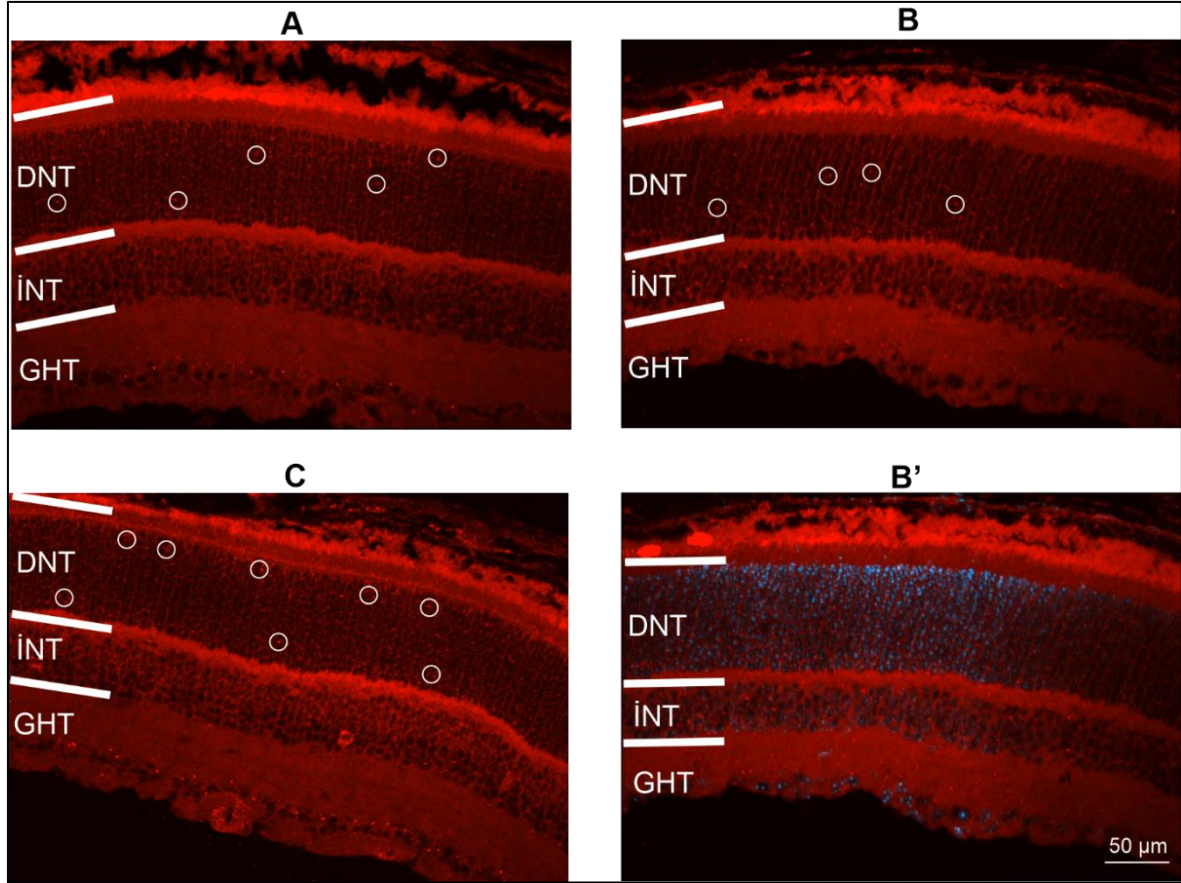
Resim 4.21. En etkili Olaparib grubundaki Müller hücre aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi. İn vitro 100nM Olaparib tedavisi uygulanan gruba ait retinal kesitlerde, kesitin tüm tabakaları boyunca dikey yayılım gösteren Müller hücre aktivitesi, fosforlu yeşil görünen GFAP immünfloresans görüntüsü ile izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka (GFAP antikoru, X200)



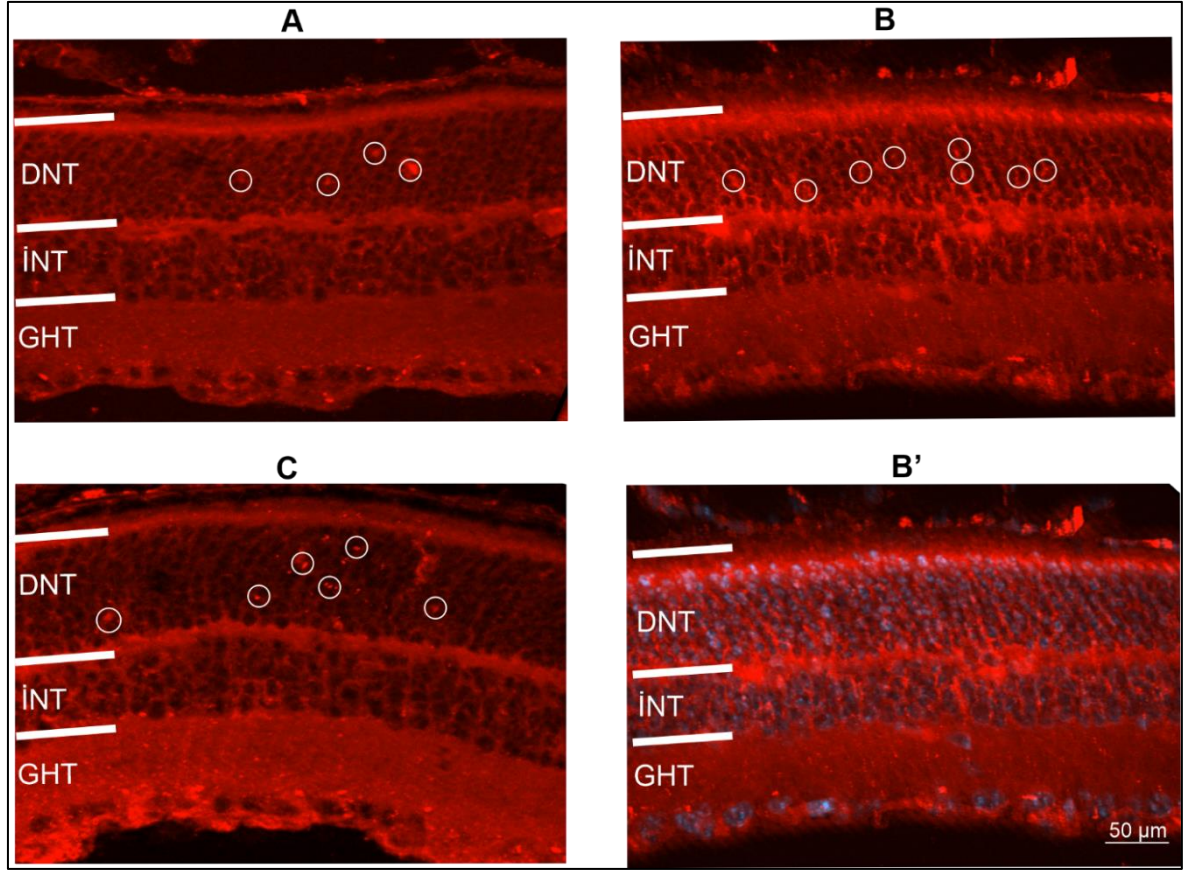
Resim 4.22. En etkili BMN-673 grubundaki Müller hücre aktivitesinin immunfloresan yöntemle incelenmesi. İn vitro 3nM BMN-673 tedavisi uygulanan gruba ait retinal kesitlerde, kesitin tüm tabakaları boyunca Müller hücre aktivitesi, fosforlu yeşil görünen GFAP immunfloresans görüntüsü ile izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka (GFAP antikoru, X200)



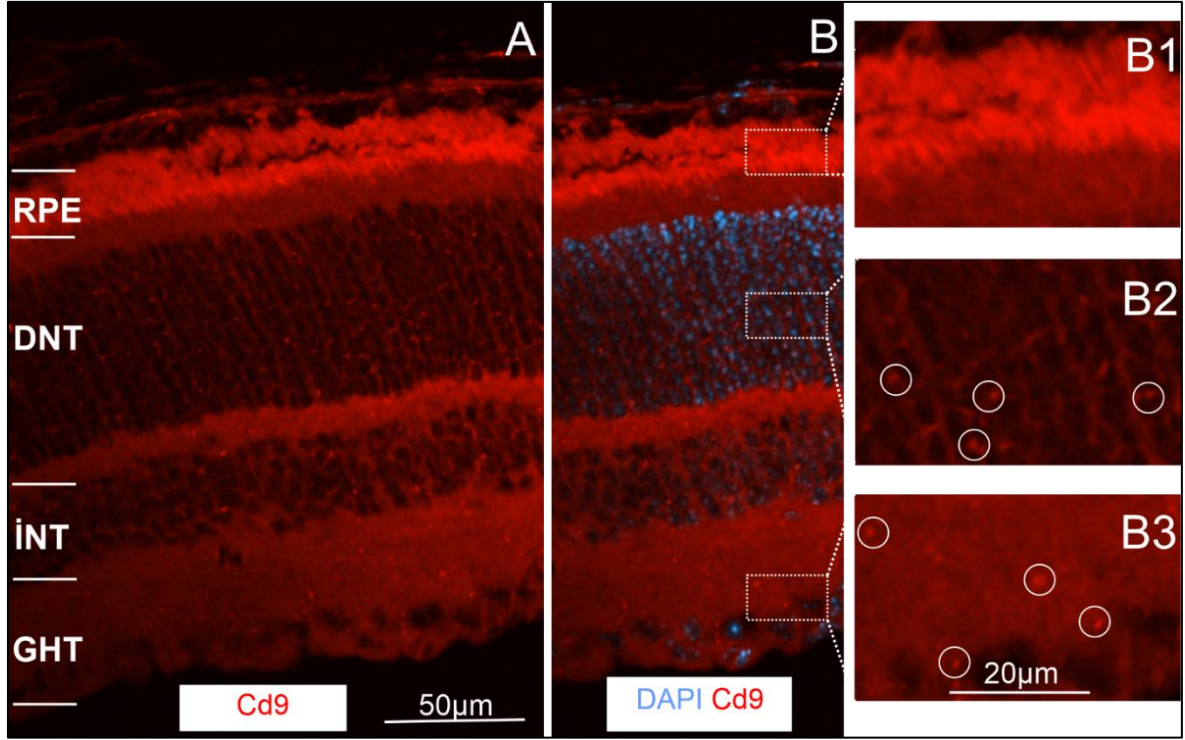
Resim 4.23. En etkili 3AB grubuna ait Müller hücre aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi. İn vitro 10nM 3AB tedavisi uygulanan gruba ait retinal kesitlerde, kesitin tüm tabakaları boyunca dikey yayılım gösteren Müller hücre aktivitesi, fosforlu yeşil görünen GFAP immünfloresans görüntüsü ile izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka (GFAP antikoru, X200)



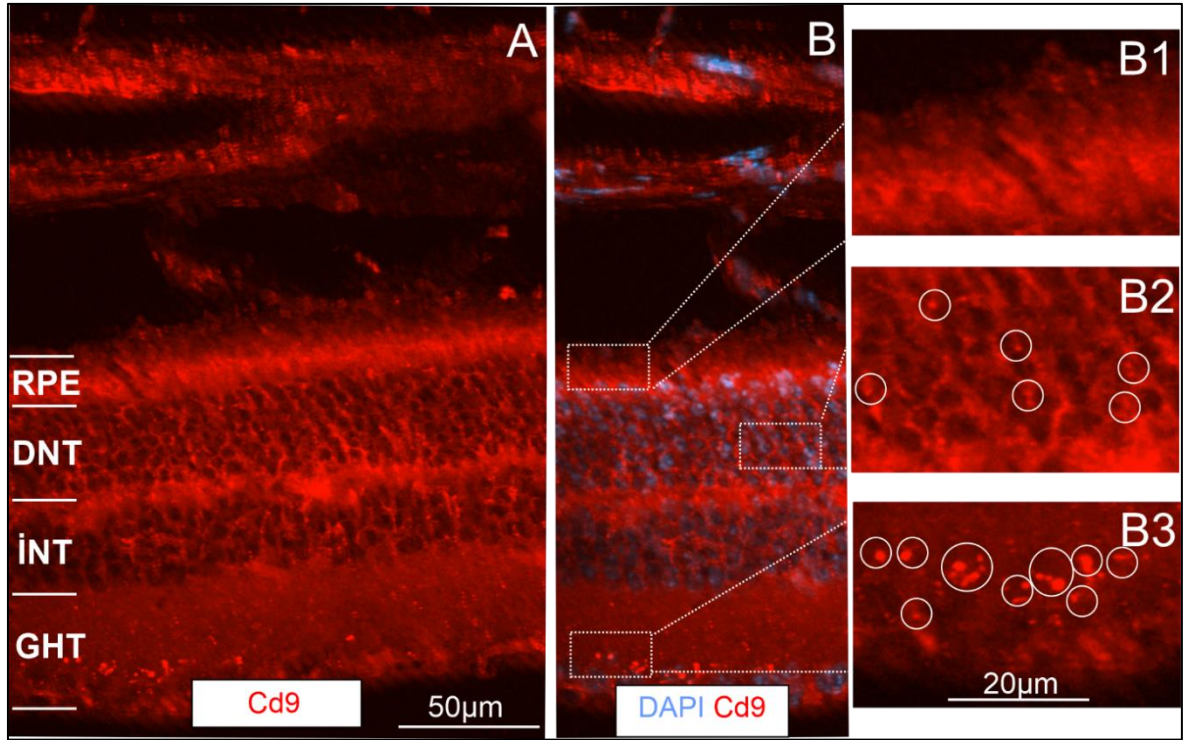
Resim 4.24. WtBl6 farelerde post natal 15, 18 ve 24. günlerde DNT' de eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi. İn vivo Wild type (WtBl6) fare retinal dokularında (A) Post Natal 15 (PN15), (B) PN18 ve (C) PN24 günlere ait ekstrasellüler vezikül (eV) aktiviteleri (○) kırmızı noktacıklar şeklinde görünen CD9 immünreaktivitesi ile immünfloresans olarak izlenirken, (B') grubunda ise B grubuna ait retinal kesitin DAPI ile kolokalize boyanması izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, INT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (CD9 antikoru, X200)



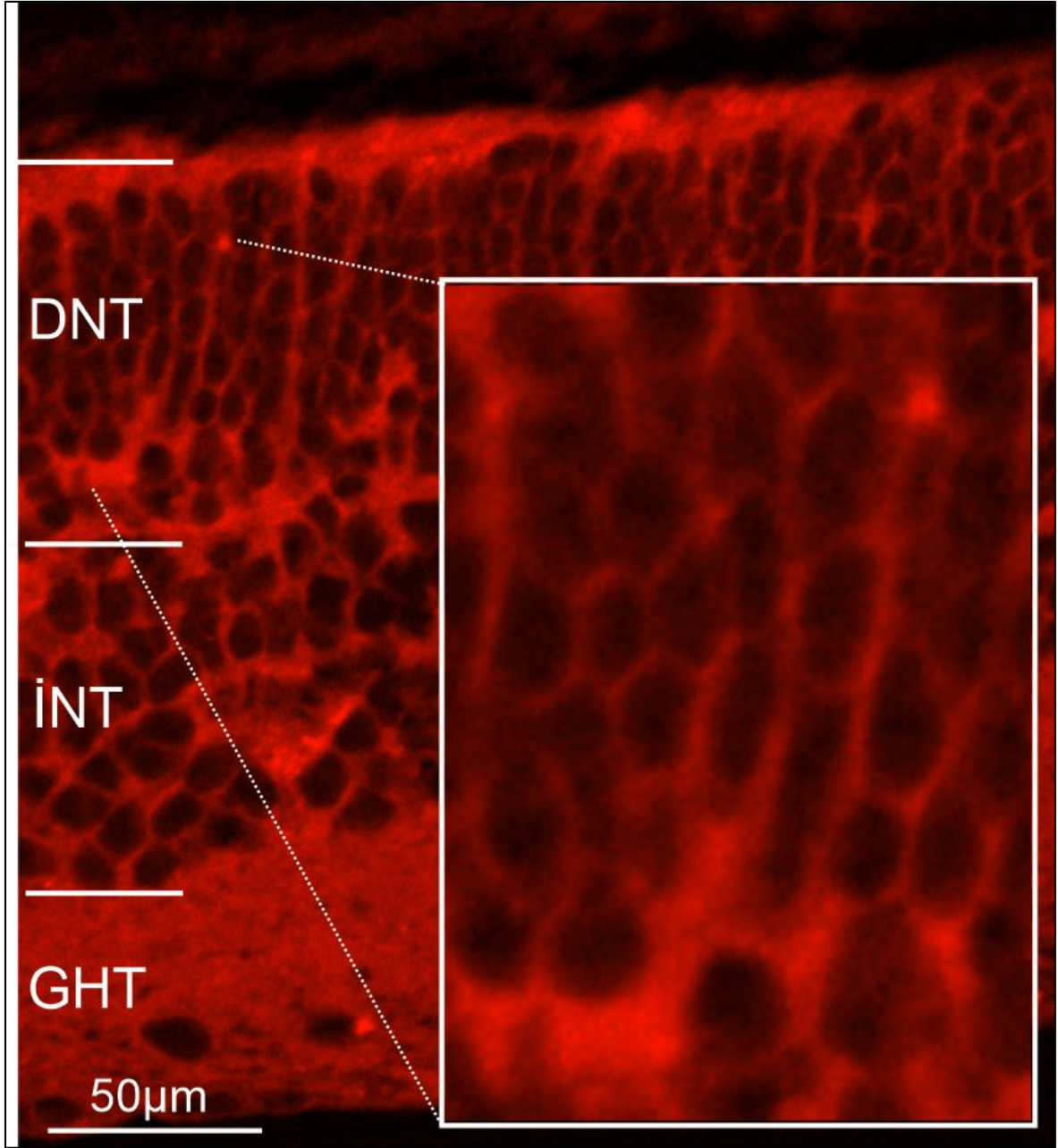
Resim 4.25. Rd2 farelerde post natal 15, 18 ve 24. günlerde DNT' de eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi. İn vivo rd2 fare retinal dokularında (A) Post Natal 15. güne ait (PN15), (B) PN18' e ait, (C) PN24' e ait ekstrasellüler vezikül (eV) aktiviteleri (○) kırmızı noktacıklar şeklinde görünen CD9 immünreaktivitesi ile immünfloresans olarak izlenirken, (B') grubunda ise B grubuna ait retinal kesitin DAPI ile kolokelize boyanması izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, INT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (CD9 antikor, X200)



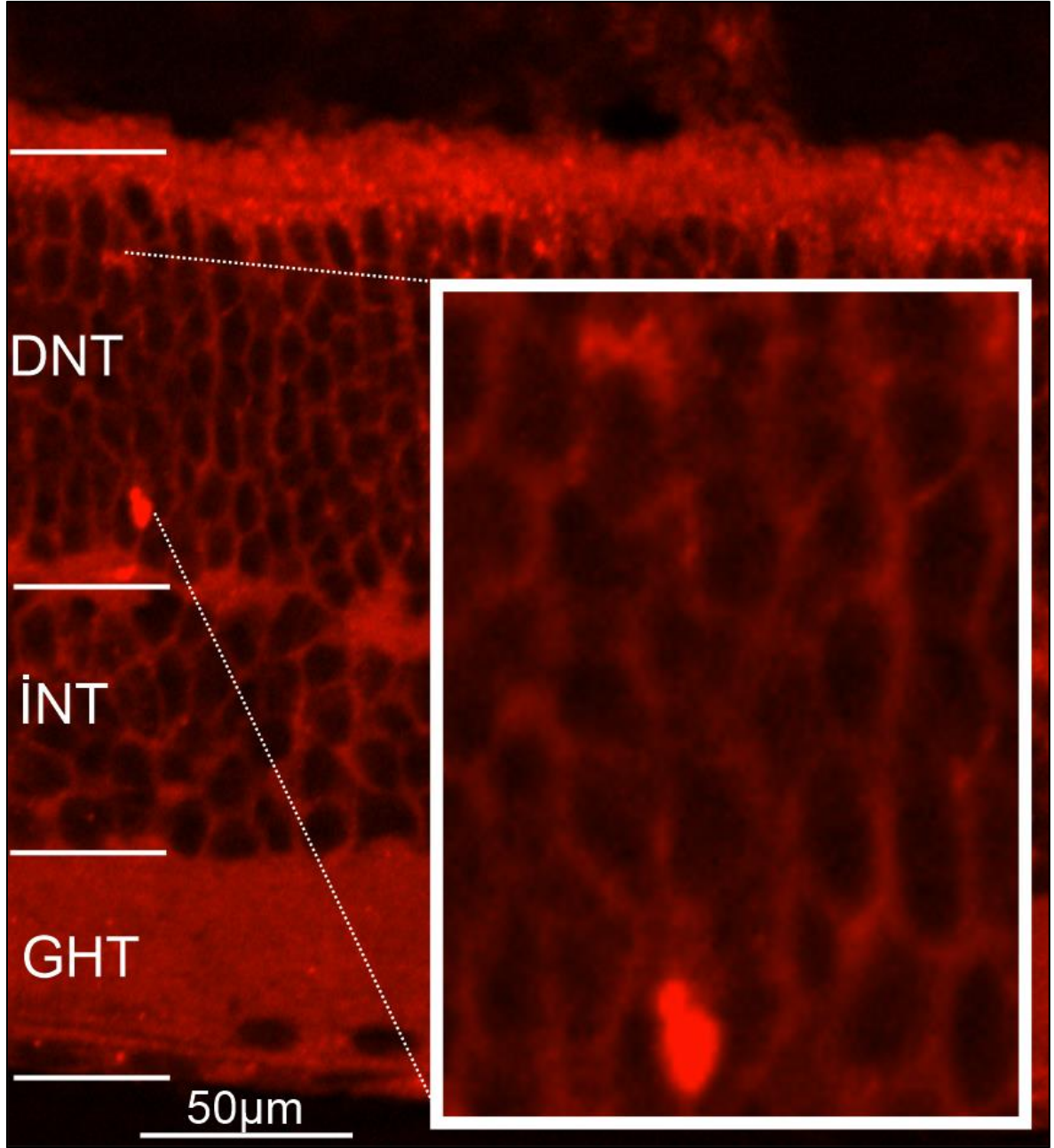
Resim 4.26. WtBl6_PN18 farelerde retinanın tüm tabakalarında eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi İn vivo Wild type (WtBl6) PN18 fare retinal dokularında ekstrasellüler vezikül (eV) aktiviteleri ($\bigcirc$) kırmızı noktacıklar şeklinde görünen CD9 immünreaktivitesi ile immünfloresans olarak (A) retinal kesitin tüm tabakalarında, (B) A grubuna ait retinal kesitin DAPI ile kolokelize boyanması ile birlikte, (B1) WtBl6 PN18 fare retinal kesitinin RPE tabakasında, (B2) WtBl6 PN18 fare retinal kesitinin DNT tabakasında, (B3) WtBl6 PN18 fare retinal kesitinin GHT tabakasında izleniyor DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (CD9 antikoru, X200)



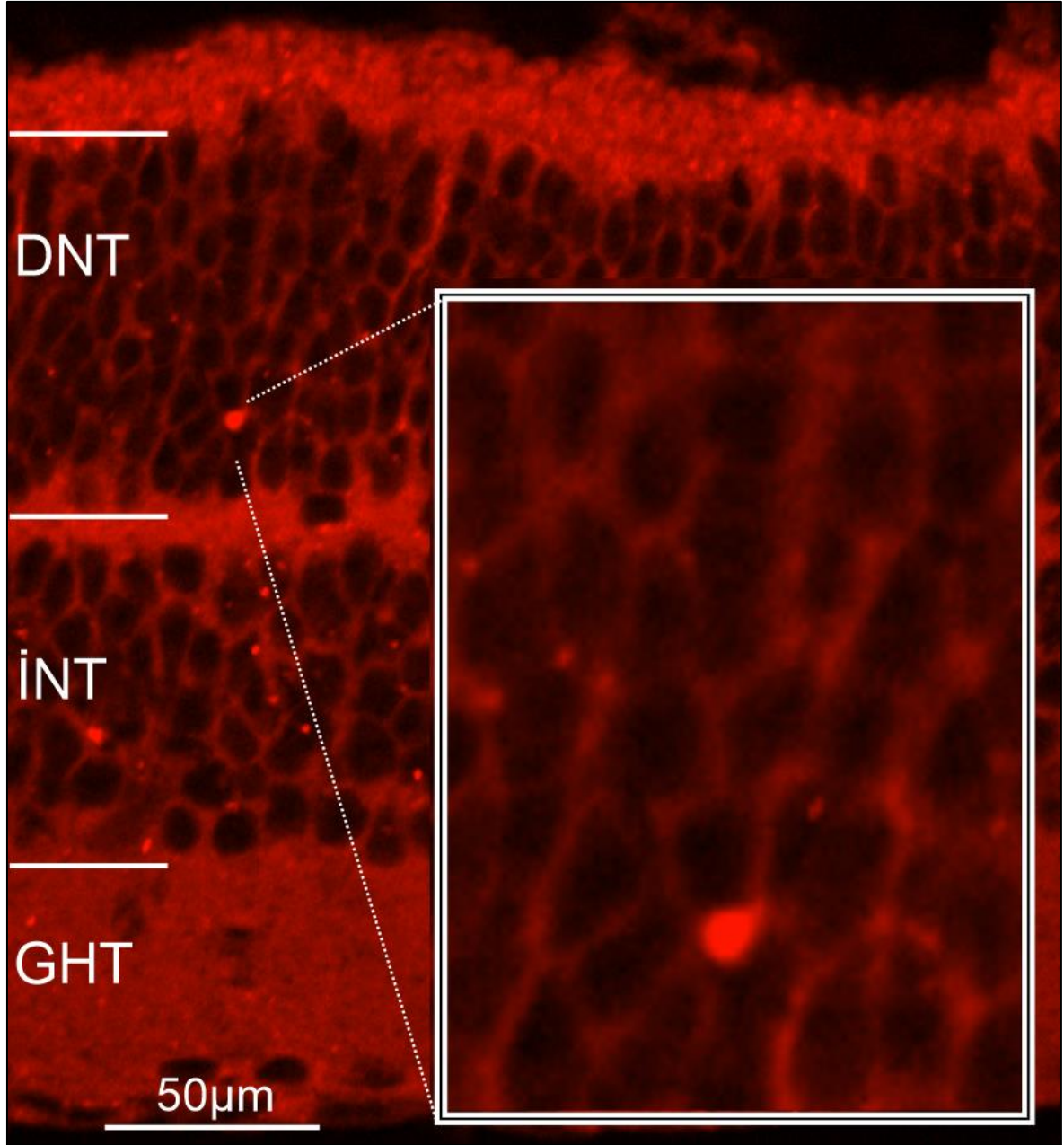
Resim 4.27. Rd2_PN18 farelerde retinanın tüm tabakalarında eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi İn vivo rd2 PN18 fare retinal dokularında ekstrasellüler vezikül aktiviteleri (○) kırmızı noktacıklar şeklinde görünen CD9 immünreaktivitesi ile immünfloresans olarak (A) retinal kesitin tüm tabakalarında, (B) A grubuna ait retinal kesitin DAPI ile kolokalize boyanması şeklinde, (B1) RPE tabakasında, (B2) DNT tabakasında, (B3) GHT tabakasında izleniyor DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (CD9 antikoru, X200)



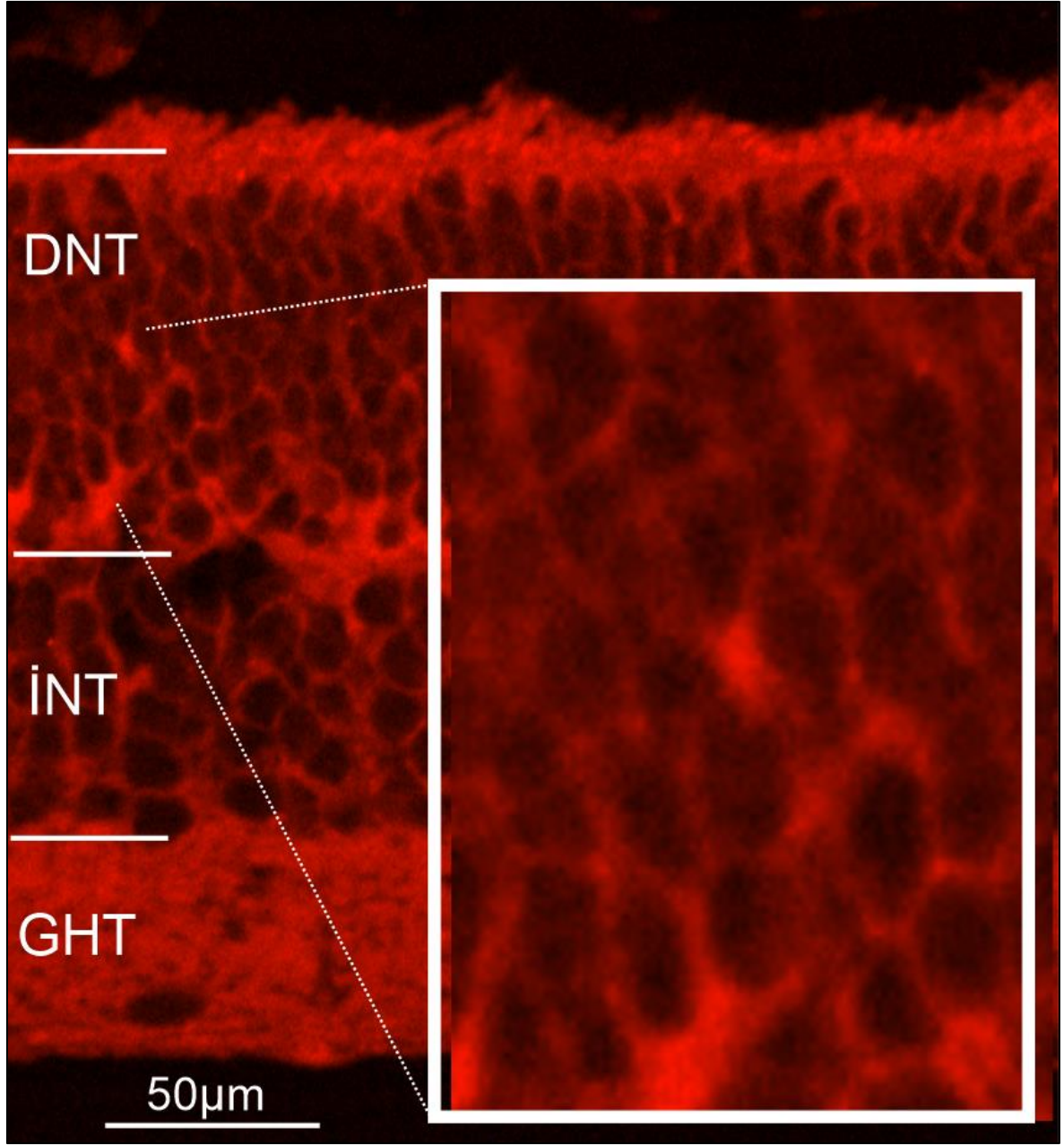
Resim 4.28. Rd2 grubuna ait retinalarda eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi İn vitro rd2 PN18 fare retinal kültürlerinde retinal kesitin Dış Nüklear Tabakası' ndaki ekstrasellüler vezikül (eV) aktivitesi kırmızı noktacıklar şeklinde görünen CD9 immünreaktivitesi ile immünfloresans olarak izleniyor DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (CD9 antikor, X200)



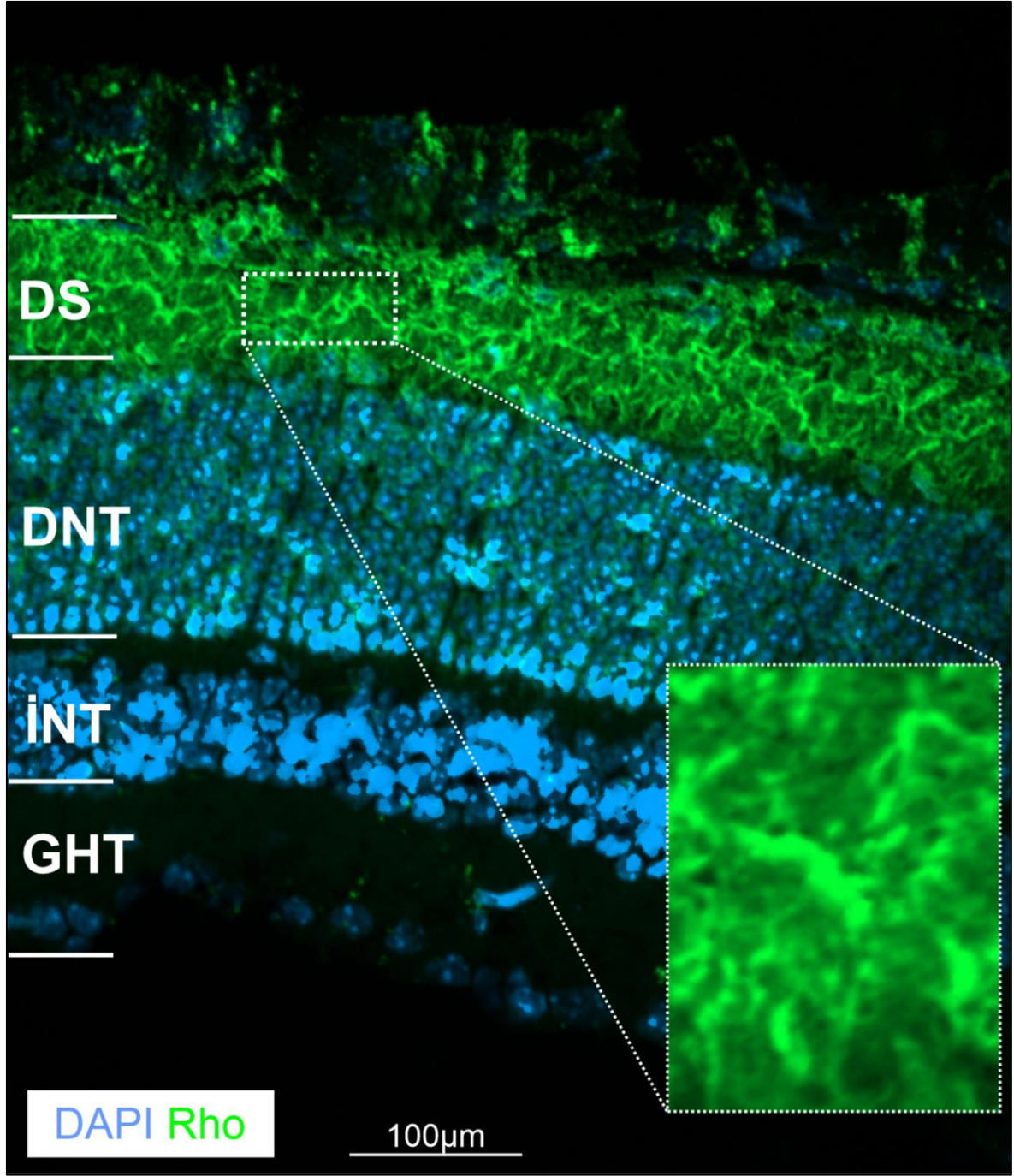
Resim 4.29. En etkili Olaparib grubuna ait retinalarda eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi. İn vitro 100nM Olaparib tedavisi uygulanan rd2 PN18 fare retinal kültürlerinde retinal kesitin Dış Nükleer Tabakası'ndaki ekstrasellüler vezikül (eV) aktivitesi kırmızı noktacıklar şeklinde görünen CD9 immünreaktivitesi ile immünfloresans olarak izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (CD9 antikor, X200)



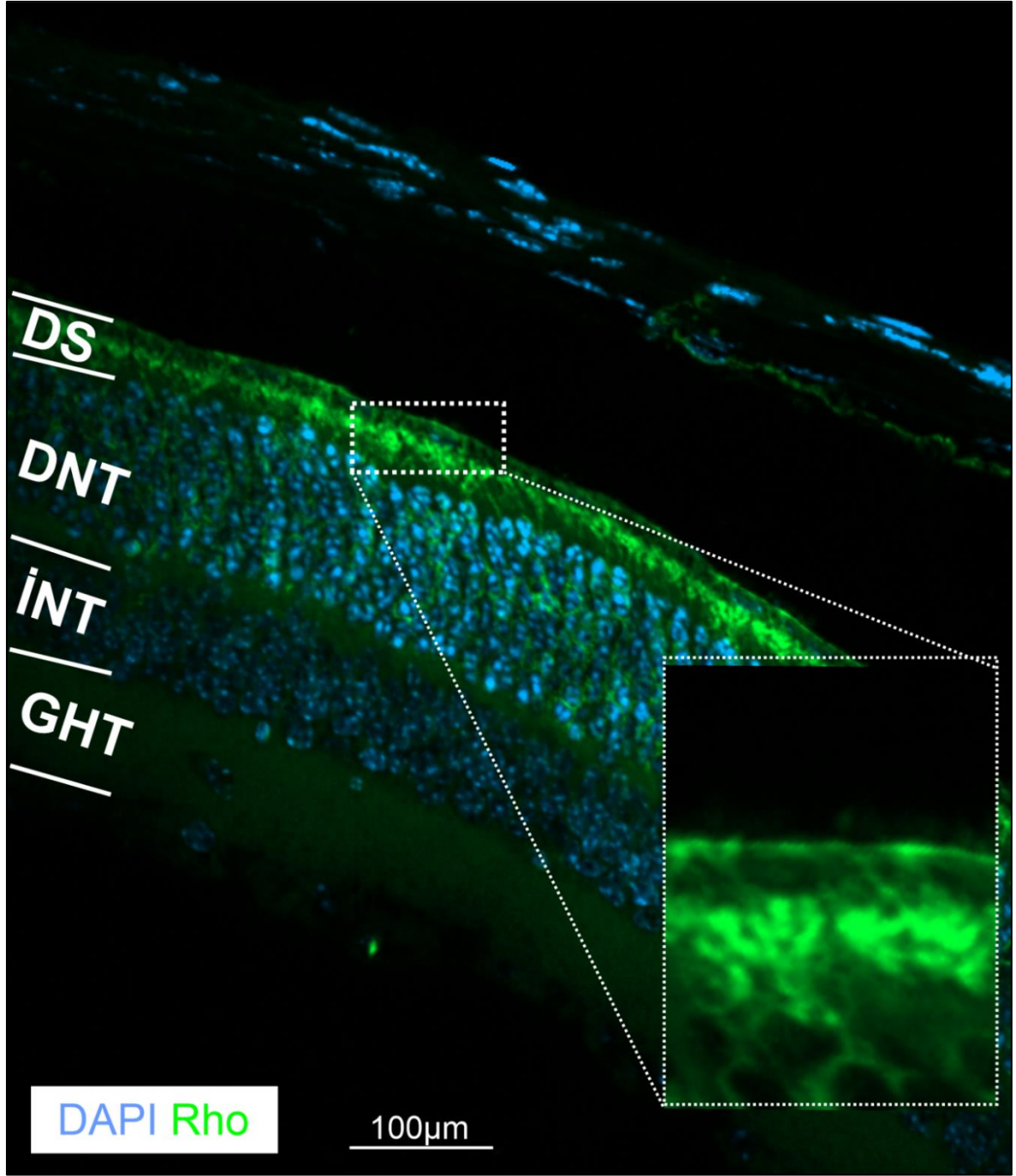
Resim 4.30. En etkili BMN-673 grubuna ait retinalarda eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi. İn vitro 3nM BMN-673 tedavisi uygulanan rd2 PN18 fare retinal kültürlerinde retinal kesitin Dış Nükleer Tabakası'ndaki ekstrasellüler vezikül (eV) aktivitesi kırmızı noktacıklar şeklinde görünen CD9 immünreaktivitesi ile immünfloresans olarak izleniyor. DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (CD9 antikor, X200)



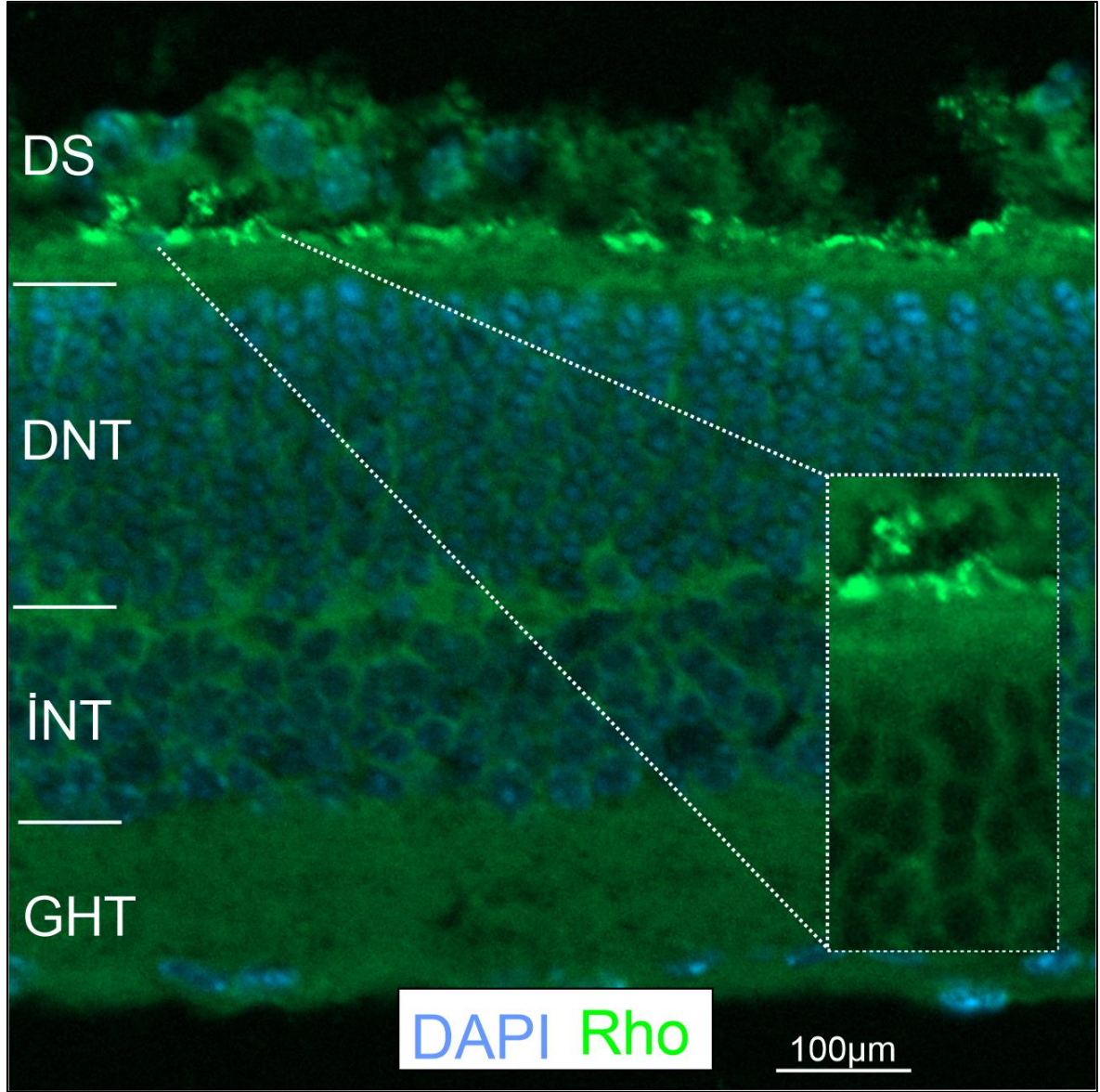
Resim 4.31. En etkili 3AB grubuna ait retinalarda eV aktivitesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi İn vitro 10nM 3AB tedavisi uygulanan rd2 PN18 fare retinal kültürlerinde retinal kesitin Dış Nüklear Tabakası' ndaki ekstrasellüler vezikül aktivitesi (eV) kırmızı noktacıklar şeklinde görünen CD9 immünreaktivitesi ile immünfloresans olarak izleniyor DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (CD9 antikoru, X200)



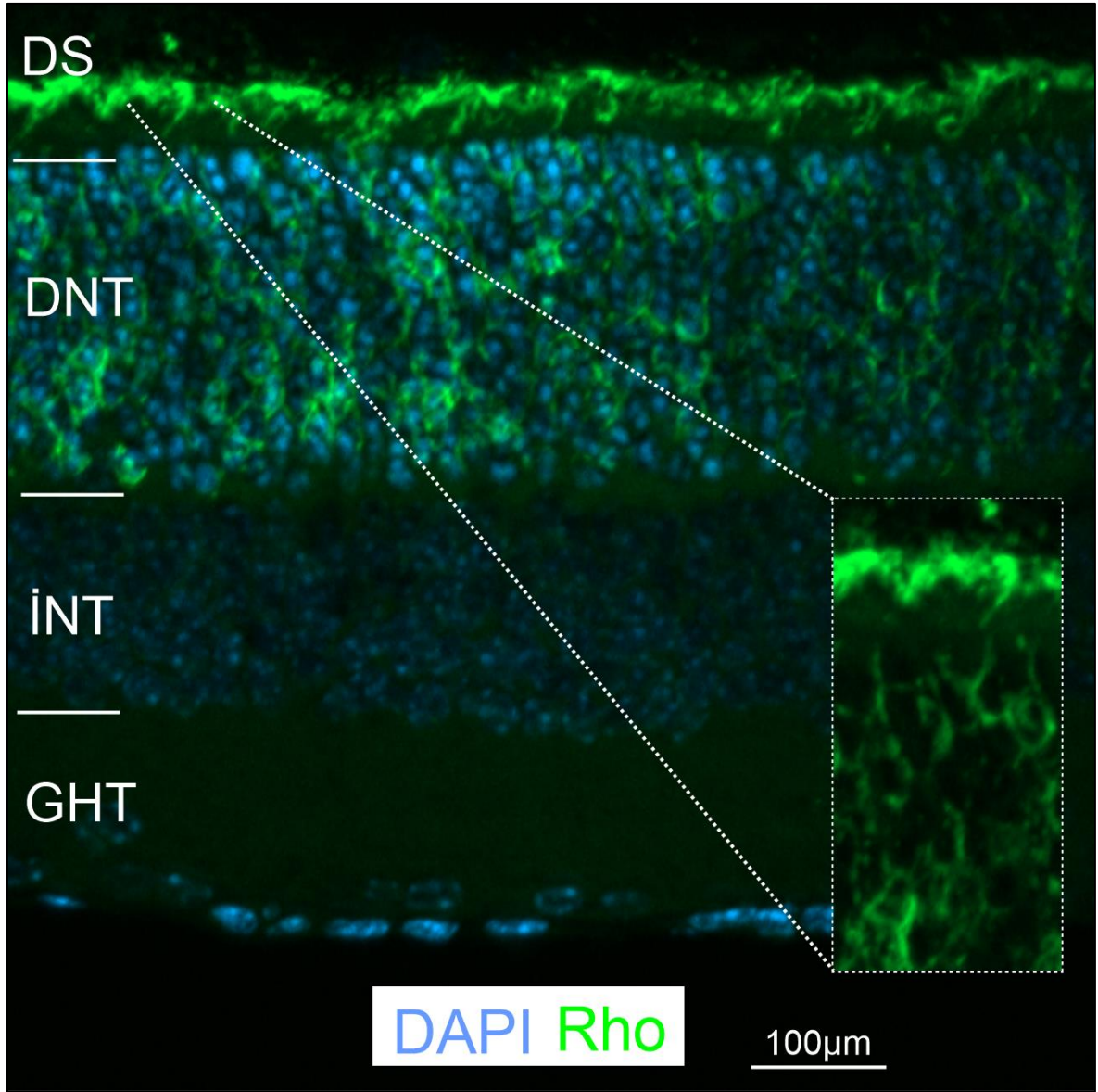
Resim 4.32. WtBl6_PN18 farelerde rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi İn vivo Wild type (WtBl6) post natal 18 gününe ait (PN18) retinal kesitin Dış Segment'indeki (DS) Rodopsin ifadenmesi Rho immünreaktivitesi ile fosforlu yeşile boyanmış olarak, DAPI kolokalize boyanması eşliğinde izleniyor DS: Dış Segment, DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (Rhodopsin antikoru, X200)



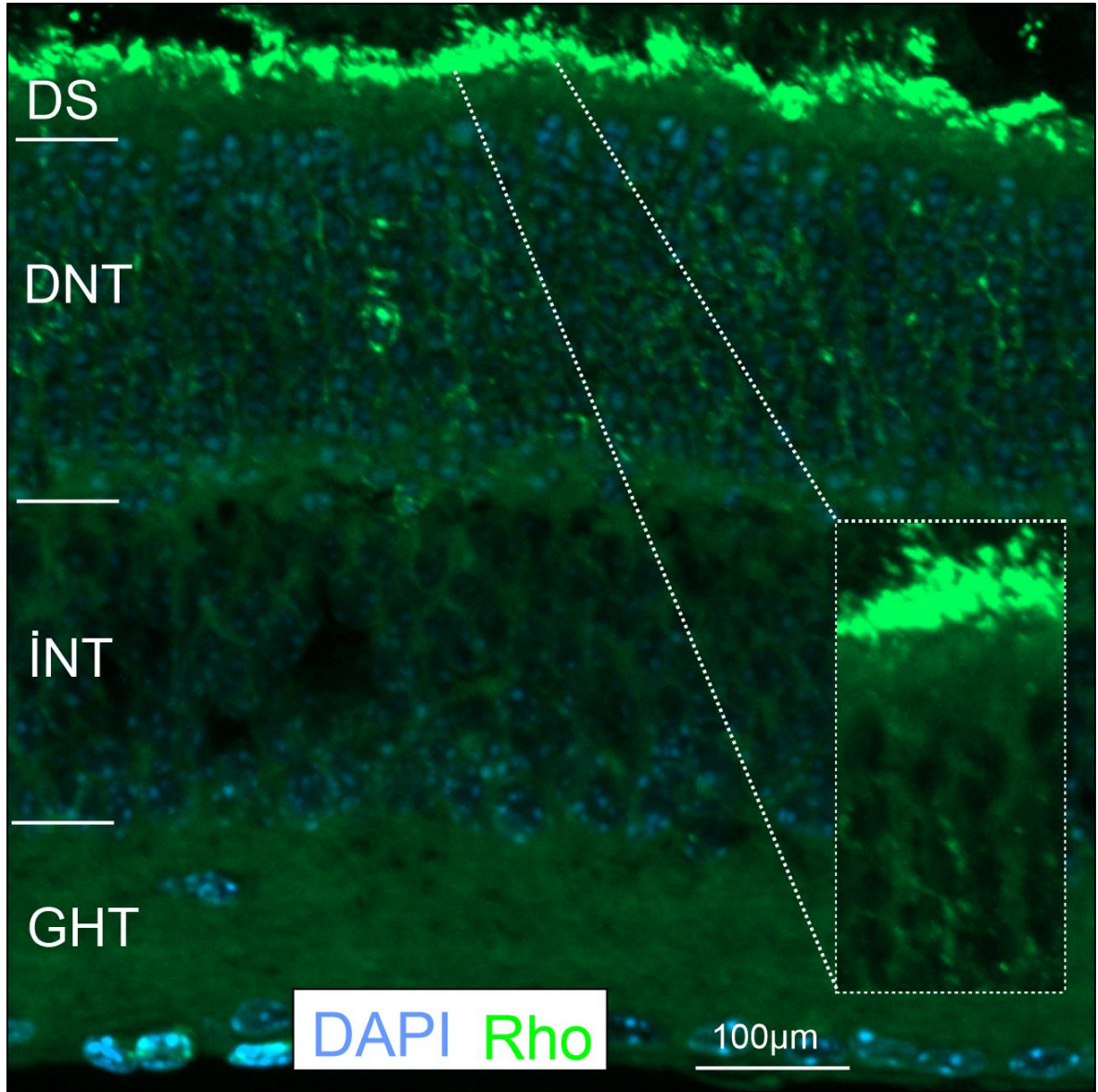
Resim 4.33. Rd2_PN18 farelerde rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi İn vivo rd2 post natal 18 gününe ait (PN18) retinal kesitin Dış Segment'indeki (DS) Rodopsin ifadenmesi Rho immünreaktivitesi ile fosforlu yeşile boyanmış olarak, DAPI kolokalize boyanması eşliğinde izleniyor DS: Dış Segment, DNT: Dış Nüklear Tabaka, İNT: İç Nüklear Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (Rhodopsin antikoru, X200)



Resim 4.34. Rd2 grubuna ait farelerde rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi Tedavi uygulanmayan in vitro rd2 post natal 18. güne ait retinal kesitin Dış Segment'indeki (DS) Rodopsin ifadenmesi Rho immünreaktivitesi ile fosforlu yeşile boyanmış olarak, DAPI kolokalize boyanması eşliğinde izleniyor DS: Dış Segment, DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (Rhodopsin antikoru, X200)



Resim 4.35. En etkili Olaparib grubunda rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi 100nM Olaparib tedavisi uygulanan in vitro rd2 post natal 18 gününe ait retinal kesitin Dış Segment'indeki (DS) Rodopsin ifadenmesi Rho immünreaktivitesi ile fosforlu yeşile boyanmış olarak, DAPI kolokalize boyanması eşliğinde izleniyor DS: Dış Segment, DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (Rhodopsin antikoru, X200)



Resim 4.36. En etkili BMN grubunda rodopsin ifadenmesinin immünfloresan yöntemle incelenmesi 3nM BMN-673 tedavisi uygulanan in vitro rd2 post natal 18. güne ait retinal kesitin Dış Segment'indeki (DS) Rodopsin ifadenmesi, Rho immünreaktivitesi ile fosforlu yeşile boyanmış olarak DAPI kolokalize boyanması eşliğinde izleniyor DS: Dış Segment, DNT: Dış Nükleer Tabaka, İNT: İç Nükleer Tabaka, GHT: Ganglion Hücre Tabakası (Rhodopsin antikoru, X200)

5. TARTIŞMA

Kalıtsal retinal dejenerasyonlar, çeşitli genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak otozomal dominant, otozomal resesif, X-kromozomu ilişkili, dijenik ya da mitokondriyal ilişkili şekilde gelişebilen ve süreç içinde retinal fonksiyonu etkileyerek kişileri görme yetisinin tamamen kaybına dek götürebilen nörodejenaratif hastalıklardır [3, 6-9]. Prevalansı 1/2000 olup dünyada yaklaşık iki milyon kişiyi etkilediği bilinen bu hastalık gruplarının etkin ve kesin bir tedavisi henüz yoktur [4]. İlerleyişlerini yavaşlatmaya ya da görme kaybının stabil tutulmasına yönelik vitamin ve antioksidan türevlerinin kullanımı gibi palyatif tedavi seçenekleri mevcuttur [255, 256]. Daha radikal olan gen tedavileri, kök hücreden üretilen retinal hücre enjeksiyonu, viral vektörlerle yapılan optogenetik yaklaşımlar ya da retinal protezler gibi cerrahi müdahaleler ne yazık ki görme yetisinin tamamına yakını kaybedildikten sonra denenebilen, ciddi risk faktörü taşıyan tedavilerdir. Bu anlamda kalıtsal retinal dejenerasyonların patogeneizlerinin aydınlatılarak uygun ve etkin bir tedavi yöntemi ortaya konabilmesi son derece önemli olmaktadır.

Adenozin difosfat ribozilasyonu ya da daha yaygın kullanımıyla “ADP-ribozilasyonu” en genel ifadesi ile bir proteine bir ya da birden çok ADP-riboz segmentinin eklendiği, post transkripsiyonel bir modifikasyondur [10]. Eğer hedef proteine bir adet ADP-riboz parçacığı ekleniyorsa bu işleme “mono-ADP ribozilasyon” anlamına gelen “MARilasyon” denilmektedir. Aksine, hedef proteine birden fazla ADP-riboz parçacığı ekleniyorsa, ki iki yüz adete kadar ADP-riboz parçacığı eklenebildiği bilinmektedir, bu işleme de “poli-ADP ribozilasyon” anlamına gelen “PARilasyon” adı verilmektedir [48]. ADP-ribozilasyonu, çeşidi ne olursa olsun, diğer post-transkripsiyonel modifikasyonlar gibi proteinin enzimatik aktivitesini modifiye etmekte, onu ubiquitinleymekte ve nihayetinde o proteinin bozunmasına kadar giden yolu içermektedir [10].

ADP-ribozilasyonunu gerçekleştiren enzimlere “PARP (Poli-ADP-riboz polimeraz) enzimleri” adı verilmekte olup bunlar fonksiyonları ve hücre altı yerleşimleri birbirinden farklı, on yedi ayrı izoformdan oluşan bir enzim ailesi grubudurlar [47, 53, 56, 57]. “ARTD” (diferi benzeri ADP-ribozil transferaz) olarak da bilinirler [52]; ancak yaygın kullanımları “PARP enzimleri” şeklindedir. Hedef proteine bağlanma bölgelerine göre çeşitli sınıflandırmalara sahip olsalar da tüm PARP enzimlerinin bir katalitik bölgesi bulunmaktadır [53]. Bu katalitik bölge aynı zamanda PARP enziminin aktif bölgesi ya da

imza bölgesi olarak da bilinir. Katalitik bölgede NAD⁺ (Nikotinamid adenin nükleotidi) katalizlenerek Nikotinamid' e ve ADP-riboz' a parçalanmakta sonra da bu ADP-riboz, hedef proteine eklenmektedir [50].

On yedi üyeden oluşan PARP enzimlerinin, en çok çalışılan izoformu PARP-1' dir [70]. PARP1; DNA-bağımlı bir PARP enzimi olup katalitik bölgesinde ise Histidin-Tirozin-Glutamat üçlüsünü içermektedir. Histidin ve Tirozin NAD⁺ ' nın katalizlenmek üzere doğru şekilde PARP enzimine bağlanmasını sağlarken Glutamat da bağlanan NAD⁺ ' nın katalizlenmesini gerçekleştiren ve PAR' ın (poli-ADP riboz) sentezlenmesini sağlayan yapıdır [53].

PARP enzimlerinin gerçekleştirdikleri ADP-ribozilasyonu sayesinde normal şartlar altında hücredeki kromatin modifikasyonu ve transkripsiyon düzenlenmekte [70, 81, 82], hücre farklılaşması ve proliferasyonu sağlanmakta [118], hücredeki telomer fonksiyonunun sağlıklı bir şekilde yürütülmesi gerçekleştirilmektedir [122, 123]. PARP enzimlerinin en önemli fonksiyonlarından biri ise hafif ve orta şiddetteki genotoksik faktörler nedeniyle DNA zincirinde oluşan kırıkların tamirini sağlayarak hücrenin canlılığını ve genetik stabilitesinin devamlılığını korumalarıdır [98].

Bununla birlikte, artmış oksidatif stres ve aşırı genotoksik faktörlere maruziyet karşısında, hücresel inflamasyonda [126, 127] ve hücreyi ölüme götüren bir yolda da yer aldıkları tespit edilmiştir [284]. Normal şartlarda, hücresel fizyolojinin gerektirdiği hücresel döngüler ya da hücrenin karşılaştığı hafif-orta genotoksik faktörlere bağlı olarak DNA kırıklarının gerçekleşmesi karşısında aktive olup hücresel DNA' yı PARilasyon yoluyla tamir eden PARP enzimleri, aşırı genotoksik faktörler karşısında DNA tek zincir kırıklarını onaramamaktadırlar. Bu durumda da hücre içi sinyal iletim mekanizmalarının başlıcalarından olan cGMP miktarının arttığı bilinmektedir. Artan cGMP, hücre içi protein kinazları aktive ederek protein kinaz-G' nin (PKG) yükselmesine neden oluyor gibi görünmektedir. PKG aktivasyonu ile birlikte histon deasetilazların (HDAC) aktivasyonu yükselmekte bu da zaten DNA zincir kırığını onarmak üzere aktive olmuş PARP enzimlerinin aktivasyonunu daha da artırıyor gibi görünmektedir [169]. Aşırı artan PARP aktivasyonu nedeniyle de bir süre sonra PARP' ların üretmekte oldukları PAR (poli-ADP-riboz) polimerleri hücre içinde aşırı birikerek "PARthanatos" adı verilen hücre ölüm mekanizmasına yol açmaktadırlar [170]. PARthanatosun gerçekleşmesi ile hücreyi ölüme

götüren süreçte ana neden; yoğun şekilde biriken PAR polimerlerinin yol açtığı toksisite olabileceği gibi [17], PARP' lar tarafından PAR polimerlerinin üretilmesi sırasında NAD⁺' nın substrat olarak kullanılmasına bağlı şekilde hücresel enerji metabolizmasında bir dengesizlik yaşanması ve böylece hücrenin ölüme doğru yol alması da olabilmektedir [16, 46]. Bu yolağa alternatif şekilde, artan cGMP miktarının hücresel kalsiyum kanallarının açılmasını sağlayarak hücre içi kalsiyum miktarını ve ona bağlı olarak da kalpainleri artırdığı, bunun da hücreyi ölüme götürüyor olabildiği de çalışılmaktadır [158, 164]. Her iki benzer fakat alternatif ölüm yolağının da kaspazları içermediği, bunun yerine cGMP artışı meydana getirdiği, bu nedenle apoptozdan farklı oldukları bilinmektedir. Bu tez çalışmasında artmış cGMP ve artmış PARP aktivasyonuna bağlı olarak gelişen, PAR polimerlerinin birikiminin görüldüğü PARthanatos ölüm yolağı temel olarak çalışılmıştır.

Kalıtsal retinal dejenerasyonlarda artmış PARP aktivitesinin yer aldığını gösteren ilk çalışma Paquet-Durand ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılmıştır. PDE6B geni mutasyonlu rd1 (retinal degeneration-1) model farelerle Wt (wild type-sağlıklı) fare retinaları karşılaştırıldığında rd1 retinal kültürlerde hem PARP ifadenmesinin hem de aktivitesinin arttığı, bununla birlikte bu farelerin retinalarında oksidatif DNA hasarının ve AIF' in (apoptoz indükleyici faktör) nükleusa translokasyonunun da gerçekleştiği gösterilmiştir [18].

2009 yılında ise Paquet-Durand ve arkadaşları tarafından hem rd1 hem de PRPH2 geni mutasyonlu rd2 model fare retinalarında, Wt fare retinaları ile karşılaştırıldığında PKG (protein kinaz G) aktivasyonunun artmış olduğu; ayrıca Wt retinaların da PKG ile indüklendiklerinde cGMP' nin liderlik ettiği fotoreseptör hücre ölümüne gittikleri ortaya konmuştur. Bununla birlikte PKG inhibitörü uygulanan rd1 ve rd2 retinal kültürlerde ise fotoreseptör hücre ölümü anlamlı şekilde azalmıştır [285].

Sancho-Pelluz ve arkadaşları tarafından, rd1 fare retinal kültürlerinde histon asetiltransferazlar (HAT' lar) ve histon deasetilazlar (HDAC' ların) aktivitesinin araştırıldığı 2010 yılına ait çalışmada ise kalıtsal retinal dejenerasyon modeli olan rd1 fare retinalarında, Wt retinal kültürler ile karşılaştırıldığında, HAT' ların aktivitesi azalmış bulunurken HDAC' ların aktivitesi artmıştır. Ayrıca HDAC 1 ve 2' nin TSA (trikostatin-A) ile farmakolojik olarak inhibisyonu gerçekleştirildiğinde, rd1 retinalardaki fotoreseptör hücre ölümünün azalmış olduğu gösterilmiştir [169].

İlk defa PARP1 enziminin rd1 model homolog mutasyonun olduğu kalıtsal retinal dejenerasyonlarda rol oynadığını kanıtlayan çalışma, 2010’ da Sahaboglu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. 2007’ deki çalışmada [18] rd1 model fare retinalarında artmış PARP aktivitesi bulunmuşken bunun hangi PARP enzim ailesi üyesine ait olduğu bilinmemekteydi. Fakat bu çalışmada Wt, rd1 ve PARP1 KO (PARP1 üretemeyen) fareler karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. İlk olarak Wt retinalar ile PARP1 KO retinalar in vivo ve ex vivo olarak OCT (optik koherens tomografi) ve ERG (elektroretinografi) ölçümlerine tabi tutularak PARP1 KO fare retinaları, sağlıklı Wt fare retinalarından morfolojik anlamda ve retinal fonksiyon anlamında farklı bulunmamıştır. Daha sonra Wt ve PARP1 KO retinalara PDE6B inhibitörü uygulanarak rd1 model fare retinalarının özelliklerini göstermeleri sağlanmıştır. Bu durumda PDE6B inhibitörü uygulanan fare retinalarındaki fotoreseptör hücre ölümleri PARP1 KO retinalara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. PARP1’ i knock out etmenin retinal morfoloji ve fonksiyonu etkilemeden fotoreseptör hücre ölümünü azaltılabileceği ifade edilmiştir [171].

Retinitis pigmentosa gibi kalıtsal retinal dejenerasyonların, aynı mı yoksa farklı ölüm yollarını kullanarak mı geliştiklerine dair sorunun cevaplanabilmesi için 2011 yılında Kaur ve arkadaşları tarafından, rodopsin geni mutasyonlu P23H ve S334ter rat modelleri kullanılmıştır. Her iki türde de hem Kalpain seviyelerinin hem de PARP aktivasyonunun artmış olduğu, PAR polimerleri birikiminin gerçekleştiği, oksidatif DNA hasarının artmış olduğu ve kalpastatin seviyelerinin düşmüş olduğu gösterilmiştir. Bu bulguların PDE6B mutasyonuna sahip olan rd1 model farelerin retinalarıyla benzer çıkması oldukça dikkate değer şeklinde nitelendirilmiştir. Bununla birlikte S334ter modelinde ise apoptoz belirteçleri olan kaspaz-3 ve 9 ile sitokrom c’ nin de varlığı tespit edilmiştir. Tüm bu bulgulara dayanarak kalıtsal retinal dejenerasyonlarda mutasyon çeşidinden bağımsız olarak benzer bir hücre ölüm yolağı üzerinden fotoreseptör hücre ölümlerinin gerçekleşiyor olduğunun tespiti yapılarak, mekanizmanın tam olarak aydınlatılabilmesiyle kalıtsal retinal dejenerasyonlarda mutasyondan bağımsız olarak tedavi protokolünün gerçekleştirilebileceği ifade edilmiştir [286].

2014’ te Arango-Gonzales ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise kalıtsal retinal dejenerasyonlarda yer alan, apoptotik olmayan hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu amaçla kalıtsal retinal dejenerasyon modeli olan ve farklı gen mutasyonlarına sahip on ayrı deney hayvanı modeli kullanılmıştır. Bu modeller rd1, rd2,

rd10, Cngb1 KO, Rho KO, S334ter, P23H, Cnga3 KO, cpfl1 ve Rpe65 KO olarak belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu hayvan modellerinin hepsi göz önüne alındığında fotoreseptör hücre ölümü üzerinde apoptozun çok az bir rolü olduğu, deney modellerinin çoğunda apoptotik olmayan, cGMP artışıyla birlikte HDAC, PARP ve kalpain seviyelerinin de artmış bulunduğu ifade edilmiştir. Bu çalışma da, önceki gibi, kalıtsal retinal dejenerasyonların tedavisinde mutasyondan bağımsız bir yaklaşım izlenebileceğini göstermiştir [19].

Bir başka ilginç çalışma yine Sahaboglu ve arkadaşları tarafından 2014' te gerçekleştirilmiştir. Normal şartlarda PARP enziminin antagonisti olan PARG (poli-ADP-riboz glikohidrolaz) etkinliği Wt ve rd1 farelerde araştırılmış ve rd1 fare retinal kültürlerinde Wt' a göre daha yüksek bulunmuştur. Daha sonra ise PARG KO (PARG knock out) fare retinaları ile Wt fare retinalarının morfolojik yapıları karşılaştırılarak bir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte Wt fare retinalarına rd1-benzeri fotoreseptör ölümünü indükleyecek ajanlar uygulandığında, indüklenmiş Wt fare retinalarındaki fotoreseptör hücre ölümünün PARG KO retinalara oranla daha fazla olduğu, aynı zamanda bu retinalarda PARP1 aktivitesinin de daha yüksek olduğu bulunmuştur. Böylece retinal dejenerasyonlar söz konusu olduğunda, PARP1 ile antagonisti olan 110 kD' luk PARG' nin birlikte yükseldikleri, aralarında pozitif bir geribildirim mekanizması olduğu ve bu anlamda her ikisinin de kalıtsal retinal dejenerasyonların tedavisinde hedef odaklar olabilecekleri vurgulanmıştır [287].

2016' da Trifunovic ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada cpfl-1 fare modeli kullanılmıştır. Bu kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde hedef, Koni fotoreseptörlerini incelemek olmuştur. İn vitro koşullarda cpfl1 retinal kültürlerine HDAC (histon deasetilaz) inhibitörlerinden TSA (Trikostatin-A) uygulandığında Koni fotoreseptörlerindeki hücre ölümünün azaldığı ve retinal merkezi görmenin korunduğu bulunmuştur. Ayrıca in vivo olarak gerçekleştirilen TSA tek seferlik enjeksiyonunda ise Koni fotoreseptörlerinin on altı güne kadar canlılıklarını koruyabildikleri, Koni fotoreseptör hücre ölümünün azalmış olduğu gösterilmiştir [288].

Zhu ve arkadaşları tarafından 2016' da kalıtsal retinal dejenerasyonlardan yaşa-bağlı maküler dejenerasyon (YBMD) modelinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, hidrojen peroksit ile oksidatif strese bağlı hücre ölümü mekanizması oluşturulmuştur ve bu şekilde

artmış PARP1 aktivasyonu tespit edilmiş olan RPE (retinal pigment epiteli) hücrelerine, eksojen şekilde NAD⁺ verilerek tedavileri denendiğinde, RPE hücrelerindeki ROS seviyelerinin, PARP1 aktivitesinin ve nihayetinde hücre ölümünün azaldığı ortaya konmuştur. PARilasyonda NAD⁺' nın substrat olarak kullanıldığı göz önüne alındığında dışarıdan verilen NAD⁺ takviyesi kalıtsal retinal dejenerasyonlu RPE hücrelerini ölümden koruyor gibi görünmektedir [289].

Direkt kalıtsal retinal dejenerasyon modeli üzerinde çalışılmamış olsa da 2016 yılında Olivares-Gonzales ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, orta şiddette hipoksiye maruz bırakılan domuz retinal kültürlerinde Zaprinast ile PDE (fosfodiesteraz) inhibisyonu modeli oluşturularak cGMP seviyelerinin azaltılması hedeflenmiştir. Çalışmanın sonucunda PDE inhibisyonuna bağlı olarak azalmış cGMP seviyeleri ve azalmış PKG (protein kinaz-G) seviyesinin elde edilmesi domuz retinal kültürlerinde fotoreseptör hücre ölümünü azaltmış ve retinal canlılığı korumaya yardımcı olmuştur. Son yıllarda kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinde de iskemi/reperfüzyonun ve oksidatif stresin yer aldığını gösteren çalışmalar da bulunduğu için [290], hipoksik retinal dokuda elde edilen bu çalışma sonuçları kalıtsal retinal dejenerasyonlar bakımından da önemli bir bulgu daha doğurmuştur [291].

Bu çalışmaya, tedavi edici ajan yönünden benzer şekilde, 2018' de Williams ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışma vardır. Kalıtsal retinal dejenerasyon modeli üzerinde olmasa da glokom modeli ile yapılan bu çalışmada, yine eksojen olarak NAD (Nikotinamid) verilmesi söz konusudur. Glokom modeli oluşturulmuş retinal kültüre ait Ganglion hücrelerine eksojen olarak NAD verilmesinin optik siniri ve aksonları koruyarak retinal hücre ölümlerini azalttığı ve retinal canlılığı korumada etkisi olduğu gösterilmiştir [292].

2018 yılında Vighi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen oldukça kapsamlı bir çalışmaya göre, kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinden rd1 fare modeli üzerinde fotoreseptör hücre ölümünün ilk basamağı olduğu kabul edilen cGMP sinyal yolağı hedef alınmış ve ayrıca bu yolak bir lipozomal ilaç iletim sistemi (cGMP analogu) geliştirilerek inhibe edilmeye çalışılmıştır. Geliştirilen bu nanokapsül formundaki analog sayesinde kan-retina bariyeri aşarak nöroretinaya ulaşabildiği, bu anlamda da hem cGMP' yi inhibe etme suretiyle hem de kalıtsal retinal dejenerasyonlarda in vivo şekilde ilaç iletim sistemi örneklemesi ilk kez

yapılabildiği için kalıtsal retinal dejenerasyonların kalıcı ve etkili tedavisi anlamında önemli bir basamak çalışma olmuştur [293].

Pan ve arkadaşları tarafından 2020’ de gerçekleştirilen bir çalışmada ise Koni fotoreseptörlerindeki hasarı gözlemek üzere kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinden biri olan 661W hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücrelerde mTOR ile PARP1 enzimi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada 661W hücrelerinin dejenerasyonunda PARP1’ in ve AIF’ in rol oynadığı gösterilirken, bu faktörlerin etkisinin azaltılmasıyla birlikte hücrelerin ölümlerinin de azaldığı; bununla birlikte mTOR ile PARP1’ in Sirtuin (SIRT1) üzerinden PARthanatosu ortak şekilde düzenledikleri ortaya konmuştur. Ayrıca mTOR ya da PARP1 inhibisyonunun, ışığın indüklediği bir mekanizmayla PARthanatosa sürüklenen 661W hücrelerinde, hücre ölümünü azaltarak retinal canlılığı korumada etkili olabileceği gösterilmiştir [294].

Çeşitli kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinde artmış cGMP ve HDAC seviyeleri ile artmış PARP enzim aktivitesinin gösterildiği bu çalışmalar, fotoreseptör hücre ölümünde genel olarak PARP-bağımlı yolağı ortaya koyuyorken; yine artmış cGMP seviyelerinin görüldüğü fakat buna artmış kalpain seviyeleri ve hücrel kalsiyum artışının eşlik ettiği fotoreseptör hücre ölüm yolağına odaklanan çalışmalar da vardır. Bu çalışmalarda da özetle rd1 fare retinalarında kalpain aktivitesi ile fotoreseptör hücre ölümünün birbirleriyle korele şekilde arttıkları ve rd1 modelinde PN13. günde pik yaptıkları, kalpain inhibitörünün ise bu fotoreseptör ölümünü azaltmayı başardığı [295]; rd1 fare retinalarına uygulanan iki farklı kalpain inhibitörünün etkisinin araştırıldığı çalışmada her iki inhibitörün de fotoreseptör hücre ölümünü azaltmayı başarırken kalpain inhibitörü XI’ in aynı zamanda uzun dönem kullanımda toksik etkiler de oluşturduğu [296]; rd1 modeli ile Cngb1 mutasyonlu fareleri çaprazlayarak çift mutasyon elde edilen çalışmada rod fotoreseptör hücre ölümünün azalarak fotoreseptörlerin dış segment morfolojilerinde iyileşmelerin sağlandığı, böylece fotoreseptörlerin dış segment membranındaki siklik nükleotid kapılı kanalların (CNGC) rod fotoreseptör hücre ölümünde önemli bir rolü olduğu [297] gösterilmiştir. Bu çalışmaların haricinde, 2010 yılında, rod ve koni fotoreseptör hücre ölümlerinde aynı yolakların mı yoksa farklı yolakların mı aktive olduğunu anlamak üzere bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada ikisi de PDE6 geni mutasyonlu olan cpfl1 kalıtsal retinal dejenerasyon modeli ile rd1 dejenerasyon modeline ait retinal kültürlerle karşılaştırılmıştır. cGMP birikimi, kalpain aktiviteleri ve VASP (vazodilatörün stimüle ettiği protein) seviyeleri karşılaştırıldığında her

iki kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde de benzer sonuçlar elde edilmiş olup bu da hem koni fotoreseptörlerinin hem de rod fotoreseptörlerinin aynı mekanizma ile hücre ölümüne gittiğini ortaya koymuştur. Bu da geliştirilecek başarılı bir tedavi protokolünün hem rod fotoreseptörleri hem de koni fotoreseptörleri için aynı nöroprotektif etkiye sahip olacağını ifade etmektedir [166].

Son yapılan bir çalışma ise kalıtsal retinal dejenerasyonlarda kalpain-aracılı yolağın mı yoksa PARP-aracılı yolağın mı baskın şekilde aktive olduğunu göstermesi bakımından oldukça önemli olmuştur. Bu çalışmada yine rd1 mutasyon modeli ile Cnbg1 mutasyonu çaprazlanarak çift mutasyon elde edilmiş ve bu farelerde hem PARP inhibitörü hem de kalpain inhibitörü denenmiştir. Buna göre PARP inhibisyonu kalpain seviyesini de düşürmeyi başarıyorken kalpain inhibitörünün PARP aktivitesi üzerinde bir etkisi olmamıştır. Bu da kalıtsal retinal dejenerasyonlarda PARP inhibisyonunun ana hedef olarak seçilmesinin yerinde olacağını göstermiştir [230].

Tüm bu literatür ışığında kalıtsal retinal dejenerasyonlarda PARP inhibisyonu yoluyla fotoreseptör hücre ölümünü azaltma hipotezi doğmuştur ve buna yönelik çeşitli kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinde çeşitli PARP inhibisyon yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalar yapılmaktadır.

PARP inhibitörleri Nikotinamid' i taklit ederek PARP enziminin NAD⁺ substratına bağlanmasını ve onu katalizlemesini önleme mantığı ile çalışmaktadırlar. Hali hazırda temel olarak BRCA geni mutasyonu nedeniyle oluşan over, meme, prostat gibi kanser türlerinde kullanılan ve FDA onayı almış, farmakolojik ilaç formları şeklinde PARP inhibitörleri bulunmaktadır. Bazı PARP inhibitörleri ise Alzheimer, MS, Parkinson ya da beyin tümörleri gibi nörodejeneratif hastalıklarda denenmektedirler.

Biz de çalışmamızda PARP inhibitörlerinden üçü olan Olaparib, Talazoparib (BMN-673) ve 3-Aminobenzamid' i (3AB) tedavi edici ajanlar olarak seçtik. Olaparib ve Talazoparib üçüncü nesil PARP inhibitörleri olup oldukça düşük dozlarda bile etkin olabildikleri biliniyorken 3AB ise birinci nesil bir PARP inhibitörüdür. Ayrıca Olaparib ve Talazoparib' in hali hazırda over ve meme kanserleri üzerinde klinik kullanımları onayları bulunmaktadır.

2007 yılında, Paquet-Durand ve arkadaşları tarafından, kalıtsal retinal dejenerasyonlarda artmış PARP aktivitesinin yer aldığını gösteren ilk çalışma; aynı zamanda PARP inhibisyonu yapılarak fotoreseptör hücre ölümünü engellemeyi hedefleyen ilk çalışma olması bakımından da önemlidir. Bu çalışmada PDE6B geni mutasyonlu rd1 (retinal degeneration-1) model farelerle Wt (wild type-sağlıklı) fare retinaları karşılaştırıldığında rd1 retinal kültürlerde hem PARP ifadenmesinin hem de aktivitesinin arttığı, bununla birlikte bu farelerin retinalarında oksidatif DNA hasarının ve AIF' in (apoptoz indükleyici faktör) nükleusa translokasyonunun da gerçekleştiği gösterilmiştir. Bunu takiben, aynı çalışmada, rd1 modeline ait in vitro retinal kültürlerde PJ34 PARP inhibitörü kullanılarak retinal dokuda PAR (poli-ADP-riboz) birikimi ve TUNEL yöntemiyle de fotoreseptör hücre ölümü incelenmiştir. PJ34 PARP inhibitörünün rd1 retinal dejenerasyon modelinde fotoreseptörleri hücre ölümünden koruduğu ortaya konmuştur [18].

Biz de çalışmamızda PARP inhibitörleri kullanarak kalıtsal retinal dejenerasyonlu in vitro fare retinal kültürlerinde PAR birikimini ve TUNEL yöntemi yardımıyla fotoreseptör hücre ölümünü inceledik. Ancak Paquet-Durand ve arkadaşlarından ayrıcalıklı olarak biz, kalıtsal retinal dejenerasyon modeli olarak PRPH2 geni mutasyonu taşıyan rd2 model fare retinalarını kullandık. Ayrıca PARP inhibitörü olarak Olaparib, BMN-673 ve 3AB olmak üzere üç ayrı PARP inhibitörünün etkisini inceledik. Bizim bulgularımıza göre de PARP inhibitörleri retinal dokudaki PAR birikimini ve fotoreseptör hücre ölümünü anlamlı şekilde azaltıyordu.

Sahaboglu ve arkadaşları tarafından 2016 yılında gerçekleştirilen çalışmada PDE6B geni mutasyonlu rd1 kalıtsal retinal dejenerasyon modelindeki in vitro fare retinal kültürlerinde, PARP inhibitörlerinden R503, Veliparib ve Olaparib' in etkisi araştırılmıştır. Çalışmada PAR birikimi, cGMP seviyeleri, TUNEL yöntemi ile fotoreseptör hücre ölümü, TN-XL biosensör aracılığıyla Koni fotoreseptörlerinin retinal dokudaki yoğunlukları ve canlı kalabilme süreleri, in vitro retinal kültürlerdeki DNA metilasyonu incelenmiştir. Ayrıca in vivo olarak Olaparib intravitreal enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarında PARP inhibitörlerinden Olaparib tedavisinin in vitro retinal kültürlerde PAR birikimini, cGMP seviyelerini ve fotoreseptör hücre ölümünü azalttığı, canlı kalabilen Koni fotoreseptörlerinin retinal dokudaki yoğunluklarının ise Olaparib tedavisine rağmen değişmediği, Olaparib tedavisinin DNA metilasyonunu da anlamlı şekilde değiştirmemiş olduğu ortaya konmuştur. İntravitreal Olaparib enjeksiyonu ise rd1 fotoreseptörlerini bir süre

(PN13-PN15 arası) hücre ölümünden korumayı başarıırken bu koruma uzun süreli olmamıştır [225].

Bizim çalışmamızdaki kalıtsal retinal dejenerasyon modelimiz bu çalışmadan ayrıcalıklı olarak rd1 değil; PRPH2 geni mutasyonu taşıyan, yavaş retinal dejenerasyonun geliştiği rd2 model fare retinal kültürleriydi. Biz de PARP inhibisyonu oluşturmak için üç farklı PARP inhibitörünü seçtik; ancak bunlar Olaparib, BMN-673 ve 3AB olmak üzere yukarıdaki çalışmada seçilen PARP inhibitörlerinden farklı inhibitörlerdi. Biz de rd1 modelinde bulunmuş olduğu gibi, rd2 modelinde de Olaparib inhibitörünün fotoreseptör hücre ölümünü korumadaki en etkili dozunu 100nM Olaparib olarak bulduk. Ayrıca diğer PARP inhibitörleri için de PAR birikimini ölçerek ve TUNEL yöntemi kullanarak fotoreseptörleri hücre ölümünden korumada en etkili dozların 3nM BMN-673 ve 10nM 3AB olduğunu tespit ettik. Bununla birlikte bu dozlardaki her üç PARP inhibitörü de rd2 in vitro retinal kültürlerdeki fotoreseptörleri anlamlı şekilde hücre ölümünden koruyorken 3nM BMN-673 grubunun aralarında en güçlü fotoreseptör korumasını sağladığını ortaya koyduk. Koni fotoreseptörleriyle ilgili olarak biz de hem in vivo retinal preparatlarda (Wt vs. rd2) hem vitro retinal kültürlerde (rd2-Olaparib-BMN673-3AB) bu fotoreseptörlerin yoğunluklarını ve yüzdelelerini ölçtük. Buna göre in vivo retinal preparatlarda optik sinir sıfır noktası olarak kabul edilip 20' şer derecelik açılarla optik sinirden her iki yöne doğru uzaklaşıldığında Wt retinal kültürlerde en yoğun Koni fotoreseptörlerinin 20-40 derece aralığındaki alanda yer aldığını (bulgularımızda burası "optik sinire orta mesafe uzaklıktaki alan" olarak ifade edilmiştir); rd2 retinal dokularda ise en az Koni fotoreseptörünün yine bu alanda yer aldığını tespit ettik. Bu bulgu, rd2 yavaş gelişen kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde, total fotoreseptör hücre ölümünün pik yaptığı bilinen bu post natal 18.günde (PN18), foveal alana ve çevresine denk gelen bu alanda maksimum Koni fotoreseptörü kaybı olduğunu gösterdi. Bu da rd2 yavaş gelişen kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde, PN18' de Rod fotoreseptörleri ile birlikte Koni fotoreseptörlerinin de ciddi bir dejenerasyona uğramış olduğunu, PN18' de Koni fotoreseptör hücre ölümlerinin Rod' ların çok gerisinde kalmamış olduğunu düşündürdü. İn vitro retinal kültürlerde yaptığımız karşılaştırmalarda ise rd2 retinalara 100nM Olaparib ve 3nM BMN-673 tedavisi uygulanmasının bu retinalardaki Koni fotoreseptör yüzdesini ve yoğunluğunu anlamlı şekilde artırmış olduğunu gösterdi. Bizim çalışmamızda DNA metilasyonu, cGMP ölçümünü ya da in vivo uygulanan herhangi bir tedavi ne yazık ki yer almadı. Ancak biz de üç farklı PARP inhibitörü vermiş olduğumuz in vitro retinal kültür tedavi gruplarımızda, ekstrasellüler vezikül aktivitesi yoğunluğuna

fotoreseptör hücre tabakasında ve Ganglion hücre tabakasında baktık; Müller hücre aktivasyonunu gruplar arasında inceledik; fotoreseptör hücre tabakası kalınlıklarını ölçerek gruplar arası karşılaştırdık ve Rod fotoreseptörlerine ait görme pigmenti olan Rodopsin yoğunluğunu 100nM Olaparib ve 3nM BMN-673 tedavisi uyguladığımız gruplar arasında karşılaştırdık.

2016 yılında Jiao ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada temelde PDE6A geninde mutasyon olan dört farklı nokta mutasyonlu fare kalıtsal retinal dejenerasyon modelleri incelenmiştir. Tüm kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinde artmış PARP aktivitesi ve artmış fotoreseptör hücre ölümü onaylandıktan sonra bu her dört mutasyon grubuna da PJ34 PARP inhibitörü tedavisi in vitro retinal kültürlerde uygulanmıştır. Bu PDE6A geni mutasyonlu fakat nokta mutasyonu farklı dört grup arasından D670G mutasyon grubunda PARP inhibitörünün fotoreseptörleri korumada en anlamlı etkiyi gösterdiği ortaya konmuştur. Bu sonuç da Retinitis pigmentosa gibi kalıtsal retinal dejenerasyonların tedavisinde PARP' ların bir hedef olarak seçilmesinin uygun olduğunu, bununla birlikte kişiye özel mutasyonların belirlenerek, buna uygun tedavi edici ajanlar uygulanmasının önemli olduğunu ifade etmektedir denilmiştir [226].

Biz çalışmamızda Jiao ve arkadaşlarından ayrıcalıklı olarak kalıtsal retinal dejenerasyonlarda PARP inhibitörlerinin etkisini araştırmak üzere, PDE6A mutasyonlu değil PRPH2 mutasyonlu fare retinal kültürlerini kullandık. Ayrıca PARP inhibitörü olarak PJ34 değil Olaparib, BMN-673 ve 3AB' yi karşılaştırmalı olarak uygulamayı tercih ettik.

Sahaboglu ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada PRPH2 geni mutasyonlu rd2 kalıtsal retinal dejenerasyon modeli kullanılmıştır. İn vitro retinal kültürlerde PARP aktivasyonu ve PAR birikimi ölçülerek bu kalıtsal dejenerasyon modelinde, rd1 modelinden ayrıcalıklı olarak, PARP aktivitesi ile fotoreseptör hücre ölümü pikinin yaşandığı günün aynı olmadığı (PN18), PARP aktivitesinin PN16' da en yoğun şekilde olduğu belirlenirken fotoreseptör hücre ölümü pikinin PN18' de görüldüğü vurgulanmıştır. İn vitro rd2 retinal kültürlerine PARP inhibitörlerinden PJ34 tedavisi uygulanmasının ise fotoreseptör hücre ölümünü azaltarak bu kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde de fotoreseptörleri korumayı başardığı ortaya konmuştur [190].

Bu çalışma bizim de çalışmamızda kullandığımız aynı kalıtsal retinal dejenerasyon modeli (rd2) üzerinde yapılmakla birlikte; biz Olaparib, BMN-673 ve 3AB olmak üzere üç farklı PARP inhibitörünün nöroprotektif etkisini rd2 in vitro retinal kültürlerde inceledik. PJ34 gibi biz de 100nM Olaparib, 3nM BMN-673 ve 10nM PARP inhibitörlerinin rd2 kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde fotoreseptörleri koruyucu etkisi olduğunu gösterdik.

2019 yılında Spalm ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise bir kalıtsal retinal dejenerasyon modeli kullanılmamış olup Wistar-albino ratlara ait in vitro retinal kültürlerle bir tür lipid olan “Seramid” ile muamele edilerek PARthanatos hücre ölümünün olaylanması sağlanmıştır. PARthanatosun gerçekleşmiş olduğuna dair bulgular; PARP1 aktivitesinde artış, PAR birikiminde artış, TUNEL ile fotoreseptör hücre ölümünde artış, mitokondriyal membran potansiyeli ölçümünde azalma, AIF (apoptoz indükleyici faktör) translokasyonu, ROS (reaktif oksijen ürünleri) seviyesinde artma tespitleri yapılarak kanıtlanmıştır. Daha sonra PARthanatosun gerçekleşmiş olduğu in vitro retinal kültürlerle PARP inhibitörlerinden PJ34, bir kalpain inhibitörü ve bir katepsin inhibitörü ayrı ayrı uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PARP inhibitörü olan PJ34 ve kalpain inhibitörü fotoreseptör hücre ölümünü anlamlı şekilde önliyorken katepsin inhibitörü fotoreseptörler için bir koruma sağlamamıştır [227].

Biz çalışmamızda Spalm ve arkadaşlarından ayrıcalıklı olarak; hem kalıtsal retinal dejenerasyon modeli kullanarak (rd2 fare modeli) PARthanatosta PARP inhibitörlerinin etkisini araştırmış olduk hem de kullandığımız PARP inhibitör çeşitleri onların kullanmış olduklarından farklıydı.

2019 yılında Vidal-Gil ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinden PDE6B mutasyonuna sahip rd10 fare modeli kullanılmıştır. Rd10 in vitro retinal kültürlerle PARP inhibitörlerinden Olaparib tedavisi uygulanarak gerçekleştirilen çalışmaya göre; Olaparib ile tedavi edilen grupta TUNEL yöntemiyle fotoreseptör hücre ölümünün azaldığı, cGMP seviyelerinin azaldığı, rod fotoreseptörlerinde dış segment gelişiminin güçlendiği, Müller hücre aktivitesinin bir miktar azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, yapılan bu çalışmada kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde ekstrasellüler vezikül (eV) aktivitesi ve silyumların kolokalize boyanması da çalışılmıştır. Rd10 modeline ait in vivo retinal dokuların (Wt vs. rd10) koroidlerinde, dış nüklear ve iç nüklear tabakalarında artmış eV aktivitesi bulunurken RPE tabakasında eV

aktivitesinin azalmış olduğu, ayrıca silyumların da ekstrasellüler veziküllerle bir arada bulundukları belirtilmiştir. PARP inhibitörü olan Olaparib ile tedavi uygulanan rd10 in vitro retinal kültürlerde ise iç ve dış nükleer tabakalarda eV aktivitesinin azalmış olduğu, RPE tabakasında ise artmış olduğu gösterilmiştir. Böylece Olaparib ile yapılan PARP inhibisyonunun PDE6B mutasyonlu kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde, ekstrasellüler vezikül (eV) aktivitesini düzenleyerek fotoreseptörler üzerinde koruma sağladığı ifade edilmiştir [26].

Biz bu çalışmadan ayrıcalıklı olarak, çalışmamızda kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinden PRPH2 geni mutasyonunu içeren rd2 fare modelini kullandık. Ayrıca PARP inhibisyonu için Olaparib haricinde, BMN-673 (Talazoparib) ve 3AB (3-aminobenzamid) PARP inhibitörlerinin de etkisini inceledik. Biz de Vidal-Gil ve arkadaşlarının rd10 modelinde buldukları gibi, rd2 modelinde Olaparib tedavisinin fotoreseptör hücre ölümünü anlamlı şekilde azaltırken Rod fotoreseptörlerinin dış segment gelişimlerini bir miktar güçlendirmiş olmakla birlikte (Rhodopsin bulguları), bunun istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmediğini; ancak 3nM BMN-673 ile tedavi edilen grupta hem fotoreseptör hücre ölümünün anlamlı şekilde azalmış olduğunu hem de Rod fotoreseptörlerindeki dış segment gelişiminin anlamlı şekilde iyileştiğini gözlemledik. Vidal-Gil ve arkadaşlarının rd10 modelinde bulunduğu sonuçlarla uyumlu olarak biz de rd2 modelinde Müller hücre aktivitesini GFAP (glial fibriler asidik protein) ifadenmesinin yoğunluğunu ölçerek gerçekleştirdik. Biz de onlar gibi Olaparib PARP inhibitörü tedavisiyle Müller hücre aktivitesinin azalmış olduğunu, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik. Öte yandan uyguladığımız diğer PARP inhibitörleri de (3nM BMN-673, 10nM 3AB) Müller hücre aktivitesini azaltmış olsalar da bu fark anlamlı değildi. Öte yandan daha önce yaşa-bağlı maküler dejenerasyon gibi bazı retinal dejenerasyonlarda aktivitesinin artmış olduğu ortaya koyulan ekstrasellüler vezikül (eV) aktivitesini, biz de rd2 kalıtsal retinal dejenerasyon modelinde inceledik. İn vivo retinal dokularda (Wt vs. rd2) araştırmasını yaptığımız ekstrasellüler vezikül aktivitesini belirleyebilmek için biz de CD9 antikoru kullandık. Farklı günlerde (PN15, PN18 ve PN24), retinal kültürlerin fotoreseptör hücre tabakalarında (DNT: dış nükleer tabaka) incelediğimiz eV aktivitesini, Wt (wild type) ile kıyaslandığında rd2 dejenerasyon modeline ait kültürlerin tamamında yüksek bulsak da bu fark PN18. güne ait sonuçlarda anlamlı çıktı. Aynı zamanda PN18. güne ait in vivo rd2 retinal dokular ile Wt doku preparatlarının Ganglion hücre tabakalarındaki (GHT) eV aktivitesini de inceledik ve orada da retinal dejenerasyon içeren rd2 modeline ait dokuların GHT' larında anlamlı şekilde

artmış ekstrasellüler vezikül aktivitesi tespit ettik. Biz, Vidal-Gil ve arkadaşlarından ayrıcalıklı olarak koroid ve RPE' de eV aktivitesini incelemedik; ayrıca eV aktivitesi ile silyum arasındaki ilişiyi bakmamış olduk. 100nM Olaparib, 3nM BMN-673 ve 10nM 3AB ile PARP inhibisyonu uyguladığımız 18.güne ait (PN18) in vitro rd2 retinal kültürlerde ise total ekstrasellüler vezikül aktivitesi en yoğun şekilde hiçbir tedavi uygulanmamış olan rd2 grubunda görülüyorken, tedavi gruplarının tamamında bu aktivitenin azalmış olduğunu ancak istatistiksel olarak anlamlılık yaratmadığını; yine de eV aktivitesinin en başarılı şekilde 3nM BMN-673 ile PARP inhibisyonu uygulanan grupta azalmış olduğunu gördük.

Yine Sahaboglu ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışma ise PDE6B geni mutasyonlu rd1 fare modeli retinalarında in vitro olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kalıtsal retinal dejenerasyonun neden olduğu fotoreseptör hücre ölümünü engellemek amacıyla iki farklı PARP inhibitörü kullanılmıştır. BMN-673 ve 3AB PARP inhibitörleri ile tedavi edilen rd1 in vitro retinal kültürlerde, fotoreseptör hücre ölümünde ve PARilasyonda anlamlı şekilde azalma tespit edilirken 3AB PARP inhibitörü fotoreseptörleri korumada daha da başarılı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada Wnt/ β -catenin yolağı da incelenerek rd1 retinal kültürlerde PARP aktivitesi ile arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. GSH ve GSK3 α olmak üzere hücreiçi antioksidan konsantrasyon ölçümleri de gerçekleştirilerek bunların öncelikle Wt' da (Wt vs. rd1) daha sonra da PARP inhibitörleri ile tedavi edilen gruplarda (in vitro kültürler) daha yüksek bulundukları tespit edilmiştir. GFAP ifadelelenmeleri PARP inhibitörü uygulanan gruplarda daha düşük olmakla birlikte, 3AB PARP inhibitörünün hem antioksidan seviyelerini artırmada hem de Müller hücre aktivitesini azaltmada daha başarılı olduğu vurgulanmıştır [228].

Biz de bu çalışmayla benzer şekilde tedavi edici ajanlar olarak PARP inhibitörlerinden BMN-673 ve 3-aminobenzamid (3AB) kullandık. Ayrıca bizim çalışmamızda Olaparib PARP inhibitörü de yer alıyordu. Sahaboglu ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan bu çalışmadan ayrıcalıklı olarak ise biz, kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinden rd1 modeli üzerinde değil, rd2 modeli (yavaş gelişen kalıtsal retinal dejenerasyon modeli) üzerinde çalıştık. Bu anlamda biz, çalışmamızda BMN-673 ve 3AB PARP inhibitörlerinin genel fotoreseptör koruyucu etkisini karşılaştırdığımızda, BMN-673' i hem gözlemsel hem istatistiksel anlamda daha etkili bulduk.

Gao ve arkadaşları tarafından 2021 yılında gerçekleştirilen bir çalışma ise kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinden birine odaklanmayıp direkt retinal dejenerasyonlarda artmış PARP aktivitesinin neden olduğu fotoreseptör hücre ölümüne odaklanmıştır. Retinal dejenerasyonlarda fotoreseptörlerin primer olarak mı yoksa RPE' de (retinal pigment epiteli) gerçekleşen dejenerasyon sonrası ikincil olarak mı öldüklerinin anlaşılma istenmesine dair yapılan bu çalışmada; bir retinal dejenerasyon modeli olan RCS ratlar kullanılmıştır. Tedavi gruplarından birine subretinal aralığa PARP inhibitörlerinden PJ34 enjeksiyonu yapılırken bir başka tedavi grubunda da subretinal PJ34 enjeksiyonu ile birlikte ARPE-19 hücre hattı transplantasyonu da uygulanmıştır. Sonuç olarak retinal dejenerasyonlu RCS rat retinal dokularında PARP inhibisyonu uygulanmasının PAR birikimi ve fotoreseptör hücre ölümünü azalttığı gösterilirken PJ34 PARP inhibitörünün RPE hücreleri transplantasyonu ile birlikte uygulandığı retinal dokularda fotoreseptör canlılığının anlamlı şekilde daha güçlü korunduğu ifade edilmiştir [229].

Gao ve arkadaşlarından ayrıcalıklı olarak biz, çalışmamızda kalıtsal retinal dejenerasyon modeli olan rd2 fare retinal kültürlerini kullandık. Ayrıca tedavi edici ajan olarak bir değil Olaparib, BMN-673 ve 3AB olmak üzere üç farklı PARP inhibitörü seçtik. Biz çalışmamızda tedavi gruplarına yönelik herhangi bir in vivo uygulamada bulunmadık.

2022 yılında Yan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma kalıtsal retinal dejenerasyonlarda fotoreseptör hücre ölümünün mekanizmasını anlamaya çalışmak üzere yapılmıştır. Kalıtsal retinal dejenerasyonda yer aldığı bilinen PARthanatos adlı kaspaz-bağımsız hücre ölümünün temel olarak kalpain artışı üzerinden mi yoksa artmış PARP aktivitesine bağlı olarak mı gerçekleştiğine ilişkin sorunun cevaplanmaya çalışıldığı bu çalışmada; kalıtsal retinal dejenerasyon modellerinden PDE6B mutasyonlu rd1 ve rd1 ile çaprazlanarak çift mutasyon elde edilen rd1*Cngb1 fare retinal kültürleri kullanılmıştır. Fotoreseptör hücre ölümü mekanizmasını anlamak üzere ayrı ayrı; PARP inhibitörlerinden Olaparib, kalpain inhibitörlerinden Kalpastatin ve voltaj kanalı kalsiyum kanalı (VGCC) inhibitörü olarak da D-cis diltizem' in kullanıldığı çalışmada her üç inhibitörün de çift mutasyonlu dejenerasyon modelinde kalpain aktivitesini azaltmayı başardığı, fakat PARP aktivitesini yalnızca PARP inhibitörü Olaparib ve VGCC inhibitörünün azaltabildiği ortaya konmuştur. Ayrıca rd1 retinal kültürlerde fotoreseptör dejenerasyonunu Olaparib ya da Kalpastatin ayrı ayrı azaltmayı başarabiliyorlarken, VGCC inhibitörü bunu başaramamıştır. Sonuç olarak PARP aktivasyonunun siklik nükleotid kanal aktivitesini (CNG) kontrol edebildiği; tüm bu

bulgular göz önüne alındığında kalıtsal retinal dejenerasyonlarda fotoreseptör hücre ölümünü azaltmak üzere PARP inhibisyonu gerçekleştirmenin en makul hedef olabileceği vurgulanmıştır [230].

Biz de Yan ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu olarak çalışmamızda kalıtsal retinal dejenerasyonlarda PARP inhibisyonunu hedefleyerek fotoreseptörler üzerinde nöroprotektif etki oluşturmayı amaçladık. Biz, bu çalışmadan ayrıcalıklı olarak rd1 ve rd1**Cngb1* çift mutasyonlu fare modellerinde değil, rd2 modeli üzerinde çalıştık. Ayrıca yalnızca PARP inhibisyonunu hedefleyerek kalpain üzerinden gelişen alternatif hücre ölüm yolağı ile ilgili herhangi bir belirteç ya da tedavi edici ajan araştırmadık. Rd2 kalıtsal retinal dejenerasyon fare modeli için üç farklı PARP inhibitörü kullanarak fotoreseptör hücre ölümünün engellenip retinal canlılığın korunmasında en etkili olan PARP inhibitörünü tespit etmeye çalıştık.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kalıtsal retinal dejenerasyonlarda fotoreseptör hücre ölümünün önüne geçerek retinal canlılığı korumak, görme kayıplarını engellemek amacıyla; PARP inhibitörlerinden Olaparib, Talazoparib (BMN-673) ve 3-aminobenzamid (3AB) aracılığıyla PARP inhibisyonu uyguladığımız retinal dokularda bu inhibitörlerin nöroprotektif etkisini araştırdığımız çalışmamızın sonuçlarına göre;

Yavaş gelişen kalıtsal retinal dejenerasyon modeli olan rd2 fare retinal kültürlerinde, PARP inhibitörleri arasından Olaparib 100nM dozunda; BMN-673 3nM dozunda ve 3AB ise 10nM dozunda kullanıldığında; kaspaz-bağımsız hücre ölümü şekli olan PARthanatos' un temel belirteçlerinden PAR birikimini ve fotoreseptör hücre ölümünü anlamlı şekilde azaltmayı, retinal dokulardaki fotoreseptör hücre tabakasının kalınlığını anlamlı şekilde artırmayı başarmışlardır.

Ayrıca 100nM Olaparib, 3nM BMN-673 ve 10nM 3AB ile PARP inhibisyonu gerçekleştirmenin; nöronal hücre ölümü hasarı belirteçlerinden olan Glial Fibriler Asidik Protein yoğunluğunu anlamlı şekilde azalttığı ve daha önce bir başka retinal kalıtsal dejenerasyon modelinde artmış olduğu gösterilen ve hücre içi atıkların birikimi ile korele şekilde arttığı bilinen ekstrasellüler vezikül aktivitesini azalttığı da gösterilmiştir. Bununla birlikte fotoreseptörlerin işlevlerini yerine getirmeleri bakımından son derece önemli olan fotoreseptör dış segmentlerinde gelişime dair bir iyileşme belirteci olarak kabul edilen Rodopsin' in yoğunluğu ise tedavi uygulanmamış ve 100nM Olaparib ile 3nM BMN-673 tedavileri uygulanmış gruplar arasında karşılaştırılarak PARP inhibisyonunun fotoreseptör hücre dış segment gelişimini de anlamlı şekilde iyileştirdiği ortaya konmuştur.

Retinitis pigmentosa gibi kalıtsal retinal hastalıklarda öncelikle Rod fotoreseptörü kaybı, ikincil olarak da Koni fotoreseptörlerinde kayıp geliştiği bilindiği için; yavaş gelişen kalıtsal retinal dejenerasyon modelimizde temel olarak Koni fotoreseptörlerinin durumuna odaklandık. İlk defa bu çalışmada rd2 modeline ilişkin Koni fotoreseptörlerinin retinadaki dağılımlarına bakılmış ve sağlıklı retinalar olan WtBl6 fare retinalarındaki Koni fotoreseptörleri, literatürle uyumlu şekilde foveal alan ve çevresinde en yoğun şekilde bulunmuştur. Çalışmamızda fotoreseptörlerin retinadaki dağılımları optik sinir sıfır noktası olarak kabul edilmek suretiyle gerçekleştirildiği için; foveal alan ve çevresi “optik sinire orta

mesafedeki alan” şeklinde ifade edilmiştir. Yine aynı yöntemle PRPH2 geni mutasyonlu rd2 model fare retinaları incelendiğinde, onlarda da aynı bölgede en az Koni fotoreseptörü yoğunluğunun izlenmesi bize rd2 modelinde, daha önceki çalışmalara göre fotoreseptör hücre ölümü pikinin yaşandığı bilinen PN18. günde, Koni fotoreseptörlerinin de Rod fotoreseptörleri ile birlikte büyük oranda dejenerasyona uğramış olduklarını göstermiştir. Literatüre göre fotoreseptör hücre ölümü pikinin yaşandığını bildiğimiz PN18. günden sonra da yavaş gelişen rd2 modelinde fotoreseptör yoğunluğunu incelediğimizde Koni fotoreseptörlerinin PN24. günde daha da azalmış olduğu görülmüştür. PARP inhibitörleri ile tedavi uygulanan rd2 in vitro kültürlerdeki Koni fotoreseptörlerinin durumu incelendiğinde ise her üç PARP inhibitörünün de Koni fotoreseptörlerinin hem yüzdelarını hem de birim alandaki yoğunluklarını arttırmış oldukları, bununla birlikte 100nM Olaparib ve 3nM BMN-673 ile tedavi edilen gruplarda bu artışın anlamlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca TUNEL yöntemi ile kolokelize olarak gerçekleştirilen retinal doku kültürü Cone-arrestin analizinde her üç PARP inhibitörünün de Koni fotoreseptörü ölümlerini anlamlı şekilde azalttıkları ortaya konmuştur.

Tüm çalışmalar göz önüne alınarak bu üç inhibitörün etkisine karşılaştırmalı olarak bakıldığında ise 3nM BMN-673’ ün kalıtsal retinal dejenerasyonlarda en yüksek nöroprotektif etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda tedavi edici ajan olarak kullandığımız PARP inhibitörlerinden Olaparib ve Talazoparib’ in (BMN-673) zaten hali hazırda FDA onaylı olup bazı kanser türlerinde klinik kullanımlarının gerçekleştiriliyor olması, 3AB PARP inhibitörünün de pre-klinik çalışmaları devam eden bir farmakolojik formül olması PRPH2 geni mutasyonu nedeniyle kalıtsal retinal dejenerasyonlardan muzdarip olan ve görme yetilerini kaybetmemek için çok da uzun süreleri bulunmayan hastalar adına ciddi bir umut olabilir diye düşünüyoruz. Rd2 fare modelinde acilen Talazoparib’ in in vivo çalışmalarına başlanması ve bulguların olumlu seyri durumunda, zaten onaylı olan bu ilacın kalıtsal retinal dejenerasyonlarda da klinik çalışmalarına devam edilmesini ümit ediyoruz.

KAYNAKLAR

1. İnternet: Koyuncular, B. (2021). Dünyadaki ve Türkiye'deki görme engelli nüfusu. *BlindLook*, Web: <https://www.blindlook.com/tr/blog/detay/gorme-engelli-nufusu> adresinden 22 Mart 2022'de alınmıştır.
2. Yannuzzi, L.A. (2013). *Retina Atlası* (Çev. E. Sunay). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. (Eserin orijinali 2011'de yayımlandı). 1-5, 87-98.
3. Gregory-Evans, K., Pennesi, M.E., and Weleber, R.G. (2012). Retinitis pigmentosa and allied disorders. In F.G. Holz and R.F. Spaide (Eds.), *Medical Retina*, 2, 761-835.
4. Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B., and Neidhardt, J. (2010). The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Progress in Retinal and Eye Reserach*, 29(5), 335-375.
5. İnternet:RetNet. (2022). Summaries of genes and loci causing retinal diseases. *Retinal Information Network*, Web: <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes> adresinden 3 Mart 2022'de alınmıştır.
6. Kajiwar, K., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1994). Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science*, 264(5165), 1604-1608.
7. Dryja, T.P., Hahn, L.B., Kajiwar, K., and Berson, E.L. (1997). Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 38(10), 1972-1982.
8. Mansergh, F.C., Millington-Ward, S., Kennan, A., Kiang, A.S., Humphries, M., Farrar, G.J., Humphries, P., and Kenna, P.F. (1999). Retinitis pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a C12258A mutation in the mitochondrial MTT2 gene. *American Journal of Human Genetics*, 64(4), 971-985.
9. Neveling, K., den Hollander, A.I., Cremers, F.P., and Collin, R.W. (2013). Identification and analysis of inherited retinal disease genes. *Methods in Molecular Biology*, 935, 3-23.
10. Berger, N.A., Besson, V.C., Boulares, A.H., Bürkle, A., Chiarugi, A., Clark, R.S., Curtin, N.J., Cuzzocrea, S., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2018). Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *British Journal of Ophthalmology*, 175(2), 192-222.
11. Chaumet-Riffaud, A.E., Chaumet-Riffaud, P., Cariou, A., Devisme, C., Audo, I., Sahel, J.A., and Mohand-Said, S. (2017). Impact of retinitis pigmentosa on quality of life, mental health, and employment among young adults. *American Journal of Ophthalmology*, 177, 169-174.

12. İnternet: Fahim, A.T., Daiger, S.P., and Weleber, R.G. (2017). Nonsyndromic retinitis pigmentosa overview. In M.P. Adam, D.B. Everman, G.M. Mirzaa, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K.W. Gripp, and A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews® [Internet]*. Seattle: University of Washington. Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/adresinden> 22 Mart 2022'de alınmıştır.
13. Chambon, P., Weill, J.D., and Mandel, P. (1963). Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 11, 39-43.
14. Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H.A., Jr., and Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nature Review Clinical Oncology*, 12(1), 27-41.
15. Berger, N.A. (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiation Research*, 101(1), 4-15.
16. Hong, S.J., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2004). Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(5), 259-264.
17. Wang, Y., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Experimental Neurology*, 218(2), 193-202.
18. Paquet-Durand, F., Silva, J., Talukdar, T., Johnson, L.E., Azadi, S., van Veen, T., Ueffing, M., Hauck, S.M., and Ekström, P.A. (2007). Excessive activation of poly (ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse. *Journal of Neuroscience*, 27(38), 10311-10319.
19. Arango-Gonzalez, B., Trifunović, D., Sahaboglu, A., Kranz, K., Michalakis, S., Farinelli, P., Koch, S., Koch, F., Cottet, S., and Janssen-Bienhold, U. (2014). Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration. *PloS One*, 9(11), e112142.
20. Moore, K.N., Pothuri, B., Monk, B., and Coleman, R.L. (2020). PARP inhibition as frontline therapy in ovarian cancer. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 18(9), 550-556.
21. Nientiedt, C., Duensing, A., Zschäbitz, S., Jäger, D., Hohenfellner, M., Stenzinger, A., and Duensing, S. (2021). PARP inhibition in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 60(5), 344-351.
22. Slade, D. (2020). PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes and Development*, 34(5-6), 360-394.
23. Salech, F., Ponce, D.P., Paula-Lima, A.C., SanMartin, C.D., and Behrens, M.I. (2020). Nicotinamide, a poly [ADP-Ribose] polymerase 1 (PARP-1) inhibitor, as an adjunctive therapy for the treatment of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 255.
24. Travis, G.H., Sutcliffe, J.G., and Bok, D. (1991). The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron*, 6(1), 61-70.

25. Sanyal, S., De Ruiter, A., and Hawkins, R. (1980). Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy. *Journal of Comparative Neurology*, 194(1), 193-207.
26. Vidal-Gil, L., Sancho-Pelluz, J., Zrenner, E., Oltra, M., and Sahaboglu, A. (2019). Poly ADP ribosylation and extracellular vesicle activity in rod photoreceptor degeneration. *Scientific Reports*, 9(1), 3758.
27. Sadler, T.W. (2011). *Langman Medikal Embriyoloji* (Çev. A. C. Başaklar). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2010'da yayımlandı). 335-344.
28. Dudek, R.W. (2016). *BRS Embriyoloji* (Çev. T. İrez, M. Erkan). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri. (Eserin orijinali 1994'te yayımlandı). 106-112. .
29. Hall, J.E., and Hall, M.E. (2021). *Guyton ve Hall, Tıbbi Fizyoloji* (Çev. B. Ç. Yeğen). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. (Eserin orijinali 1956'da yayımlandı). 627-661.
30. Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş* (Çev. R. Demir). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2002'de yayımlandı). 227-250.
31. Eşrefoglu, M. (2016). *Özel Histoloji (İkinci Baskı)*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri. 400-423.
32. İnternet: Albert, D.M., Gamm, D.M., and Rogers, K. (2011). Human eye. *Encyclopædia Britannica, Inc.*, Web: <https://www.britannica.com/science/eyeball#/media/1/199358/100395> adresinden 7 Mayıs 2022'de alınmıştır.
33. Ross, M.H., and Pawlina, W. (2014). *Histoloji, Konu Anlatımı ve Atlas* (Çev. B. Baykal). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2011'de yayımlandı). 896-919.
34. Goldberg, A.F., Moritz, O.L., and Williams, D.S. (2016). Molecular basis for photoreceptor outer segment architecture. *Progress in Retinal and Eye Research*, 55, 52-81.
35. İnternet: Conge, H. (2022). Retina layers, light micrograph. *Science Photo Library*, Web: <https://www.sciencephoto.com/media/1065653/view> adresinden 25 Ağustos 2022'de alınmıştır.
36. Mescher, A.L. (2019). *Junqueira Temel Histoloji, Atlas Kitap* (Çev. S. Solakoğlu, A. Erdoğan, H. S. Mutlu). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. (Eserin orijinali 2009'da yayımlandı). 490-508.
37. Hildebrand, G.D., and Fielder, A.R. (2011). Anatomy and physiology of the retina. In J. Reynolds, Olitsky, S. (Ed.), *Pediatric Retina*. New York: Springer. pp. 39-65.
38. Nilsson, S.F., Ver Hoeve, J., Wu, S., Kaufman, P.L., and Alm, A. (2011). *Adler's Physiology of the Eye*. (L. Levin Ed.). Amsterdam: Elsevier Health Sciences.
39. Wurtz, R., and Kandel, E. (2000). *Principles of Neural Science* (4th ed.). New York (NY): McGraw-Hill Health Professions Division. 523-547.

40. Radius, R.L., and Anderson, D.R. (1979). The histology of retinal nerve fiber layer bundles and bundle defects. *Archives of Ophthalmology*, 97(5), 948-950.
41. Marmor, M.F. (1999). Retinal and retinal pigment epithelial physiology. *Vitreoretinal Disease*, 25-38.
42. Cunha-Vaz, J.G. (2004). The blood–retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Experimental Eye Research*, 78(3), 715-721.
43. Saint-Geniez, M., and D'Amore, P.A. (2004). Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *The International Journal of Developmental Biology*.
44. Pfeiffer, R.L., Marc, R.E., Kondo, M., Terasaki, H., and Jones, B.W. (2016). Müller cell metabolic chaos during retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, 150, 62-70.
45. Provis, J.M. (2001). Development of the primate retinal vasculature. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(6), 799-821.
46. Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 789-829.
47. Gibson, B.A., and Kraus, W.L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology*, 13(7), 411-424.
48. Thomas, C., and Tulin, A.V. (2013). Poly-ADP-ribose polymerase: machinery for nuclear processes. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(6), 1124-1137.
49. Alvarez-Gonzalez, R., and Jacobson, M.K. (1987). Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. *Biochemistry*, 26(11), 3218-3224.
50. Munnur, D., Bartlett, E., Mikolčević, P., Kirby, I.T., Rack, J.G.M., Mikoč, A., Cohen, M.S., and Ahel, I. (2019). Reversible ADP-ribosylation of RNA. *Nucleic Acids Research*, 47(11), 5658-5669.
51. Gupte, R., Liu, Z., and Kraus, W.L. (2017). PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes and Development*, 31(2), 101-126.
52. Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Lüscher, B., Schöler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(4), 208-219.
53. Vyas, S., Matic, I., Uchima, L., Rood, J., Zaja, R., Hay, R.T., Ahel, I., and Chang, P. (2014). Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nature Communications*, 5, 4426.
54. Jankevicius, G., Hassler, M., Golia, B., Rybin, V., Zacharias, M., Timinszky, G., and Ladurner, A.G. (2013). A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(4), 508-514.

55. O'Sullivan, J., Tedim Ferreira, M., Gagné, J.P., Sharma, A.K., Hendzel, M.J., Masson, J.Y., and Poirier, G.G. (2019). Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation. *Nature Communications*, 10(1), 1182.
56. Amé, J.C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays*, 26(8), 882-893.
57. Vyas, S., Chesarone-Cataldo, M., Todorova, T., Huang, Y.H., and Chang, P. (2013). A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nature Communications*, 4, 2240.
58. van Steensel, B., and de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, 385(6618), 740-743.
59. Ancelin, K., Brunori, M., Bauwens, S., Koering, C.E., Brun, C., Ricoul, M., Pommier, J.P., Sabatier, L., and Gilson, E. (2002). Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), 3474-3487.
60. Goenka, S., and Boothby, M. (2006). Selective potentiation of Stat-dependent gene expression by collaborator of Stat6 (CoaSt6), a transcriptional cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(11), 4210-4215.
61. Rouleau, M., Saxena, V., Rodrigue, A., Paquet, E.R., Gagnon, A., Hendzel, M.J., Masson, J.Y., Ekker, M., and Poirier, G.G. (2011). A key role for poly(ADP-ribose) polymerase 3 in ectodermal specification and neural crest development. *PloS One*, 6(1), e15834.
62. MacPherson, L., Tamblyn, L., Rajendra, S., Bralha, F., McPherson, J.P., and Matthews, J. (2013). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. *Nucleic Acids Research*, 41(3), 1604-1621.
63. Verheugd, P., Forst, A.H., Milke, L., Herzog, N., Feijs, K.L., Kremmer, E., Kleine, H., and Lüscher, B. (2013). Regulation of NF- κ B signalling by the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10. *Nature Communications*, 4, 1683.
64. Cho, S.H., Goenka, S., Henttinen, T., Gudapati, P., Reinikainen, A., Eischen, C.M., Lahesmaa, R., and Boothby, M. (2009). PARP-14, a member of the B aggressive lymphoma family, transduces survival signals in primary B cells. *Blood*, 113(11), 2416-2425.
65. Barbarulo, A., Iansante, V., Chaidos, A., Naresh, K., Rahemtulla, A., Franzoso, G., Karadimitris, A., Haskard, D.O., Papa, S., and Bubici, C. (2013). Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 (PARP14) is a novel effector of the JNK2-dependent pro-survival signal in multiple myeloma. *Oncogene*, 32(36), 4231-4242.
66. Jwa, M., and Chang, P. (2012). PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1 α -mediated unfolded protein response. *Nature Cell Biology*, 14(11), 1223-1230.

67. Iansante, V., Choy, P.M., Fung, S.W., Liu, Y., Chai, J.-G., Dyson, J., Del Rio, A., D'Santos, C., Williams, R., Chokshi, S., Anders, R.A., Bubici, C., and Papa, S. (2015). PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nature Communications*, 6(1), 7882.
68. Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Litchfield, D.W., Shilton, B.H., and Lüscher, B. (2008). Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Molecular Cell*, 32(1), 57-69.
69. Kuny, C.V., and Sullivan, C.S. (2016). Virus-host interactions and the ARTD/PARP family of enzymes. *PLoS Pathogens*, 12(3), e1005453.
70. Chen, Q., Kassab, M.A., Dantzer, F., and Yu, X. (2018). PARP2 mediates branched poly ADP-ribosylation in response to DNA damage. *Nature Communications*, 9(1), 3233.
71. Alkhatib, H.M., Chen, D.F., Cherney, B., Bhatia, K., Notario, V., Giri, C., Stein, G., Slattery, E., Roeder, R.G., and Smulson, M.E. (1987). Cloning and expression of cDNA for human poly(ADP-ribose) polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(5), 1224-1228.
72. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology*, 7(7), 517-528.
73. Riffell, J.L., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(12), 923-936.
74. Langelier, M.-F., Ruhl, D.D., Planck, J.L., Kraus, W.L., and Pascal, J.M. (2010). The Zn3 domain of human poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly (ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18877-18887.
75. Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science*, 336(6082), 728-732.
76. Steffen, J.D., McCauley, M.M., and Pascal, J.M. (2016). Fluorescent sensors of PARP-1 structural dynamics and allosteric regulation in response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 44(20), 9771-9783.
77. Xu, W., Wang, F., Yu, Z., and Xin, F. (2016). Epigenetics and cellular metabolism. *Genetics and Epigenetics*, 8, 43-51.
78. Martin, C., and Zhang, Y. (2007). Mechanisms of epigenetic inheritance. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(3), 266-272.
79. Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J.T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.H., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Wu, Z., and Puigserver, P. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *The Embo Journal*, 26(7), 1913-1923.

80. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425-479.
81. Buch-Larsen, S.C., Hendriks, I.A., Lodge, J.M., Rykær, M., Furtwängler, B., Shishkova, E., Westphall, M.S., Coon, J.J., and Nielsen, M.L. (2020). Mapping Physiological ADP-Ribosylation Using Activated Ion Electron Transfer Dissociation. *Cell Reports*, 32(12), 108176.
82. Hendriks, I.A., Larsen, S.C., and Nielsen, M.L. (2019). An Advanced Strategy for Comprehensive Profiling of ADP-ribosylation Sites Using Mass Spectrometry-based Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(5), 1010-1026.
83. Imai, S.-i., and Guarente, L. (2014). NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends in Cell Biology*, 24(8), 464-471.
84. Mennella, M.R.F. (2015). A new facet of ADP-ribosylation reactions: SIRTs and PARPs interplay. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 20, 458-473.
85. Jęsko, H., and Strosznajder, R.P. (2016). Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly (ADP-ribose) polymerases. *Folia Neuropathologica*, 54(3), 212-233.
86. Kraus, W.L. (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(3), 294-302.
87. Poirier, G.G., De Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., and Mandel, P. (1982). Poly (ADP-ribosyl) ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(11), 3423-3427.
88. Palazzo, L., Leidecker, O., Prokhorova, E., Dauben, H., Matic, I., and Ahel, I. (2018). Serine is the major residue for ADP-ribosylation upon DNA damage. *eLife*, 7.
89. Bonfiglio, J.J., Fontana, P., Zhang, Q., Colby, T., Gibbs-Seymour, I., Atanassov, I., Bartlett, E., Zaja, R., Ahel, I., and Matic, I. (2017). Serine ADP-Ribosylation Depends on HPF1. *Molecular Cell*, 65(5), 932-940.e936.
90. Schiewer, M.J., Mandigo, A.C., Gordon, N., Huang, F., Gaur, S., de Leeuw, R., Zhao, S.G., Evans, J., Han, S., Parsons, T., Birbe, R., McCue, P., McNair, C., Chand, S.N., Cendon-Florez, Y., Gallagher, P., McCann, J.J., Poudel Neupane, N., Shafi, A.A., Dylgjeri, E., Brand, L.J., Visakorpi, T., Raj, G.V., Lallas, C.D., Trabulsi, E.J., Gomella, L.G., Dicker, A.P., Kelly, W.K., Leiby, B.E., Knudsen, B., Feng, F.Y., and Knudsen, K.E. (2018). PARP-1 regulates DNA repair factor availability. *Embo Molecular Medicine*, 10(12).
91. Wright, R.H., and Beato, M. (2012). PARty promoters: Hormone-dependent gene regulation requires CDK2 activation of PARP1. *Cell Cycle*, 11(23), 4291-4293.
92. Muller, P.A., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, 15(1), 2-8.

93. Kanai, M., Hanashiro, K., Kim, S.-H., Hanai, S., Boulares, A.H., Miwa, M., and Fukasawa, K. (2007). Inhibition of Crm1–p53 interaction and nuclear export of p53 by poly (ADP-ribosyl) ation. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1175-1183.
94. Cantó, C., and Auwerx, J. (2011). Interference between PARPs and SIRT1: a novel approach to healthy ageing? *Aging (Albany NY)*, 3(5), 543.
95. Gibson, B.A., Zhang, Y., Jiang, H., Hussey, K.M., Shrimp, J.H., Lin, H., Schwede, F., Yu, Y., and Kraus, W.L. (2016). Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation. *Science*, 353(6294), 45-50.
96. Jalal, S., Earley, J.N., and Turchi, J.J. (2011). DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clinical Cancer Research*, 17(22), 6973-6984.
97. d'Amours, D., Desnoyers, S., d'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999). Poly (ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*, 342(2), 249-268.
98. El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 31(19), 5526-5533.
99. Dabin, J., Fortuny, A., and Polo, S.E. (2016). Epigenome maintenance in response to DNA damage. *Molecular Cell*, 62(5), 712-727.
100. Luo, X., and Kraus, W.L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly (ADP-ribose) and PARP-1. *Genes and Development*, 26(5), 417-432.
101. de Murcia, J.M., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Amé, J.-C., Dierich, A., and LeMeur, M. (2003). Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *The Embo Journal*, 22(9), 2255-2263.
102. Eustermann, S., Wu, W.-F., Langelier, M.-F., Yang, J.-C., Easton, L.E., Riccio, A.A., Pascal, J.M., and Neuhaus, D. (2015). Structural basis of detection and signaling of DNA single-strand breaks by human PARP-1. *Molecular Cell*, 60(5), 742-754.
103. Clark, N.J., Kramer, M., Muthurajan, U.M., and Luger, K. (2012). Alternative modes of binding of poly (ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(39), 32430-32439.
104. Schreiber, V., Amé, J.-C., Dollé, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly (ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 23028-23036.
105. Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., and Yasui, A. (2003). Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3974-3981.

106. Ahel, D., Hořejší, Z., Wiechens, N., Polo, S.E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., Flynn, H., Skehel, M., West, S.C., and Jackson, S.P. (2009). Poly (ADP-ribose)–dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*, 325(5945), 1240-1243.
107. Gottschalk, A.J., Timinszky, G., Kong, S.E., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Ladurner, A.G., and Conaway, J.W. (2009). Poly (ADP-ribosyl) ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13770-13774.
108. Malanga, M., Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., and Althaus, F.R. (1998). Poly (ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *Journal of Biological Chemistry*, 273(19), 11839-11843.
109. Valenzuela, M.T., Guerrero, R., Núñez, M.I., Ruiz de Almodóvar, J.M., Sarker, M., de Murcia, G., and Oliver, F.J. (2002). PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response. *Oncogene*, 21(7), 1108-1116.
110. Loseva, O., Jemth, A.-S., Bryant, H.E., Schüler, H., Lehtiö, L., Karlberg, T., and Helleday, T. (2010). PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 8054-8060.
111. Boehler, C., Gauthier, L.R., Mortusewicz, O., Biard, D.S., Saliou, J.-M., Bresson, A., Sanglier-Cianferani, S., Smith, S., Schreiber, V., and Boussin, F. (2011). Poly (ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2783-2788.
112. Langelier, M.-F., Riccio, A.A., and Pascal, J.M. (2014). PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7762-7775.
113. Dodge, M.E., and Lum, L. (2011). Drugging the cancer stem cell compartment: lessons learned from the hedgehog and Wnt signal transduction pathways. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51.
114. Nagy, Z., Kalousi, A., Furst, A., Koch, M., Fischer, B., and Soutoglou, E. (2016). Tankyrases promote homologous recombination and check point activation in response to DSBs. *PLoS Genetics*, 12(2), e1005791.
115. Schreiber, V., Amé, J.C., Dollé, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 23028-23036.
116. Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., and Poirier, G.G. (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 10(4), 293-301.
117. Herceg, Z., and Wang, Z.Q. (2001). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutation Research*, 477(1-2), 97-110.

118. Doege, C.A., Inoue, K., Yamashita, T., Rhee, D.B., Travis, S., Fujita, R., Guarnieri, P., Bhagat, G., Vanti, W.B., and Shih, A. (2012). Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature*, 488(7413), 652-655.
119. Weber, F.A., Bartolomei, G., Hottiger, M.O., and Cinelli, P. (2013). Artd1/Parp1 regulates reprogramming by transcriptional regulation of Fgf4 via Sox2 ADP-ribosylation. *Stem Cells*, 31(11), 2364-2373.
120. Ju, B.-G., Solum, D., Song, E.J., Lee, K.-J., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2004). Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase II δ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell*, 119(6), 815-829.
121. Roper, S.J., Chrysanthou, S., Senner, C.E., Sienerth, A., Gnan, S., Murray, A., Masutani, M., Latos, P., and Hemberger, M. (2014). ADP-ribosyltransferases Parp1 and Parp7 safeguard pluripotency of ES cells. *Nucleic Acids Research*, 42(14), 8914-8927.
122. Beneke, S., Cohausz, O., Malanga, M., Boukamp, P., Althaus, F., and Bürkle, A. (2008). Rapid regulation of telomere length is mediated by poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Nucleic Acids Research*, 36(19), 6309-6317.
123. Espejel, S., Klatt, P., Murcia, J.M.-d., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Taccioli, G., de Murcia, G., and Blasco, M.A. (2004). Impact of telomerase ablation on organismal viability, aging, and tumorigenesis in mice lacking the DNA repair proteins PARP-1, Ku86, or DNA-PKcs. *The Journal of Cell Biology*, 167(4), 627-638.
124. Dantzer, F., Giraud-Panis, M.-J., Jaco, I., Amé, J.-C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C.-E., Gilson, E., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2004). Functional interaction between poly (ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Molecular and Cellular Biology*, 24(4), 1595-1607.
125. Hsiao, S.J., and Smith, S. (2008). Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie*, 90(1), 83-92.
126. Jagtap, P., and Szabó, C. (2005). Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(5), 421-440.
127. Strosznajder, R.P., Czubowicz, K., Jesko, H., and Strosznajder, J.B. (2010). Poly (ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. *Molecular Neurobiology*, 41(2), 187-196.
128. Pacher, P., and Szabo, C. (2008). Role of the peroxynitrite-poly (ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. *The American Journal of Pathology*, 173(1), 2-13.
129. Zhao, L., Zabel, M.K., Wang, X., Ma, W., Shah, P., Fariss, R.N., Qian, H., Parkhurst, C.N., Gan, W.B., and Wong, W.T. (2015). Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *Embo Molecular Medicine*, 7(9), 1179-1197.
130. Ciftci, O., Ullrich, O., Schmidt, C.A., Diestel, A., and Hass, R. (2001). Regulation of the nuclear proteasome activity in myelomonocytic human leukemia cells after adriamycin treatment. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 97(9), 2830-2838.

131. Khan, H., Sharma, K., Kumar, A., Kaur, A., and Singh, T.G. (2022). Therapeutic implications of cyclooxygenase (COX) inhibitors in ischemic injury. *Inflammation Research*, 1-16.
132. Geboes, K. (1994). From inflammation to lesion. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, 57(5-6), 273-284.
133. Khan, H., Gupta, A., Singh, T.G., and Kaur, A. (2021). Mechanistic insight on the role of leukotriene receptors in ischemic-reperfusion injury. *Pharmacological Reports*, 73(5), 1240-1254.
134. Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846-852.
135. Shacter, E., Beecham, E.J., Covey, J.M., Kohn, K.W., and Potter, M. (1988). Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis*, 9(12), 2297-2304.
136. Zhang, J.N., Ma, Y., Wei, X.Y., Liu, K.Y., Wang, H., Han, H., Cui, Y., Zhang, M.X., and Qin, W.D. (2019). Remifentanyl protects against lipopolysaccharide-induced inflammation through PARP-1/NF- κ B signaling pathway. *Mediators of Inflammation*, 2019, 3013716.
137. Sun, M., Zhao, Y., Gu, Y., and Xu, C. (2012). Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- κ B. *Amino Acids*, 42(5), 1735-1747.
138. Pazzaglia, S., and Pioli, C. (2019). Multifaceted role of PARP-1 in DNA repair and inflammation: pathological and therapeutic implications in cancer and non-cancer diseases. *Cells*, 9(1).
139. Olivares-González, L., Velasco, S., Campillo, I., and Rodrigo, R. (2021). Retinal inflammation, cell death and inherited retinal dystrophies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4).
140. Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L.M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q.L., Salvesen, G.S., Bredesen, D.E., Rosenthal, R.E., and Fiskum, G. (1999). Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5752-5757.
141. Leist, M., and Jäätelä, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 589-598.
142. Galluzzi, L., Maiuri, M., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1237.
143. Ameisen, J.C. (1996). The origin of programmed cell death. *Science*, 272(5266), 1278-1279.
144. Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528-537.

145. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
146. Hengartner, M.O., Ellis, R., and Horvitz, R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature*, 356(6369), 494-499.
147. Renehan, A.G., Booth, C., and Potten, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *British Medical Journal*, 322(7301), 1536-1538.
148. Cryns, V., and Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes and Development*, 12(11), 1551-1570.
149. Creagh, E.M., Conroy, H., and Martin, S.J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological Reviews*, 193(1), 10-21.
150. Bellamy, C.O., Malcolmson, R.D., Harrison, D.J., and Wyllie, A.H. (1995). *Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
151. Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7320-7326.
152. Walker, N., Harmon, B., Gobe, G., and Kerr, J. (1988). Patterns of cell death. *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, 13, 18-54.
153. Gross, A., Yin, X.-M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), 1156-1163.
154. Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33869-33874.
155. Offen, D., Elkon, H., and Melamed, E. (2000). Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *Advances in Research on Neurodegeneration*, 153-166.
156. Tatton, W., Chalmers-Redman, R., Ju, W., Wadia, J., and Tatton, N. (1997). Apoptosis in neurodegenerative disorders: potential for therapy by modifying gene transcription. *Advances in Research on Neurodegeneration*, 245-268.
157. Jimenez del Rio, M., and Velez-Pardo, C. (2001). Apoptosis in neurodegenerative diseases: facts and controversies. *Revista de Neurologia*, 32(9), 851-860.
158. Hood, J.L., Brooks, W.H., and Roszman, T.L. (2004). Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 43126-43135.

159. Chan, S.L., and Mattson, M.P. (1999). Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *Journal of Neuroscience Research*, 58(1), 167-190.
160. Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*, 83(3), 731-801.
161. Fox, D.A., Poblenz, A.T., and He, L. (1999). Calcium overload triggers rod photoreceptor apoptotic cell death in chemical-induced and inherited retinal degenerations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 282-285.
162. Takano, J., Tomioka, M., Tsubuki, S., Higuchi, M., Iwata, N., Itohara, S., Maki, M., and Saido, T.C. (2005). Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16175-16184.
163. Doonan, F., Donovan, M., and Cotter, T.G. (2005). Activation of multiple pathways during photoreceptor apoptosis in the rd mouse. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(10), 3530-3538.
164. Vosler, P., Brennan, C., and Chen, J. (2008). Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 38(1), 78-100.
165. Paquet-Durand, F., Azadi, S., Hauck, S.M., Ueffing, M., van Veen, T., and Ekström, P. (2006). Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse. *Journal of Neurochemistry*, 96(3), 802-814.
166. Trifunović, D., Dengler, K., Michalakakis, S., Zrenner, E., Wissinger, B., and Paquet-Durand, F. (2010). cGMP-dependent cone photoreceptor degeneration in the cpfl1 mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, 518(17), 3604-3617.
167. Oka, T., Tamada, Y., Nakajima, E., Shearer, T.R., and Azuma, M. (2006). Presence of calpain-induced proteolysis in retinal degeneration and dysfunction in a rat model of acute ocular hypertension. *Journal of Neuroscience Research*, 83(7), 1342-1351.
168. Das, A., Garner, D.P., Del Re, A.M., Woodward, J.J., Kumar, D.M., Agarwal, N., Banik, N.L., and Ray, S.K. (2006). Calpeptin provides functional neuroprotection to rat retinal ganglion cells following Ca²⁺ influx. *Brain Research*, 1084(1), 146-157.
169. Sancho-Pelluz, J., Alavi, M.V., Sahaboglu, A., Kustermann, S., Farinelli, P., Azadi, S., van Veen, T., Romero, F.J., Paquet-Durand, F., and Ekström, P. (2010). Excessive HDAC activation is critical for neurodegeneration in the rd1 mouse. *Cell Death and Disease*, 1(2), e24.
170. Andrabi, S.A., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2008). Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 233-241.
171. Sahaboglu, A., Tanimoto, N., Kaur, J., Sancho-Pelluz, J., Huber, G., Fahl, E., Arango-Gonzalez, B., Zrenner, E., Ekström, P., and Löwenheim, H. (2010). PARP1 gene knock-out increases resistance to retinal degeneration without affecting retinal function. *PloS One*, 5(11), e15495.

172. Gallenga, C.E., Lonardi, M., Pacetti, S., Violanti, S.S., Tassinari, P., Di Virgilio, F., Tognon, M., and Perri, P. (2021). Molecular mechanisms related to oxidative stress in retinitis pigmentosa. *Antioxidants*, 10(6), 848.
173. Vyas, S., and Chang, P. (2014). New PARP targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 14(7), 502-509.
174. Scott, G.S., Szabó, C., and Hooper, D.C. (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase activity contributes to peroxynitrite-induced spinal cord neuronal cell death in vitro. *Journal of Neurotrauma*, 21(9), 1255-1263.
175. Koh, D.W., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2005). Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacological Research*, 52(1), 5-14.
176. Jagtap, P., and Szabó, C. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(5), 421-440.
177. Obrosova, I.G., Xu, W., Lyzogubov, V.V., Ilnytska, O., Mashtalir, N., Varenjuk, I., Pavlov, I.A., Zhang, J., Slusher, B., and Drel, V.R. (2008). PARP inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(6), 972-981.
178. Peralta-Leal, A., Rodríguez-Vargas, J.M., Aguilar-Quesada, R., Rodríguez, M.I., Linares, J.L., de Almodóvar, M.R., and Oliver, F.J. (2009). PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), 13-26.
179. Ghonim, M.A., Pyakurel, K., Ibba, S.V., Al-Khami, A.A., Wang, J., Rodriguez, P., Rady, H.F., El-Bahrawy, A.H., Lammi, M.R., and Mansy, M.S. (2015). PARP inhibition by olaparib or gene knockout blocks asthma-like manifestation in mice by modulating CD4+ T cell function. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 1-12.
180. Matsuura, S., Egi, Y., Yuki, S., Horikawa, T., Satoh, H., and Akira, T. (2011). MP-124, a novel poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor, ameliorates ischemic brain damage in a non-human primate model. *Brain Research*, 1410, 122-131.
181. Maier, C., Scheuerle, A., Hauser, B., Schelzig, H., Szabó, C., Radermacher, P., and Kick, J. (2007). The selective poly (ADP) ribose-polymerase 1 inhibitor INO1001 reduces spinal cord injury during porcine aortic cross-clamping-induced ischemia/reperfusion injury. *Intensive Care Medicine*, 33(5), 845-850.
182. Goldfarb, R.D., Marton, A., Szabó, É., Virág, L., Salzman, A.L., Glock, D., Akhter, I., McCarthy, R., Parrillo, J.E., and Szabó, C. (2002). Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase in a porcine model of severe bacterial sepsis. *Critical Care Medicine*, 30(5), 974-980.
183. Murakami, K., Enkhbaatar, P., Shimoda, K., Cox, R.A., Burke, A.S., Hawkins, H.K., Traber, L.D., Schmalstieg, F.C., Salzman, A.L., and Mabley, J.G. (2004). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates acute lung injury in an ovine model of sepsis. *Shock*, 21(2), 126-133.

184. Preiss, J., Schlaeger, R., and Hilz, H. (1971). Specific inhibition of poly adpribose polymerase by thymidine and nicotinamide in HeLa cells. *FEBS Letters*, 19(3), 244-246.
185. Antolin, A.A., Ameratunga, M., Banerji, U., Clarke, P.A., Workman, P., and Al-Lazikani, B. (2020). The kinase polypharmacology landscape of clinical PARP inhibitors. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14.
186. Fong, P.C., Boss, D.S., Yap, T.A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., Mortimer, P., Swaisland, H., Lau, A., and O'Connor, M.J. (2009). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *New England Journal of Medicine*, 361(2), 123-134.
187. Ettl, J., Quek, R.G.W., Lee, K.H., Rugo, H.S., Hurvitz, S., Gonçalves, A., Fehrenbacher, L., Yerushalmi, R., Mina, L.A., Martin, M., Roché, H., Im, Y.H., Markova, D., Bhattacharyya, H., Hannah, A.L., Eiermann, W., Blum, J.L., and Litton, J.K. (2018). Quality of life with talazoparib versus physician's choice of chemotherapy in patients with advanced breast cancer and germline BRCA1/2 mutation: patient-reported outcomes from the EMBRACA phase III trial. *Annals of Oncology*, 29(9), 1939-1947.
188. Scott, G.S., Szabó, C., and Hooper, D.C. (2004). Poly (ADP-ribose) polymerase activity contributes to peroxynitrite-induced spinal cord neuronal cell death in vitro. *Journal of Neurotrauma*, 21(9), 1255-1263.
189. Abdelkarim, G.E., Gertz, K., Harms, C., Katchanov, J., Dirnagl, U., Szabó, C., and Endres, M. (2001). Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. *International Journal of Molecular Medicine*, 7(3), 255-260.
190. Sahaboglu, A., Sharif, A., Feng, L., Secer, E., Zrenner, E., and Paquet-Durand, F. (2017). Temporal progression of PARP activity in the PRPH2 mutant rd2 mouse: neuroprotective effects of the PARP inhibitor PJ34. *PloS One*, 12(7), e0181374.
191. Shroff, R.T., Hendifar, A., McWilliams, R.R., Geva, R., Epelbaum, R., Rolfe, L., Goble, S., Lin, K.K., Biankin, A.V., and Giordano, H. (2018). Rucaparib monotherapy in patients with pancreatic cancer and a known deleterious BRCA mutation. *JCO Precision Oncology*, 2, 1-15.
192. Scott, L.J. (2017). Niraparib: first global approval. *Drugs*, 77(9), 1029-1034.
193. Baxter, P.A., Su, J.M., Onar-Thomas, A., Billups, C.A., Li, X.-N., Poussaint, T.Y., Smith, E.R., Thompson, P., Adesina, A., and Ansell, P. (2020). A phase I/II study of veliparib (ABT-888) with radiation and temozolomide in newly diagnosed diffuse pontine glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *Neuro-oncology*, 22(6), 875-885.
194. Middleton, M., Friedlander, P., Hamid, O., Daud, A., Plummer, R., Falotico, N., Chyla, B., Jiang, F., McKeegan, E., and Mostafa, N. (2015). Randomized phase II study evaluating veliparib (ABT-888) with temozolomide in patients with metastatic melanoma. *Annals of Oncology*, 26(10), 2173-2179.
195. Virág, L., Robaszkiewicz, A., Rodriguez-Vargas, J.M., and Oliver, F.J. (2013). Poly (ADP-ribose) signaling in cell death. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(6), 1153-1167.

196. Baxter, P., Chen, Y., Xu, Y., and Swanson, R.A. (2014). Mitochondrial dysfunction induced by nuclear poly (ADP-ribose) polymerase-1: a treatable cause of cell death in stroke. *Translational Stroke Research*, 5(1), 136-144.
197. Mabley, J.G., Horváth, E.M., Murthy, K.G., Zsengeller, Z., Vaslin, A., Benkő, R., Kollai, M., and Szabo, C. (2005). Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(2), 812-820.
198. Ganguly, B., Dolfi, S.C., Rodriguez-Rodriguez, L., Ganesan, S., and Hirshfield, K.M. (2016). Role of biomarkers in the development of PARP inhibitors. *Biomarkers in Cancer*, 8, BIC. S36679.
199. González-Martín, A., Pothuri, B., Vergote, I., DePont Christensen, R., Graybill, W., Mirza, M.R., McCormick, C., Lorusso, D., Hoskins, P., and Freyer, G. (2019). Niraparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 381(25), 2391-2402.
200. Gojo, I., Beumer, J.H., Pratz, K.W., McDevitt, M.A., Baer, M.R., Blackford, A.L., Smith, B.D., Gore, S.D., Carraway, H.E., and Showel, M.M. (2017). A phase 1 study of the PARP inhibitor Veliparib in combination with Temozolomide in acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, 23(3), 697-706.
201. Shall, S. (1983). ADP-ribosylation, DNA repair, cell differentiation and cancer. *Princess Takamatsu Symposium*, 13, 3-25.
202. Berger, N.A., Berger, S.J., and Gerson, S.L. (1987). DNA repair, ADP-ribosylation and pyridine nucleotide metabolism as targets for cancer chemotherapy. *Anti-Cancer Drug Design*, 2(2), 203-209.
203. Lupo, B., and Trusolino, L. (2014). Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation in cancer: old and new paradigms revisited. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1846(1), 201-215.
204. Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N.M., Jackson, S.P., Smith, G.C., and Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917-921.
205. McCabe, N., Turner, N.C., Lord, C.J., Kluzek, K., Bialkowska, A., Swift, S., Giavara, S., O'Connor, M.J., Tutt, A.N., Zdzienicka, M.Z., Smith, G.C., and Ashworth, A. (2006). Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Research*, 66(16), 8109-8115.
206. Drew, Y. (2015). The development of PARP inhibitors in ovarian cancer: from bench to bedside. *British Journal of Cancer*, 113 Suppl 1(Suppl 1), S3-9.
207. Tsikarishvili, S., Karapetian, M., Kulikova, N., and Zaalishvili, G. (2021). PARP inhibition suppresses topoisomerase 1 poisoning induced caspase-3 dependent cell death in zebrafish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 550, 166-170.

208. Wang, D., Li, C., Zhang, Y., Wang, M., Jiang, N., Xiang, L., Li, T., Roberts, T.M., Zhao, J.J., Cheng, H., and Liu, P. (2016). Combined inhibition of PI3K and PARP is effective in the treatment of ovarian cancer cells with wild-type PIK3CA genes. *Gynecologic Oncology*, 142(3), 548-556.
209. Wahlberg, E., Karlberg, T., Kouznetsova, E., Markova, N., Macchiarulo, A., Thorsell, A.G., Pol, E., Frostell, Å., Ekblad, T., Öncü, D., Kull, B., Robertson, G.M., Pellicciari, R., Schüler, H., and Weigelt, J. (2012). Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. *Nature Biotechnology*, 30(3), 283-288.
210. Curtin, N.J., and Szabo, C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(6), 1217-1256.
211. Baldwin, P., Tangutoori, S., and Sridhar, S. (2018). In vitro analysis of PARP inhibitor nanoformulations. *International Journal of Nanomedicine*, 13(T-NANO 2014 Abstracts), 59.
212. Ter Brugge, P., Kristel, P., Van Der Burg, E., Boon, U., De Maaker, M., Lips, E., Mulder, L., De Ruiter, J., Moutinho, C., and Gevensleben, H. (2016). Mechanisms of therapy resistance in patient-derived xenograft models of BRCA1-deficient breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 108(11).
213. Hurtado-Bagès, S., Knobloch, G., Ladurner, A.G., and Buschbeck, M. (2020). The taming of PARP1 and its impact on NAD⁺ metabolism. *Molecular Metabolism*, 38, 100950.
214. Martire, S., Mosca, L., and d'Erme, M. (2015). PARP-1 involvement in neurodegeneration: a focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 146, 53-64.
215. Zhang, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Snyder, S.H. (1994). Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*, 263(5147), 687-689.
216. Eliasson, M.J., Sampei, K., Mandir, A.S., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z.-Q., Dawson, T.M., and Snyder, S.H. (1997). Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Medicine*, 3(10), 1089-1095.
217. Matsuura, S., Egi, Y., Yuki, S., Horikawa, T., Satoh, H., and Akira, T. (2011). MP-124, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor, ameliorates ischemic brain damage in a non-human primate model. *Brain Research*, 1410, 122-131.
218. de La Lastra, C.A., Villegas, I., and Sanchez-Fidalgo, S. (2007). Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: new pharmacological functions and potential clinical implications. *Current Pharmaceutical Design*, 13(9), 933-962.
219. Kim, Y., Kim, Y.S., Noh, M.Y., Lee, H., Joe, B., Kim, H.Y., Kim, J., Kim, S.H., and Park, J. (2017). Neuroprotective effects of a novel poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, JPI-289, in hypoxic rat cortical neurons. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(6), 671-679.

220. McGurk, L., Mojsilovic-Petrovic, J., Van Deerlin, V.M., Shorter, J., Kalb, R.G., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Lee, E.B., and Bonini, N.M. (2018). Nuclear poly(ADP-ribose) activity is a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 84.
221. Kam, T.-I., Mao, X., Park, H., Chou, S.-C., Karuppagounder, S.S., Umanah, G.E., Yun, S.P., Brahmachari, S., Panicker, N., and Chen, R. (2018). Poly (ADP-ribose) drives pathologic α -synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, 362(6414), eaat8407.
222. Matsuno, H., Kadowaki, K.M., and Tsuji, H. (1997). Generation II knee bracing for severe medial compartment osteoarthritis of the knee. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 78(7), 745-749.
223. Jang, K.-H., Do, Y.-J., Son, D., Son, E., Choi, J.-S., and Kim, E. (2018). AIF-independent parthanatos in the pathogenesis of dry age-related macular degeneration. *Cell Death and Disease*, 8(1), e2526-e2526.
224. Kovacs, K., Vaczy, A., Fekete, K., Kovari, P., Atlasz, T., Reglodi, D., Gabriel, R., Gallyas, F., and Sumegi, B. (2019). PARP inhibitor protects against chronic hypoxia/reoxygenation-induced retinal injury by regulation of MAPKs, HIF1 α , Nrf2, and NF κ B. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 60(5), 1478-1490.
225. Sahaboglu, A., Barth, M., Secer, E., Del Amo, E.M., Urtti, A., Arsenijevic, Y., Zrenner, E., and Paquet-Durand, F. (2016). Olaparib significantly delays photoreceptor loss in a model for hereditary retinal degeneration. *Scientific Reports*, 6, 39537.
226. Jiao, K., Sahaboglu, A., Zrenner, E., Ueffing, M., Ekström, P.A., and Paquet-Durand, F. (2016). Efficacy of PARP inhibition in Pde6a mutant mouse models for retinitis pigmentosa depends on the quality and composition of individual human mutations. *Cell Death Discovery*, 2, 16040.
227. Spalm, F.H.P., Vera, M.S., Dibo, M.J., Simón, M.V., Politi, L.E., and Rotstein, N.P. (2019). Ceramide induces the death of retina photoreceptors through activation of parthanatos. *Molecular Neurobiology*, 56(7), 4760-4777.
228. Sahaboglu, A., Miranda, M., Canjuga, D., Avci-Adali, M., Savvytska, N., Secer, E., Ferial-Pliego, J.A., Kayık, G., and Durdagi, S. (2019). Drug repurposing studies of PARP inhibitors as a new therapy for inherited retinal degeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1-18.
229. Gao, F., Li, Z., Kang, Z., Liu, D., Li, P., Ou, Q., Xu, J.-Y., Li, W., Tian, H., and Jin, C. (2021). Inhibition of PARP activity improves therapeutic effect of ARPE-19 transplantation in RCS rats through decreasing photoreceptor death. *Experimental Eye Research*, 204, 108448.
230. Yan, J., Günter, A., Das, S., Mühlfriedel, R., Michalakakis, S., Jiao, K., Seeliger, M.W., and Paquet-Durand, F. (2022). Inherited retinal degeneration: PARP-dependent activation of calpain requires CNG channel activity. *Biomolecules*, 12(3).

231. Thorsell, A.-G., Ekblad, T., Karlberg, T., Löw, M., Pinto, A.F., Trésaugues, L., Moche, M., Cohen, M.S., and Schüler, H. (2017). Structural basis for potency and promiscuity in poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and tankyrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(4), 1262-1271.
232. İnternet: AstraZeneca, A. (2014). Lynparza. *European Medicines Agency*, Web: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lynparza#authorisation-details-section> adresinden 14 Haziran 2022'de alınmıştır.
233. Sander Effron, S., Makvandi, M., Lin, L., Xu, K., Li, S., Lee, H., Hou, C., Pryma, D.A., Koch, C., and Mach, R.H. (2017). PARP-1 expression quantified by [18F] FluorThanatrace: a biomarker of response to PARP inhibition adjuvant to radiation therapy. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 32(1), 9-15.
234. Shen, Y., Aoyagi-Scharber, M., and Wang, B. (2015). Trapping poly (ADP-ribose) polymerase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(3), 446-457.
235. Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., and Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Molecular Cell*, 25(2), 297-308.
236. Banasik, M., Stedeford, T., and Strosznajder, R.P. (2012). Natural inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Molecular Neurobiology*, 46(1), 55-63.
237. Nabavi, S.F., Sureda, A., Habtemariam, S., and Nabavi, S.M. (2015). Ginsenoside Rd and ischemic stroke; a short review of literatures. *Journal of Ginseng Research*, 39(4), 299-303.
238. Alano, C.C., Garnier, P., Ying, W., Higashi, Y., Kauppinen, T.M., and Swanson, R.A. (2010). NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for Poly (ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *Journal of Neuroscience*, 30(8), 2967-2978.
239. Dhein, S., Grassl, M., Gerdorn, M., Vollroth, M., Bakhtiary, F., von Salisch, S., Krämer, K., Sobiraj, A., Kostelka, M., and Mohr, F.-W. (2015). Organ-protective effects on the liver and kidney by minocycline in small piglets undergoing cardiopulmonary bypass. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 388(6), 663-676.
240. Wu, Y., Chen, Y., Wu, Q., Jia, L., and Du, X. (2015). Minocycline inhibits PARP-1 expression and decreases apoptosis in diabetic retinopathy. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 4887-4894.
241. Oláh, G., Szczesny, B., Brunyánszki, A., López-García, I.A., Gerö, D., Radák, Z., and Szabo, C. (2015). Differentiation-associated downregulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 expression in myoblasts serves to increase their resistance to oxidative stress. *PloS One*, 10(7), e0134227.
242. Aldinucci, A., Gerlini, G., Fossati, S., Cipriani, G., Ballerini, C., Biagioli, T., Pimpinelli, N., Borgognoni, L., Massacesi, L., and Moroni, F. (2007). A key role for poly (ADP-ribose) polymerase-1 activity during human dendritic cell maturation. *The Journal of Immunology*, 179(1), 305-312.

243. Berger, N., Berger, S., and Gerson, S. (1987). DNA repair, ADP-ribosylation and pyridine nucleotide metabolism as targets for cancer chemotherapy. *Anti-Cancer Drug Design*, 2(2), 203-209.
244. Zaremba, T., Thomas, H.D., Cole, M., Coulthard, S.A., Plummer, E.R., and Curtin, N.J. (2011). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pharmacogenetics, activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers. *Biochemical Journal*, 436(3), 671-679.
245. Redmond, T.M., Poliakov, E., Yu, S., Tsai, J.Y., Lu, Z., and Gentleman, S. (2005). Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13658-13663.
246. Duncan, J.L., Pierce, E.A., Laster, A.M., Daiger, S.P., Birch, D.G., Ash, J.D., Iannaccone, A., Flannery, J.G., Sahel, J.A., and Zack, D.J. (2018). Inherited retinal degenerations: current landscape and knowledge gaps. *Translational Vision Science and Technology*, 7(4), 6-6.
247. Sun, W., Huang, L., Xu, Y., Xiao, X., Li, S., Jia, X., Gao, B., Wang, P., Guo, X., and Zhang, Q. (2015). Exome sequencing on 298 probands with early-onset high myopia: approximately one-fourth show potential pathogenic mutations in RetNet genes. *Investigative Ophthalmology and Vision Science*, 56(13), 8365-8372.
248. Novak-Lauš, K., Kukulj, S., Zorić-Geber, M., and Bastaić, O. (2002). Primary tapetoretinal dystrophies as the cause of blindness and impaired vision in the republic of Croatia. *Acta Clinica Croatica*, 41(1), 23-25.
249. Bunker, C.H., Berson, E.L., Bromley, W.C., Hayes, R.P., and Roderick, T.H. (1984). Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. *American Journal of Ophthalmology*, 97(3), 357-365.
250. Campochiaro, P.A., and Mir, T.A. (2018). The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*, 62, 24-37.
251. Sahel, J.-A., Marazova, K., and Audo, I. (2015). Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(2), a017111.
252. Pinckers, A., Van Aarem, A., and Keunen, J. (1993). Colour vision in retinitis pigmentosa. *International Ophthalmology*, 17(3), 143-146.
253. Viores, S.A., Küchle, M., Derevjani, N.L., Henderer, J.D., Mahlow, J., Green, W.R., and Campochiaro, P.A. (1995). Blood-retinal barrier breakdown in retinitis pigmentosa: light and electron microscopic immunolocalization. *Histology and Histopathology*, 10(4), 913-923.
254. Campbell, M., Humphries, M., Kennan, A., Kenna, P., Humphries, P., and Brankin, B. (2006). Aberrant retinal tight junction and adherens junction protein expression in an animal model of autosomal dominant retinitis pigmentosa: the Rho(-/-) mouse. *Experimental Eye Research*, 83(3), 484-492.

255. Bresnick, G.H. (1970). Oxygen-induced visual cell degeneration in the rabbit. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 9(5), 372-387.
256. Kuno, N., and Fujii, S. (2010). Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders. *Drugs and Aging*, 27(2), 117-134.
257. LaVail, M.M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Lau-Villacorta, C., Unoki, K., Sung, C.-H., and Steinberg, R.H. (1998). Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39(3), 592-602.
258. Bok, D., Yasumura, D., Matthes, M.T., Ruiz, A., Duncan, J.L., Chappelow, A.V., Zolotukhin, S., Hauswirth, W., and LaVail, M.M. (2002). Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Experimental Eye Research*, 74(6), 719-735.
259. Do Rhee, K., Ruiz, A., Duncan, J.L., Hauswirth, W.W., LaVail, M.M., Bok, D., and Yang, X.-J. (2007). Molecular and cellular alterations induced by sustained expression of ciliary neurotrophic factor in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(3), 1389-1400.
260. Schlichtenbrede, F., MacNeil, A., Bainbridge, J., Tschernutter, M., Thrasher, A., Smith, A., and Ali, R. (2003). Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the PRPH2Rd2/Rd2 model of retinal degeneration. *Gene Therapy*, 10(6), 523-527.
261. Bok, D. (2005). Ciliary neurotrophic factor therapy for inherited retinal diseases: pros and cons. *Retina*, 25(8), S27-S28.
262. Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T.J., Siebert, S., Groner, A.C., Cabuy, E., Forster, V., and Seeliger, M. (2010). Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science*, 329(5990), 413-417.
263. Akimoto, M., Cheng, H., Zhu, D., Brzezinski, J.A., Khanna, R., Filippova, E., Oh, E.C., Jing, Y., Linares, J.L., Brooks, M., Zarepari, S., Mears, A.J., Hero, A., Glaser, T., and Swaroop, A. (2006). Targeting of GFP to newborn rods by Nrl promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3890-3895.
264. Chacko, D.M., Rogers, J.A., Turner, J.E., and Ahmad, I. (2000). Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(3), 842-846.
265. Wang, N.K., Tosi, J., Kasanuki, J.M., Chou, C.L., Kong, J., Parmalee, N., Wert, K.J., Allikmets, R., Lai, C.C., Chien, C.L., Nagasaki, T., Lin, C.S., and Tsang, S.H. (2010). Transplantation of reprogrammed embryonic stem cells improves visual function in a mouse model for retinitis pigmentosa. *Transplantation*, 89(8), 911-919.
266. MacLaren, R.E., Pearson, R.A., MacNeil, A., Douglas, R.H., Salt, T.E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J.C., and Ali, R.R. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*, 444(7116), 203-207.

267. Besch, D., Sachs, H., Szurman, P., Gülicher, D., Wilke, R., Reinert, S., Zrenner, E., Bartz-Schmidt, K.U., and Gekeler, F. (2008). Extraocular surgery for implantation of an active subretinal visual prosthesis with external connections: feasibility and outcome in seven patients. *British Journal of Ophthalmology*, 92(10), 1361-1368.
268. Zrenner, E., Bartz-Schmidt, K.U., Benav, H., Besch, D., Bruckmann, A., Gabel, V.-P., Gekeler, F., Greppmaier, U., Harscher, A., and Kibbel, S. (2011). Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1711), 1489-1497.
269. Ahuja, A.K., Dorn, J., Caspi, A., McMahon, M., Dagnelie, G., Stanga, P., Humayun, M., Greenberg, R., and Group, A.I.S. (2011). Blind subjects implanted with the Argus II retinal prosthesis are able to improve performance in a spatial-motor task. *British Journal of Ophthalmology*, 95(4), 539-543.
270. Aplin, F.P., Fletcher, E.L., Luu, C.D., Vessey, K.A., Allen, P.J., Guymer, R.H., Shepherd, R.K., and Shivdasani, M.N. (2016). Stimulation of a suprachoroidal retinal prosthesis drives cortical responses in a feline model of retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(13), 5216-5229.
271. Spencer, T.C., Fallon, J.B., Thien, P.C., and Shivdasani, M.N. (2016). Spatial restriction of neural activation using focused multipolar stimulation with a retinal prosthesis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(7), 3181-3191.
272. Keeler, C.E. (1924). The inheritance of a retinal abnormality in white mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10(7), 329-333.
273. Bruckner, R. (1951). Slit-lamp microscopy and ophthalmoscopy in rat and mouse. *Documenta Ophthalmologica*, 5, 452-554.
274. Bowes, C., Li, T., Danciger, M., Baxter, L.C., Applebury, M.L., and Farber, D.B. (1990). Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the β subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature*, 347(6294), 677-680.
275. Chang, B., Hawes, N., Hurd, R., Davisson, M., Nusinowitz, S., and Heckenlively, J. (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*, 42(4), 517-525.
276. Chang, B., Hawes, N., Pardue, M., German, A., Hurd, R., Davisson, M., Nusinowitz, S., Rengarajan, K., Boyd, A., and Sidney, S. (2007). Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the β -subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision Research*, 47(5), 624-633.
277. Gargini, C., Terzibasi, E., Mazzoni, F., and Strettoi, E. (2007). Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *Journal of Comparative Neurology*, 500(2), 222-238.
278. Jiao, K., Sahaboglu, A., Zrenner, E., Ueffing, M., Ekström, P., and Paquet-Durand, F. (2016). Efficacy of PARP inhibition in Pde6a mutant mouse models for retinitis pigmentosa depends on the quality and composition of individual human mutations. *Cell Death Discovery*, 2(1), 1-9.

279. Chang, B., Grau, T., Dangel, S., Hurd, R., Jurklies, B., Sener, E.C., Andreasson, S., Dollfus, H., Baumann, B., Bolz, S., Artemyev, N., Kohl, S., Heckenlively, J., and Wissinger, B. (2009). A homologous genetic basis of the murine cpfl1 mutant and human achromatopsia linked to mutations in the PDE6C gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46), 19581-19586.
280. Sakami, S., Kolesnikov, A.V., Kefalov, V.J., and Palczewski, K. (2014). P23H opsin knock-in mice reveal a novel step in retinal rod disc morphogenesis. *Human Molecular Genetics*, 23(7), 1723-1741.
281. Martinez-Navarrete, G., Seiler, M.J., Aramant, R.B., Fernandez-Sanchez, L., Pinilla, I., and Cuenca, N. (2011). Retinal degeneration in two lines of transgenic S334ter rats. *Experimental Eye Research*, 92(3), 227-237.
282. Eisenfeld, A.J., Bunt-Milam, A.H., and Sarthy, P.V. (1984). Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Investigative Ophthalmology and Vision Science*, 25(11), 1321-1328.
283. Banizs, A.B., Huang, T., Dryden, K., Berr, S.S., Stone, J.R., Nakamoto, R.K., Shi, W., and He, J. (2014). In vitro evaluation of endothelial exosomes as carriers for small interfering ribonucleic acid delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4223.
284. Olivares-González, L., Velasco, S., Campillo, I., and Rodrigo, R. (2021). Retinal inflammation, cell death and inherited retinal dystrophies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4).
285. Paquet-Durand, F., Hauck, S.M., Van Veen, T., Ueffing, M., and Ekström, P. (2009). PKG activity causes photoreceptor cell death in two retinitis pigmentosa models. *Journal of Neurochemistry*, 108(3), 796-810.
286. Kaur, J., Mencl, S., Sahaboglu, A., Farinelli, P., Van Veen, T., Zrenner, E., Ekström, P., Paquet-Durand, F., and Arango-Gonzalez, B. (2011). Calpain and PARP activation during photoreceptor cell death in P23H and S334ter rhodopsin mutant rats. *PloS One*, 6(7), e22181.
287. Sahaboglu, A., Tanimoto, N., Bolz, S., Garrido, M., Ueffing, M., Seeliger, M., Löwenheim, H., Ekström, P., and Paquet-Durand, F. (2014). Knockout of PARG110 confers resistance to cGMP-induced toxicity in mammalian photoreceptors. *Cell Death and Disease*, 5(5), e1234.
288. Trifunović, D., Arango-Gonzalez, B., Comitato, A., Barth, M., Del Amo, E.M., Kulkarni, M., Sahaboglu, A., Hauck, S.M., Urtti, A., and Arsenijevic, Y. (2016). HDAC inhibition in the cpfl1 mouse protects degenerating cone photoreceptors in vivo. *Human Molecular Genetics*, 25(20), 4462-4472.
289. Zhu, Y., Zhao, K.-k., Tong, Y., Zhou, Y.-l., Wang, Y.-x., Zhao, P.-q., and Wang, Z.-y. (2016). Exogenous NAD⁺ decreases oxidative stress and protects H₂O₂-treated RPE cells against necrotic death through the up-regulation of autophagy. *Scientific Reports*, 6, 26322.

290. Gallenga, C.E., Lonardi, M., Pacetti, S., Violanti, S.S., Tassinari, P., Di Virgilio, F., Tognon, M., and Perri, P. (2021). Molecular mechanisms related to oxidative stress in retinitis pigmentosa. *Antioxidants*, 10(6), 848.
291. Olivares-González, L., de la Cámara, C.M.-F., Hervás, D., Marín, M.P., Lahoz, A., Millán, J.M., and Rodrigo, R. (2016). cGMP-phosphodiesterase inhibition prevents hypoxia-induced cell death activation in porcine retinal explants. *PloS One*, 11(11), e0166717.
292. Williams, P.A., Harder, J.M., Cardozo, B.H., Foxworth, N.E., and John, S.W. (2018). Nicotinamide treatment robustly protects from inherited mouse glaucoma. *Communicative and Integrative Biology*, 11(1), e1356956.
293. Vighi, E., Trifunović, D., Veiga-Crespo, P., Rentsch, A., Hoffmann, D., Sahaboglu, A., Strasser, T., Kulkarni, M., Bertolotti, E., and Van Den Heuvel, A. (2018). Combination of cGMP analogue and drug delivery system provides functional protection in hereditary retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(13), E2997-E3006.
294. Pan, Y.-R., Song, J.-Y., Fan, B., Wang, Y., Che, L., Zhang, S.-M., Chang, Y.-X., He, C., and Li, G.-Y. (2020). mTOR may interact with PARP-1 to regulate visible light-induced parthanatos in photoreceptors. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 27.
295. Paquet-Durand, F., Azadi, S., Hauck, S.M., Ueffing, M., van Veen, T., and Ekström, P. (2006). Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse. *Journal of Neurochemistry*, 96(3), 802-814.
296. Paquet-Durand, F., Sanges, D., McCall, J., Silva, J., Van Veen, T., Marigo, V., and Ekström, P. (2010). Photoreceptor rescue and toxicity induced by different calpain inhibitors. *Journal of Neurochemistry*, 115(4), 930-940.
297. Paquet-Durand, F., Beck, S., Michalakakis, S., Goldmann, T., Huber, G., Mühlfriedel, R., Trifunović, D., Fischer, M.D., Fahl, E., and Duetsch, G. (2010). A key role for cyclic nucleotide gated (CNG) channels in cGMP-related retinitis pigmentosa. *Human Molecular Genetics*, 20(5), 941-947.

EKLER

EK-1. Etik Kurul

Baden-Württemberg
Tübingen Valiliği

Tübingen Valiliği • Postfach 26 66 • 72016 Tübingen

Bayan Dr. Ayşe Sahaboğlu-Tekgöz,
Eberhard-Karls-Üniversitesi Tübingen
Oftalmoloji Bölümü
Oftalmoloji Araştırma Enstitüsü (FIA)
Göz Patofizyolojisi
Elfriede-Aulhornstr. 7,
72076 Tübingen

Bilgi için:
Hayvan Koruma Kurumu,
Veterinerlik Servisi ve Laboratuvar Hayvanı Bilimi
Calwer Straße 7/4
72076 Tübingen
Tübingen Kaymaklığı
-Veterinerlik Dairesi-
72072 Tübingen

4 Temmuz 2013 tarihli Hayvan Koruma Yasasını (federal resmi gazete I. S. 2182) değiştirmeye yönelik olarak üçüncü yasayla değiştirilen 18 Mayıs 2006 tarihli ilan (federal resmi gazete I. S. 1206) metni içindeki Hayvan Koruma Yasası (TierSchG).
2 Mayıs 2018 tarihli bildiri; Posta girişi: 09.05.2018

Sayın Bayan Dr. Sahaboğlu-Tekgöz,

Bu belge ile, "Kalıtsal fotoreseptör dejenerasyonunun tedavisi konusunda yeni hedeflerin araştırılması: Kanseri tedavisinde PARP inhibitörleri ile ilgili ikincil tıbbi endikasyon" başlıklı bildirinizi, Hayvan Koruma Yasası (TierSchG) madde 4, fıkra 3 uyarınca aldığımızı onaylıyoruz.
Valilik tarafından projenin uygulanmasına herhangi bir itiraz bulunmamaktadır.

Saygılarımla
İmza
Dr. Saskia Hogreve

EK-1. (devam) Etik Kurul



Baden-Württemberg
REGIERUNGSPRÄSIDIUM TÜBINGEN

Regierungspräsidium Tübingen · Postfach 26 66 · 72016 Tübingen

Frau
Dr. Ayse Sahaboglu-Tekgoez
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Dept. f. Augenheilkunde
Forschungsinstitut f. Augenheilkunde (FIA)
Pathophysiologie des Auges
Elfriede-Aulhornstr. 7
72076 Tübingen

nachrichtlich:
Einrichtung für Tierschutz,
Tierärztlicher Dienst
und Labortierkunde
Calwer Straße 7/4
72076 Tübingen

Landratsamt Tübingen
-Veterinäramt-
72072 Tübingen

 Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206), das durch das Dritte Gesetz zur Änderung des Tierschutzgesetzes (BGBl. I S. 2182) vom 04. Juli 2013 (TierSchG) geändert worden ist
Mitteilung vom 02.05.2018; Posteingang: 09.05.2018

Sehr geehrte Frau Dr. Sahaboglu-Tekgoez,

wir bestätigen hiermit den Eingang Ihrer Mitteilung nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz (TierSchG) mit dem Titel „**Untersuchung neuer Targets zur Therapie erblicher PhotorezeptorDegeneration: Sekundäre medizinische Indikation für PARP Inhibitoren der Krebsbehandlung**“.

EK-1. (devam) Etik Kurul

- 2 -

Gegen die Durchführung des Vorhabens bestehen seitens des Regierungspräsidiums keine Einwände.

Mit freundlichen Grüßen

gez.

Dr. Saskia Hogreve

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AKKAYA, Pakize Nur
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji ABD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji ABD	2015
Lisans	Ankara Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2012
Lisans	İstanbul Üniversitesi / Sosyoloji Bölümü	Devam ediyor
Lisans	Atatürk Üniversitesi / Sosyal Hizmetler U.	Devam ediyor
Lise	Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2018-devam ediyor	Balıkesir Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2014-2018	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, İtalyanca, Almanca

Yayınlar ve Bildiriler

1. Akkaya, P.N., Hosseinzadeh, Z., Elmas, Ç. ve Sahaboglu, A. (2022). Age-related macular degeneration and current therapies. *Journal of Gazi University Health Sciences Institute*, Accepted: 22 September 2022.
2. Akkaya, P.N., Elmas, Ç. ve Sahaboglu, A. (2022, 26-28 May). *Cell death in hereditary retinal degenerations: PARthanatos and PARP inhibition*. Paper presented orally at the First International Congress of Histology and Embryology, Türkiye.
3. Akkaya, P.N., Elmas, Ç., Zrenner, E. ve Sahaboglu, A. (2021, 22-24 September).

Repurposing of PARP inhibitors as neuroprotective agents on retinal degenerations. Paper presented orally at Fisrt International Microscopy and Spectroscopy Congress, Türkiye.

4. Akkaya, P.N., Elmas, Ç., Zrenner, E. ve Sahaboglu, A. (2020, 9-12 December). *Repurposing of PARP inhibitors as neuroprotective agents in slow photoreceptor degeneration.* Paper presented as poster presentation at Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) Congress, USA.
5. Akkaya, P.N., Zrenner, E. ve Sahaboglu, A. (2020, 1 July). *Repurposing of PARP inhibitors as neuroprotective agents in retinal degeneration in rd2 mice.* Progress report, Seminar, Tübingen University, Germany.
6. Akkaya, P.N., Trifunovic, D., Elmas, Ç., Zrenner, E. ve Sahaboglu, A. (2020). Repurposing of PARP inhibitors as neuroprotective agents in slow retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 61(7), 2484-2484.
7. Sahaboglu, A., Miranda, M., Akkaya, P.N., Zrenner E. ve Durdagi, S. (2019, 19-21 December). *Repurposing of PARP inhibitors for inherited retinal degeneration.* 7th International Bau Drug Design Congress, Türkiye.
8. Akkaya, P.N. ve Erbaş, O. (2019). Corneal transplantation and immünosuppressants. *Demiroglu Science University Florence Nightingale Transplantation Journal*, 4, 1-10.
9. Akkaya, P.N., Elmas, Ç., Seymen, C.M., Take Kaplanoğlu, G. ve Şener, D. (2017, 18-21 May). *The effects of di-n-butyl phthalate on tuba uterina and possible protective effect of resveratrol.* Paper presented as poster presentation at 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Türkiye.

Hobiler

Deneme türünde yazılar yazmak, yardım kuruluşlarının gönüllü faaliyetlerine katılmak, doğa yürüyüşleri, satranç, fotoğraf çekmek.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

