

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı**

**DENEYSEL GLOKOM MODELİNDE
KAROTENOİDİN RETİNA YAPI VE FONKSİYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

Ayşegül ÇÖRT

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2008

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı**

**DENEYSEL GLOKOM MODELİNDE KAROTENOİDİN
RETİNA YAPI VE FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Ayşegül ÇÖRT

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Gültekin YÜCEL**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:2006.02.0122.013)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2008

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı




Üye : Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Akif ÇİFTÇİOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Onay:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin OĞUZ

Enstitü Müdürü

DENEYSEL GLOKOM MODELİNDE KAROTENOİDİN RETİNA YAPI VE FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Ayşegül ÇÖRT

ÖZET

Glokom retinal gangliyon hücre ölümüyle seyreden, optik sinir nöropatisidir. Artmış göz içi basıncı (IOP) glokom için bir risk faktörüdür. Oksidatif ve nitratif stresin glokomun yol açtığı optik sinir hasarının karakteristiği olan nöronal ölümün gelişiminde rolü olduğu açıktır.

Bu çalışmanın amacı Astaksantin (ASX) IOP artışı varlığında retina üzerine olan, olası, koruyucu etkilerini elektrofizyolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırmaktır. Bu projede ratlarda oluşturulan deneysel glokom modelinde nöroprotektif ve antioksidan bir karotenoid olan ASX'in retinal apoptozis, protein oksidasyonu, nitrik oksit sentaz-2 (NOS-2) ve glutatyon (GSH) düzeylerine olan etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda 46 adet wistar sıçan rastgele bölünerek 2 gruba ayrılmıştır. Birinci gruba 8 hafta süre ile intragastirik gavaj yoluyla 5 mg/kg/gün ASX uygulanırken, ikinci grupta yer alan ratlara deney süresince gavaj yoluyla 300 µl zeytinyağı verilmiştir. Her iki deney grubunda limbal venlerden köken alan üç dal, unilateral olarak oftalmik koter vasıtasıyla koterize edilmiştir. Koterizasyon yapılan gözde IOP artışı sağlanırken diğer göz kontrol grubu olarak çalışılmıştır. Deney süresinin sonunda sıçanların görsel uyarılma potansiyelleri (VEP) kaydedilmiş ve hayvanlar kurban edilerek enükleasyon yapılmıştır. Deney gruplarından elde edilen gözler 4 gruba ayrılmıştır. 1. Kontrol grubu (K); 2. Astaksantin uygulanan grup (ASX); 3. IOP artışı sağlanan grup (IOP); 4. Göz içi basınç artışı sağlanan ve ASX uygulanan grup (IOP + ASX).

Protein karbonil seviyeleri glokomlu retinalarda yüksek olarak bulunmuştur. Astaksantin uygulaması protein karbonil seviyelerini düşürmüştür. Retina dokusunda western blot analizi gerçekleştirilmiş ve glokomlu retinalarda NOS-2 ekspresyonu gözlenmiştir. Anlamlı düzeyde olmasa da GSH seviyelerinin glokomda azaldığı ve ASX'in GSH seviyelerini artırdığı bulunmuştur. Bütün VEP komponentlerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IOP artışı grubunda uzamış latensler kaydedilmiştir. Göz içi basınç artışı grubuna ASX verilmesi VEP latenslerini önemli düzeyde kısaltmıştır. Retinal TUNEL boyaması IOP artışı grubunda apoptozis varlığını göstermiştir. Astaksantin uygulaması IOP artışı grubunda apoptotik hücre sayısını azaltmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin glokomun patogenezindeki rolünü açıklığa kavuşturmuş, ASX uygulamasının koruyucu etkilerini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Glokom, Astaksantin, VEP, GSH, Protein Karbonil, NOS-2

THE EFFECT OF CAROTENOID ON RETINAL STRUCTURE AND FUNCTION IN EXPERIMENTAL GLAUCOMA MODEL

Ayşegül ÇÖRT

ABSTRACT

Glaucoma is an optic nerve neuropathy involving the death of retinal ganglion cells. Glaucoma leads to progressive loss of vision associated with optic nerve damage. Elevated intraocular pressure (eIOP) in the eye is a risk factor for glaucoma. Although the initiating causes leading to glaucoma are unknown, oxidative and nitrate stress appears to play a role in the progressive neuronal death that is characteristic of glaucomatous optic nerve damage.

The aim of this study was to clarify the possible effect of astaxanthin ingestion on retina, by means of electrophysiological, biochemical and immunohistochemical parameters. The neuroprotective and antioxidant effect of ASX was determined by measuring retinal apoptosis, protein oxidation, nitric oxide synthase-2 (NOS-2) and glutathione (GSH) levels in an experimental rat model of eIOP.

46 wistar rats randomly divided into two groups. The first group of rats were given 300 µl of olive oil while the second group received 5 mg/kg/day ASX dissolved in olive oil for a period of 8 weeks. Intraocular pressure was elevated by unilaterally cauterizing three episcleral vessels. The unoperated eye in each rat served as control. At the end of the experimental period, visual evoked potentials (VEP) were recorded and rats were sacrificed. Enucleated globes were divided into 4 groups. 1. Control (K); 2. Astaxanthin treated group (ASX); 3. Elevated IOP group (eIOP), 4. Elevated IOP and ASX treated group (eIOP+ASX).

Protein carbonyl levels were increased in rats with eIOP. Astaxanthin treatment reduce protein carbonyl levels. Western blot analysis carried out in retinal tissues showed increased NOS-2 expression in eIOP. Though not significant, GSH levels were decreased in rats with eIOP. Treatment with ASX elevated GSH levels in the retina. Larger latencies in all VEP components were observed in rats with eIOP compared to control. Astaxanthin treatment in eIOP significantly lowered VEP latencies. Retinal TUNEL staining showed the presence of apoptosis in eIOP. Astaxanthin treatment reduced apoptotic cells in rats with eIOP.

The present data confirmed the role of reactive oxygen and nitrogen species and highlighted the protective effect of ASX in the pathogenesis of glaucoma.

Key words: Glaucoma, Astaxanthin, VEP, Protein Carbonyl, NOS-2, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Bu araŐtırmanın gerçekleŐmesinde yol gÖsteren hocam Prof. Dr. GÖltekin YÜCEL'e ve araŐtırmanın her aŐamasında destek olan Doç. Dr. Mutay ASLAN'a, operasyonların yapılmasını sağlayan Doç. Dr. Mustafa ÜNAL'a, yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mehmet Akif ÇİFTÇİOĞLU'na ve özverili çalıŐmalarından dolayı AraŐ. Gör. Nihal ÖZTÜRK ve AraŐ. Gör. Deniz AKPINAR'a teknik olanakları ile bu çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleŐmesini sağlayan Deney Hayvanları Ünitesi çalıŐanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	6
2.1. Görme Sistemi	6
2.1.1. Gözün yapısı	6
2.1.2. Sıçan Görme Sistemi	12
2.2. Glokom	13
2.2.1. Aköz Humorun Akışı ve Trabeküler Ağ	13
2.2.2. Glokomun Patogenezi ve Tipleri	14
2.3. Görsel Uyarılma Potansiyelleri	16
2.3.1. Görsel Uyarılma Potansiyeli Kayıtları	17
2.3.2. Görsel uyarılma potansiyellerini Etkileyen Faktörler	18
2.4. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	19
2.4.1. Serbest Radikal Tanımı	19
2.4.2. Serbest Radikal Oluşumu	19
2.4.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Kaynakları	20
2.4.4. Reaktif Nitrojen Türleri ve Kaynakları	22
2.4.5. Nitrik oksit ve oksijen radikalleri arasındaki etkileşim	22
2.5. Glokomda Oksidatif ve Nitratif Stres Markırları	23
2.5.1. Protein Oksidasyonu ve Glokom	23
2.5.2. Lipit Peroksidasyonu ve Glokom	25
2.5.3. Gliko-oksidasyon ve Glokom	26
2.5.4. DNA-Oksidasyonu ve Glokom	27
2.5.5. Protein Nitrasyonu ve Glokom	28
2.5.6. Lipit Nitrasyonu ve Glokom	28
2.6. Glokom Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	29
2.6.1. β blokörler	29
2.6.2. Prostaglandin Analogları	29

2.6.3. Sempatomimetik ve Paraseempatomimetik İlaçlar	29
2.6.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	30
2.6.5. Nöroprotektif İlaçlar	30
2.6.6. Ca ⁺² Kanal Blokörleri	31
2.6.7. Antiglokom İlaçlar	31
2.6.8. N-metil-D-aspartat Antagonistleri	31
2.6.9. Nitrik Oksit Sentaz-2 İnhibitörleri	31
2.6.10. Nörotrofinler	31
2.7. Glokom Tedavisinde Kullanılan Antioksidanlar	31
2.7.1. Karotenoidler	32
2.7.2. Astaksantin	33
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	36
3.1. Gruplandırma	36
3.2. Deney Protokolü	36
3.3. Albino Wistar Ratlarında Göz İçi Basınç Artışına Bağlı Glokom Oluşturmak	36
3.4. Göz İçi Basınç Ölçümü	37
3.5. Astaxantin Verilmesi	37
3.6. Görsel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi	37
3.7. Retina Dokusunun Alınması	37
3.8. Retinal NOS-2 protein miktarının belirlenmesi	38
3.9. Retinal Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü	39
3.10. Retinal Okside Glutasyon (GSSG) ve Redükte Glutasyon (GSH) Miktarının Ölçümü	39
3.11. Protein Tayini	40
3.12. Retinal Apoptozisin Belirlenmesi	41
3.13. Sonuçların Değerlendirilmesi	42
BULGULAR	43
4.1. Genel Görünüm	43
4.2. Ağırlık Değişimi	43
4.3. Göz İçi Basınç Ölçümü Sonuçları	43
4.4. Retinal NOS-2 Protein Miktarı Sonuçları	45
4.5. Retina Redükte Glutasyon ve Okside Glutasyon Aktivite Sonuçları	46
4.6. Retinal Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü Sonuçları	46
4.7. Protein Standardı Grafiği	47
4.8. Retinal Apoptozis Sonuçları	47
4.9. Görsel Uyarılma Potansiyeli Sonuçları	48
TARTIŞMA	51
SONUÇLAR	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
AGEs	: ileri glikasyon ürünleri
CAT	: katalaz
CPPA	: coomassie plus protein ölçümü
Cu/Zn-SOD	: bakır-çinko süperoksit dismutaz
DNP	: dinitrofenil
DNPH	: dinitrofenil-hidrazin
DTNB	: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit
FVEP	: flaş VEP
GAPDH	: gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GC	: guanilat siklaz
GFAP	: glial fibriler asidik protein
GON	: glokoma bağlı optik nöropati
GPx	: glutatyon peroksidaz
GSH	: glutatyon
GSSG	: okside glutatyon
GST	: glutatyon S-transferaz
H₂O₂	: hidrojen peroksit
HA	: hiyaluronik asit
HDL	: yüksek dansiteli lipoproteinler
HOCl	: hipoklorit
HRP	: horseradish peroksidaz
IOP	: göz içi basıncı
IP	: izoprostan
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
LDL	: düşük dansiteli lipoproteinler
MDA	: malondialdehit
MES	: morfolin etansülfonik asit
Mn-SOD	: mangan süperoksit dismutaz
NF-κB	: nükleer faktör-κB
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: nitrik oksit
NO₃⁻	: nitrat
NOS	: nitrik oksit sentaz
O₂⁻	: süperoksit anyon radikali
OH[·]	: hidroksil radikali
ONH	: optik sinir başı
ONOO⁻	: peroksi nitrit
ONOOCO₂⁻	: nitrozoperoksokarbonat
ONOOH	: peroksinitröz asit
p38 MAPK	: p38 mitojenik aktive edici protein kinaz
POAG	: primer açık açılı glokom
PUFA	: poliunsatüre fatty asit
R[·]	: organik radikaller

RAGE	: AGE reseptörü
RCOO[·]	: organik peroksitler
RGC	: retinal gangliyon hücre
RNS	: reaktif nitrojen türlerinin
RO[·]	: alkoksi radikali
ROO[·]	: peroksil radikali
ROS	: reaktif oksijen metabolitleri
RS[·]	: tiyil radikali
SOD	: süperoksit dizmutaz
TBARS	: tiobarbütirik asit reaktif ürünleri
TdT	: terminal deoksinükleotid transferaz
TEAM	: trietanolamin reaktifi
TGF	: transforme edici büyüme faktörü
TNB	: 5-thio-2-nitrobenzoik asit
TUNEL	: terminal. deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and. labelling assay
VEP	: görsel uyarılma potansiyeli
VLDL	: çok düşük dansiteli lipoproteinler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.1	Apoptozisin başlıca sinyal bileşenleri	3
Şekil 2.1.	Gözün yapısı	6
Şekil 2.2.	Retina elemanları ve retina katmanları	7
Şekil 2.3.	Koni ve basillerin bölümleri	8
Şekil 2.4.	Foveanın yapısı	9
Şekil 2.5.	Işık uyarımı ile rodopsinde meydana gelen değişimler	10
Şekil 2.6.	Fotoreseptör dış segment membranında bulunan cGMP-kapılı kanallara ışığın neden olduğu değişimler.	10
Şekil 2.7.	Retinanın nöronal yapısı	11
Şekil 2.8.	Temel görsel yolaklar	12
Şekil 2.9.	Ön segment anatomisi ve aköz humorun akış şeması	13
Şekil 2.10.	Trabeküler ağın konumu	14
Şekil 2.11.	Görsel uyarılma potansiyelleri ve bileşenleri	18
Şekil 2.12.	Peroksinitrit oluşumu ve yıkılımı	23
Şekil 2.13.	Arjinin yan zincirinin ROS aracılı oksidasyonu ile protein karbonil oluşumu	24
Şekil 2.14.	Protein karbonillerin belirlenmesi	24
Şekil 2.15.	Astaksantin yapısı	34
Şekil 3.1.	SDS-PAGE ve western blot analizi	38
Şekil 3.2.	DNA fragmanlarının 3'-OH ucunun biotin ile işaretlenmesi ve HRP bağlanması	42
Şekil 4.1	Göz içi basınç değerlerinin haftalara göre değişimi grafiği	43
Şekil 4.2	Retina protein boyaması	45
Şekil 4.3	Retina NOS-2 western blot analizi	45
Şekil 4.4.	Retina GSH, GSSG ve GSH/GSSG değerleri	46
Şekil4.5.	Retina protein karbonil değerleri	46
Şekil 4.6.	Protein standart grafiği	47
Şekil 4.7.	Retinanın hematoksilen eozin boyaması	47
Şekil 4.8.	Retinal Apoptozis Boyaması	48
Şekil 4.9.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen VEP'ler ve bileşenleri	49

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 4.1. Kontrol ve deney grubu hayvanların haftalık ağırlık değişimleri	44
Tablo 4.2. VEP latensleri	50
Tablo 4.3. VEP genlikleri	50

GİRİŞ

Amerika ve diğer endüstriyel ülkelerde körlüğün başlıca nedeni olan glokom ilerleyen bir optik nöropatidir. Artmış basınç gözde glokom için bir risk faktörüdür, primatlarda basınç artışının sağlandığı deneysel çalışmalar glokoma bağlı optik sinir hasarı ile sonuçlanmıştır (1). Ancak göz içi basıncı (IOP-intraocular pressure) normal seviyede olduğunda da glokoma bağlı görme kaybı meydana gelebilir (2). Glokomun başlatıcı sebepleri bilinmemesine rağmen oksidatif ve nitratif stresin glokoma bağımlı optik sinir hasarının neden olduğu nöronal ölümün gelişiminde rolü olduğu açıktır. Glokomda; proteinlerdeki nitrotirozin ve karboniller, lipid oksidasyon ürünleri ve okside DNA bazlarını da içeren birçok oksidatif stres markırları rapor edilmiştir (3). Oksidatif stres sırasında meydana gelen serbest radikaller, hücrenin yapı taşları olan lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlere zarar verip fonksiyonlarını bozmaktadır. Özellikle retinada doymamış yağ asitlerinin bol miktarda bulunması (4), retinayı serbest radikallere karşı daha duyarlı hale getirmektedir. Böylece, membran lipidlerinin oksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyon ürünleri membran fonksiyonlarında önemli değişikliklere yol açmaktadır. Yapılan son deneysel çalışmalar iris-silier cisim, retina ve glokomlu optik sinir başında (ONH) indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS-2 veya iNOS)'un varlığını rapor ederek glokomda nitrik oksitin rolünü belirtmiştir (5).

Glokoma bağlı optik nöropatiye (GON) neden olan patofizyolojik mekanizmalarda halen açıklanamamış noktalar bulunmaktadır. Nöronal hasarda gözlenen mekanik basınç ve vasküler iskeminin önemli rolü olduğu düşünülmektedir (6). Mekanik basınç teorisi artmış IOP'yi glokom için en önemli risk olarak görmektedir (7). Glokomda IOP artışının mekanizması açık açılı glokomda ön odada drenaj sisteminde meydana gelen bozukluklar ya da kapalı açılı glokomda ise aköz humorun drenaj sistemine erişiminde meydana gelen bozukluklar sonucu aköz humorun akışının bozulmasıdır (8).

Oksidatif stresin trabeküler ağ dejenerasyonunu tetikleyerek IOP artışına ve aköz akışında değişimlere neden olduğu ileri sürülmektedir (9). Gerçekten de hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele trabeküler ağ hücrelerinin hücre dışı matriks adezyonunu bozar ve hücre iskeletinin yapısında yeni düzenlenmelere yol açar (10). Kontrol ile karşılaştırıldığında glokom hastalarının trabeküler ağ hücrelerinde oksidatif DNA hasarının önemli derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (11). Ayrıca insanlarda yapılan in vivo çalışmalar hem IOP artışı hem de görme alanı hasarının oksidatif DNA hasarı miktarı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (12). Benzer şekilde primer açık açılı glokomlu (POAG) gözlerde optik sinir hasarının şiddeti trabeküler ağ değişimleri ile korelasyona sahiptir (13).

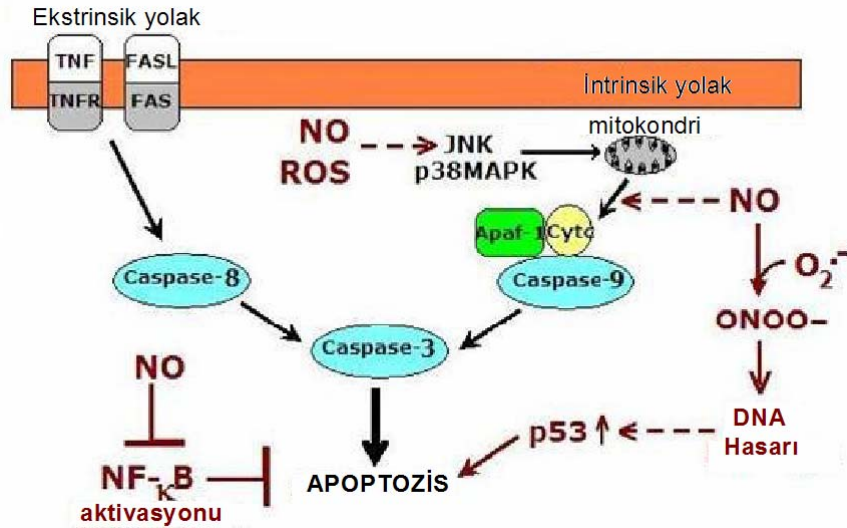
Nitrik oksit, IOP'nin regülasyonunda ve oküler kan akımının modülasyonunda görev alan önemli bir mediatördür. Nitrik oksit (NO), NOS enzimi vasıtasıyla sentezlenir (14). Nitrik oksit sentaz enziminin üç tane isoformu mevcuttur

(15). Bunlar, NOS-1, NOS-2 ve NOS-3'tür NOS-1 ve NOS-3 buldukları dokularda daim sentez edilirken, NOS-2, immünolojik ve inflamatuvar stimülasyonlardan sonra eksprese olur (16). Nitrik oksit sentaz-1 ve NOS-3 tarafından üretilen NO miktarı nanomolar düzeyde olup fizyolojik sınırlar içerisinde yer alırken, NOS-2 tarafından yapılan NO miktarı mikromolar düzeyde ifade edilir ve patolojiktir (17). Son 5 yıl içerisinde, göz içi NO sentezi incelenmiş ve her üç NOS enziminin varlığı göz içerisinde gösterilmiştir (18). Nitrik oksit sentaz-1 ve NOS-3 tarafından yapılan az miktardaki nitrik oksit, kardiovasküler ve sinir sistemi içerisinde sinyal iletilişinde görev almaktadır (19). Nitrik oksitin nörotransmisyon ve vazodilatasyon gibi etkileri guanilat siklaz (GC) enzimi vasıtasıyla yapılan cGMP yoluyla gerçekleşmektedir (20). Nitrik oksit sentaz-2 tarafından yapılan NO'nun direk reaksiyonu, oksidasyon ve nitrasyon reaksiyonları verebilen sekonder türlerin oluşumu yoluyla sitotoksik ve inflamatuvar yanıtın gelişmesinde önem teşkil eder. Nitrik oksit düşük moleküler ağırlığı ve nötral yapısı nedeniyle biyolojik sistemlerde çok rahat difüzyon gösterir. Oksidatif stres varlığında $O_2^{\cdot-}$ ve metallerle çok rahat reaksiyona girer. Oküler hipertansiyon hayvan modellerinde artmış IOP retinal hücrelerde apoptozisi artırır, NOS-2 ekspresyonunu uyarır ve protein nitrasyonuna yol açar (21). Glokomlu rat (22) ve insanlara (14) ait ONH'de yapılan çalışmalar nitrotirozin boyamaları ile glokomda ONH'de NOS-2 varlığını göstermiş ve NO'nun GON'daki rolünü belirtmiştir. Oküler dejenerasyonun eşlik ettiği klinik durumlarda nitratif stres hastalık gidişatını kötüleştirir ve glokomda NOS-2 ekspresyonunun artışı, nitrik oksidin oküler patolojilerde rolünü ortaya koyar (23). Bu sonuç reaktif nitrojen türlerinin (RNS) artmış IOP ile ilişkili retinal gangliyon hücre (RGC) ölümüne katkıda bulunabileceğini işaret etmektedir (14) (22). Çalışmamızda NOS-2 enzim miktarının kalitatif tayini yapılarak IOP artışına bağlı olarak geliştirilen glokomun retina dokusunda oluşturabileceği moleküler oksidasyonun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Glokomda görme kaybının ana mekanizması, retinanın iç nükleer tabakası ve sinir lifi tabakasının zayıflamasına ve optik sinirde aksonal kayıba neden olan RGC apoptozisidir (6). Makrofajlar (24), astrositler (25) ve nöronal hücrelerde (26) nitrik oksitin aracı olduğu sitotoksikite ve apoptozisi uyarıcı NO miktarı rapor edilmiştir. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri iki ana yoldan uyarılan apoptozisin önemli regülatörleridir. İntrinsik yolda stres uyarımlı mitokondriyal sitokrom c salınımı meydana gelirken, ekstrinsik yolda membran reseptörlerine TNF- α ve Fas ligandın bağlanması ile meydana gelir. Salınan sitokrom c apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 ve prokaspaz-9 ile kompleks oluşturur, bu olay kaspaz-9'u aktive eder. Her iki yolda da kaspaz-3 aktivasyonunda birleşir. Kaspaz-3'ün aktivasyonu nükleer yıkım ve hücre morfolojik değişimler ile sonuçlanır (27).

Oksidatif ve nitratif stres kaspaz-3 aktivasyonuna yol açan c-Jun N-terminal kinaz (JNK, stres ile aktive olan protein kinaz SAPK) p38 mitojenik aktive edici protein kinaz (p38 MAPK) ile apoptotik hücre ölümünü uyarır (28) (29). Nitrik oksit de tirozin nitrasyonu ile mitokondriden sitokrom c'nin direk olarak salınımını uyarır (30). Nitrik oksit aracılı apoptozisin mekanizması tam olarak açıklanmamasına rağmen yüksek konsantrasyondaki NO ve peroksinitrit (ONOO $^{\cdot-}$)'in apoptozisin uyarılmasına ve p53'ü (apoptozise neden olduğu rapor edilen) aktive ederek hücre büyümesinin durmasına neden olarak DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir (31).

Nükleer faktör- κ B (NF- κ B) antiapoptotik proteinleri kodlayan genleri arttırarak apoptoze karşı koruyucu rol oynar (32). Nitrik oksit NF- κ B inhibitörü alt ünitesi olan I κ B α 'nın ekspresyonunu ve NF- κ B/ I κ B α kompleksinin stabilizasyonunu uyarak NF- κ B aktivasyonunu inhibe eder (33). Nitrik Oksitin tersine oksidatif stres NF- κ B aktivasyonu ve I κ B α fosforilasyonuna yol açan I κ B kinazı (IKK) aktive eder (32). I κ B α 'nin fosforilasyonu ve IKK'nın aktivasyonu NO ve antioksidanlar tarafından bloke edilebilir. Daha önce yayınlanan çalışmalar ile apoptozis indüksiyonunun oksijen ve nitrojen türleri arasında hassas biyokimyasal bir etkileşimi gerektirdiği öngörülebilir. Nitrik Oksitin başlattığı apoptotik hücre ölümünün başlıca sinyal bileşenleri Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Apoptozis'in en tanımlayıcı özelliği DNA fragmentasyonunun olmasıdır. Çalışmamızda nöronal retina katmanlarında apoptozisin belirlenmesi amacı ile mikroskopik DNA fragmentasyon tayini yapılmıştır.



Şekil 1.1. Apoptozisin başlıca sinyal bileşenleri

Artmış IOP hayvan modellerinde hücresel komponentlerin oksidatif yıkımı genellikle oküler doku hasarına eşlik eder. Protein karbonil oluşumu ve lipid peroksidasyon ürünleri gibi oksidatif stres markırları oküler hipertansiyon deneysel modellerinde rapor edilmiştir (34). Protein oksidasyonunun en yaygın ve genel göstergesi protein karbonil miktarıdır. Çalışmamızda protein karbonil miktarı, protein karboniller ile 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) arasında oluşan reaksiyon son ürün protein hidrazonun spektrofotometrik olarak tayini ile belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada kontrol ile karşılaştırıldığında kronik basınç uyarımlı rat glokom modellerinde karbonil immünoreaktivitesi ile oranlandığında gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), HSP72 ve glutamin sentazın önemli derecede artış gösterdiği görülmüştür (34). Benzer şekilde artmış IOP'ye sahip ratlarda retina lipid oksidasyonu yüksek bulunmuştur (35).

Glutatyon antioksidan savunma sisteminin önemli bir ögesi olup serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmayı korur. Glokom hastaları ile yapılan

bir çalışma GSH seviyelerinin önemli derecede düşük olduğunu göstermiştir (36). Düşük GSH seviyeleri antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına, serbest radikallerin indüklenmesine, radikallerin etkilerine karşı oldukça dayanıksız olan hücrelerin hasar görmesine yol açar. Yapılan son bir çalışma glutamat taşıyıcı GLAST ya da EAAC1 defektli farelerde IOP artışı olmaksızın, retinal gangliyon ve optik sinirde spontan dejenerasyonun olduğunu göstermiştir (37). GLAST defektli farelerde müller gliada GSH seviyeleri düşük olarak bulunmuştur ve glutamat taşıyıcılarının hem eksitotoksik retinal hasarın önlenmesinde hem de GSH sentezinde önemli bir hücresele antioksidan olduğu sonucuna varılmıştır (38). Çalışmamızda, IOP artışı ile oluşturulan deneysel glokom modelinde serbest radikallerin artışına paralel olarak antioksidan kapasitenin azaldığı da dikkate alınarak, glokomun, okside-redükte GSH mekanizmalarına olan etkileri araştırılmış ve literatüre yeni bilgiler eklenmesi planlanmıştır.

Oküler perfüzyon basınç ortalamasındaki sirkadien dalgalanma normal tansiyon glokomda hastalığın ilerleyişi için tutarlı bir risk faktörüdür (39). Normal IOP'ye sahip hastalarda stabil olmayan oküler kan akışının reperfüzyon hasarına yol açtığı ve oksidatif stres ile sonuçlandığı ileri sürülmektedir (40). Periferal vasküler yetmezlik, hasar riskinin olduğu organlarda proinflatuar durumu uyararak O_2^- ve H_2O_2 'nin artması sonucu gerçekleşir (41). Glokomda oluşan IOP artışına ilave olarak reaktif oksijen metabolitlerinin (ROS) de artışı rapor edilmiştir (3). Hücre metabolizması sırasında oluşan ROS sitoplazmik makromolekülleri oksidasyona uğratabilme özelliğine sahiptir. Retinal gangliyon hücreleri, sinir lifi tabakası, dış pleksiform tabaka, fotoreseptörlerin iç segmenti ve retinal pigment epitelyumunda bulunan bu reaktif türler genellikle mitokondriyal solunum zinciri bileşenlerinin otooksidasyonundan türer (42).

Mekanik basınç teorisi artmış hasar (43) ve nöroretinal hattın zayıflaması (44) gibi GON için önemli işaretlere destek vermektedir. Fakat normal tansiyon glokomu açıklamamaktadır (45). Alternatif bir diğer teori ise vasküler iskemi teorisidir. Bu teori ONH'de vasküler yetmezliğin azalan metabolik aktivite ve ardından artmış glutamat birikimi ile ganglion hücre ölümüne neden olduğunu ileri sürmektedir (46) (47). Gerçekten de yapılan birçok çalışma GON ile hipertansiyon, diyabet ve hiperkolesterolemi ile ilişkili vasküler bozukluklar arasında ilişkinin yüksek seviyelerde olduğunu göstermiştir (48) (49) (50) (51). Vasküler yetmezlikten kaynaklanan artmış glutamat birikimi sinaptik olarak salındığında potansiyel toksik seviyelere ulaşabilir. Glutamat, nöron ve gliaların plazma membranında yerleşmiş olan N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri üzerinden hareket eden uyarıcı bir nörotransmitterdir (47). N-metil-D-aspartat reseptörlerinin aşırı uyarılması hücre içi kalsiyumu toksik seviyelere kadar artırır ve aşırı NO üretimi ile sonuçlanan NOS'u aktive eder (52).

Glokomun görsel sistemde oluşturduğu değişiklikler ile retinanın fizyolojik fonksiyonunu değerlendirmek için VEP ölçülmüştür. Elektrofizyolojik bir parametre olan VEP görsel sistem değişikliklerini ortaya koyan duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak bir çok araştırmacı tarafından kabul edildiğinden dolayı tercih edilmiştir (53) (54) (55). Özellikle VEP latenslerinin optik yol patolojisine paralel olarak uzadığı ve bu nedenle VEP'lerin klinik amaçla kullanılabileceği birçok çalışmada ortaya

konmuştur (54) (56) (57) (58). Ayrıca, sıçanların görsel sisteminin insanlara benzer olması nedeniyle, sıçanlarda kaydedilen VEP'lerin yapılan araştırmaların insan sağlığı üzerine olan etkilerini yansıtmada iyi bir model olduğu vurgulanmaktadır (59).

Glokomda gelişen posttranslasyonel oksidatif modifikasyonlar (34) (21) hem ROS oluşum miktarlarına hem de intraselüler ve ekstraselüler antioksidan seviyelerine bağlıdır. Glutasyon, askorbat gibi düşük moleküler ağırlığa sahip antioksidanlar ile sistein ve tirozin gibi serbest radikalleri tutma özelliğine sahip moleküller aköz humorda tespit edilmiştir (60). Askorbat aköz humor içerisinde yüksek konsantrasyonda mevcuttur (1-2 mmol/l) (61)

Yukarıda bildirilen antioksidan moleküllere ilaveten, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerin varlığı da aköz humorda rapor edilmiştir. Süperoksit dismutaz enziminin üç formu (Cu-Zn SOD, Mn SOD ve EC SOD)'da aköz humorda mevcuttur (62). Aköz humorda GPx'in varlığı radioimmunoassay teknikleri kullanılarak gösterilmiştir (63). Bu antioksidan enzim H_2O_2 ve organik peroksitlerin redüksiyonunu katalizler. Glutasyon peroksidaz mRNA ekspresyonunun asıl gerçekleştiği yerin oküler silier epitelyum olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak aköz humorda GPx bu hücrelerden köken almaktadır (64).

Sonuç olarak glokoma bağlı artış gösteren oksijen metabolitlerinin detoksifikasyonu oküler antioksidanlara oldukça bağlıdır. Çalışmamızda oluşturulan deneysel glokom modelinde nöroprotektif ve antioksidan etkisi olan karotenoidin etkisi araştırılmıştır. Karotenoidin glokomda oluşan oksidatif harabiyete olan etkileri henüz araştırılmamıştır ve literatürde yoktur. Bu anlamda çalışmamız literatüre ışık tutulacak niteliktedir.

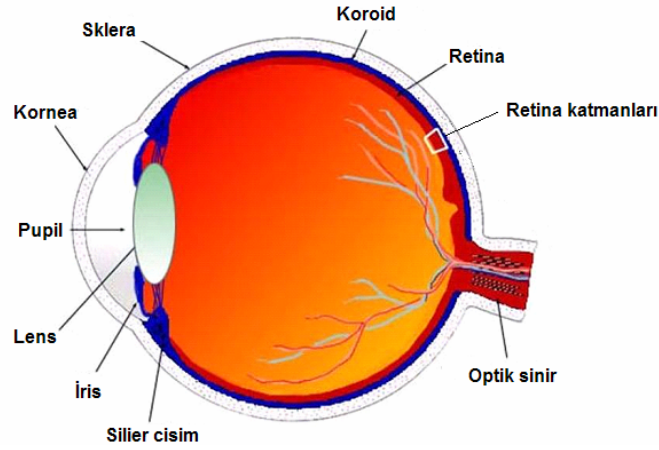
Özet olarak, deneysel protokolümüzde IOP artışının sağlandığı deneysel glokom modelimizde, sıçanların retina dokularında oluşan moleküler oksidasyon, elektrofizyolojik ve biyokimyasal yöntemler ile değerlendirilmiş ve VEP değişikliklerinin kaydedilmiştir. Çalışmamızda, serbest radikallerin artışına paralel olarak antioksidan kapasitenin azaldığı da dikkate alınarak, glokomun, okside-redukte GSH düzeylerine ve protein karbonil seviyelerine olan etkileri araştırılmış ve literatüre yeni ve kapsamlı bilgiler katılması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Görme Sistemi

2.1.1. Gözün Yapısı

Görme duyusunun görme merkezine ulaştırılmasında görevli olan göz, ışığı odaklayan mercek sistemine, bu ışığı algılayan reseptör tabakasına ve bu uyarıları merkeze ileten sinir sistemine sahiptir (65). Göz, dıştan içe doğru sklera, koroid ve retina olmak üzere üç tabakadan oluşur. (Şekil 2.1)

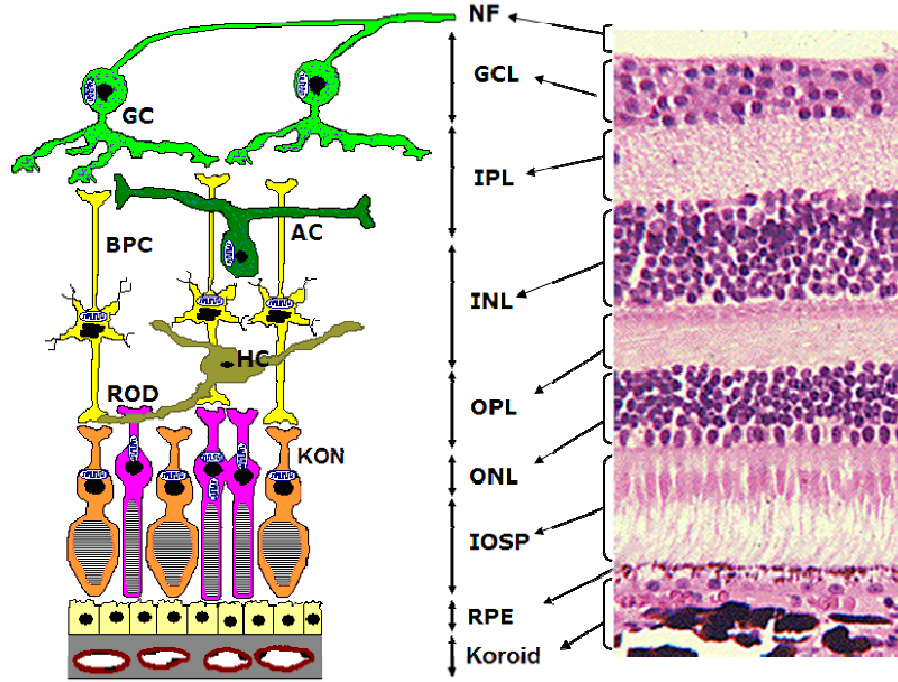


Şekil 2.1. Gözün yapısı (66)

Sklera tabakası, gözün ön tarafında ışığa karşı geçirgen ve saydam korneayı oluşturur. Göz merceği (lens) ve kornea gelen ışığı kırarak retinanın üzerine düşmesini sağlarlar. Ortadaki ikinci tabaka olan koroid kan damarlarını ve ışığı absorbe ederek göz içinde yansımaları engelleyen melanin pigmentini içerir ve gözün renkli görünen kısmını, irisi oluşturur. İrisin ortasında göz bebeği açıklığı (pupil) bulunur. İriste bulunan düz kaslar gelen ışığın şiddeti doğrultusunda pupil açıklığını düzenler (65). Pupil göze fazla ışık geldiği zaman daralır ve fazla ışık girmesini engeller, az ışık geldiği zaman ise genişler. Pupilin arka tarafında; bikonveks, saydam ve esnek özellikte göz merceği bulunur.

Işığı retinanın üzerine düşürmek için merceğin şeklini değiştirmesine akomodasyon denir. Merceğin şekli, zonular liflerle bağlı, silyer kaslarla kontrol edilir. Yakın cisimlerde kaslar kasılır ve merceğin küreselliği artar. Silyer kas beyinden göze iletilen parasempatik sinir sinyalleri ile kontrol edilir. Parasempatik sinirlerin uyarılması silyer kasın kasılmasına ve mercek bağlarının gevşemesiyle merceğin kırma gücünün artmasına yol açar. Kırma gücünün artması ile göz, yakın nesnelere odaklanma özelliği kazanır. Bu nedenle, uzakta yer alan bir nesne göze yaklaştıkça, gözün nesneyi odaklayabilmesi için, silyer kasa ulaşan parasempatik impulsların sayısı gittikçe artmalıdır (67).

En iç tabaka olan retina ışığa duyarlı reseptörleri içerir. Retinanın en alt katmanında bulunan pigment epitelyum hücreleri, retinayı geçebilen tüm ışıkları soğuran siyah pigment melanin sıvısı içerir ve ışığın gözün arka kısmından tekrar retinaya yansımaya engel olur. Fotoreseptörler gözün arka kısmında, pigment epitelyumun hemen önünde bulunur ve diğer tüm retina hücreleri ise fotoreseptörlerin önünde, merceğe yakın yüzeydedir. Bu nedenle, ışık fotoreseptörlere çarpmadan önce diğer retinal nöron katmanlarından geçer. Işık ilk olarak ganglion hücrelerinden, pleksiform ve nükleer tabakadan ve son olarak koni ve basil tabakasına ulaşmadan önce sınırlayıcı zarlardan geçer. (Şekil 2.2).

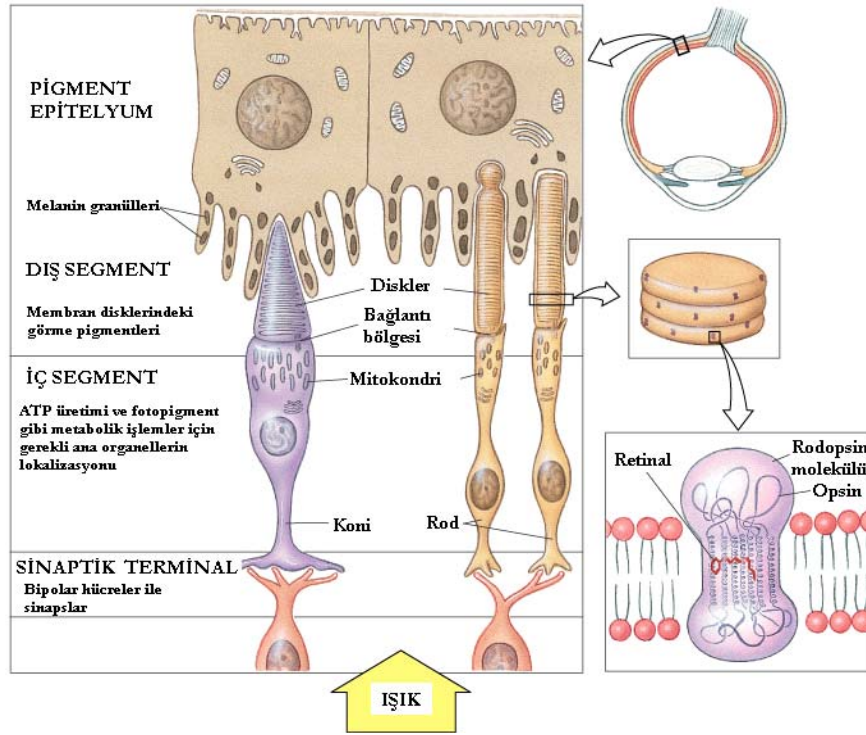


Şekil 2.2. Retina elemanları ve retina katmanları (68). GC: Gangliyon hücre, BPC: Bipolar hücre, AC: Amakrin hücre, HC: Horizontal hücre, NF: Optik sinir, GCL: Gangliyon hücre tabakası, IPL: İç pleksiform tabaka, INL: İç nükleer tabaka, OPL: Dış pleksiform tabaka, ONL: Dış nükleer tabaka, IOSP: Fotoreseptörlerin iç ve dış segmentleri, RPE: retinal pigment epiteli.

İki tür fotoreseptör vardır; rodlar ve koniler. Rodlar özellikle ışığa duyarlıdır bu nedenle akşam üzeri veya gece loş ışıkta fonksiyonlarını daha iyi yerine getirir. Fonksiyonlarının bozuk olması gece körlüğüne neden olur. Rod sistemi akromatiktir. ve sadece tek bir tip pigment bulundurur. Bu nedenle farklı dalga boylarına aynı şekilde yanıt verir. Rodlar konilere göre daha fazla sayıda görsel pigment içerir ve böylece daha fazla ışık absorbe edebilir. Tek bir foton rodta fark edilebilir elektriksel bir tepki yaratabilir. Birçok rodun, bipolar hücre internöronunda sinapsı vardır. Bu nedenle, roddan gelen sinyaller bipolar hücrede toplanır, rodların yanıtlarındaki farklılıkların internöronda ortalaması alınır, birbirini tetikleyerek her bir bağımsız reseptördeki ışığın yarattığı sinyalleri güçlendirir ve böylece beynin loş ışığı algılamasını kolaylaştırır. Koniler aydınlıkta ve renk görmeye görev alır ve fonksiyonunun bozuk olduğu kişiler renk körü olarak adlandırılır. Konilerle görüş,

rodlarla görüşten daha keskindir ve görüşteki ani değişiklikleri daha iyi çözümler. Koniler fovea'da daha yoğun olarak bulunmaktadır. Konide elektriksel bir tepkinin oluşması için onlarca, yüzlerce fotonun absorbe edilmesi gerekir. Her bir bipolar hücre tek bir koni ile sinaps yapar (69). Her biri ışık tayfının farklı bir bölgesine duyarlı üç tip koni vardır. Beyin bu üç tür koninin tepkilerini karşılaştırarak renkle ilgili bilgi edinir.

Rodlar ve koniler dış segment, iç segment, sinaptik terminal olmak üzere üç temel fonksiyonel bölge içerirler. (70) (69) (67). (Şekil 2.3)



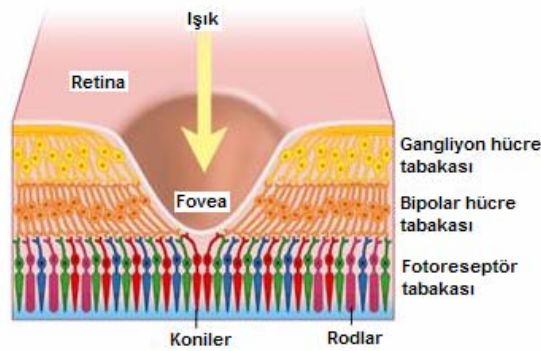
Şekil 2.3. Koni ve basillerin bölümleri (69).

Dış segment, retinanın dış veya distal bölümünde yer alır, fototransdüksiyonu gerçekleştirir. Bu bölüm ışığı emen görüntü pigmentleriyle doludur. Rodlarda tek tip konilerde ise üç tip (mavi, yeşil ve kırmızı) görme pigmenti bulunur. Her pigment ışığı absorbe eden molekül içerir. Rodlar ve koniler, bu moleküllerden çok sayıda içerir (her hücrede 10^8 tane) ve hücrelerde zarın yüzey alanını ciddi biçimde genişleten, zarımsı disklere dönüşmüşlerdir. Konilerde, diskler plazma zarının devamındayken, rodlarda plazma zarından ayrılmış ve hücre içi bir organel haline gelmiştir. Koni ve basillerin her ikisi de ışığa maruz kaldıklarında parçalanmış kimyasal maddeler içerir ve sonuçta gözden çıkan sinir liflerini uyarırlar.

İç segment, retinanın içinde daha proksimal olarak yerleşmiştir, hücrenin çekirdeğini ve pek çok biosentetik parçasını içerir. İç segmentte sitoplazma ve sitoplazmik organeller bulunur. Bu segmentteki mitokondriler fotoreseptör işlevi için enerji sağlamada önemli rol oynarlar. Sinaptik terminal, koni ya da rodun horizontal ve bipolar hücreler ile bağlantısını sağlayan bölümdür (67) (69).

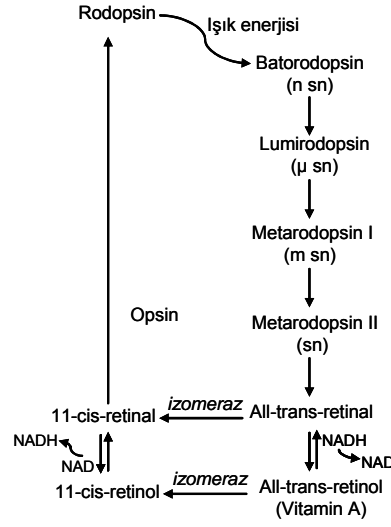
Fotoreseptörler de diğer nöronlar gibi, bölünmez ancak dış bölümlerini sürekli olarak yenilerler. Yeni diskler hızla oluşur, eski diskler ise pigment epitel hücrelerinin fagositik hareketleri ile atılır (69).

Retinada objelerin net görüntüsünün biçimlendiği nokta fovea centralis'dir. (Şekil 2.4) Fovea' da proksimal retinal nöronların hücre gövdelerinin yanlara doğru kayması oradaki fotoreseptörlerin en az zarar görmüş şekilde görüntüyü almalarına imkan verir. Bu kayma en çok fovea'nın merkezi olan foveola'da belirgindir. Fovea' da sadece koniler bulunmaktadır. Retinada ayrıca, optik disk adı verilen, optik sinir liflerinin retinayı terk ettiği, bir bölüm vardır. Bu bölgede fotoreseptör yoktur ve görsel anlamda kör noktadır.



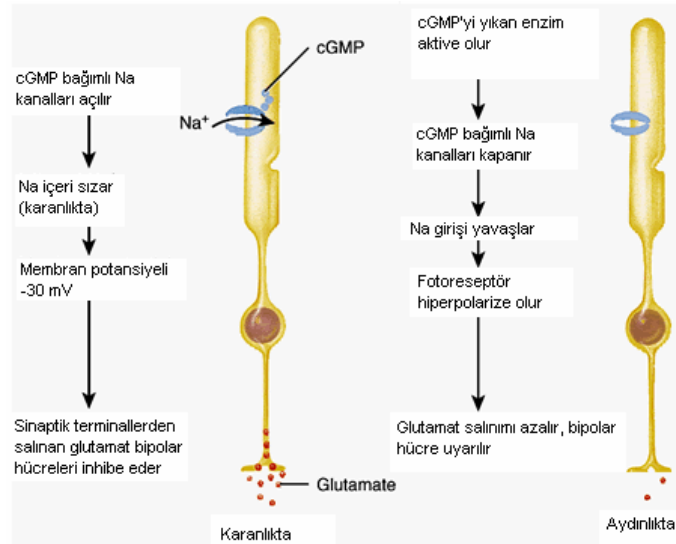
Şekil 2.4. Foveanın yapısı (71)

Retina üzerine düşen ışık elektriksel değişikliklerin oluşması ile sonuçlanan biyokimyasal reaksiyon basamaklarını tetikler ve fotokimyasal değişikliklere neden olur. Bu fotokimyasal değişiklikler rodlarda ve konilerde gerçekleşir. Rodlarda bulunan ışığa duyarlı pigment rodopsin adını alır ve maksimum absorpsiyon spektrumu 500 nm civarındadır. Konilerde bulunan ışığa duyarlı kimyasal madde ise iodopsindir (72) (67). Rodopsin opsin proteini ve karotenoid pigmenti olan retinalin (Vitamin A aldehiti ya da 11-cis-retinal) birleşiminden oluşur. Işık, retina tarafından absorbe edilince rodlarda bulunan 11-cis-retinali all-trans-retinale dönüştürür. All-trans-retinal opsinden ayrılır. Bu işleme fotodekompozisyon adı verilir. Bu parçalanma sonucunda ortaya çıkan batorodopsin nanosaniyeler içinde lümirodopsine dönüşür. Lümirodopsin mikrosaniyeler içinde metarodopsin I'i, sonra yaklaşık bir milisaniye içinde metarodopsin II'yi ve sonuçta çok daha yavaş bir şekilde tamamen parçalanmış ürünler olan opsin ve all-trans retinali oluşturur (67). All-trans retinal, ilk olarak A vitaminin bir şekli olan all-trans retinole dönüşür. Sonra all-trans retinol, izomeraz enziminin etkisiyle 11-cis retinole dönüştürülür. 11-cis retinal rod dış segmentinde opsin ile birleşerek rodopsini meydana getirir. (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. Işık uyarımı ile rodopsinde meydana gelen değişimler (72).

Işık 11-cis retinali aktive eder ve fosfodiesteraz enziminin aktivasyonunu sağlar. Bu enzim cGMP'yi hidrolize ederek cGMP'nin sitoplazmik yoğunluğunu düşürür (Şekil 2.6). cGMP bağımlı kanallar (Na^+ ve Ca^{2+}) kapanır ve fotoreseptör hiperpolarize olur. Hiperpolarizasyon fotoreseptörün ucuna pasif olarak iletilir ve hücreden nörotransmitter salınımı azalır. Daha sonra Ca kanallarının kapanması nedeniyle Ca konsantrasyonunda ki düşüş, kalsiyuma duyarlı proteini aktifleştirerek, Guanilat Siklaz'a bağlanmasına ve daha fazla cGMP üretilmesine neden olur. Bu da Na^+ ve Ca^{2+} kanallarının açılmasını ve hücrelerin tekrar dinlenim durumuna dönmesini sağlar (65).

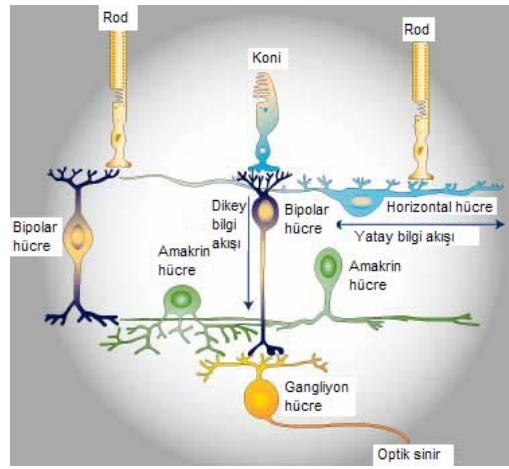


Şekil 2.6. Fotoreseptör dış segment membranında bulunan cGMP-kapılı kanallara ışığın neden olduğu değişimler. (73).

Fotoreseptörler ve ganglion hücreleri arasında bulunan bipolar, horizontal ve amakrin hücre internöronları sinyalleri fotoreseptörlerden ganglion hücrelerine

iletirler. Her retinal internöron türü (horizontal, bipolar ve amakrin), retina aracılığıyla iletilen fotoreseptör sinyallerinin şekillenmesinde önemli bir rol oynar (69). Rodlar ve koniler sinyalleri dış pleksiform tabakaya iletirken bipolar hücreler ve horizontal hücreler ile sinaps yaparlar.(Şekil 2.7) Gangliyon hücreleri ise çıkış sinyallerini retinadan optik sinir aracılığıyla beyne iletirler (67).

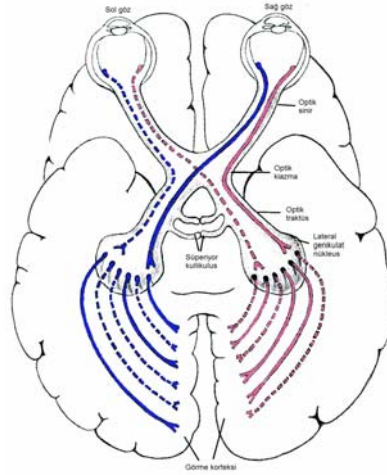
Retinanın her bölgesinde, aynı fotoreseptörlerden sinyalleri paralel yollarla ileten, fonksiyonel olarak farklı ganglion hücresi iki fonksiyonel sınıfa ayrılır: M (magno, büyük) ve P (parvo, küçük). Her iki sınıfta da merkez ve merkez-dışı hücreler vardır. M hücrelerinin büyük alıcı alanları vardır ve devamlı aydınlanmaya geçici olarak tepki verirler. Optimum olarak büyük nesnelere tepki verirler ve uyarıcılardaki ani değişiklikleri fark edebilirler. Daha küçük olan P hücreleri ise görüntüdeki detaylardan sorumlu olarak kabul edilir (69).



Şekil 2.7. Retinanın nöronal yapısı (74)

Gangliyon hücrelerinin aksonları beyne giden optik siniri oluştururlar. İki optik sinirin buluştuğu yere optik kiazma denir. Retinanın nazal yarımından gelen lifler optik kiazmada çaprazlaşarak, temporal yarımdan gelenler ise çapraz yapmadan dorsal genikülat nükleus (dLGN)'a girerler ve sinaps yaparlar (Şekil 2.8). Dorsal genikülat nükleus; optik traktusun görsel bilgisini, optik radyasyon (genikülokalkarin traktus) yolu ile görme korteksine iletme ve görsel bilgi sinyallerinin ne kadarının kortekse geçeceğini kontrol etmede işlev görür. Sinyalleri primer görme korteksinden lateral genikülata uzanan kortikofugal liflerden ve mezensefalunun retiküler alanlarından gelen liflerden alır.

Dorsal genikülat nükleus altı nükleer tabakadan oluşmuştur. 2, 3 ve 5. tabakalar sinyalleri retinanın temporal bölgesinden alırken 1,4 ve 6. tabakalar sinyalleri karşı gözün nazal retinasından alırlar (67). Dorsal genikülat nükleusda P hücrelerinden sinyalleri alan parvoselüler (3, 4, 5 ve 6. tabakalar), M hücrelerinden sinyalleri alan magnoselüler tabaka (1. ve 2. tabakalar) olmak üzere iki alt tabaka bulunmaktadır. Bu tabakada bulunan nöronlar morfolojik ve fizyolojik olarak farklılık gösterirler (67) (75) (76).



Şekil 2.8. Temel görsel yolaklar (77).

Parvoselüler ve magnoselüler tabakada bulunan nöronlar görsel korteksin farklı tabakalarına parvoselüler ve magnoselüler sistem olarak isimlendirilen ayrı kortikal yollarla ulaşırlar (69). Diğer yandan, hem parvoselüler hem de magnoselüler yoldan primer görme korteksine (17. alan) giriş yapan üçüncü bir sistem de bulunmuştur. Diğer iki yoldan tamamen farklı olan bu sistem renkli görmeden sorumlu olup, mitokondriyal bir enzim olan sitokrom oksidazı bol miktarda içeren ve renk damlaları (blob) adı verilen bölgelerde (17. bölge) sonlanır. Magno sistem hareket ve derinlik algılanmasından, parvosistem şekillerin ayırt edilmesinden ve hızlı yersel değişikliklerin algılanmasından, blob sistem ise renkli görmeden sorumludur (78). Dorsal genikülat nükleustan çıkan görsel bilgi sinyalleri primer görme korteksine ulaşır. Görme korteksi primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Sekonder görme korteksine görsel asosiyasyon alanları da denir. Görsel uyarıların analizi için primer görme korteksinden gelen sinyallerin iletiildiği alanlardır.

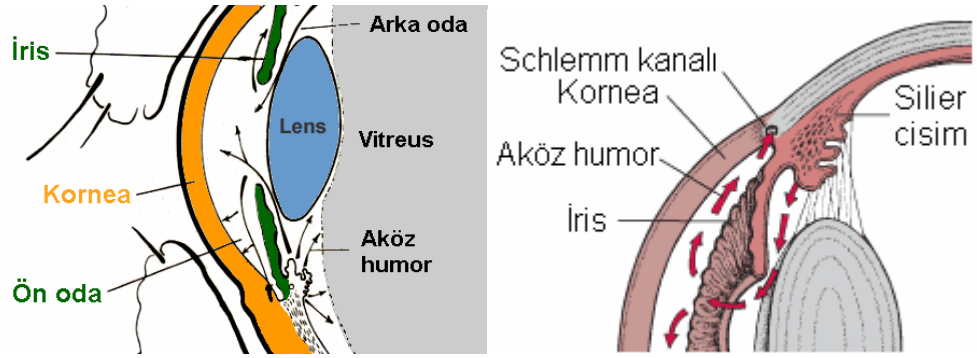
2.1.2. Sıçan Görme Sistemi

Sıçanlarda, dLGN, parvoselüler ve magnoselüler diye ayrılmamıştır ve ayrı görsel alt sistemler tanımlanmamıştır. Sıçanlar, insanlara göre, retinada, dLGN’de ve görme korteksinde çok az özelleşme gösterirler. Sıçanlar renkli görmeden (79) ve tahminen blob sisteme karşılık gelen bir sistemden yoksundurlar. Sıçanların temporal (zamansal) frekansları ayırt etme yetenekleri vardır. Magno sisteme karşılık gelen bir sistem varken, parvo sistemine karşılık bir sistemlerinin olduğu şüphelidir. Çünkü uzaysal rezolüsyonları insanlarınkinden daha küçüktür (78). Türler arası topografik özelleşme ve algı yeteneklerindeki farklılıklara rağmen, iki tür arasında nitelik olarak parvoselüler ve magnoselüler sistemlerinde benzerlik bulunmaktadır. Primatlara benzer olmakla birlikte, sıçanların görsel yolakları retinal ganglion hücrelerinin morfolojisi, optik traktustaki sinir liflerinin hızı, retinal ganglion hücrelerinin dLGN tabakalarındaki dağılımı, talamokortikal projeksiyonların kortikal dağılımı ve ileti hızları, dLGN’deki nöronların reseptif alan özellikleri ve görsel korteks bakımından fonksiyonel ve yapısal olarak farklılıklar gösterirler. Primer görme korteksinden input alan ekstrasitriyal görsel bölgeler diğer memelilerde olduğu gibi sıçanlarda da şekilli görmeyi sağlar (78).

2.2. Glokom

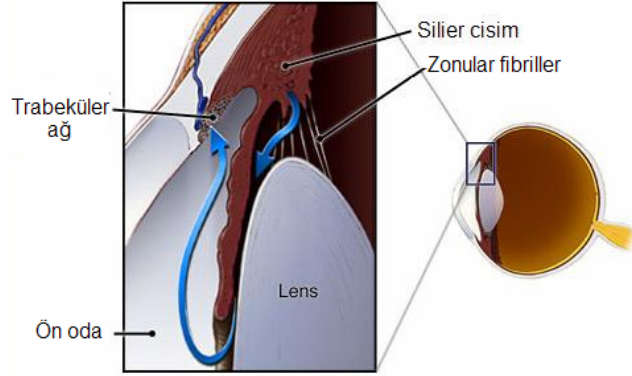
2.2.1. Aköz Humorun Akışı ve Trabeküler Ağ

Önde kornea arkada iris ve lensin arasında bulunan boşluk ön oda olarak isimlendirilir. Lens, iris ve kornea silier cisim tarafından üretilen, ön odayı dolduran aköz humor isimli sıvı ile beslenir. Ön odada 0,25 mL hacminde, arka odada 0,06 mL hacminde bulunur. Aköz humor IOP'nin sürdürülmesini sağlar, kornea ve lensden metabolitlerin uzaklaştırılmasında ve gerekli substratların sağlanmasında, optik geçirgenliği sağlanmasında önemli role sahiptir. Aköz humor %99,9 su ve %0,01 solidlerden oluşmuştur. Bu solidler; proteinler: kan aköz bariyerinden dolayı aköz humor protein içeriği plazmadan çok daha düşüktür. İnflamasyon durumunda, kan aköz bariyeri bozulduğunda aköz humor protein konsantrasyonu artar. Aköz humor amino asit bileşenleri: 5 mg/kg sudur. Non-kolloid bileşenler: milimol/kg su olarak glukoz (6), üre (7), askorbat (0,9), laktik asit (7,4), inozitol (0,1), Na⁺ (144), K⁺(4,5), Cl⁻(10) ve HCO₃⁻(34). Oksijen: aköz humorda çözülmüş halde bulunur. Ön oda aköz humor bileşimi ile arka oda aköz humor bileşimi birbirinden farklıdır. Arka odada HCO₃⁻ ön odadakinden yüksektir. Arka oda Cl⁻ konsantrasyonu ön odadakinden düşüktür. Arka oda askorbat konsantrasyonu ön odadaki konsantrasyonundan çok az miktarda yüksektir (72). Ön oda Schlemm kanalı, trabeküler ağ (uveal ağ- korneaskleral ağ-jukstakanaliküler ağ), silier cismin ön sınırı ve iris kökünden oluşur. Aköz humor lensin ön yüzü ile irisin arka yüzü arasındaki dar aralıktan ön odaya akar ve %80 trabeküler ağ yolu ile, %20 uveoskleral yol ile dışarı akar. Buradan ya direk olarak aköz venden episkleral vene yada indirek olarak episkleral venden toplayıcı kanallar yolu ile Schlemm's kanalına akar (80). (Şekil 2.9)



Şekil 2.9. Ön segment anatomisi ve aköz humorun akış şeması (81).

Arka oda, irisin arkasında yer alan aköz humor ile dolu bölmedir. Önde irisin arka yüzü ve silier cismin bir kısmı arkada ise lens ve vitreus ön yüzüne kadar uzanır (72). Kornea, sklera ve konjonktivanın birleşme yeri olan limbus ön odanın drenaj sistemi olan trabeküler ağ ve Schlemm kanalını içerir (82). Trabeküler ağ ön oda ile schlemm kanal lümeni arasında bulunur. (Şekil 2.10)



Şekil 2.10. Trabeküler ağın konumu (83)

Trabeküler ağ aköz humorun schlemm kanalına erişmek için aktarıldığı biyolojik bir filtre olarak tanımlanmaktadır (84). Trabeküler ağ hücreleri bütün akış sistemi homeostazisinin sürdürülmesinde büyük öneme sahiptir (85). Trabeküler ağ aköz humorun dışı akışını ve IOP'yi kontrol eden özelleşmiş bir göz dokusudur. Bu bölgede meydana gelen değişiklikler akış sisteminde oluşan direnç ile sonuçlanır (86). Trabeküler ağ glokomun patogenezi kilit rol oynayan bölgedir. Birçok araştırmacının glokomun iskemik hasar sonucu oluştuğunu düşünmesine rağmen trabeküler ağda oksidatif serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarının glokom patogenezi öneme sahip olduğu düşünülmektedir (46). Göz içi basıncının oksidatif serbest radikallerin oluşumuna neden olarak patojenik bir role sahip olduğu tanımlanmıştır (87) (72).

Glokomda IOP artışının mekanizması açık açılı glokomda ön odada drenaj sisteminde meydana gelen bozukluklar ya da kapalı açılı glokomda ise aköz humorun drenaj sistemine erişiminde meydana gelen bozukluklar sonucu aköz humorun akışının bozulmasıdır (8). Silier cisimde üretilen aköz humor arka odaya girer, pupilden geçerek ön odaya ulaşır ve ardından ön oda açısındaki trabeküler ağa gelir. Kollajen demetleri ve trabeküler hücreleri ile çevrili elastik dokudan meydana gelen trabeküler ağ, aköz sıvısını Schlemm kanalına akıtır (8). Endotelial hücre benzeri olan trabeküler hücreler fagositoz yapabilmeye ve matris-olçaltıcı enzimleri, hücre dışı matris elementlerini ve transforme edici büyüme faktörünü (TGF)- β üretebilme kabiliyetine sahiptir (88) (89).

2.2.2. Glokomun Patogenezi ve Tipleri

Glokom tüm dünyada 70 milyon insanı etkileyen , kalıcı görme kaybına en sık neden olan göz hastalığıdır (90). Glokom RGC ölümüyle seyreden, optik sinir nöropatisidir (91). Normalde göz içi yapıların beslenmesinde görevli olan aköz humor, sürekli olarak kanallar yolu ile göz dışına atılır. Aköz humoru dışarı boşaltan Schlemm kanalından çıkan drenaj kanallarında yapısal olarak tıkanıklık oluşması glokoma neden olabilir (92). Aköz humorun kornea ve skleraya yaptığı basınca IOP adı verilir (93). Göz içi basıncı normal değerleri 10 ile 20 mm Hg (ortalama $16 \pm 2,5$ mm Hg) düzeyindedir. Aköz humorun oluşumu ve atılımı arasındaki dinamik denge ile IOP normal düzeyde tutulur. Göz içi basıncı silier cisim epitelyumundan aköz humor üretimi ve gözden aköz humorun dışı akım direncinin oranı ile belirlenir (94).

Aköz humorun yeterli boşalamamasına bağlı olarak göz içinde basınç yükselir. Yüksek IOP ve kan akımı disregülasyonu glokoma neden olan başlıca risk faktörleridir (95). Aköz oluşumu silier kapillerin geçirgenliği ve kanın osmotik basıncına bağlıdır. Ayrıca artmış episkleral ven basıncı IOP'de artışa neden olabilir. Yükselen IOP gangliyon hücrelerinin beslenmesini engelleyerek hasara neden olur. Böylece kademeli gangliyon hücre ölümü nedeni ile görme kaybı ortaya çıkar. Hücrelerin tümü öldüğü zaman kalıcı görme kaybı meydana gelir (96). Retinal gangliyon hücre ölümü, bazı patolojik olaylar sonucu büyüme faktörlerinin (nörotrofinler) beyinden RGC'lere taşınmasının bloke olması ile ilişkilidir. Nörotrofinlerin blokajı, hasar kaskatını başlatır ve hücreler normal fonksiyonunu sürdüremezler (97). Retinal gangliyon hücreler normal fonksiyonlarını sürdüremez ve apoptozise uğrarlar. Ayrıca farklı hücrelerinde apoptozise uğramasını tetiklerler. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Hücreler geri dönüşümsüz şekilde hasara uğrayak ölümler ve ardından inflamatuvar bir yanıt oluşturmadan komşu hücrelerce yutulurlar. Retinal gangliyon hücre ölümü retinal sinir liflerinin kaybı ile de ilişkilidir. Optik sinir liflerinin kaybı fonksiyonel bölgelerin normal fizyolojik çakışmalarını uzatır. Karakteristik olarak optik diskte değişimleri ve görme alanı defektleri meydana gelir.

Uzunca bir süre, glokomda görülen optik sinir zedelenmesinin yalnızca IOP artışından kaynaklandığı düşünülüyordu. Yüksek IOP'nin glokom gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmekle beraber diğer faktörlerin de glokom gelişiminde önemli olduğu artık bilinmektedir (98). Zira, normal IOP olan kişilerde de glokom gelişimi görülebilmektedir (99). Artmış IOP mekanik teori ile açıklanmaktadır. Artmış IOP lamina kribrosa üzerinde mekanik gerilim yaratarak aksonal deformasyona, kapiler kan akımını değiştirerek iskemiye neden olur. Nötrotropinler ise retinal ganliyon hücre gövdelerinin yaşamını sürdürmesi için yetersiz miktardadırlar. Basınçtan bağımsız faktörler ise vasküler yetmezlik teorisi ile açıklanmakta ve IOP artışını gözlenmediği normal tansiyon glokom hastalarında ONH'nin vasküler perfüzyonunu etkileyen faktörler GON'a karışmaktadır. Bu faktörler; kan akım mekanizması otheregülasyonundaki bozukluklar, vazospazm, sistemik hipertansiyon ve akut kan kaybı, abnormal pıhtılaşma profili gibi diğer faktörlerdir (100) (101) (2). Eksitotoksiste teorisine göre ise nöronal dejenerasyonun glutamat, serbest oksijen radikalleri ve ölüme maruz kalan RGC'lerden salınan nitrik oksit gibi toksik faktörler tarafından sürdürüldüğüne inanılmaktadır (102).

Tüm glokomların %90'ı 40 yaşın üzerinde kişilerde görülmektedir (103). Kırk yaşın üzerinde yaklaşık olarak her 40 kişiden 1'inde görülür ve hastalığın ortaya çıktığı 20 kişiden 1'inde her iki gözde kalıcı görme kaybına, yani total körlüğe neden olur (104). Şeker hastalığı, yüksek miyopi, uzun süreli kortizon kullanımı, göz yaralanmaları, yüksek kan basıncı, kanın osmotik basıncında artış, şiddetli kansızlık ve şok geçirilmesi glokom riskini arttıran faktörlerdir (105).

Glokomda reaktif oksijen metabolitlerinin arttığı gösterilmiştir (3). Hücre metabolizması sırasında oluşan ROS sitoplazmik makromolekülleri oksidasyona uğratabilme özelliğine sahiptir. Glokomda gelişen posttranslasyonel oksidatif modifikasyonlar (34) (21) hem ROS oluşum miktarlarına hem de intraselüler ve ekstraselüler antioksidan seviyelerine bağlıdır. Glutatyon, askorbat gibi düşük

moleküler ağırlığa sahip antioksidanlar ile sistein ve tirozin gibi serbest radikalleri tutma özelliğine sahip moleküller aköz humorde tespit edilmiştir (60). Askorbat aköz humor içerisinde yüksek konsantrasyonda mevcuttur (1-2 mmol/l) (61). Bu antioksidan moleküllere ilaveten, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin varlığı da aköz humorde rapor edilmiştir. Süperoksit dismutaz enziminin üç formu da aköz humorde mevcuttur (62). Aköz humorde GPx'in varlığı gösterilmiştir (63). Glutasyon peroksidaz mRNA ekspresyonunun asıl gerçekleştiği yerin oküler silier epitelyum olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak aköz humorde GPx bu hücrelerden köken almaktadır (64).

Glokom başlıca açık açılı ve kapalı açılı glokom olmak üzere iki tipte görülebilir.

AÇIK açılı glokom: Glokomların %85-90'ı bu tiptedir. Gözün ön ve arka odasını dolduran berrak bir sıvı olan aköz humor silier cisimde üretilir ve pupilden geçerek trabeküler ağa akar. Açık açılı glokomda ön odada drenaj sisteminde bozukluklar meydana gelir. Aköz humorun bozulan akışı IOP artışına neden olur. Açık açılı glokomlu hastalarda hastalık belirgin bir belirti vermeden ilerler. Ancak hastalığın son dönemine yaklaşıldıkça görme bozulur ve azalır. Fakat bu durumda, göz siniri büyük oranda tahrip olmuş ve görme alanı çok daralmıştır (8).

KAPALI açılı glokom: Glokomlu hastaların %5-10 kadarını oluşturur. Aköz humorun drenaj sistemine erişiminde bozukluklar meydana gelir. İris ile korneanın birbiri ile temas edip aköz humorun gözü terk etmek için göz kanallarına ulaşamadığı durumdur. Açı kapanması glokomu veya akut glokom krizi olarak isimlendirilen bu glokom türünde, birden gözde şiddetli ağrı, kızarıklık, görmenin bulanıklaşması ve azalması belirtileri ortaya çıkar. Göz içi basıncı 40-50 mm Hg veya daha yüksek düzeylere çıkabilir. Bu yüksek basınç görme kaybı oluşturur. Aköz humorun akış kanallarında anatomik bir blok vardır. Örneğin periferik iris dokusu atılım kanallarını tıkayabilir. Bu glokom, türü kronik veya akut tipte olabilir.

En çok görülen bu iki glokom tipinden başka bir de sekonder glokom adı verilen bir glokom türü mevcuttur. Sekonder glokomda, gözde IOP'nin yükselmesine neden olan bir hastalık vardır. Bu, değişik nedenlerle oluşan göz içi kanamaları, göz içi iltahapları, şeker hastalığı, göze gelen darbeler (travma), ileri dönemdeki katarakt gibi çok değişik sebeplerle olabilir.

2.3. Görsel Uyarılma Potansiyelleri

Görsel uyarılma potansiyelleri (visual evoked potentials, VEP), görsel bir uyarana karşı, korteksin oksipital bölgesinde oluşan uyarılmış potansiyellerdir (106) (107). Gelişen bilgisayar teknolojilerine paralel olarak, VEP'ler görsel sistem fizyolojisinin anlaşılması ve görsel yollardaki patolojilerin teşhisi için sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik, görme keskinliği ve nöroanatomik değerlendirilmesi yanında, makular dejenerasyon, renk körlüğü gibi oftalmolojik hastalıkların ve optiknörit, iskemik optik nöropati, demiyelinize hastalıkların araştırılmasında kullanılmaktadır. Dolayısıyla, görme yolağındaki iletimi ve fonksiyonları yansıtmaları nedeniyle, VEP'ler görsel sistemin değerlendirilmesi için kullanılan objektif bir yöntemdir.

Retinada ışık uyarımı ile provake olan potansiyel, optik sinir, kiyazma ve optik traktus yolu ile korpus genikülatum lateraleye gelir. Buradan kaynaklanan genikülokalkınarius lifleri, optik radyasyon içinde primer görme korteksinde sonlanır (Area 17). Buradan da sekonder (Area 18) ve tersiyer (Area 19) görme korteksine bağlantı sağlanır. Görsel uyarılma potansiyellerinin ölçülmesinin amacı retinokortikal iletimi ve görme korteksindeki aktiviteyi de kapsayan yüksek afferent görme merkezlerinin durumunu bildirir verileri elde etmektir (106).

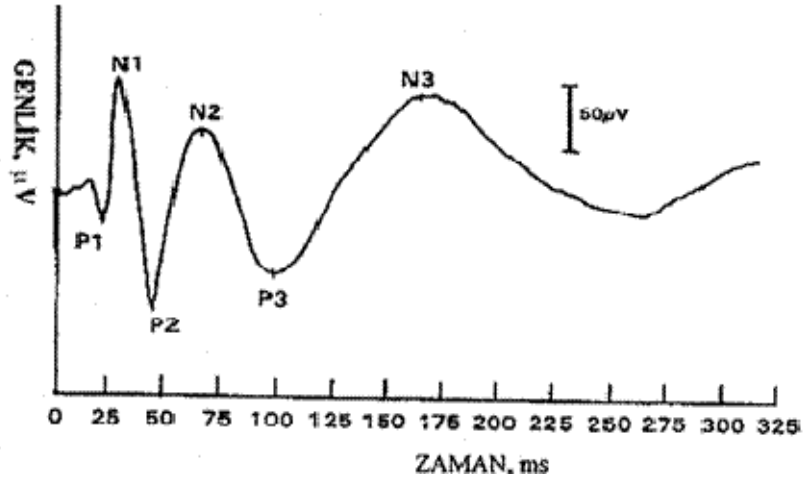
Görsel sistemin elektrofizyolojik bir ölçümü olan VEP'lerde ortaya çıkan dalga formları, polarite ve ortaya çıkış zamanlarına göre adlandırılmaktadır. Görsel uyarımı takiben ortaya çıkan dalgalar polaritelerine göre, negatif (N) ve pozitif (P) olarak gösterilmektedir. Ortaya çıkış zamanlarına göre ise üç gruba ayrılarak incelenmiştir (54). Görsel uyarımı takiben ilk 10 ms'lik zaman içinde oluşan dalgalara kısa latensli (erken), 10 ile 50 ms' lik süre içinde oluşanlara orta latensli ve 50 ile 300 ms'lik süre içinde oluşanlara ise uzun latensli VEP'ler denir (Şekil 2.11) (54). Diğer uyarılma potansiyellerinde olduğu gibi, VEP'lerin değerlendirilmesi için kullanılan en önemli parametreler içersinde dalgaların tepeden tepeye genlik değerleri ve latensleri yer alır. Latens, bir uyarı verildikten sonra oluşan dalga formunun, maksimum genliğe ulaştığı süredir.

Görsel uyarılma potansiyeli kayıtlarında, ilk ortaya çıkan dalga formunun pozitif olması nedeniyle ilk bileşen P1 olarak, diğerleri ise ortaya çıkış sürelerine göre N1, P2, N2, P3, N3 olarak isimlendirilir. Görsel uyarılma potansiyellerinin P1 bileşeninin nereden kaynaklandığı henüz tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte, 17 ve 18a'da bulunan görsel alanların üst nasal kısımlarında olabileceği kanısı yaygındır (108). Yapılan çalışmalarda, N1 ve P2 bileşenlerinin genikulokortikal afferent girişlerin oluşturduğu kortikal cevaplar olduğu, lamina IV'teki stellate hücrelerinin hiperpolarizasyonu sonucu P2'nin, depolarizasyonu sonucu ise N2'nin oluştuğu ileri sürülmüştür (109) (110). Diğer yandan, P3'ün üst laminadaki piramidal hücrelerin eksitator postsinaptik cevaplarını yansıttığı belirlenmiştir (109). N3 jeneratörlerinin yüzeyel tabakalar boyunca dik olarak yayıldığı ve bu bileşenin, gövdeleri derin tabakalarda bulunan nöronların apikal dendritleri boyunca oluşan depolarizasyonunu yansıttığı ifade edilmiştir (111).

2.3.1. Görsel Uyarılma Potansiyeli Kayıtları

Görsel uyarılma potansiyeli çalışmalarında, VEP sinyallerini amplifiye etmek için diferansiyel amplifikatör, sinyallerin ortalamasını almak için toplama cihazı ve sinyalleri görüntülemek ve kaydetmek için bilgisayar gereklidir. Görsel uyarılma potansiyeli kayıtlarında dikkat edilmesi gereken hususlardan biri elektrotların seçimi ve kullanılmasıdır. Genellikle gümüş klorür (Ag-AgCl) elektrotların VEP kayıtları için kullanılan elektrotlardır (107).

Görsel uyarılma potansiyeli kayıtlarında kullanılan iki tip elektrot düzeneği vardır. Bunlara referansın konumuna bağlı olarak monopolar veya bipolar kayıt denir. Monopolar kayıtda, elektrotlardan biri kortikal bölgeye, referans ise kulak veya mastoid gibi kortikal olmayan bir bölgeye yerleştirilir. Bipolarda ise elektrotların ikisi de kortikal bölgeye yerleştirilir ve sonuçta oluşan dalga bu iki kortikal kaynak arasındaki farkı gösterir.



Şekil 2.11. Görsel Uyarılma Potansiyelleri ve Bileşenleri (112)

Görsel uyarılma potansiyelleri, görsel uyarı içeriğine göre pattern (şekilli uyarı) veya flaş (yanıp sönen ışık), uyarı hızına göre geçici (transient) veya kararlı hal (steady-state) diye sınıflandırılabilir. Flaş ışığının yüksek şiddetle ve kısa aralıklarla tekrarlanması ile kaydedilen potansiyellere Flaş Uyarılma Potansiyelleri (FVEP) denir.

Uyarının verilme sıklığına bağlı olarak VEP'in yapısı değişir. Seyrek verilen (1 Hz) uyarana doğan cevaptan sonra ikinci uyarana kadar oksipital korteksin toparlanması mümkündür; yani uyarılmış sistem uyarılar arasında istirahat konumuna dönecek zamanı bulur. Bu nedenle VEP'te bütün pozitif ve negatif osilasyonları görmek mümkündür (transient VEP; geçici hal uyarısı). Tanım olarak geçici yanıt, gözlenen zaman içinde ortaya çıkan ve tamamen kaybolan yanıt anlamına gelmektedir. Tekrarlayan uyarıların verilmesi ve daha sonra elde edilen yanıtların ortalamalarının alınması ile elde edilen geçici uyarılma potansiyeli kaydında, bir uyarının oluşturduğu değişimlerin, bir sonraki uyarı gelmeden önce tamamen söndüğü ve böylece tekrarlayan uyarılar serisi içinde bir uyarıya karşı elde edilen uyarılma potansiyelinin kendisinden önceki uyarının neden olduğu değişimden etkilenmediği varsayılmaktadır. Buna karşılık, sık verilen (4Hz ve üzeri) uyarana doğan cevaptan sonra korteksin toparlanabilmesi için zaman yoktur. Yani yeni bir yanıt başlamadan bir önceki işaret yok olmaz. Uyarın sıklığına göre VEP harmonik dalga karakteri kazanır (steady state-VEP; kararlı hal uyarısı). Steady state uyarılmış potansiyeller, yeterince sık uygulanan, yani uyarılar arası beyin mekanizmalarının başlangıçtaki durumuna dönmeye olanak tanımayacak kadar kısa olan, uyarılara karşı, frekans bileşenlerinin uzun bir zaman diliminde değişmeden kaldığı ardışık uyarılma potansiyel yanıtları olarak tanımlanmaktadır (113) (114).

2.3.2. Görsel Uyarılma Potansiyellerini Etkileyen Faktörler

Flaş uyarımında, saniyede gönderilen uyarı sayısı, elde edilen aydınlık oranı, dalga boyu, ortamın fotopik veya skotopik oluşu VEP kayıtlarını etkileyen parametrelerdir. Flaş uyarımında normal VEP cevabını etkileyen faktörler farklılık gösterir. Flaş uyarımında retinanın ışığa duyarlılığı, optik sinirden oksipital kortekse

kadar olan ileti hızı, kortikal görme merkezi ve üst merkezlerle bağlantılar VEP cevaplarını etkiler (115) (116).

Klinik testlerde daha çok pattern uyaran kullanılır. Çünkü bu potansiyeller görsel yol lezyonlarını göstermede daha duyarlı olup, denekler arasında çok fazla değişkenlik göstermezler. Ayrıca, insanın görme fonksiyonlarından biri şekilleri ve kenarlarını analiz etmek olduğundan, şekil değişmeli VEP (PR-VEP)'lerin bazı özellikleri değiştirilerek, bunlar hakkında daha fazla bilgi elde edilebilmektedir. Şekil değişmeli VEP'ler insanda temel olarak fovea ve konilerin aktivitesini göstermektedir (67). Diğer yandan, PR-VEP'lerde 100 ms latenste oluşan P100 bileşeninin optik nöropatilerde, retrobulbar nöropatilerde ve multipl sklerozda (107) (117) daha klinik semptomlar ortaya çıkmadan uzaması, bu hastalıkların erken teşhisi yönünden önemli bir parametre olarak kabul edilmesine yol açmıştır.

Görsel uyarılma potansiyellerini etkileyen en önemli faktörlerden biri de serbest radikaller ve oluşturduğu lipid peroksidasyonudur. Daha önce yapılan çalışmalarda (118) (119). (120) (121) lipid peroksidasyonundaki artışa paralel olarak VEP latenslerinin uzadığı tespit edilmiştir.

2.4. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

2.4.1. Serbest Radikal Tanımı

Moleküllerin dış yörüngelerinde biri diğerine zıt yönde hareket eden elektron çiftleri bulunmaktadır. Bu elektron çiftleri, molekülün kararlı kalmasını sağlar. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir (122) (123) (124). Serbest radikaller rastlantısal bir şekilde metabolizmanın yan ürünleri olarak veya belli bir amaca yönelik olarak (ör: fagositoz) hücre içerisinde sürekli üretilirler.

2.4.2. Serbest Radikal Oluşumu

Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur.

1. Normal bir molekülün kovalent bağının homolitik ayrılmasıyla: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de eşleşmemiş elektron kalır.

2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesiyle: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybetmesinin ardından dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur.

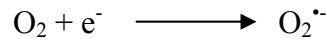
3. Normal bir moleküle elektron eklenmesiyle: Radikal özelliği taşımayan moleküle bir elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgeme radikal oluşumuna neden olur (125).

Bir radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, başka bir serbest radikal oluşur. Bu özellik serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlara girebilmelerine olanak sağlar (125).

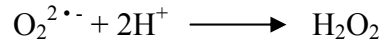
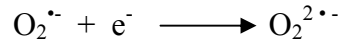
2.4.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Kaynakları

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, aerobik koşullar altında süren yaşam ile ve hem fizyolojik hem de patofizyolojik koşullar altında üretilen reaktif araçlar ile ilgilidir (126). Reaktif oksijen türleri DNA, karbohidratlar ya da proteinler gibi biyolojik makro moleküllere hasar verebilme yeteneğine sahiptir. Bu oksijen metabolitleri ya hidroksil radikali (OH \cdot), peroksil radikali (ROO \cdot) gibi radikal ya da singlet oksijen, ONOO \cdot ya da H₂O₂ gibi reaktif radikal olmayan bileşiklerdir (127). Gözde ROS kaynakları daha sonra ayrıntılı olarak açıklanacak olan güneş ışığı, mitokondriyal solunum ve hücrel metabolik reaksiyonlardır.

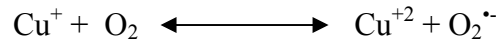
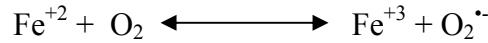
Süperoksit hücre içerisinde moleküler oksijenin redüksiyonu ile oluşan başlıca serbest radikaldir (126).



Süperoksit anyonu elektron fazlasını bir başka elektron alıcısına vererek tekrar moleküler oksijene (O₂) oksitlenebilir. Ya da bir elektron daha alarak peroksil anyonunu (O₂²⁻) oluşturur, bu da ortamdan iki proton alarak (H⁺) H₂O₂ oluşumuna neden olur (128).



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu O₂^{·-} meydana getirebilir.



Geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü reaksiyonlardır. Süperoksit radikal anyonunun ondan meydana gelen diğer reaktif ara ürünlerin oluşumunda merkezi rol oynadığı görünür. Mitokondrideki respiratuar zincir öncelikle O₂^{·-} ve O₂^{·-} dismutasyonunun bir ürünü olarak H₂O₂ ROS'un güçlü bir kaynağıdır (129). Bu durum mitokondriyal elektron taşıma zincirinin spesifik bir bölgesinde oksijenin O₂^{·-}'e uygunsuz redüksiyonu ile sonuçlanan olası eşleşmemiş elektron sızıntısından kaynaklanır (130). Bir diğer önemli ROS kaynağı inflamatuvar (özellikle kronik inflamasyon) reaksiyonlardır. Aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücreler çeşitli ROS'ları (H₂O₂, NO, O₂^{·-}) ve hipokloriti (HOCl) serbest bırakırlar (131). Nötrofiller membrana bağlı çok bileşenli NADPH oksidaz olarak adlandırılan bir enzim kompleksine sahiptirler. NADPH oksidaz aktive edildiğinde büyük miktarda ROS üretir (132). Bu sistem nötrofil "respiratuar patlama"dan (fagositozda artmış solunum) sorumludur.

Süperoksit anyonu, hücre membranlarından kolay geçemediği için kendisi doğrudan zarar vermemektedir (133). Süperoksitin asıl önemi, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve H₂O₂ kaynağı olmasıdır. Hidrojen peroksit üretimi SOD tarafından katalizlenen O₂^{·-} dismutasyonu ile olmaktadır.

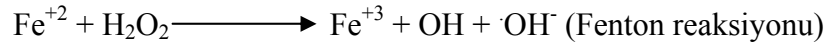
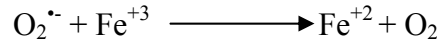


Hidrojen peroksit düşük elektriksel yükü ve noniyonize özelliklerinden dolayı hücre membranlarından hızlı bir şekilde geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikaller oluşur (133) (134).

Dış çevre de ısı, UV ışık, terapötik ilaçlar ve χ - ve γ - radyasyon gibi birçok kaynaktan ROS üretebilir (135). Demir katalizli Haber-weiss reaksiyonu, $O_2^{\cdot-}$, askorbat, tiyoller ve diğer redükthanlar Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye, H_2O_2 'yi etkili bir oksidan olan ve lipit oksidasyonuna neden olan OH^{\cdot} 'a indirgerler (126).

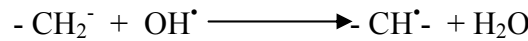
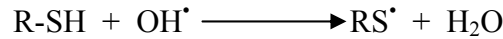


Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat geçiş metalleri, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde demir benzeri geçiş metalleri, demir içeren maddeler (transferrin, laktoferrin, hemoglobin) mevcuttur. Süperoksit radikali ferrik (Fe^{+3}) demiri, ferröz (Fe^{+2}) demire indirger. Bu sırada H_2O_2 , OH^{\cdot} 'a dönüşür (136).



Mitokondriler membran lipitleri, proteinler ve mitokondrial DNA'nın oksidatif hasarını ilerleten düşük moleküler ağırlıklı Fe^{2+} komplekslerinin birikimi için ana bölümdür.

Hidroksil radikali en reaktif oksijen türevidir. Bu radikal yüksek reaktivitesinden dolayı oluştuğu yerde çevredeki hedef moleküller ile derhal reaksiyona girer. Hidroksil radikali oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS \cdot), karbon merkezli organik radikaller (R \cdot), organik peroksitler (RCOO \cdot) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



Peroksil radikalleri, poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) hidrojen atomunun çıkarılması ile başlatılan lipit peroksidasyonu sırasında meydana getirilebilir (137). Peroksil radikalleri biyolojik sistemlerde önemli difüzyon kabiliyetine sahip ve oldukça uzun ömürlü türevlerdir. Ayrıca lipit peroksidasyonunda oluşan ürünler aldehitlerdir (138). Lipit peroksidasyonu $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 tarafından başlatılmadığında OH^{\cdot} , alkoksi radikalleri (RO \cdot) ve ROO \cdot lipit peroksidasyonunun başlamasına yol açar (139). Lipit peroksil radikalleri diğer lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girer böylece elektronların transferinin artmasına ve substratların oksidasyonuna sebep olur. Hücre membranları yapısal olarak oksidatif saldırıya

oldukça hassas olan çok miktarda PUFA'dan oluşmuştur ve PUFA'da meydana gelen önemli değişiklikler; değişmiş membran akışkanlığı, geçirgenliği ve hücrel metabolik disfonksiyon ile sonuçlanır (140).

2.4.4. Reaktif Nitrojen Türleri ve Kaynakları

Nitrik oksit aslında yararlı bir metabolit olduğuna inanılan bir serbest radikaldir. Gerçekten de lipit peroksidazlar ile reaksiyona girebilir ve antioksidan olarak fonksiyon görebilir (141). Çünkü nitrik oksit biyolojik membranlara kolayca penetre olabilen serbest bir gazdır (142). Nitrik oksit sentaz prekürsör aminoasit sustratı olan L-arjinini, terminal guanidino nitrojeninin oksidasyonunu enzimatik olarak katalizleyerek L-sitrüline çevirir ve NO'yu meydana getirir (143).

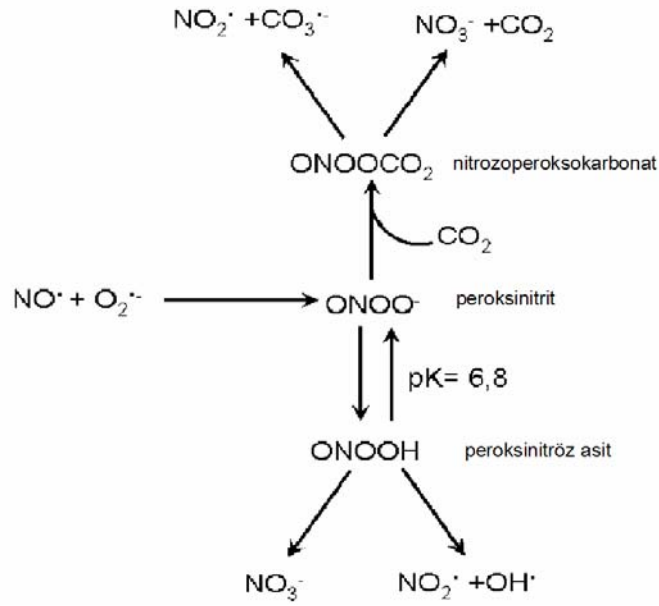
Nitrik oksitin kontrolsüz üretimi sonucu proteinlerin nitrolizasyonu, DNA kırılmaları ve diğer moleküler etkileşimler ile beyin dokusunda hasar meydana gelebilir (144).

Nitrik oksit sentaz izoformları genellikle iki kategoride incelenir (i) Ca^{2+} /kalmodülün bağımlı constitutive NOS (NOS1 ve NOS3) ve (ii) ekspresyonu sitokinler ve diğer inflamatuvar uyarılar ile artan indüklenebilir NOS (NOS-2 veya iNOS). Nöronal (nNOS, NOS-I), indüklenebilir (iNOS, NOS-II) ve endotelial (eNOS, NOS-III) olmak üzere üç NOS izoformu bulunmaktadır. Üçü de NADPH ve O_2 'e ko-substrat olarak ihtiyaç duyar. Nitrik Oksit Sentaz- 1 ve NOS-3 izoformları sırası ile insan retina ve retinal vasküler endotelial hücrelerden klonlanmıştır (145),(146). Nitrik Oksit Sentaz-1 farklı türlerde amakrin hücrelerde, iç nükleer tabaka ve retina fotoreseptörlerinde immünohistokimya ile tanımlanmıştır (147). Nitrik Oksit Sentaz-2 izoformu artmış IOP ve üveit koşulları altında kornea, iris, silier cisim, nöronal retina, retinal glial hücreler ve ONH'de gösterilmiştir (19) (148) (21).

2.4.5. Nitrik oksit ve oksijen radikalleri arasındaki etkileşim

Süperoksit radikalının NO'ya karşı afinitesi yüksektir. Nitrik oksit ve O_2^- arasındaki reaksiyon $ONOO^-$ olarak adlandırılan yeni bir molekülü meydana getirir (149). Peroksinitrit oldukça reaktif bir moleküldür ve protein, lipit ve özellikle DNA'da yoğun hasara neden olabilir. Tiyol gruplarının oksidasyonu yoluyla direkt sitotoksik etki gösteren $ONOO^-$, çeşitli nitrojen oksit radikallerini ve OH^- oluşturarak dekompoze olabilir (149). Nitrik oksitin metalloproteinler, protein sülfidril ve oksijenden türeyen serbest radikaller ile reaksiyonu inflamasyon ve oksidatif strese aracılık etmesini sağlar (150).

Peroksinitritin konjuge asidi peroksinitröz asit ($ONOOH$) iki yolla reaksiyon verir. İlk yol güçlü oksidan ara ürünler oluşturmaksızın nitrat (NO_3^-) üretmesi. İkinci yol ise güçlü bir oksidan olan, yağ asidi oksidasyonunu ve amino asit nitrasyonunu başlatabilen OH^- ve nitrojen dioksit (NO_2) oluşması (149). Peroksinitrit reaktivitesi reaktif nitrozoperoksokarbonat ($ONOOCO_2^-$) ara ürününü oluşumu nedeni ile CO_2 'den etkilenir. Sonuç olarak, CO_2 hem $ONOO^-$ 'i azalışını uyarır hem de moleküllerin $ONOO^-$ aracılı nitrasyonunu 2 kata kadar artırır (151) (Şekil 2.12).



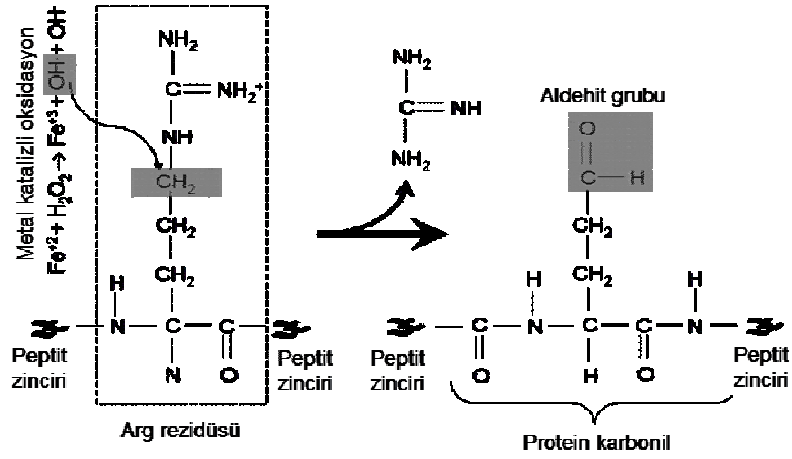
Şekil 2.12. Peroksinitrit oluşumu ve yıkılımı

Oksidazlar ve oksijenazlar oksijen radikal üretiminde kritik kaynaklardır ve metaloproteinler ve vasoaktif bir molekül olan NO'nun serbest radikal aracılı tüketimi yolu ile NO sinyalizasyonundaki bozukluklara neden olabilirler. Oksidaz ve oksijenaz aktiviteleri bu sebepten prooksidatif çevre ve kronik inflamasyona neden olan NO'nun fonksiyonel inaktivasyonundan sorumlu olabilir (152).

2.5. Glokomda Oksidatif ve Nitratif Stres Markırları

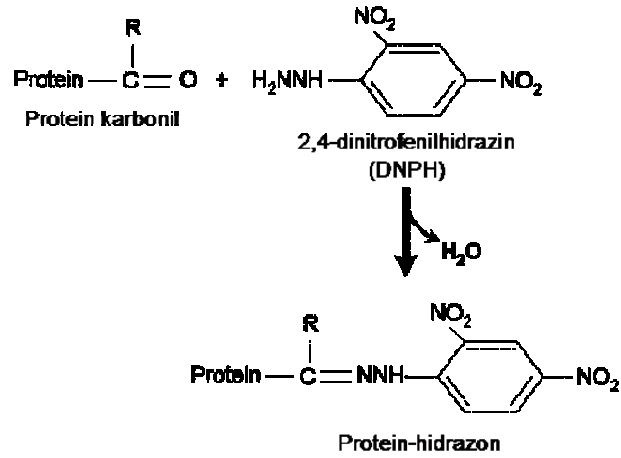
2.5.1. Protein Oksidasyonu ve Glokom

Protein karbonil oluşumu genellikle protein oksidasyonu için kullanılan bir markırdır (153). Karbonil gruplarının ölçümü; oksidatif stresin proteinler üzerinde meydana getirdiği hasarın miktarının belirlenmesinde iyi bir belirteç olarak düşünülmektedir. Şekerlerin ve membran lipitlerinin ROS aracılı oksidasyonunu takiben oluşan karboniller; biyolojik aktivitelerinin değişmesine neden olan ve genellikle yapısal proteinler ile CO-proteinler (karbonil grubu taşıyan proteinler) olarak bilinen bileşikler oluşturabilir (154). Proteinlerdeki reaktif karbonil grupları protein yan zincirlerinin direk oksidasyonu ile de oluşabilir (155). Reaktif oksijen türleri amino asit rezidü yan zincirlerini keton ya da aldehit türevlerine okside edebilir. Histidin, arjinin ve lizin ROS-aracılı protein karbonil oluşumuna en hassas aminoasitlerdir (156) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Arjinin yan zincirinin ROS aracılı oksidasyonu ile protein karbonil oluşumu

Proteine bağlı karbonilleri ölçen birçok metod; karbonillenmiş protein yan zincirlerinin DNPH ile kovalent reaksiyonu ve 2,4-dinitrofenil-hidrazon gruplarının spesifik anti-dinitrofenil (DNP) antikoru ile belirlenmesi esasına dayanır. Dinitrofenil-hidrazin reaksiyonunda üretilen protein hidrazon aynı zamanda spektrofotometrik olarak 360-385 nm arası bir absorbansta da ölçülebilir (155) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Protein karbonillerin belirlenmesi

Kronik basıncın neden olduğu rat glokom modelinde protein karbonil oluşumu proteomik analiz ile tanımlanmıştır (34). Yapılan bu çalışmada, karbonillenmiş protein yan zincirleri içeren kontrol ve oküler hipertansif retinal protein lizatları DNPH ile reaksiyona sokulmuş ve 2,4-dinitrophenyl-hidrazon gruplarının oluşumu DNP antikoru ile iki dimensiyonlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) kullanılarak tanımlanmıştır. Oküler hipertansiyonda protein karbonil immünoreaktivitesini gösteren yaklaşık 60 protein noktası 2D-oxyblot üzerinde belirlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında bu proteinlerden üç tanesi anlamlı artış göstermiştir. Bu noktalar çıkarılıp matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) ile tanımlanmadan önce jele gömülmüştür.

MALDI-TOF-MS ile toplanan spektral ağırlıklar Mascot ve DeepView araştırma makinaları kullanılarak bioinformatik olarak analiz edilmiştir. Ağırlık parmakizi ile tanımlanan proteinlerin GAPDH, Hsp72 ve glutamin sentaz olduğu görülmüştür. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, gliseraldehit-3-fosfatın fosforilasyonunu katalizleyen glikolitik bir enzimdir. Bu enzimin aktif bölgesi H_2O_2 ya da $O_2^{\cdot-}$ üreten sistemler varlığında (157) kolaylıkla okside olabilen SH-grupları içerir (158). Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazın hafif oksidasyonu glikolizde oksidasyon ve fosforilasyonun birbirinden ayrılması ve hücrede ATP'nin azalması ile sonuçlanır (159). Böylece GAPDH'nin oksidasyonu değişmiş enzim aktivitesine neden olarak glokom ile ilişkili nöronal hücre ölümünü de içeren çeşitli patolojik süreçlerin gelişmesinde kilit rol oynayabilir.

Hsp72'nin posttranslasyonel oksidatif modifikasyonu protein fonksiyonu üzerinde zararlı sonuçlar doğurabilir. Hsp72'nin birincil fonksiyonu saf, anormal kıvrımlara sahip ve mutasyona uğramış proteinlerin hücre içi moleküler şaperonu olarak işlev görmesidir (160). Kültüre edilmiş rat RGC'lerinde Hsp72'nin ekspresyonunun hipoksik ve eksitotoksik hasara toleransı arttırdığı gösterilmiştir (161). Benzer şekilde ısı şoku protein indükleyici geranil geranil aseton ile muamele edilen glokom rat modelinde RGC koruması gözlenmiştir (162).

Glutamin sentaz glutamatın glutamine dönüşümünü katalizler ve önemli bir nörotransmitter olan glutamat metabolizmasına katılan kilit enzimdir (163). Glutamin sentaz ekspresyonu retinal gangliyon müller hücrelerinde de gösterilmiştir (164). Nöronal eksitotoksisiteye karşı önemli bir koruyucu rol oynar. Karbonil oluşumunun glutamin sentaz fonksiyonu üzerine etkisi açıklanmıştır. Fakat glokom ile ilişkili RGC ölümünde muhtemel sonuçlara sahip olabilir.

2.5.2. Lipit Peroksidasyonu ve Glokom

Oksidatif stres sırasında üretilen ROS lipitlerin (hem hücrel membran lipitleri hem de dolaşımda bulunan lipoprotein molekülleri) peroksidasyonunu indükler ve oldukça reaktif aldehytlere meydana getirir (138). Oluşan son ürünler malondialdehit (MDA) ya da 4-hidroksinanenal (4-HNE) oksidatif streste patolojik moleküler süreçte iyi bilinen markırlardır (165). 4-hidroksinanenal; konjuge çift bağlara bir hidrojen atomu (OH , HO_2^{\cdot}) çıkarıp, çift bağ (O_2) ekleyebilen reaktif türler için kolay bir hedef olan linoleik ve araşidonik asit gibi ω -6 PUFA'dan türer (166). Lipit peoksidasyonu MDA seviyelerinin tiyobarbütirik asit reaktif substratının (TBARS) kantitatif olarak ölçümü ile belirlenmesine rağmen TBARS, tiyobarbütirik asidin lipit olmayan parçalar ile reaksiyonundan dolayı membran lipit peroksidasyonunun spesifik olmayan bir markırı olarak düşünülmektedir (167). Membran fosfolipitlerinden serbest bırakılan 20 karbonlu ansatüre yağ asidi olan araşidonik asitin (20:4 ω 6) serbest radikal uyarımı ile oksidasyonu F2- ve D2/E2-izoprostanların (IP) oluşumu ile sonuçlanır (168). Yapılan son çalışmalar IP ölçümünün in vivo lipit peroksidasyonunun ölçülmesinde güvenilir noninvaziv bir yaklaşım sağlayacağını göstermiştir (169).

Yapılan bir çalışmada POAG hastalarından toplanan kırkdokuz gözün lens, aköz humor ve trabeküler ağ dokusu lipit ekstraktlarında konjuge dienlerin, lipit peroksidasyonu son ürünlerinin birikiminin çalışılması için UV spektrofotometri ve

floresans analiz kullanılmıştır. Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında glokom hastalarının aköz humor ve trabeküler dokuda lipit peroksidasyon ürünleri anlamlı düzeyde yüksek konsantrasyonda bulunmuştur (170). Benzer şekilde; yapılan bir diğer çalışmada artmış IOP'ye sahip ratlarda MDA seviyeleri vitreus ve retinada yüksek olarak bulunmuştur (35) (51). Poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu nöronal hücrelerde apoptozisi uyaraabilen 4-HNE'i de içeren birçok aldehitin oluşumu ile sonuçlanır (171). 4-hidroksinanenalin doz ve zamana bağımlı etkileri normal ve glokomlu insan gözlerinden elde edilen ONH astrositlerinin primer kültüründe çalışılmıştır (172). 6 saat kadar 50 mM ve daha yüksek konsantrasyonda 4-HNE uygulaması normal ONH astrositlerinin yaşamsallığını %50'den fazla düşürmüştür (172). Glutasyon hücrede en çok bulunan nonprotein tiyoldür ve 4-HNE'nin inaktivasyonunda önemli ve kilit antioksidandır (173). Bir saat kadar 4-HNE muamelesinin ardından normal astrositlerde GSH seviyelerinde önemli düşüş gözlenmiştir (171). Glokomlu insanların gözlerinden alınan ONH astrositlerinin primer kültüründe normal astrositler ile karşılaştırıldığında GSH'nın bazal seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (172). Bu bulgu glokomda antioksidan savunma mekanizmalarının değişmiş olduğunu göstermektedir. Normal ve glokomlu astrositlerde hidroksinonenalin uzaklaştırılmasından yirmi dört saat sonra GSH seviyelerinde önemli bir artış olduğu bulunmuştur (172). Bir saatten fazla 25 µM 4-HNE ile muamele insan ONH astrositlerinde glutamat sistein ligaz katalitik altünitesi (GCLC) ekspresyonunu uyarılmış (172), GSH sentezi artmış böylece hücrel oksidan savunma mekanizması güçlenmiştir (174). Bir saatten fazla 25 µM 4-HNE ile muamele edilen ONH astrositlerinde 4-HNE'yi inaktif bir metabolite dönüştüren aldoketo reductaz 1C ekspresyonu artmıştır (172). Optik sinir başı astrositlerinde 4-HNE'nin GSH'a konjugasyonunu katalizleyen glutasyon S-transferaz (GST) ekspresyonu 4-HNE inkübasyonu ile uyarılmıştır (172). Bu enzimlerin uyarılması ile insan ONH nöronal hücrelerinde oksidatif hasara karşı korunma mekanizmasına katkıda bulunmaktadır.

Kronik hiyaluronik asit (HA) injeksiyonu ile oluşturulan glokomlu ratlarda artmış lipit peroksidasyonu artmış antioksidan enzim aktivitelerine eşlik eder (175). Tiyobarbütirik asit reaktif substratı ile ölçülen retina lipit peroksidasyonu zaman ve hipertansiyona bağımlı biçimde yüksek olarak bulunmuştur. Tiyobarbütirik asit reaktif substratında gözlenen bu artışa GSH, CAT ve SOD enzim aktivitelerinde düşüş eşlik eder (175).

2.5.3. Gliko-oksidasyon ve Glokom

İleri glikasyon son ürünleri (AGEs) redükte şekerler ile ε-amino grupları ya da N-terminal grupları arasındaki enzimatik olmayan kondenzasyon reaksiyonu yolu ile meydana gelir. Glikasyon modifikasyonları, serbest amin içeren lipitler ve DNA üzerinde gerçekleşebilir ve değişken çapraz bağlanmalar, pigmentasyon ve floresans özelliklere sahip reaktif ürünler meydana getirmek için kompleks kimyasal yeniden düzenleme serileri ile kendiliğinden ilerler fakat bu glikasyon modifikasyonları tercihen lizin ve arjinin aminoasitleri üzerinde gerçekleşir (176). Oksidasyon glikasyona eşlik ettiğinde oluşan ürün glikooksidasyon ürünleri olarak bilinir (177). İleri glikasyon son ürünleri spektroskopik ve flourometrik metodla absorbsiyon (280 nm) ve floresans (440 nm emisyon, 370 nm eksitasyon) değerleri kullanılarak ölçülebilir. Ancak bu metodlar çok spesifik değildir ve sadece glikasyon sürecinin

genel akışındaki belirtileri verebilir (176). Son zamanlarda AGE'ye karşı poliklonal antikörleri kullanan ve glukozun ribonükleaz ile glikasyon reaksiyonundan in vitro olarak elde edilen RIA ve ELISA metodları geliştirilmiştir (178).

Proteinlerin non-enzimatik glikasyonu makro ve mikro anjiyopati gibi vasküler hastalıkların komplikasyonlarının gelişiminde (179) önemli bir fenomen olmasına rağmen yapılan son çalışmalar ile glokomda da gözlenmiştir (180). İleri glikasyon son ürünlerinin üretimi protein çapraz bağlanmalarına ve hücrel yapıların yıkımına neden olabilir (177). Aminoguanidin gibi AGE inhibitörlerinin hayvan modellerinde kollajeni de kapsayan çeşitli proteinlerde AGE'lerin oluşumunu önleyerek vasküler hastalıkların komplikasyonlarının gelişimini yavaşlattığı rapor edilmiştir (181) (182). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada glokomlu ve aynı yaş grubunda kontrollerinden toplanan gözlerin retina ve ONH'de AGE ve AGE reseptörlerini (RAGE) belirlemek için immunoperoksidaz ve double-immünofloresans işaretleme kullanılmıştır. Glokomlu retina ve ONH'de kontrol ile karşılaştırıldığında artmış AGE birikimi ve RAGE up-regülasyonu belirlenmiştir (180). Bu çalışmada ayrıca hücrel AGE ve RAGE lokalizasyonu, astrosit belirteci olan glial fibriler asidik proteine (GFAP), müller hücrelerin belirteci olan antivimentine ve RGC'lerin belirteci olan brn-3'e karşı antikörler kullanılarak immüno labeling ile belirlenmiştir. Glokomda artmış AGE immüno labeling RAGE immüno lokalizasyonunun astrositler ile bağlantılı olduğu hücre dışı bileşen ve ONH'de laminar kribriform tabakada gözlenmiştir (180).

2.5.4. DNA-Oksidasyonu ve Glokom

Oksidatif deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı DNA-protein çapraz bağlantılarına, zincir kırıklarına ve baz modifikasyonlarına neden olabilir. Oksidatif DNA hasarı bu hasar için bir indikatör olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG) seviyelerinin ölçümü ile tayin edilmektedir (183). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin elektrokimyasal yöntem ya da GC/MS teknikleri kullanılarak HPLC ile ölçülebilir (184). DNA zincir kırıkları dokularda alkali elüsyon hücrelerde ise DNA fragmentasyonunun terminal deoksinükleotid transferaz (TdT)-aracılı in situ son etiketleme kullanılarak belirlenmesi ile ölçülebilir (185). Aközün akışında meydana gelen azalmaya bağlı olarak gelişen artmış IOP glokoma neden olan ana etkidir (7). Gözün dışı akış sistemi ön oda açısında trabeküler ağ tabakasını da içeren bir seri endotelial hücre dizisi yapısından oluşmaktadır. Oksidatif DNA hasarının bir markırı olan 8-OHdG seviyeleri, POAG hastalarından toplanan trabeküler ağ tabakası örneklerinde belirlenmiştir (12). DNA oksidasyonu, IOP ve görme alanı hasarı ile hastalığın seyri arasındaki ilişki; ekstrakte edilmiş DNA örneklerinde 8-OHdG ³²P-postlabeling prosedürü kullanılarak ölçülmüştür. Oksidatif DNA seviyeleri, görme alanı hasarı ve IOP arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Oksidatif DNA hasarının, artmış IOP'ye yol açan trabeküler ağ tabakası hasarına neden olduğu sonucuna varılmıştır. Glutasyon S-transferazlar hücrel detoksifikasyonda kilit rol oynayan multifoksiyonel enzimlerdir. Bu enzimler toksikanları Glutatyona konjuge ederek onların elektofilik kısımlarını nötralize ederek ve oluşan ürünleri daha çözünür hale getirerek hücreleri toksikanlara karşı korur (186). Glutasyon S-transferaz M1 gen polimorfizmleri terapötik göz cerrahisi (trabekülektomi) uygulanan 45 POAG hastası ve uygulama yapılmamış kontrollerden toplanan trabeküler ağ örneklerinde çalışılmıştır (11). Mu-sınıfı

Glutasyon S-transferaz (GSTM1) boş aleli ile POAG arasında ilişki olduğu bulunmuştur. Bu ilişki hastalıkta defektif GSTM1 detoksifikasyonuna muhtemel bir genetik yatkınlık olduğunu ileri sürmektedir. GSTM1 delesyonuna sahip POAG hastaları GSTM1 pozitiflerden 2.2 kat fazla 8-OH-dG miktarına sahiptir. Ayrıca GSTM1 delesyonu POAG hastalarında etkilenmemiş kontrollerden önemli derecede daha sık görülür. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin kontrol ile karşılaştırıldığında POAG hastalarında 3.6 kat artmış olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ilk olarak sunulan sonuçlar GST genlerinin fizyolojik koşullarda trabeküler ağda ifade edildiğini ve oksidatif DNA hasarının POAG ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

2.5.5. Protein Nitrasyonu ve Glokom

Aromatik nitrasyon patolojik koşullar, NO ve oksidatif stresi içine alan sinyalizasyon olaylarının aracısı olarak tanınır. Çok sayıda in vitro biyokimyasal çalışma protein tirozin rezidülerinin nitrasyonunun proteinin fonksiyonunu değiştirebildiğini göstermiştir (187). 3-nitrotirozin (NO₂Tyr), 3-bromotirozin ve 3-klorotirozinin protein nitrasyonunun seçici markırları olduğu gösterilmiştir (188). Gerçekten de NO₂Tyr tayini genellikle hem insan hastalık dereceleri hem de hayvan modellerinde NO'dan türeyen oksidanların tanısasal markırı olarak kullanılır (189). Western blotlama, enzim-bağlı immunosorbent assay (ELISA), immünokimya, HPLC ve mass spektrometriyi içeren birçok teknik çeşitli hastalık seviyelerinde NO₂Tyr oluşumunun belirlenmesinde kullanılır (189).

Artmış IOP NOS-2 ekspresyonunu, retinal protein nitrasyonunu ve apoptozisi artırır (21). Protein nitrasyonu ve apoptozisin, oküler dejenerasyonun eşlik ettiği klinik koşullarda hastalığın ilerleyişini alevlendirdiği ileri sürülmektedir. Nitrik oksit sentaz-2'nin seçici inhibisyonu ve IOP'nin düşürülmesi uzun dönem görme kaybını önleyebilir ve glokomun idare edilmesinde gelişmelere yol açabilir. Gerçekten de farmakolojik çalışmalar aminoguanidin ile NOS-2 inhibisyonunun kronik glokom rat modelinde RGC'lerin nöronal korumasını desteklediğini göstermiştir (190). Glokomlu optik sinir başlarında gözlenen NOS-2 immunostaining, NOS-2'nin artmış IOP ile ilişkili RGC ölümüne katkıda bulunabileceğini ileri sürmektedir (22) (14). Nitrik oksit aracılı sitotoksiste ve apoptozisi uyaran NO kapasitesi makrofajlarda (24), astrositlerde (25) ve nöronal hücrelerde (26) rapor edilmiştir. Nitrik oksit aracılı apoptozisin mekanizması halen açıklanmamasına rağmen NO'in yol açtığı apoptozis, p53'ü aktive ederek apoptozise neden olduğu rapor edilen DNA hasarının bir sonucu olabilir (31).

2.5.6. Lipit Nitrasyonu ve Glokom

Birçok yolak ONOO⁻ ve nitrojen dioksiti (NO₂) içeren RNS tarafından lipit oksidasyonu ve nitrasyonunu artırır. Ansatüre yağ asitleri ve RNS arasındaki reaksiyonlar lipit oksidasyon ve nitrasyon ürün spektrumu meydana getirir (191). Lipit nitrasyon ürünleri özellikle de tokoferol nitrasyonundan meydana gelenler nitratif stres için biyomarkır olarak rapor edilmiştir(192). Yapılan son çalışmalar çeşitli biyolojik örneklerde internal nitrolinoleatı standart olarak kullanarak kantitatif mass spektrofotometrik analiz ile nitratlanmış yağ asitlerinin varlığını göstermiştir (193) (194).

2.6. Glokom Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Kronik oksidatif stres glokomun patogenezi ve özellikle de yaşa bağlı klinik başlangıcı ile ilişkilidir. Glokom teşhis edildiğinde IOP artmış ya da normal olsun birincil tedavi genellikle cerrahi yöntemlerdir (195). Glokom tedavisinde şu an için kullanılan ajanlar IOP'yi düşürme amaçlı dizayn edilmişlerdir. Bu ilaçlar silier cisimde aköz humor üretimini sınırlar ve/ya da aközün trabeküler ağdan ya da üveoskleral yoldan dışa akımını artırır (196). Glokomlu bir hastada ilk aşamada topikal ilaç tedavisi seçilirse aşamalı bir yaklaşım kullanılır. Başka bir ajan ile birlikte ya da diğer bir ajan denenmeden önce topikal bir ajan tek başına maksimum dozunda verilir. İlaç tedavileri IOP'yi düşürmeye olan katkıları ve yan etkilerinin tolere edilebilirliğine dayanarak seçilir. Göze uygulanan ilaç hızlıca nazolakrimal kanaldan geçerek buruna sonrasında ise çokça damar içeren nazal mukozaya geçer. Sistemik dolaşıma katılan ilaç karaciğerde metabolize olur. Topikal olarak alınan ilaçların zıt etkileri ve ölüm çok nadir görülür. Sistemik yan etkiler genellikle antihipertansif ve antiaritmi ilaçları kullanan hastalarda gerçekleşir.

2.6.1. β blokörler

β blokörlere örnek olarak timolol, karteolol, betaksolol, levobunolol ve metipranolol verilebilir. β blokörler silier cisimde aköz sekresyonunu düşürürerek IOP'yi düşürür ve topikal amaçlı tedavi için kullanılır. β blokör damlaları sistemik β blokaja neden olabilir (197). Timolol ve diğer topikal β blokörlerin astım ve konjestif kalp rahatsızlıkları ve nadiren bunun sonucu ani ölüm ile ilişkili olduğu bulunmuştur (198). Kardioselektif bir β blokör olan Betaxolol (Betoptic) timololden daha az kardiyopulmoner yan etkilere sahiptir. Yapılan birçok çalışma betaxolol'un görme alanının korunmasını sağladığını göstermiştir (199) (200) (201).

2.6.2. Prostaglandin Analogları

Latanoprost, travoprost ve bimatoprost gibi prostaglandin analogları aközün gözden üveoskleral yol ile uzaklaştırılmasını artırarak IOP'yi düşürür. Bu ilaçlar IOP'yi %30-35 kadar düşürebilir. Latanoprost artmış iris pigmentasyonuna yol açabilir. Sistemik yan etkileri minimal düzeydedir (197).

2.6.3. Sempatomimetik ve Parasempatomimetik İlaçlar

Pilocarpin gibi parasempatomimetik ilaçlar göz silier kaslarının kasılmasını sağlayarak pupili daraltır ve trabeküler ağ üzerine çeker böylelikle aközün göz dışını akışını artırır. Ancak lens merkezi opaklaşmışsa küçülen pupil görme problemlerine yol açabilir. Silier cismin daralması akomodasyon ve bulanık görüğe yol açabilir. Gözde iflamasyon varlığında pilocarpin kullanılmamalıdır. Çünkü pupil görme eksenine yapışarak görmeyi engelleyebilir. Pilocarpine genellikle β blokörler ile kombine olarak verilir (197).

Topikal sempatomimetikler epinefrin (alfa ve beta reseptör stimülasyonu) ve klonidin benzeri ajanlar (alfa reseptör stimülasyonu) olarak incelenebilir. Simpatomimetikler hem aköz üretimini düşürebilir hem de aköz dışa akımına arttırabilirler. Epinefrin sıklıkla oküler aleji yaratır ve glokomda nadiren kullanılır. Dipivefrin (Propine) oküler ve sistemik yan etkilere sahip olsa da glokom tedavisinde kullanılan klonidin benzeri bir ajandır. Apraclonidine (Iopidine) oküler cerrahiden

sonra IOP'nin düzenlenmesinde kullanılır. Brimonidine (Alphagan) alfa 2 reseptörleri için selektiftir ve aköz üretimini sınırlayarak IOP'yi düşürür (196).

2.6.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Topikal olarak kullanılan dorzolamide, brinzolamide ya da oral olarak kullanılan acetazolamide bu tür ilaçlara örnek olarak verilebilir. Acetazolamide, dorzolamide ve brinzolamide sülfonamid türevidirler ve alerjik reaksiyonlara neden olabilirler. Silier epitelyumda aköz sekresyonunu düşürürler. Oral olarak alınan formu bulantı, halsizlik, hipokalsemi ve böbrek taşı gibi yan etkilere sahip olsa da IOP'yi düşürmede en etkili ilaçtır. Topikal formunun sistemik yan etkileri minimal düzeydedir. Dorzolamide timolol ile kombine olarak verilir (197) (196).

Glokom tedavisinde kullanılan bu ilaç ve ajanların tek başına kullanımının yerine farklı nöroprotektif antioksidanlar ile kombine kullanımının daha etkili sonuçlar ortaya çıkaracağı ileri sürülmektedir (202)

2.6.5. Nöroprotektif İlaçlar

Nöroprotektif tedavinin amacı farmakolojik ya da farklı yollardan ortamda oluşan hasarı azaltmak ya da hücrenin meydana gelen değişimler ile başa çıkması için gerekli araçları sağlamaktır (203) (204). Bu yaklaşıma göre herhangi bir kronik dejeneratif hastalıkta aktif dejenerasyon sürecine maruz kalan bazı nöronlar bulunduğu ortamın kendisine karşı bir saldırı oluşturmasına yol açabilir. Dejenerasyon sonucu hücrelerin hızlı kaybı hasara uğramış nöronlardan kaynaklanır (205). Nöroproteksiyon, risk devam ettiği sürece nöronlarda korunmanın sağlanmasına çalışır (206). Nöroproteksiyonun esas çekici yanı hastalık nedenini tedavi etmeye ihtiyaç duymamasıdır. İşe karışan faktörler basınca bağlı olsun ya da olmasın nöroproteksiyon RGC ölümüne yol açan son ortak yola etki eder. Deneysel kanıtlar bazı nöroprotektif ilaçların glokom hasarının oluşturduğu IOP'yi düşürdüğünü ileri sürmektedir.

Nöroprotektif ilaç kronik stres ya da hasar varlığında RGC'lerin yaşamsallığını güçlendirmelidir. Wheeler ve WoldeMussie hayvan çalışmalarında gösterildiği şekilde nöroprotektif ilaçların terapötik kullanılabilirliğini değerlendirmek üzere dört kriter önermiştir. İlacın retina ve optik diskte spesifik bir reseptör hedefi olmalıdır. Hedefin aktivasyonu nöronların strese karşı direncini arttıran yolları tetiklemeli ya da toksik ajan üzerine baskılayıcı etkiye sahip olmalıdır. İlaç retina ve vitreusta farmakolojik olarak etkili konsantrasyona ulaşabilmelidir. İlacın nöroprotektif aktivitesi klinik denemeler ile gösterilmiş olmalıdır. Birçok farmakolojik ilaç, büyüme faktörleri ve diğer bileşenlerin çok sayıda nörolojik ve nörodejeneratif hastalıkta in vitro nöroprotektif olduğu rapor edilmiştir (203). Bazı ajanların optik sinirde nöroprotektif aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.

2.6.6. Ca⁺² Kanal Blokörleri

Ca⁺² kanal blokörlerinin glutamat-NMDA'nın meydana getirdiği hücre içi Ca⁺² akımını nötralize ettiği gösterilmiştir. Netland ve ark. Ca⁺² kanal blokörleri alan normal tansiyon ve açık açılı glokom hastalarında yaptıkları bir çalışmada kontrol ile karşılaştırıldığında bu blokörleri kullanan hastalarda glokom ilerleyişinde düşüş olduğunu göstermişlerdir (207). Güçlü bir Ca⁺² kanal blokörü olan flunarizinin farelerde optik sinir transeksiyonundan sonra RGC yaşamsallığını arttırdığı gösterilmiştir (208). Ca⁺² kanal blokörlerinin kan basıncını düşürme özelliklerinden dolayı optik sinirde perfüzyonu azaltarak iskemiye yol açabilirler (209).

2.6.7. Antiglukom İlaçlar

Rat optik sinir hasarı modelinde RGC kaybını azaltma yeteneğine sahip olan brimodin nöröprotektif özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. (205). Geo ve ark. intravitreal brimodin rat RGC'de beyinden türeyen nörotrofin ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir (210).

2.6.8. N-metil-D-aspartat Antagonistleri

Aşırı kalsiyum akışını önleyerek nöroproteksiyon sağlayan NMDA antagonistleri NMDA reseptörlerinin aşırı uyarımını inhibe edebilirler. Bir NMDA antagonisti olan memantine hem kültür hem de in vivo RGC'lerin eksitotoksik cevabını bloke eder (211). Göz içi basıncının 120 mm-Hg'ya yükseltilerek yapılan retinal iskemi rat modelinde sistemik olarak verilen memantine gangliyon hücre kaybını düşürmüştür (212). Ayrıca maymunlarda yapılan deneysel oküler hipertansiyon glokom modelinde optik sinir lifi kaybı, görsel fonksiyon kaybı ve merkez görme yolağı nöronal bozulmasına karşı nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (213) (214).

2.6.9. Nitrik Oksit Sentaz-2 İnhibitörleri

Önemli miktarlarda NO apoptozisten önce gerçekleşen DNA nitrozilasyonu ve fragmentasyonunda önemli rol oynar (215). Neufeld ve ark. üç episkleral damarın koterize edilerek oluşturulduğu rat modelinde NOS-2 inhibitörü olan aminoguanidinin oral kullanımının glokomun neden olduğu hasara karşı koruyucu etkisi ile ilgili çalışmalar yapmıştır (190). Uygulamadan altı ay sonra tedavi edilmemiş hayvanların ONH'leri solgun ve hasarlı iken tedavi alan hayvanların ONH'leri normal olarak gözlenmiştir. Tedavi edilmemiş gözlerin RGC'lerinin ortalama %36 'sını kaybettiği, tedavi edilenlerin ise RGC'lerinin %10'dan daha azını kaybettiği histolojik olarak gösterilmiştir.

2.6.10. Nörotrofinler

Beyinden türeyen nörotrofinler, silier nörotrofin faktörü ve temel fibroblastik büyüme faktörü hücre kültürü ve in vivo insan RGC'lerinin yaşamsallığını arttırdığı gösterilmiştir (216). Bu maddenin dağılımı ile ilgili olarak öne sürülen bir yaklaşıma göre ön oda ile vitreus kavitesi arasındaki fistülde yapılan nörotrofinler iristen retinaya ulaşabilir.

2.7. Glukom Tedavisinde Kullanılan Antioksidanlar

Antioksidanlar reaktif oksijen türlerini nötralize ederler. Katalaz, SOD, vitamin C ve E gibi serbest radikal süpürücüler oksidatif hasar sırasında oluşan

ürünlerin temizlenmesinde faydalıdır. Oküler dokular ve sıvılar oksidatif hasara karşı korunmada kilit rol oynayan antioksidanları içerir. Süperoksit kendisini dismutasyona uğratarak H_2O_2 ve O_2 oluşturan, sitoplazmik mitokondrial ve ekstraselüler SOD tarafından uzaklaştırılır(217). Gözün ön segment dokularında oluşturulan H_2O_2 hem içeren CAT ya da GPx enzimi ile uzaklaştırılır (218). Süperoksit dismutaz ve CAT'ın spesifik aktivitesi hem normal insan kadavra trabeküler ağ tabakasında (219) hem de tavşan iris ve korneal endotelyumunda ölçülmüştür (220). Süperoksit dismutazın spesifik aktivitesi normal insan kadavra trabeküler ağ tabakasında yaşa bağlı bir düşüş gösterirken bu düşüş CAT aktivitesinde gözlenmemiştir. Ancak CAT aktivitesinin yaşa bağlı düşüşü tavşan iris ve korneal endotelyumunda görülmüştür. Glutasyon ve askorbik asit (Vitamin C) insanların aköz humor'unda tespit edilebilen düşük moleküler ağırlıkta antioksidanlardır (60). Lipit peroksidasyonu sırasında Vitamin E'nin hızlı düşüşü Vitamin E radikalini tekrar kullanılabilir hale getirebilen askorbik asit ile azaltılabilir (221). 12 kontrol ve 38 kronik açık açılı glokom hastasına ait kan askorbik asit seviyeleri ölçülmüş ve anlamlı bir fark görülmemiştir (222). Aksine POAG teşhisi yeni koyulmuş olan 21 hasta ile 34 aynı yaş ve cinsiyette kontrol örneklerinin plazma GSH seviyeleri ölçülmüş ve glokom hastalarının kontrollerden önemli derecede düşük GSH seviyelerine sahip oldukları gözlenmiştir (36). Laboratuvar sonuçları ve hayvan çalışmaları oksidatif hasarın glokom patogenezindeki rolünü desteklese de tamamlanan denemeler ek antioksidan (Vitamin E, askorbik asit) kullanımı ve POAG riski arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermemiştir (223).

2.7.1. Karotenoidler

Karotenoidler bakteri, alg, bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan sarı, kavuniçi renkli pigmentlerdir. Günümüze deyin 750'ye yakın, doğal olarak bulunan karotenoid pigmenti tanımlanmıştır (224). İnsan ve hayvanlar karotenoid pigmentini sentez edemezler, bu sebeple kendi organizmaları içerisinde bulunan karotenoid pigmentlerinin tamamı diyet yolu ile alınır (224). Karotenoidler bütün fototrofik organizmalarda ve birçok heterotrofik organizma membranlarında bulunan non-polar izoprenoid bileşenlerdir (225). Bütün karotenoidler 40 karbonlu fitoenin siklizasyon, izomerizasyon ve oksidasyonundan türer (226). Karotenoidler uzamış konjuge çift bağ sistemine sahiptirler ve görünür ışık-ultraviole (UV) aralığında ışığı absorblayabilirler. Karotenoidler oksidatif kırılmalar ile apo-karotenoidler olarak adlandırılan küçük bileşenleri oluşturabilirler. Birçok apo-karotenoid küçük moleküllerden büyük izoprenoidlerin oksidatif kırılımından sentezlenir. Bu işlem "oksidatif remodeling" adı verilir (227) (228) (229). Remodeling aşaması karotenoid kırıcı oksijenaz (CCO) enzim ailesi tarafından başlatılır.

Fizyolojik stres, hava kirliliği, sigara kullanımı, UV ışığa maruziyet, kimyasal maddelere maruziyet gibi durumlar normal metabolik reaksiyonlar sırasında üretilen serbest radikallerin ve yüksek reaktiviteye sahip oksijen formlarının üretimini artırır. Fagositler de aşırı miktarda serbest radikal üretebilirler. Serbest radikaller DNA, protein ve lipit membranları hasara uğratabilir. Oksidatif hasarın yaşlanma, iskemi-reperfüzyon hasarı, yaşa bağımlı maküler dejenerasyon, ateroskleroz, retinopati ve karsinogenez ile ilişkili olduğu bulunmuştur (230). Karotenoidler gibi diyetle alınan antioksidanlar bu tür hastalıklara karşı savunma ve korunmada yardımcı rol üstlenebilirler. Karotenoidler singlet oksijenin eskite enerjisini karotenoid halkasına

absorbe edebilen güçlü biyolojik antioksidanlardır. Bu işlem karotenoid molekülünün degradasyonuna neden olurken diğer molekülleri ya da dokuları hasara karşı korur (231) (232). Aynı zamanda lipit membranların degradasyonuna neden olan PUFA degradasyonunu başlatan serbest radikallerin zincir reaksiyonunun üretimini önleyebilirler

Karotenoidler insan sağlığında önemli faktörlerdir. Beta-karoten ve diğer karotenlerin en önemli rolü diyet ile alınan ana vitamin A kaynağı olmalarıdır. Karotenoidlerin pek çok fizyolojik fonksiyonu vardır. Bu fonksiyonlar içerisinde en önemlileri reaktif oksijen metabolitlerinin detoksifikasyonu, retina üzerine gelen kısa dalga boyuna sahip ışınların tutulması ve biomembranların fizyolojik yapısının korunmasıdır. Karotenoidlerin fotoprotektif etkileri reaktif fotonların tutulmasından kaynaklanır. Bu koruyucu fonksiyonları reaktif oksijen türlerinin tutulması ile benzeşir.

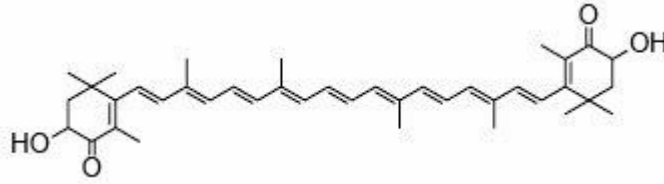
Doğada bulunan pek çok karotenoid tetraterpen yapısındadır. Bilinen karotenoidler arasında Beta-karoten, zeaxanthin, lutein, astaksantin, all-trans violaxanthin ve 9-cis violaxanthin yer alır. Bazen karotenoidlerin hidrokarbon iskeletlerine oksijen içeren hidroksi (OH), keto (COO) ve epoksi grupları eklenebilir. Bu durumda oluşan karotenoidlere ksantofil denir. Karotenoidlerin çok önemli yapısal ve spektroskopik özelliklerinden birisi yapılarında çift bağ içermeleridir. Yapısal açıdan bakıldığında mevcut çift bağ sistemi karotenoidlere stabilite kazandırır ve reaktif oksijen metabolitlerinin detoksifikasyonunda etkilidir (233). Karotenoidlerin günümüze değin akciğer ve prostat kanserlerinde (234) (235), maküler dejenerasyonda (236), kistik fibrozisde (237) ve aterosklerotik damar hastalıklarında (238) koruyucu etkileri gösterilmiştir. Karotenoidler ile yapılan hayvan deneyleri (Giron ve ark. 1997, Kim ve ark. 1998, Okajima ve ark. 1998) ve insanlarda in vitro kanser hücrelerinin inhibisyonunda (Pastori ve ark.1998, Amir ve ark. 1999) rol oynadığı saptanmıştır.

2.7.2. Astaksantin

Astaksantin alabalık, somon, çipura, karides ve istakoz gibi akuatik hayvanlarda bulunan başlıca karotenoid pigmentidir. Aynı zamanda flamingo ve bıldırcın gibi kuşlarda da bulunur. Bazı mikroorganizmalar astaksantinden zengindir, doğada astaksantini en yüksek seviyelerde biriktiren klorofit algı olan *Haematococcus pluvialis*'dir. *Haematococcus pluvialis* ve *Xanthophyllomyces dendrorhous* ticari olarak astaksantin üretiminde kullanılan mikrobiyal sistemlerdir. 1995 yılında dünyada *Haematococcus pluvialis*'ten elde edilmiş doğal astaksantin içeren gıda takviyesinin ticaretini yapan ilk şirket İsviçre'de bulunan Bioreal şirkettir. Bu şirket yararlarının anlaşılması için doğal astaksantin kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar yapmıştır. Astaksantin biyosentezi yalnızca mikroorganizmalar ile sınırlıdır.

Alabalıklarda kasta, istakoz dış iskeletinde molekülü stabilize eden bir ya da iki yağ asidi ile esterleşmiş halde bulunur. Alabalık astaksantin içeriği 1.7 - 2.6 mg/100 g'dır. Astaksantin hayvanlar tarafında sentez edilemez ve diyet ile alınmalıdır. Memeliler ve birçok balık diyet ile aldıkları karotenoidleri astaksantine dönüştürememektedir. Ancak karides gibi krustaseler diyetle aldıkları karotenoidleri

astaksantine dönüştürebilir. Memeliler astaksantini sentez edebilme ya da diyetle aldıkları astaksantini vitamin A'ya dönüştürebilmekten yoksundur. β -karotenin aksine astaksantin bu canlılarda pro-vitamin A aktivitesine sahip değildir (239). İyonon halkalarında hidroksil ve keto uçlarının bulunması, astaksantine esterleştirme, yüksek antioksidan aktivite ve diğer karotenoidlerden daha polar bir konfigürasyon gibi eşsiz özellikler katar (Şekil 2.15) (240). İmmün cevap, pigmentasyon ve reproduktif davranışta önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (241). Astaksantin doğada proteinler ile konjuge halde bulunur. Serbest astaksantin oksidasyona karşı daha hassastır.



Şekil 2.15. Astaksantin yapısı

Karotenoidler, UV-ışığın meydana getirdiği fotooksidasyona karşı dokuların korunmasında önemli role sahiptir ve güneş ışığına direk olarak maruz kalan dokularda sıklıkla bulunurlar. Astaxantin de bulunduğu birçok su canlısında çok güçlü bir antioksidan olarak PUFA oksidasyonuna karşı dokuları ve hücreleri korur ve UV ışığın etkilerine karşı koruyucu rol oynar. Lipitlerin ve dokuların UV-ışığa maruziyeti singlet oksijen ve serbest radikallerin üretilmesine ve bu lipitlerin ve dokuların fotooksidatif hasarına yol açabilir (230). Chitchumroonchokchai ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada insan lens hücrelerinde ksantofillerin UV-ışık tarafından meydana getirilen lipit peroksidasyonunu azalttığı rapor edilmiştir (242).

Astaksantin yapısal olarak β -karoten, lutein ve zeaksantine benzerlik göstermesine rağmen bu karotenoidlerden daha güçlü bir antioksidan aktiviteye ve UV-ışığa karşı daha güçlü koruyucu etkiye sahiptir (243). Ayrıca astaksantin vitamin E'den defalarca kat yüksek serbest radikal antioksidan aktivitesine sahiptir (244). Astaksantin molekülü diğer ksantofiller ile karşılaştırıldığında ucunda hidroksil ve karbonil grupları olan en uzun konjuge çift bağ poliyen zincirine sahiptir. Bu konfigürasyon astaksantine büyük antioksidan kapasite ve serbest radikallerin poliyen zincirine girmesini ve böylece yakalanmasını sağlar. Bu özelliği ile astaksantin vitamin E ve vitamin C gibi diğer antioksidanların da serbest radikal temizleme kapasitesini güçlendirir. Gözde UV-ışıktan kaynaklanan oksidatif hasara karşı astaksantin koruyucu olduğu ve göz sağlığı açısından çok önemli olabileceği rapor edilmiştir (230). Oksidasyon ile ilişkili faktörlerin glokom riskini arttırdığı epidemiyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. Özellikle lutein ve zeaksantin karotenoidlerinin diyet ile yüksek miktarda alımı (ıspanak, karalahana ve diğer lifli yeşil sebzeler ile) göz hastalıklarının riskinin düşürülmesi ile ilişkilidir (245) (246) (247).

Astaksantin ile yakın benzerlik gösteren lutein ve zeaksantin karotenoid pigmentleri gözün makula kısmında birikir (248). Astaksantin henüz insan gözünde

izole edilmemiştir. Ancak yapılan bir hayvan çalışması astaksantin kan-beyin bariyerini geçebildiğini ve luteine benzer şekilde memelilerin retinasında depolandığını göstermiştir (249). UV-ışık ile hasara uğratıldığında astaksantin ile beslenen ratların retinal fotoreseptörleri astaksantin ile beslenmeyenlerden daha az hasar görmüş ve daha hızlı düzelmeye göstermiştir. Böylece gözde astaksantin birikiminin UV ışığa ve retinal dokuların oksidasyonuna karşı daha kuvvetli koruyucu etki sergileyebileceği ve astaksantin göz sağlığının sürdürülmesinde potansiyele sahip olduğu çıkarımı yapılabilir.

Astaksantin duodenal mukozada emilir ve karaciğere taşınır. Karaciğerde vücut hücrelerine taşınmak üzere lipoproteinlere bağlanır. Plazmada β -karoten, likopen gibi non-polar karotenoidler çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) ve düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ile taşınırken, zeaksantin, lutein gibi polar karotenoidler LDL'ler ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) ile taşınır (240). İnsanlarda astaksantin biyoyararlanımı ile ilgili olarak yapılan bir çalışma astaxanthinin tek defada yüksek doz olarak 100 mg kullanımının plazma lipoproteinleriyle taşınımını göstermektedir (250). Membran fosfolipitlerinin ve diğer lipidlerin peroksidasyona karşı korunmasında çok başarılı olan (251) astaksantin günlük alımının 4 mg olması tavsiye edilmektedir (252) (253).

Son dönemde yapılan bir çok çalışmada; serbest radikal hasarlarına bağlı makular dejenerasyon gibi göz ve retina problemleri, nöronal dejenerasyon ve kardiyovasküler hastalıklara (240) karşı koruma sağlayan astaksantin UV-ışık fotooksidasyonu, inflamasyon, kanser (254) (255), ülser, *Helicobacter pylorii* infeksiyonu (256), yaşlanma ve yaşa bağımlı hastalıkların önlenmesinde, immün cevabın dağılımında, karaciğer fonksiyonunda, ve prostat sağlığında da kilit role sahip olduğu vurgulanmaktadır.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Biyofizik ve Deneysel Hayvanlar Ünitesinde gerçekleştirilen çalışmamızda 46 adet 3 aylık, ortalama 250-300 gr ağırlığında, erkek Wistar sıçan kullanılmıştır.

3.1. Gruplandırma

Deneysel Hayvanlar Ünitesinden birer hafta ara ile rastgele alınan toplam 46 adet sıçan her grupta 23 hayvan olacak şekilde, zeytinyağı alan ve karotenoid tedavisi alan iki gruba bölünmüştür. Her hayvanın sol gözü IOP artışını sağlamak amacıyla koterize edilmiştir. Böylelikle dört grup oluşturulmuştur.

A. Astaksantin tedavisi verilmeyen gruplar

Grup 1: Kontrol grubu (K) (zeytinyağı alan hayvana ait operasyon yapılmamış sağ göz)

Grup 2: Göz içi basınç artışı sağlanan grup (IOP) (zeytinyağı alan hayvana ait operasyon yapılmış sol göz)

B. Astaksantin tedavisi verilen gruplar

Grup 3: Karotenoid tedavisi alan grup (K+ASX) (zeytinyağı içerisinde çözünmüş karotenoid tedavisi alan hayvana ait operasyon yapılmamış sağ göz)

Grup 4: Karotenoid tedavisi alan IOP artışı sağlanan grup (IOP+ASX) (zeytinyağı içerisinde çözünmüş karotenoid tedavisi alan hayvana ait operasyon yapılmış sol göz)

3.2. Deneysel Protokolü

56 günlük deneysel süresi boyunca, hayvanlar her kafeste en fazla 5 hayvan olacak şekilde, 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuşlardır. Bu süre içinde hayvanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir.

Deneysel süresince;

- i) K grubuna zeytin yağı,
- ii) K+ASX grubuna 5 mg/kg/gün zeytinyağı içerisinde çözünmüş Astaxantin
- iii) IOP grubuna zeytinyağı
- iv) IOP+ASX grubuna 5 mg/kg/gün zeytinyağı içerisinde çözünmüş Astaxantin gavajla verilmiştir.

3.3. Albino Wistar Ratlarında Göz İçi Basınç Artışına Bağlı Glokom Oluşturmak

Albino Wistar ratlarında IOP artışını sağlamak için unilateral üç-damar koterizasyonu yapılmıştır (257). İntraperitoneal anestezi eşliğinde (12 mg/kg xylazine/80 mg/kg ketamine) limbal venlerden köken alan 5 ana dalın üç tanesi konjunktiva insizyonu yapılarak ekvator bölgesinde açığa çıkarılmıştır. Her ven forceps yardımıyla kaldırılarak oftalmik koter vasıtasıyla koterize edilmiştir. Hemen gelişen retraksiyon ve kanama olmaması, başarılı koterizasyon yapıldığının bir göstergesi olmuştur.

3.4. Göz İçi Basıncı Ölçümü

Çalışmada ratlardaki IOP'yi ölçmek için TonoPen tonometre kullanılmıştır. Ölçümler %0.5 proparacaine HCL eşliğinde ameliyattan önce, ameliyattan 1 gün sonra ve haftada bir kez olmak üzere 8 hafta boyunca yapılmıştır. TonoPen tonometre kullanılarak rat gözlerinde doğru, tekrarlanabilir, noninvaziv IOP tayini yapılması sağlanmıştır. (258).

3.5. Astaxantin Verilmesi

Astaxantin operasyon gününden başlayarak intragastric gavaj yoluyla 5mg/kg/gün olacak şekilde 8 hafta boyunca verilmiştir. Kontrol gruplarına aynı volümde zeytinyağı verilmiştir. Bu doz Kim ve ark. tarafından yapılan çalışmalar esas alınarak seçilmiştir (259) (260).

3.6. Görsel Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi

Görsel uyarılma potansiyelleri hafif eter anestezisi altında hayvanların kafalarına yerleştirilen iğne elektrotları (NE-223S, 5 mm Nihon Kohden) ile Biopac MP100 Data Acquisition cihazında kaydedilmiştir. Aktif ve referans elektrotlar bregmanın 0.5 cm arkasına ve önüne yerleştirilmiştir. Toprak elektrodu ise hayvanların kuyrukları üzerine konulmuştur. Flaş uyarısı Nova-Strobe AB stroboskobu ile hayvanların pupillalarının tümü aydınlatılacak şekilde 15 cm mesafeden uygulanmıştır. Flaş uyarısı saniyede bir defa ve en düşük şiddette (0.1 J) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Flaşla oluşturulan görsel uyarılma potansiyelleri sağ ve sol göz olmak üzere monooküler uyarılarla kaydedilmiştir. Deney süresince flaş verilmeyen diğer göz bir pamuk ve karbon kâğıdı ile kapatılmıştır. Bu esnada hayvanların vücut sıcaklıkları ısıtıcı yardımıyla 37-38.5 °C arasında sabit tutulmuştur (261).

Çalışmada kullanılan cihazın amplifikatörünün limitleri 1 Hz- 3 KHz, kazancı 20 µV/div, analiz zamanı 300 ms olarak ayarlanmıştır. Flaş VEP'ler 100 kez ortalama alınarak kaydedilmiştir. Kayıt alındıktan sonra FVEP'ler dijital olarak kesim frekansı 100 Hz olan alçak geçiren filtre ile işlenmiştir.

Görsel uyarılma potansiyellerinin tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla her kayıt en az iki kez yapılmıştır. İzoelektrik çizginin üzerindeki potansiyel tepeler negatif (N), altındaki çukurlar pozitif (P) olarak kabul edilmiştir. Tepe latensleri stimulus artifaktından itibaren milisaniye (ms) birimiyle, birbirini izleyen ters polaritedeki dalgaların genlikleri tepeden-tepeye mikrovolt (µV) birimiyle hesaplanmıştır.

3.7. Retina Dokusunun Alınması

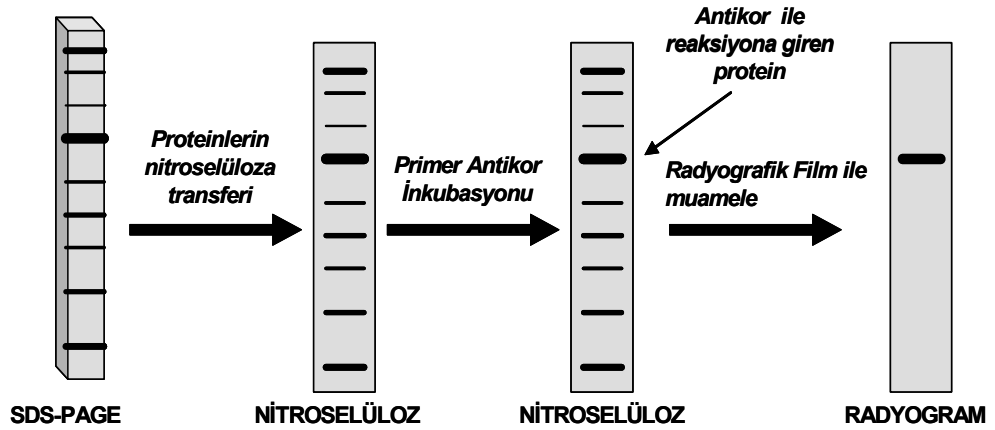
Deney protokolü, grupların arasında birer hafta olacak şekilde planlanmıştır. Görsel uyarılma potansiyelleri kayıt edildikten bir gün sonra hayvanlara üreteran anestezisi uygulanmış ve abdominal aorttan heparinize kan örnekleri alınmıştır. Bu işlemi takiben kardiyak perfüzyon ile organlar ve göz dokuları kandan arındırılarak eksize edilmiştir. Sakrifiye edilen ratlardan çıkarılan gözlerden kornea, iris, lens ve vitreus alındıktan sonra kalan posterior segmentten retinal tabaka ve optik sinir

diseksiyonu yapılarak çıkarılan dokular sıvı nitrojen içerisinde hemen dondurulmuş ve ardından -80 °C derin dondurucuda deneysel çalışmaya uygun şekilde saklanmıştır.

3.8. Retinal NOS-2 protein miktarının belirlenmesi

Prensip: Western Blot Analizi için retina homojenatlarından elde edilen proteinler sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıldıktan sonra jeldeki proteinler nitroselüloza transfer edilerek anti NOS-2 antikoru ile inkübe edilmişlerdir. Daha sonra ortama peroksidaz bağımlı sekonder antikor ilave edilerek immünoreaktif bantlar kemilüminesans yöntemiyle gözlenmiştir.

İşlemler: Nitrik oksit sentaz-2 enzim miktarının kalitatif tayini PAGE-western blot yöntemiyle yapılmıştır (Şekil 3.1). Retinal tabaka ve optik sinir diseksiyonu yapılarak çıkarılmış ve dondurulmuş dokular 4°C'daki homojenizasyon tamponu içerisinde (50 mM K₂HPO₄, 80 µM leupeptin, 2.1 mM Pefabloc SC, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, pH 7.4) homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 23,000 x g'de 40 dk, 4°C'da santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda protein konsantrasyonu 595 nm'de Coomassie reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Bu ölçümde bovine serum albumini de standart olarak kullanılmıştır. Elde edilen protein homojenatı Laemli tamponu ile 1:2 oranında karıştırılarak, %9'luk poliakrilamid jele tatbik edilerek elektroforetik ayrımı sağlanmıştır. Jelde ayrılan proteinler, selüloz asetata transfer edilerek western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrılan doku proteinleri primer anti NOS-2 antikoru içerisinde (1:1000 dilüsyonda) bir gece bekletildikten sonra horseradish peroksidaz (HRP) bağlı sekonder antikor (1:10000 dilüsyonda) ile muamele edilmiştir. Reaktif doku proteinleri kemilüminesans yöntemiyle belirlenmiştir.



Şekil 3.1. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi (112)

Nitrik Oksit Sentaz-2 Aktivitesinin Hesaplanması: Görüntülenen protein bantlarının dansitometrik analizi, NIH image 1,61 software programı kullanılarak yapılmıştır.

3.9. Retinal Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü

Protein Karbonil ölçümleri ticari bir kit (Cat. #10005020. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapılmıştır (Tietze F. Enzymic method for quantitative).

Prensip: Protein karboniller DNPH ile reaksiyona girerek Schiff bazı oluştururlar ve son ürün olarak gösterilen protein hidrazon bileşikleri meydana gelir (Şekil 2.14). 360-385 nm'de absorbans veren bu bileşikler aracılığı ile protein karboniller spektrofotometrik olarak tayin edilir.

Reaktifler

- 1) Hidroklorik Asit
- 2) DNPH
- 3) TCA Solüsyon
- 4) Guanidin Hidroklorit
- 5) Etanol
- 6) Etil Asetat

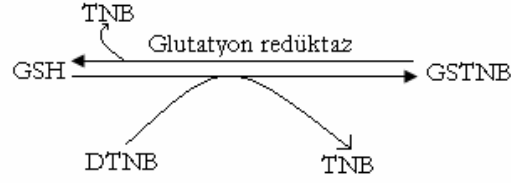
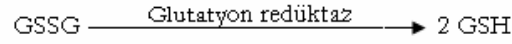
İşlemler: Dondurulmuş halde bulunan retinalar 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde homojenize edilip (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc.,Connecticut, USA) 4 C⁰'de 10,000 g'de 15 dak santrifüj edilerek süpernatanı atılmıştır. Her numuneden alınan 200'er µl olacak şekilde bir tüp numune tüpü, diğer tüp kontrol tüpü olmak üzere iki ayrı tüpe aktarılmıştır. Numune tüpüne 800 µl DNPH, kontrol tüpüne 800 µl HCl ilave edilerek 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bütün tüpler sırası ile %20 ve %10 TCA eklenerek 5 dak inkübe edilmiş ve her basamağın ardından 4 C⁰'de 10,000 g'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Pelet (1:1) etanol/etil asetat karışımı içerisinde resüspanse edilerek 4 C⁰'de 10,000 g'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Bu basamak iki kere daha tekrarlanıp son yıkamadan sonra protein peletleri 500 µl guanidin hidroklorit içerisinde vortekslenerek resüspanse edilmiş ve 4 C⁰'de 10,000 g'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Absorbanslar, 360-385 nm arasında bir dalga boyunda plate reader kullanılarak ölçülmür.

Protein Karbonil miktarının hesaplanması: Kontrol örneklerinin ortalama absorbansı numune örneklerinin ortalama absorbansından çıkartılarak absorbans değeri elde edilmiş ve bu değerler dilüsyon faktörü ile çarpılıp Dinitrofenilhidrazin için 370 nm'de molar absorblama katsayısı ve (mg/ml) protein miktarına bölünerek karbonil miktarı (nmol/mg) olarak ifade edilmiştir.

3.10. Retinal Okside Glutasyon (GSSG) ve Redükte Glutasyon (GSH) Miktarının Ölçümü

GSH ve GSSG ölçümleri ticari bir kit (Cat. #703002. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapılmıştır (Tietze F. Enzymic method for quantitative).

Prensip: GSH'nın sülfidril grubu, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girer ve ürün olarak sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoik asit (TNB) meydana çıkar. Oluşan TNB miktarı GSH oluşum miktarı ile orantılıdır. Bu nedenle 405 nm'de TNB miktarını tayin etmek GSH miktarının tam olarak ölçülmesini sağlar.



Reaktifler:

- 1) Metafosforik asit tamponu (MES, 2X)
- 2) GSSG standardı
- 3) Kofakör karışımı
- 4) Enzim karışımı
- 5) DTNB
- 6) Trietanolamin reaktifi (TEAM, 4 M)
- 7) 2-Vinil-pridin (1 M)

İşlemler: Dondurulmuş halde bulunan retinalar 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde homojenize edilip (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc.,Connecticut, USA) ve 4 C⁰'de 10,000 g'de 15 dak santrifüj edilerek süpernatanı atılmış ve deproteinizasyon işlemine geçilmiştir. 150 µl doku süpernatantı içerisine 150 µl MPA reaktifi ilave edilerek oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben 5000g'de 5 dakika santrifüj yapılarak her bir dokudan elde edilen süpernatantlar GSH ve GSSG ölçümleri için iki ayrı ependorf tüpe 100 er µl olacak şekilde aktarılmıştır. GSH ölçümü için 100 µl süpernatant üzerine 5 µl TEAM reaktifi ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışımdan alınan 50 µl numune üzerine, 2-N-morfolin etan sülfonik asit (MES), kofaktör karışımı (NADP ve glukoz-6-fosfatın liyofilize formunu içerir), enzim karışımı (glutasyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içerir), DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit) ve distile su içeren 150 µl ölçüm kokteyli ilave edilerek karanlıkta inkübe edilmiştir. 25 dakikalık inkübasyonu takiben 405 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Okside glutasyon tayini için 100 µl doku süpernatantı üzerine 1 µl 2-vinilpiridin ilave edilerek 60 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemden sonra GSH ölçümündeki basamaklar aynen takip edilmiştir.

GSH ve GSSG Miktarlarının Hesaplanması: Okside glutasyon standardı aynen numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturulmuştur. Dokulardaki GSH ve GSSG miktarları bu grafikler yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.11. Protein Tayini

Retinada protein tayini modifiye Bredford yöntemine dayanan kit ile yapılmıştır (262).

Reaktifler:

- 1) Standart solüsyon: 2 µg/ µl bovin serum albümin (Albümin Bovina, Sigma, A-8022)
- 2) CPPA reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210)

İşlemler: 1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklenmiş ve 595 nm'de absorbands spektrofotometrik olarak okunmuştur. Standart çalışması ise, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır.

Protein Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki protein miktarı standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.12. Retinal Apoptozisin Belirlenmesi

Apoptozis ölçümleri ticari bir kit (Cat. # QIA33. Calbiochem EMD Biosciences, Inc.) ile yapılmıştır.

Prensip: Bu kit lam üzerine Fragment End Labeling (FragELTM) ile fikse edilmiş parafine gömülü doku kesitlerinde apoptotik nükleusların DNA'sının tanımlanmasına imkan vermektedir. Bu deneyde TdT apoptotik sinyallere cevaben oluşan DNA fragmanlarının 3'-OH ucuna biotin ile işaretlenmiş deoksinükleotidlerin eklenmesini katalizler. Streptavidine bağlanmış haldeki HRP biotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Diaminobenzidin DNA fragmantasyon bölgelerinde işaretlenmiş örnekler ile reaksiyona girerek çözünmeyen renkli bir substrat oluşturur. Apoptotik hücrelerde Metil green kahverengiye dönüşürken, apoptotik olmayan hücrelerde metil green renk değişimi gözlenmez. Böylelikle normal ve apoptotik hücrelerin belirlenmesi sağlanır.

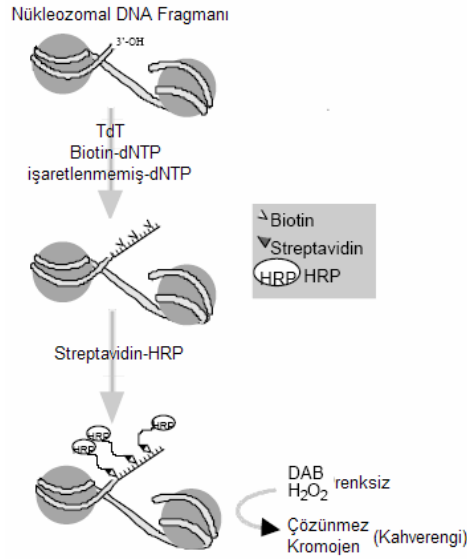
Reaktifler:

- 1) Proteinaz K: 10 mM Tris içerisinde 2 mg/ml Proteinase K, pH 8
- 2) 5X TdT Denge Tamponu: 1 M Sodium Cacodilate, 0.15 M Tris, 1.5 mg/ml BSA, 3.75 mM CoCl₂, pH 6.6
- 3) TdT işaretleme reaksiyon karışımı
- 4) TdT enzimi: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
- 5) Durdurma Tamponu: 0.5 M EDTA, pH 8
- 6) Bloklama Tamponu: PBS içerisinde 4% BSA
- 7) 50X Konjugat: Peroksidaz streptavidin konjugatı: 50-kat konsantre solüsyon
- 8) DAB Taletleri: 3,3'Diaminobenzidine (0.7 mg/tablet)
- 9) H₂O₂/Üre Taletleri: H₂O₂/üre (1.6 mg/tablet)
- 10) Metil Green boyası: 0.3% Metil green

İşlemler:

Parafine gömülü doku örnekleri kesit alınarak lam üzerine aktarıldı. Lamlar oda ısısında 5 dak ksilenden ve ardından %100, %90, %80 ve %70 etanol serilerinden geçirilerek TBS ile yıkandı. Ardından oda ısısında 20 dak Proteinaz K ile inkübe edildi ve TBS ile yıkandı. Örnekler 20 dak süre ile 1 µg/µl DNase I ile inkübe edilip TBS ile yıkandı. Endojen peroksidazların inaktivasyonu için örnekler 5 dak süre ile 3% H₂O₂ ile inkübe edildi ve TBS ile yıkandı. Örnekler TdT Denge

Tamponu ile oda ısısında 20 dak kadar inkübe edildi. Ardından örnekler üzerine TdT ile işaretlenmiş DNA fragmanlarını optimize etmek için işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksिनुकлеотид karışımı içeren TdT işaretleme reaksiyon karışımı eklendi ve durdurma tamponu ile reaksiyon durduruldu. Örnekler oda ısısında 10 dak bloklama tamponu ile inkübe edildi. Ardından örnekler 10 dak DAB solüsyonu ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkandı. Örnekler metilen green ile muamele edilerek önce%100 etanol eklendi ardından ksilen içine alındı. Apoptozise uğramış hücreler DAB ile koyu kahverengi boyandı. Işık mikroskobu ile tüm numuneler değerlendirildi. Apoptotik olmayan hücrelerde renk değişimi olmadı ve metil green ile aynı renkte gözlemlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. DNA fragmanlarının 3'-OH ucunun biotin ile işaretlenmesi ve HRP bağlanması

3.13. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır, Normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc Testi, uymayanlarda ise nonparametrik olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır.

BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

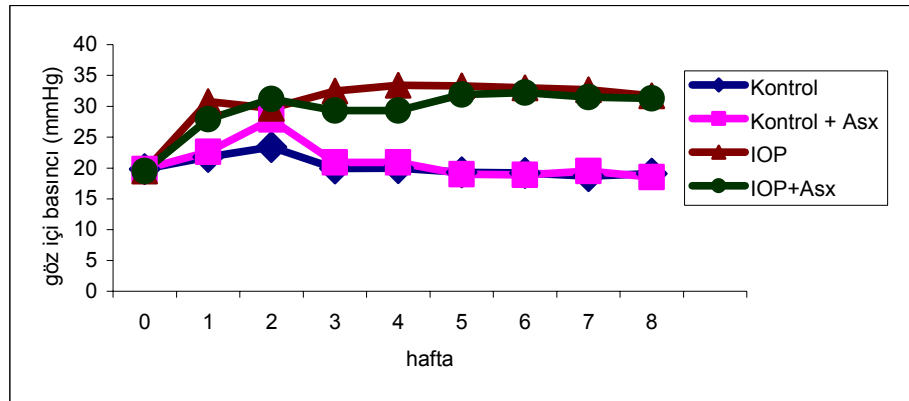
Deney süresince hayvanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

4.2. Ağırlık Değişimi

Deney gruplarının haftalara göre ağırlık değişimleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Deney süresi boyunca tüm deney gruplarındaki hayvanların haftalık vücut ağırlıkları takip edilmiş, grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

4.3. Göz İçi Basınç Ölçümü Sonuçları

Kontrol ve deney gruplarının IOP ölçümlerinin haftalık sonuçları Şekil 4.1’de verilmiştir. Albino Wistar ratlarında göz içi basınç artışını sağlamak amacı ile birinci hafta yapılan unilateral üç-damar koterizasyonu sonucunda göz içi basınç değerleri IOP ve IOP+ASX gruplarında artmıştır. IOP ve IOP+ASX gruplarına ait hayvanların göz içi basınç değerlerinin haftalara ve gruplara göre değişimi tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile incelenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05;0,093$). K ve K+ASX gruplarına ait hayvanların göz içi basınç değerlerinin haftalara ve gruplara göre değişimi tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile incelenmiş ve bu grupların göz içi basınç değerlerinin değişimi haftalara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05;0,001$) bu farklılık 2. haftadaki ölçümlerden kaynaklanmaktadır. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05; 0,123$). IOP ve K gruplarına ait hayvanların göz içi basınç değerlerinin gruplara göre değişimi tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile incelenmiş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05;0,001$). K+ASX ve IOP+ASX gruplarına ait hayvanların göz içi basınç değerlerinin gruplara ($p<0,05;0,001$) ve haftalara göre ($p<0,05;0,001$) değişimi tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile incelenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.



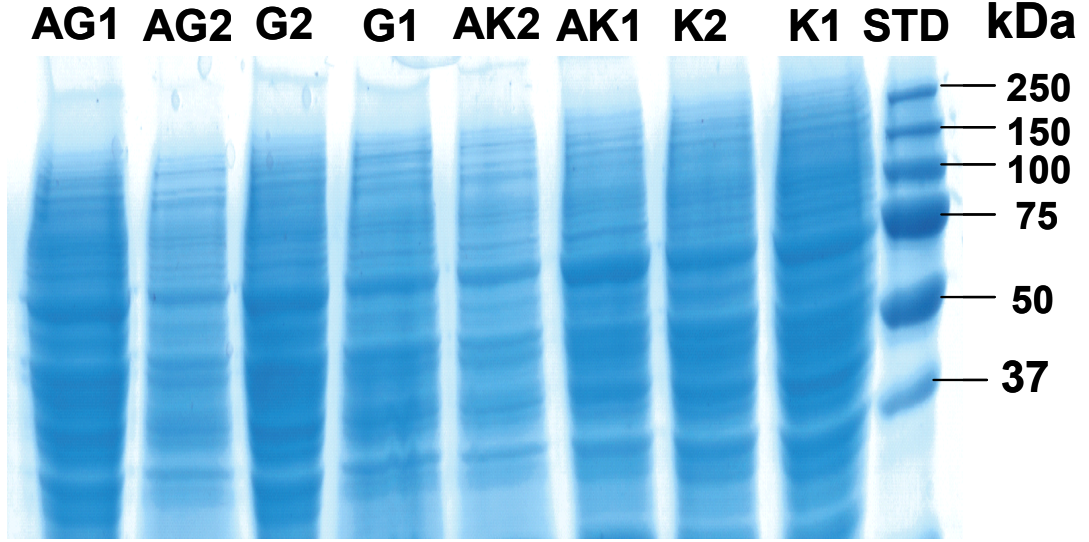
Şekil 4.1 Göz içi basınç değerlerinin haftalara göre değişimi grafiği

Tablo 4.1. Kontrol ve deney grubu hayvanların haftalık ağırlık değişimleri

Gruplar	1. hafta vücut ağırlığı (g)	2. hafta vücut ağırlığı (g)	3. hafta vücut ağırlığı (g)	4. hafta vücut ağırlığı (g)	5. hafta vücut ağırlığı (g)	6. hafta vücut ağırlığı (g)	7. hafta vücut ağırlığı (g)	8. hafta vücut ağırlığı (g)
Zeytinyağı alan kontrol grubu	341.87 ± 41.11	326.96 ± 48.40	339.35 ±42.91	349.13 ±38.57	367.83 ±36.05	345.03 ±39.25	348.20 ±33.02	346.57 ±36.71
Astaxantin alan deney grubu	340.00 ± 34.90	309.78 ± 27.32	328.91 ±31.55	339.09 ±34.46	342.27 ±42.56	332.01 ±32.55	347.39 ±30.25	345.13 ±35.80

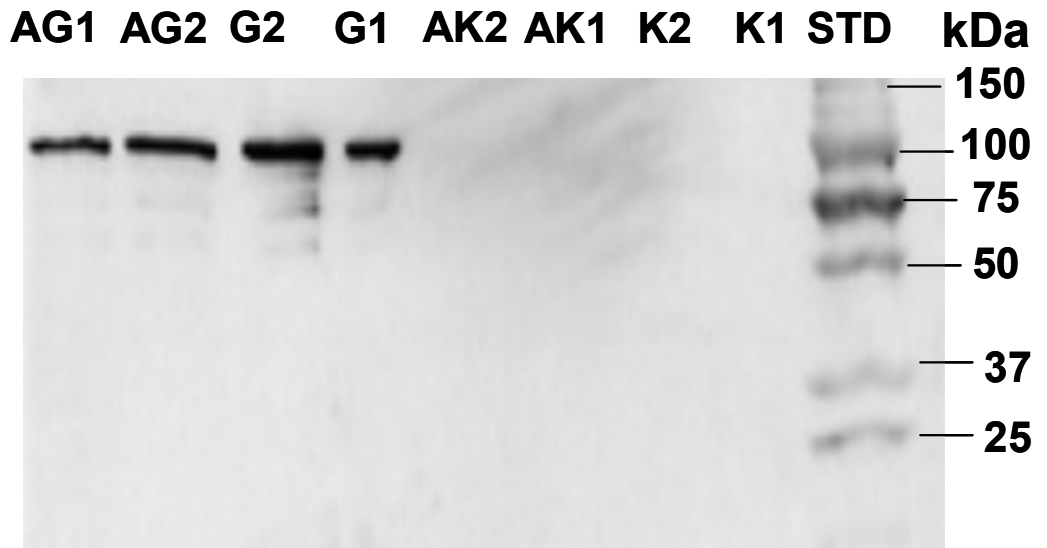
4.4. Retinal NOS-2 Protein Miktarı Sonuçları

Kontrol ve deney gruplarının retina dokularında yapılan protein boyaması sonuçları Şekil 4.2’de verilmiştir. Her kuyucuğa eşit miktarlarda protein içeren doku süpernatantı konulduğu şekilde gözlenen bantların aynı olması ile teyit edilmiştir.



Şekil 4.2 Retina Protein Boyaması

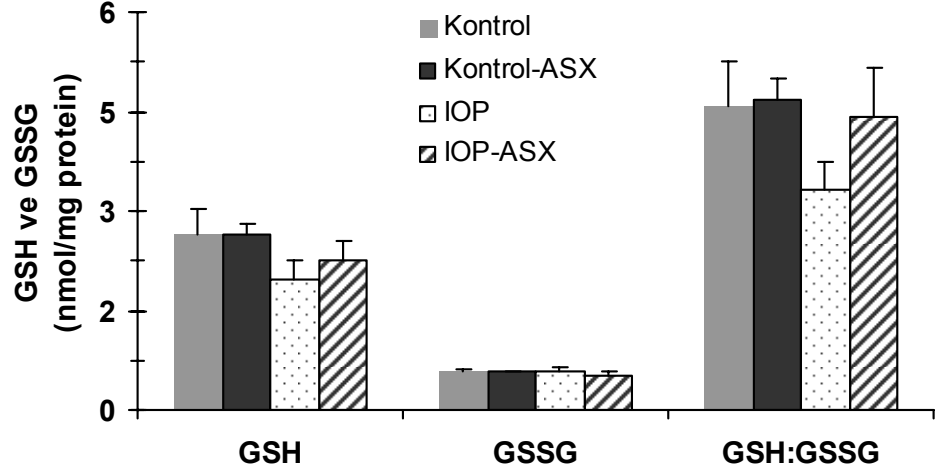
Kontrol ve deney gruplarının retina dokularında gerçekleştirilen NOS-2 western blot analizi Şekil 4.3’te verilmiştir. Kontrol gruplarında NOS-2 protein bantlarına rastlanmadığı halde glokom oluşturulan gruplarda NOS-2 protein bantları gözlenmiştir. Ayrıca astaksantin verilen glokom oluşturulmuş ratlarda NOS-2 bantlarının glokom oluşturulmuş ancak astaksantin tedavisi almamış ratlardakine göre daha koyu boyandığı dikkat çekmektedir.



Şekil 4.3 Retina NOS-2 western Blot Analizi

4.5. Retina Redükte Glutasyon ve Okside Glutasyon Aktivite Sonuçları

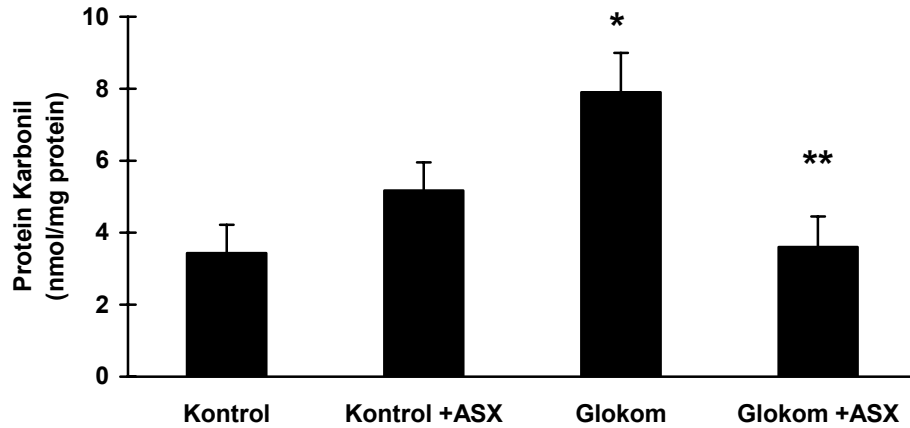
8'er rattan oluşturulan gruplardan elde edilen retina dokusu GSH, GSSG ve GSH/GSSG oranları Şekil 4.4'te verilmiştir. Göz içi basınç artışının GSH ve GSSG oranını azalttığı, ancak bu azalışın istatistiksel olarak önemli bir düzeye ulaşmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.4. Retina GSH, GSSG ve GSH/GSSG değerleri

4.6. Retinal Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü Sonuçları

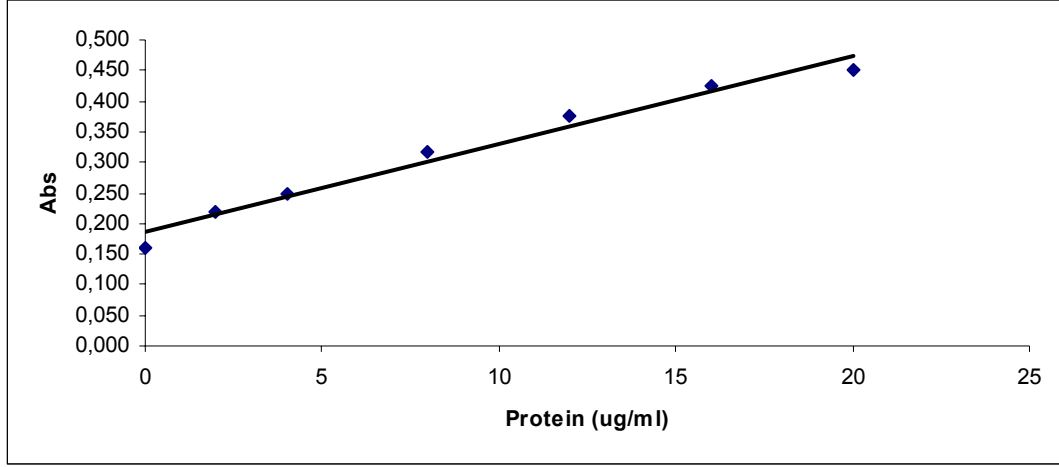
6'şar hayvandan oluşan gruplarda retina dokusu protein karbonil içeriği tayini ile elde edilen ölçüm değerleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında IOP grubunun protein karbonil içeriğinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeye arttığı gözlenmiştir. IOP+ASX grubunun protein karbonil içeriği ise IOP grubuna göre fark edilir düzeyde azalmıştır.



Şekil4.5. Retina Protein Karbonil değerleri

4.7. Protein Standardı Grafiği

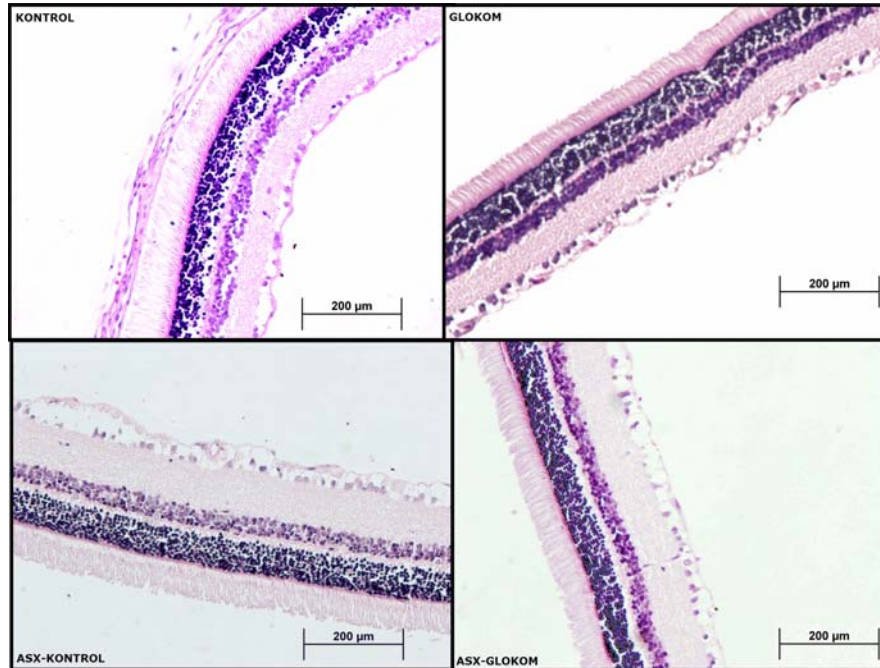
Standart olarak Bovin Serum Albüminin kullanıldığı standart grafik Şekil 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Protein Standart Grafiği

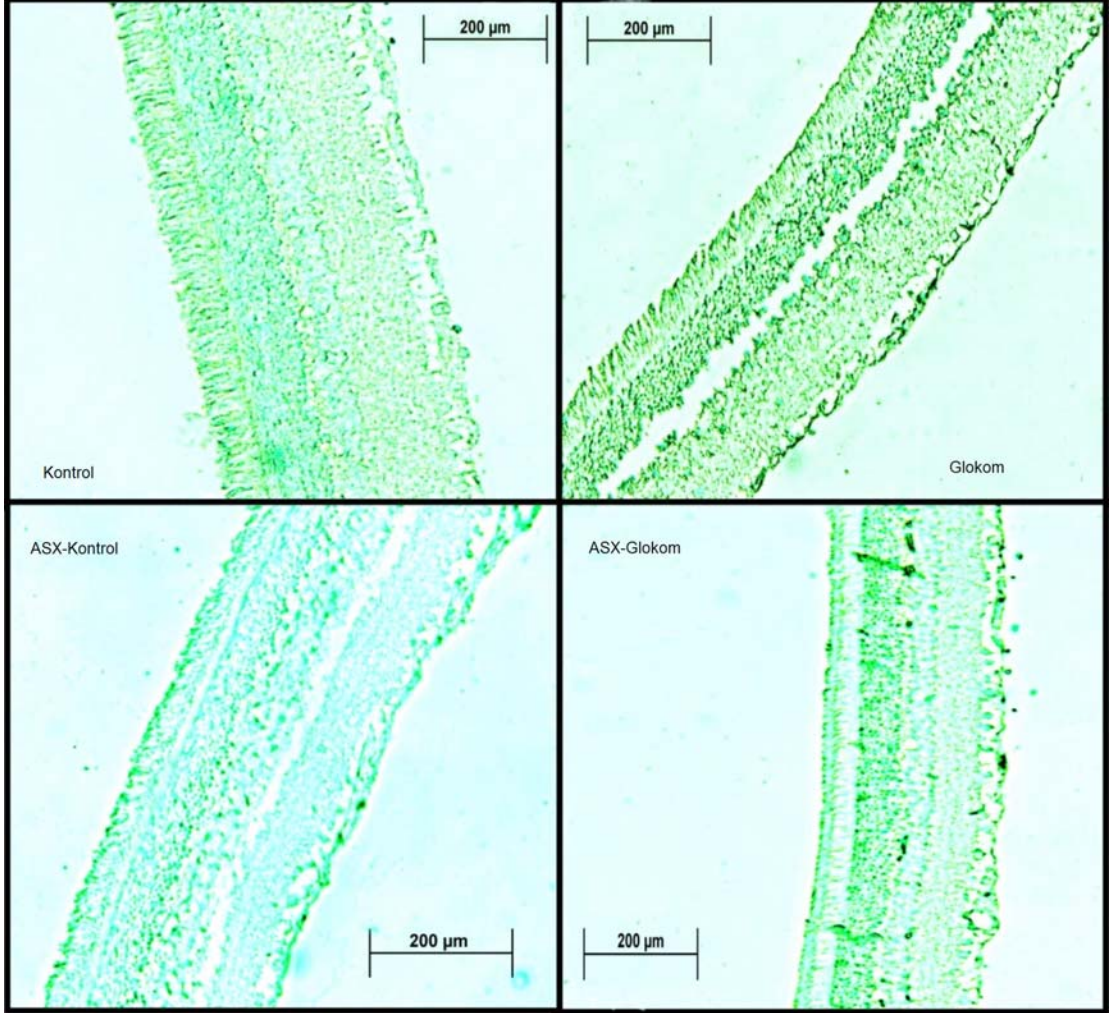
4.8. Retinal Apoptozis Sonuçları

Her gruptan 6'şar hayvan çalışılmış ve her gruptan birer hayvanın örnek olarak gösterildiği retinal doku hematoksilin eozin ile boyama bulguları Şekil 4.7'de gösterilmektedir. Glokomda göz içi basınç artışından dolayı baskıya maruz kalan retinanın gözle görülür şekilde incelmeği saptanmıştır. Astaksantin verilen göz içi basınç artışına bağlı glokom oluşturulan (ASX-glokom) grubunda ise bu baskılanmanın azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Retinanın hematoksilin eozin boyaması

Dört grup için birer hayvana ait retinal apoptozis boyaması fotomikrografik olarak Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Glokom grubunda gangliyon hücre tabakası ile iç ve dış nükleer tabakalarda apoptotik hücreler görülmektedir. Astaksantin tedavisi alan göz içi basınç artışına bağlı glokom oluşturulan ASX-glokom grubunda ise apoptozise uğramış hücrelerin azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.8. Retinal Apoptozis Boyaması

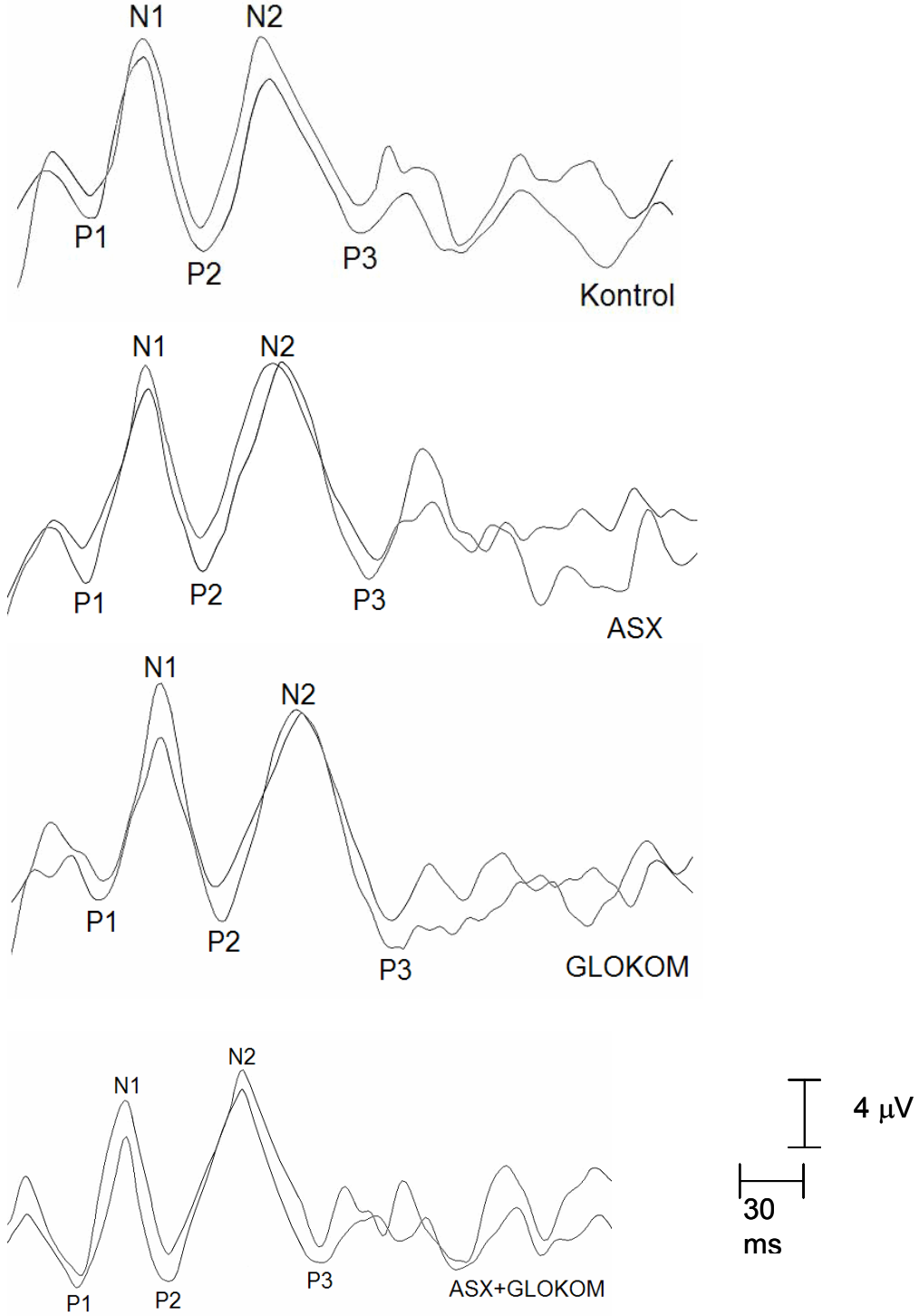
4.9. Görsel Uyarılma Potansiyeli Sonuçları

Görsel uyarılma potansiyelleri sağ ve sol gözler flaş uyarıcı ile ayrı ayrı uyarılarak monoküler olarak kaydedilmiştir. Dört grup için elde edilen VEP'lere birer örnek Şekil 4.9’de sunulmuştur. Görsel uyarılma potansiyeli parametrelerinin grup farklılıkları varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiştir.

Görsel uyarılma potansiyellerinin latens ve genliklerinin ortalama değerleri, standart sapmaları ve Tukey testi sonuçları Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’de görülmektedir. ASX grubunun P1, N1, P2, N2 ve P3 latensleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında latenslerin değişmediği görülmüştür. Ancak IOP grubunda tüm bileşenlerin latenslerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uzadığı saptanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede IOP+ASX grubuna ait tüm

bileşenlerin latenslerinin IOP grubuna göre fark edilir düzeyde kısaldığı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farkı olmadığı bulunmuştur.

Tepeden tepeye genlik değerleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4.9. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen VEP'ler ve bileşenleri

Tablo 4.2. Kontrol ve Deney grubu hayvanlarından kaydedilen VEP latensleri (ms) * : p<0.001 K grubundan fark, #: p<0.001 IOP grubundan farklı.

Gruplar	P ₁ (ms)	N ₁ (ms)	P ₂ (ms)	N ₂ (ms)	P ₃ (ms)
K	20.17±0.90	35.13±1.96	50.40±1.60	68.90±2.84	94.47±1.95
K+ASX	20.74±0.85	36.47±2.03	51.55±2.65	71.03±3.01	95.08±2.21
IOP	24.13±1.06 K*	39.58±1.41 K*	55.78±2.04 K*	77.06±1.17 K*	100.92±1.22 K*
IOP+ASX	20.73±0.86 IOP*	36.23±1.60 IOP*	51.14±2.71 IOP*	70.85±3.77 IOP*	93.69±1.93 IOP*

Tablo 4.3. Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen genlikler (µV)

Gruplar	P ₁ N ₁ (µV)	N ₁ P ₂ (µV)	P ₂ N ₂ (µV)	N ₂ P ₃ (µV)
K	5.86±1.33	5.65±1.75	5.51±1.45	5.87±1.55
K+ASX	6.17±1.57	5.89±0.91	6.61±1.66	6.04±1.42
IOP	6.26±1.10	6.15±1.44	5.30±1.47	6.10±1.45
IOP+ASX	6.27±1.45	4.97±1.20	6.27±1.08	6.18±1.33

TARTIŞMA

Glokom dünya çapında beş milyondan fazla insanı etkileyen görsel bozuklukların en büyük sebebidir (263). Tuck ve ark. artan yaş ile birlikte özellikle 55 yaşından sonra glokom prevalansının da arttığını rapor etmişlerdir (264). 6250 yaşlı insan üzerinde yapılan bir popülasyon çalışması yaşları 55 ile 64 arasında değişenlerde görme alanı kaybı prevalansının %3, 85 ve üzeri yaşlarda ise prevalansın %19 olduğunu göstermiştir. Bu çalışma görme alanı kaybına en sık sebebinin glokom olduğunu vurgulamaktadır (265). Gelişmiş ülkelerde glokomun ilerideki prevalansı artmaya yatkındır ve büyük bir halk sağlığı problemi olacaktır bu nedenle tarama morbiditenin düşürülmesinde çok büyük öneme sahip olabilir (266) (267). Populasyona dayalı çalışmalar her on kişiden birinde sonunda mutlaka glokom gelişeceğini ve bu durumun glokomu çok yaygın bir hastalık yaptığı göstermiştir (268).

Glokomun görsel sistemde oluşturduğu değişikliklere ışık tutmak amacıyla çalışmamızda, elektrofizyolojik parametrelerden biri olan görsel uyarılma potansiyelleri tercih edilmiştir. Glokomun; patolojik etkilerine paralel olarak, görsel uyarılma potansiyellerinde de önemli değişiklikler oluşturduğu daha önceki çalışmalarda saptanmıştır (269) (270). Görsel uyarılma potansiyelleri görsel sistemin fonksiyonel araştırmasında ve optik yol patolojilerinin değerlendirilmesinde kullanılan duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir. Özellikle VEP latenslerinin optik yol patolojisine paralel olarak uzadığı ve bu nedenle VEP'lerin klinik amaçla kullanılabileceği birçok çalışmada vurgulanmıştır (54) (57) (56) (58). Hem maküler bozukluklar hem de optik sinir hastalıkları VEP üzerine etkilere sahiptir. Ayrıca, sıçanların görsel sisteminin insanlara benzer olması nedeniyle, sıçanlarda yapılan böyle bir çalışmanın insan görsel sisteminin incelenmesi yönünden iyi bir model olduğu da düşünülmektedir. Amplitüdlerin orta alan kayıtlarını önemli ölçüde değiştirebilmesinden dolayı ölçüm için latens daha güvenilir bir parametredir (271). Good ve ark., insanlar üzerinde yaptıkları çalışmada kronik glokomda tepeden tepeye genlik değerlerini incelemişler ve VEP P1 bileşeninin azaldığını ve P2'nin değişmediğini göstermiştir (272). Aynı çalışma P1 ve P2 dalgalarının kaynaklarının farklı olduğunu ve P1'in maküler alandan kaynaklanmadığını savunmaktadır. Bu amaç doğrultusunda 51 kronik glokom hastası ve 82 normal kontrol grubunda yapılan bu çalışmada kritik değer olarak 4 μ V alındığında P1 amplitüd dağılımının gruplar arasında anlamlı bir farka sahip olduğunu fakat P2 amplitüd cevabının iki grup arasında anlamlı bir farka sahip olmadığı gösterilmiştir. P1'in kritik değere eşit ya da yüksek olduğu 7 glokomlu göze sahip hasta yıllar sonra incelendiğinde yüksek IOP'ye sahip olsalar bile kusursuz görme alanına sahip oldukları bulunmuş ve bu bulgu ışığında glokoma bağlı hasarın gelişmediği önerilmiştir. P1'in kritik değerden düşük olduğu 13 glokomlu göze sahip hastada ise görme alanı kaybı bulunmamaktaydı. Bu durumda olan hastalar yıllar sonra incelendiğinde yüksek IOP'ye sahip olarak bulunmuştur. Bu verilerin sonucunda 13 hastanın oküler

hipertansiyona sahip olduğu ve 7 hastanın düşük P1 komponentine sahip olduğu bulunmuştur. Bu veriler flaş VEP P1 komponenti amplitüdünün 4 μ V altına düşmesi ile meydana gelen bu azalmanın glokoma bağlı sinir lifi kaybının bir ölçütü olduğunu ve sinir lifi bütünlüğü kaybını gösterebileceğini ileri sürmektedir. Araştırmacılar flaş VEP'in glokomun erken tanısı ve değerlendirilmesi için yararlı olabileceğini ayrıca görme alanı kaybı olmadan hasarın tespit edilebileceğini ileri sürmektedir. P1 amplitüdünün 4 μ V üzerinde olması iyi bir prognozu işaret etmekte ve bu komponentin takibi glokomun tedavisinde ve kontrolünde yardımcı olmaktadır. Çalışmamızda ise tepeden tepeye genlik değerleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu durumu açıklayabilmek için ileri çalışmalara gerek olduğu düşünülmektedir. Özet olarak, daha önceki araştırmalarda da belirtildiği gibi (271) genliklerle kıyaslandığında VEP latenslerinin görsel sistem değişikliklerini ortaya koyan daha duyarlı ve önemli bir parametre olduğu ortaya konmuştur. Glokom hastalarında latenslerin uzadığını gösteren birçok çalışmada rapor edilmiştir (273) (274) (275). Glokoma bağlı olarak VEP latenslerinde meydana gelen uzama glokomun oksidan stresi tetikleyerek görsel sistem hasarına neden olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda ASX grubunun latensleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında latenslerin değişmediği görülmüştür. Ancak IOP grubunda tüm bileşenlerin latenslerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uzadığı saptanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede IOP+ASX grubuna ait tüm bileşenlerin latenslerinin IOP grubuna göre fark edilir düzeyde kısaldığı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farkı olmadığı bulunmuştur.

Kontrol hayvanlarında bulunan VEP latensleri daha önce yapılan çalışmalar ile (276) (277) ve diğer başka laboratuvarlarda gerçekleştirilen çalışmalarla uygunluk göstermektedir (278). Kontrol ile karşılaştırıldığında IOP grubunda tüm VEP bileşenlerinin uzaması, glokomun görsel sistemi önemli derecede etkilediğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, astaksantin verilen IOP grubunda VEP latenslerinin IOP grubuna göre önemli derecede kısılması VEP değişikliklerinin gangliyon hücre ölümü ile ilişkili olduğunu ve astaksantin tedavisinin gangliyon hücre ölümünü azaltmasından dolayı latenslerin kontrol seviyelerine kadar kısaldığını gösteren bir kanıttır.

Astaksantin glokoma bağlı VEP değişiklikleri üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıran astaksantin IOP artışına bağlı olarak gelişen glokomun oluşturduğu VEP değişikliklerini düzeltmesi, bu antioksidanın görsel sistem üzerine olumlu etkilerinin olduğunu vurgulamıştır. Bu da astaksantin görsel sistemi etkileyen hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Astaksantin serbest radikallere elektron vermektense onlara uzun ve çift bağ içeren zincirini ekleyerek onları yakalar. Astaksantin eşsiz kimyasal yapısı ve hücredeki lokalizasyonu itibarı ile hücre membranını korur. Astaksantin polar son grupları çift tabakalı hücre membranında yayılım göstererek hücre membranını stabilize eder, sertliğini ve mekanik gücünü artırır (279). Ayrıca astaksantin yakaladığı serbest radikallerin hücrenin polar kısımlarına taşınmasında köprü görevi

görür. β -karoten çift tabaka lipit membranının içinde, vitamin C sadece lipit membranının dış yüzeyinde astaksantin molekülü ise hücrenin hem iç hem de dış kısmında yerleşiktir ve böylece daha iyi koruyuculuk sağlar (244). UV-ışığın oluşturduğu singlet oksijeni ve triplet oksijeni nötralize eder. Etkin bir taşıyıcı olan lipoproteine bağlanarak biyoyararlanımını sağlar. Antikor üreten hücrelerin ve interlökin 2'nin üretimini ve interferon gama baskılanmasını artırarak immün sistem fonksiyonunu arttırır (280). İnflamasyona neden olan reaktif oksijen türlerini inhibe eder. Vitamin E ve Vitamin C'nin antioksidan aktivitesini arttırır. İhtiyaç durumunda karaciğerden Vitamin A salınımını sağlar. Ohno S. ve grubunun üveyit hastalarında astaksantin kullanımı ile yaptıkları çalışmalarda astaksantin nöroprotektif etkileri vurgulanmıştır (281) (282). Yapılan son çalışmalar IOP'nin düşürülmesinin glokoma bağlı görme kaybı oranını düşüreceğini teyit etmektedir (283). Glokomda ise astaksantin etkileri henüz gösterilmemiştir.

Glokomun meydana getirdiği yapısal değişikliklerin temelini oksidatif hasarın oluşturduğunu gösteren birçok çalışma vardır (175) (12). Protein oksidasyonu in vivo oksidatif stresin belirlenmesinde yararlı bir markıdır. Oksidatif stres markırı olarak protein karbonil lipit peroksidasyon ürünlerine göre okside proteinlerin daha stabil olmasından dolayı daha avantajlıdır. Yağcı ve ark. yapmış oldukları çalışmada, oksidatif stresin proteinler üzerinde oluşturduğu hasarın miktarının belirlenmesi amacı ile glokomun tanımlanabilir sebeplerinden olan psödoeksfolasyon (PEX) sendromuna (284) sahip 29 hasta ve 27 kontrole ait aköz humor örneklerinde protein karbonil seviyeleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (285). Psödoeksfolasyon sendromuna sahip hastaların aköz humor (2.18 ± 1.51 nmol/l) protein karbonil konsantrasyonu kontrol aköz humor (1.31 ± 0.47 nmol/l) örneklerine göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Artmış aköz humor protein karbonil seviyeleri psödoeksfolasyon sendromu fizyopatolojisinde protein oksidasyonunun rol oynayabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda protein karbonil içeriği ölçülmüş ve IOP artışının meydana getirildiği IOP grubunda protein karbonil içeriği kontrol grubuna göre önemli düzeye yüksek bulunmuştur. Astaksantin tedavisi alan göz içi basınç artışı grubunun protein karbonil içeriği ise IOP grubuna göre fark edilir düzeyde azalmıştır. Bu da glokomda astaksantin protein karbonil seviyelerini düşürücü yönde etkisinin olabileceğini göstermektedir. Literatürde hanüz glokomda protein karbonil içeriği üzerine karotenoidlerin etkisi ile ilgili olarak yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

Gözde bulunan önemli bir antioksidan olan GSH organizmanın genotoksik ajanlara karşı korunmasında büyük rol oynar (286). Süperoksit dismutaz-CAT sistemi göz dokularını H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarına karşı korurken GSH ise göz dokularını düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'nin neden olduğu hasara karşı korur (220) (218). Aköz humor (60) ve trabeküler ağda (287) GSH yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda önemli bir molekül olduğundan dolayı çalışmamızda bir tripeptid olan GSH'nın IOP artışına bağlı olarak oluşturulan deneysel glokom modelinde değişimleri incelenmiştir. Göz içi basınç artışı (kontrol grubuna göre) retina GSH seviyelerinde %26 düşüşe neden olmuştur. Astaksantin uygulanması IOP artışının neden olduğu glokomlu gözlerde GSH seviyelerinde %15 artış sağlamıştır. Glokomda oksidatif

hasarın önemi glokomdan etkilenen hastalarda aköz humor total antioksidan potansiyelinde tükenme (3) ve plazma GSH seviyelerinde azalma (36) ile de gösterilmiştir. Yüksek IOP'nin neden olduğu oksidatif stresin retinal dokuda GSH seviyelerini düşürdüğü Moreno ve ark. tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir (175). Glutasyon, IOP artışına bağlı olarak oluşturulan glokom modelinde oksidatif stresin neden olduğu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ve hücre hasarına neden olan H₂O₂'nin elimine edilmesi için kullanılır. Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sırasında gerçekleşen dönüşümler GSH'nin indirgenmesine ve yükseltgenmesine neden olur. Çalışmamızdaki GSH seviyelerindeki azalma, IOP artışının neden olduğu oksidatif ajanların ortadan kaldırılması için oksitlenmesine bağlanabilir. Bu da retinada oksidan stresin glokoma bağlı olarak arttığını gösteren diğer bulgularımızla paralellik taşımaktadır.

Nitrik oksit sentaz-2 ekspresyonu sonucu meydana gelen NO, oksidasyon ve nitrasyon reaksiyonları verebilen sekonder türlerin oluşumuna neden olarak sitotoksik ve inflamatuvar yanıtın gelişmesinde rol oynar. Göz içi basınç artışının NOS-2 ekspresyonunu arttırdığı Aslan ve ark. tarafından yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (21). Nitrik oksit sentaz-2 inhibisyonunun görme kaybını önleyebileceği düşünülmektedir. Astaksantin rat makrofaj hücre kültürlerinde NOS-2 ekspresyonunu inhibe ettiği western blot analizi ile gösterilmiştir (288). Ohno S. ve ark. astaksantin doza bağımlı olarak NOS enzim aktivitesini inhibe ederek aköz humorda NO üretimini baskıladığını göstermişlerdir (282). Nitrik oksit sentaz-2 inhibisyonunun gangliyon hücrelerinin glokomun yarattığı dejenerasyona karşı korumasını desteklediği gösterilmiştir (190). Çalışmamızda IOP artışına bağlı olarak geliştirilen glokomun retina dokusunda oluşturabileceği moleküler oksidasyonun tespit edilmesi amaçlanmış ve bu doğrultuda retina NOS-2 enzim miktarının kalitatif tayini yapılmıştır. Bu analiz sonucunda kontrol ve astaksantin alan kontrol gruplarında NOS-2 proteininin ekspresyonu gözlenmemiştir. Bu bulgu kontrol ve astaksantin alan kontrol gruplarında inflamatuvar yanıtın gelişmediğini göstermektedir. Göz içi basınç artışına bağlı olarak oluşturulan glokomlu gözlerle ait retina dokusunda NOS-2 proteininin ekspresyonu gözlenmiş fakat astaksantin alan glokomlu grupta ise NOS-2 proteininin ekspresyonu glokomlu gruba göre azalmıştır. Bu da bize astaksantin glokomun meydana getirdiği inflamatuvar yanıtı azaltabileceğini göstermektedir.

Oküler hipertansiyon hayvan modellerinde IOP artışının retinal hücrelerde apoptozisi arttırdığı Aslan ve ark. tarafından rapor edilmiştir (21). Nitrik oksit sentaz-2 tarafından meydana getirilen NO'nin retinal apoptozise yol açtığı düşünülmekte fakat NO aracılı apoptozisin mekanizması halen açıklanamamaktadır. NO'nin yol açtığı apoptozis, p53'ü aktive ederek apoptozise neden olduğu rapor edilen DNA hasarının bir sonucu olabilir (31). Çalışmamızda da glokomun gangliyon hücre tabakası ile iç ve dış nükleer tabakalarda meydana getirdiği apoptozis gösterilmiştir. Gangliyon hücre tabakası ile iç ve dış nükleer tabakalarda artmış olan apoptotik hücreler apoptozisin NOS-2 uyarımıyla gerçekleştiğini desteklemektedir. Artmış IOP retinada, NO üretimini uyararak patojenik değişimleri şiddetlendirebilir. Çalışmamızda astaksantin alan glokomlu grupta (ASX-glokom) apoptozisin glokom grubuna göre azaldığı gösterilmiştir. Retinal hücrelerde karotenoid grubundan retinoik asidin anti apoptotik aktiviteye sahip olduğu Kholodenko ve ark. tarafından

bildirilmiştir (289). Benzer şekilde lutein ve zeaksantin fotoresptörleri oksidatif stresin neden olduğu apoptozise karşı koruduğu Chucair ve ark. tarafından gösterilmiştir (290). Astaksantin retinal apoptozisi azalttığı ilk kez bu çalışmada gösterilmektedir.

Oksidatif ve nitratif sürecin glokomun patogenezinde önemli rol oynadığına dair yeterince kanıt bulunmamaktadır. Ancak bütün bu deneysel veri dökümanlarına rağmen glokomda serbest radikal üretiminin primer mi yoksa sekonder mi geliştiğı halen anlaşılamamıştır. Trabeküler ağ hücrel komponentlerindeki oksidatif hasar ekstraselüler matriks yapısının regülasyonunu etkileyebilir ve aköz humor akışında değişmelere yol açabilir. Gözün akış sisteminde meydana gelen bu bozukluk IOP artışına yol açarak glokomun klinik başlangıcına sebep olabilir. Bu tip durumlarda oksidatif stres glokom patogenezinde sekonder bir olay olarak göz önünde tutulabilir. Artmış IOP ya da normal tansiyon glokom hayvan modellerinde retinal oksidatif hasar, RGC tabakasına direkt olarak zarar vererek GON'a yol açabilir. Bu hastalığa sahip kişilerde in vivo oksidatif stresi azaltmaya yönelik terapötik denemeler devam etmektedir. Koruyucu tedavinin etkili bir şekli hastalığın erken dönemlerinde girişimde bulunulması ve reaktif oksijen türlerinin üretildiğı spesifik bölgelerin hedeflenmesidir. Yapılacak yeni çalışmalar ve klinik denemeler glokomda nöronal dejenerasyonun mekanizmasının anlaşılmasını sağlayacak ve daha etkili tedavilerin dizayn edilmesine yardımcı olabilecektir.

Glokoma bağlı artış gösteren oksijen metabolitlerinin detoksifikasyonu oküler antioksidanlara oldukça bağımlıdır. Gerçekleştirilen bu projede oluşturulan deneysel glokom modelinde nöroprotektif ve antioksidan özelliğe sahip olan astaksantin etkisi araştırılmıştır. Bu karotenoidin glokomda oluşan oksidatif harabiyete olan etkileri henüz araştırılmamıştır ve literatürde yoktur. Bu anlamda çalışmanın tüm parametreleri orijinal ve literatüre ışık tutulacak niteliktedir. Glokomda görülen retinal harabiyetin gelişiminde önem teşkil eden faktörlere ışık tutulmuş ve edinilen bilimsel veriler yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde fayda sağlayacak niteliktedir.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

1. Unilateral üç-damar koterizasyonu yapılarak göz içi basınç artışı sağlanmıştır.
2. Glokomlu gruplarda NOS-2 ekspresyonu gösterilmiştir. Astaksantin NOS-2 ekspresyonunu azaltmıştır.
3. Glokom retina GSH seviyelerinde azalmaya sebep olmuştur.
4. Glokom retinada protein karbonil gruplarını arttırmıştır. Astaksantin protein karbonil gruplarını azaltmıştır.
5. Glokomun VEP latenslerini önemli ölçüde uzattığı gözlenmiştir. Astaksantin glokomun oluşturduğu VEP değişikliklerini düzelttiği gösterilmiştir.
6. Glokom retinada apoptozisi uyarılmış, astaksantin ise apoptazisi azaltıcı etki göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Quigley, H.A.E.M. Addicks, Chronic experimental glaucoma in primates. II. Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve head and axonal transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 19(2): 137-52, 1980.
2. Kamal, D.R. Hitchings, Normal tension glaucoma--a practical approach. *Br J Ophthalmol*, 82(7): 835-40, 1998.
3. Ferreira, S.M., S.F. Lerner, R. Brunzini, P.A. Evelson S.F. Llesuy, Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*, 137(1): 62-9, 2004.
4. Derin, N., P. Yargicoglu, M. Aslan, O. Elmas, A. Agar Y. Aiciguzel, The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health*, 22(6): 233-40, 2006.
5. Pang, I.H., E.C. Johnson, L. Jia, W.O. Cepurna, A.R. Shepard, M.R. Hellberg, A.F. Clark J.C. Morrison, Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(4): 1313-21, 2005.
6. Fechtner, R.D.R.N. Weinreb, Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol*, 39(1): 23-42, 1994.
7. Yan, D.B., F.M. Coloma, A. Metheetrairut, G.E. Trope, J.G. Heathcote C.R. Ethier, Deformation of the lamina cribrosa by elevated intraocular pressure. *Br J Ophthalmol*, 78(8): 643-8, 1994.
8. Salmon, J.F., Glaucoma. 17 ed. *General Ophthalmology*, ed. P. Riordan-Eva, Whitcher, J.P., Asbury, T., New York: McGraw-Hill. 212-222, 2008.
9. Sacca, S.C., A. Izzotti, P. Rossi C. Traverso, Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res*, 84(3): 389-99, 2007.
10. Zhou, L., Y. Li B.Y. Yue, Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J Cell Physiol*, 180(2): 182-9, 1999.

11. Izzotti, A., DNA damage and alterations of gene expression in chronic-degenerative diseases. *Acta Biochim Pol*, 50(1): 145-54, 2003.
12. Sacca, S.C., A. Pascotto, P. Camicione, P. CaprisA. Izzotti, Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 123(4): 458-63, 2005.
13. Gottanka, J., D.H. Johnson, P. MartusE. Lutjen-Drecoll, Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork. *J Glaucoma*, 6(2): 123-32, 1997.
14. Liu, B.A.H. Neufeld, Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*, 30(2): 178-86, 2000.
15. Marletta, M.A., Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*, 268(17): 12231-4, 1993.
16. Palmer, R.M., D.S. AshtonS. Moncada, Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333(6174): 664-6, 1988.
17. Lyons, C.R., G.J. OrloffJ.M. Cunningham, Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem*, 267(9): 6370-4, 1992.
18. Petros, A., G. Lamb, A. Leone, S. Moncada, D. BennettP. Vallance, Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res*, 28(1): 34-9, 1994.
19. Becquet, F., Y. CourtoisO. Goureau, Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol*, 42(1): 71-82, 1997.
20. Knowles, R.G.S. Moncada, Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 (Pt 2): 249-58, 1994.
21. Aslan, M., I. Yucel, Y. Akar, G. Yucel, M.A. CiftciogluS. Sanlioglu, Nitrotyrosine formation and apoptosis in rat models of ocular injury. *Free Radic Res*, 40(2): 147-53, 2006.
22. Shareef, S., A. SawadaA.H. Neufeld, Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(12): 2884-91, 1999.

23. Goureau, O., J. Bellot, B. Thillaye, Y. Courtois, Y. de Kozak, Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Immunol*, 154(12): 6518-23, 1995.
24. Sarih, M., V. Souvannavong, A. Adam, Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 191(2): 503-8, 1993.
25. Hu, J.L.J. Van Eldik, S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1313(3): 239-45, 1996.
26. Heneka, M.T., P.A. Loschmann, M. Gleichmann, M. Weller, J.B. Schulz, U. Wullner, T. Klockgether, Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem*, 71(1): 88-94, 1998.
27. Reed, J.C., Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157(5): 1415-30, 2000.
28. Saeki, K., N. Kobayashi, Y. Inazawa, H. Zhang, H. Nishitoh, H. Ichijo, K. Saeki, M. Isemura, A. Yuo, Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem J*, 368(Pt 3): 705-20, 2002.
29. Jun, C.D., C.D. Oh, H.J. Kwak, H.O. Pae, J.C. Yoo, B.M. Choi, J.S. Chun, R.K. Park, H.T. Chung, Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways. *J Immunol*, 162(6): 3395-401, 1999.
30. Hortelano, S., A.M. Alvarez, L. Bosca, Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *Faseb J*, 13(15): 2311-7, 1999.
31. Kim, Y.M., C.A. Bombeck, T.R. Billiar, Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res*, 84(3): 253-6, 1999.
32. Chen, F., V. Castranova, X. Shi, L.M. Demers, New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*, 45(1): 7-17, 1999.

33. Peng, H.B., P. Libby, J.K. Liao, Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*, 270(23): 14214-9, 1995.
34. Tezel, G., X. Yang, J. Cai, Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(9): 3177-87, 2005.
35. Ko, M.L., P.H. Peng, M.C. Ma, R. Ritch, C.F. Chen, Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free Radic Biol Med*, 39(3): 365-73, 2005.
36. Gherghel, D., H.R. Griffiths, E.J. Hilton, I.A. Cunliffe, S.L. Hosking, Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(3): 877-83, 2005.
37. Andrews, R.M., P.G. Griffiths, M.A. Johnson, D.M. Turnbull, Histochemical localisation of mitochondrial enzyme activity in human optic nerve and retina. *Br J Ophthalmol*, 83(2): 231-5, 1999.
38. Harada, T., C. Harada, K. Nakamura, H.M. Quah, A. Okumura, K. Namekata, T. Saeki, M. Aihara, H. Yoshida, A. Mitani, K. Tanaka, The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest*, 117(7): 1763-70, 2007.
39. Choi, J., K.H. Kim, J. Jeong, H.S. Cho, C.H. Lee, M.S. Kook, Circadian fluctuation of mean ocular perfusion pressure is a consistent risk factor for normal-tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(1): 104-11, 2007.
40. Mozaffarieh, M., M.C. Grieshaber, J. Flammer, Oxygen and blood flow: players in the pathogenesis of glaucoma. *Mol Vis*, 14: 224-33, 2008.
41. Henry, T.D., S.L. Archer, D. Nelson, E.K. Weir, A.H. From, Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion. *Circ Res*, 67(6): 1453-61, 1990.
42. Wallace, D.C., Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283(5407): 1482-8, 1999.
43. Greenfield, D.S., Glaucomatous versus nonglaucomatous optic disc cupping: clinical differentiation. *Semin Ophthalmol*, 14(2): 95-108, 1999.

44. Jonas, J.B., A. Dichtl, W.M. BuddeP. Lang, Optic disc morphology in pigmentary glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 82(8): 875-9, 1998.
45. Yamamoto, T.Y. Kitazawa, Vascular pathogenesis of normal-tension glaucoma: a possible pathogenetic factor, other than intraocular pressure, of glaucomatous optic neuropathy. *Prog Retin Eye Res*, 17(1): 127-43, 1998.
46. Flammer, J., The vascular concept of glaucoma. *Surv Ophthalmol*, 38 Suppl: S3-6, 1994.
47. Sucher, N.J., S.A. LiptonE.B. Dreyer, Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res*, 37(24): 3483-93, 1997.
48. Hayreh, S.S., A. BillG.O. Sperber, Effects of high intraocular pressure on the glucose metabolism in the retina and optic nerve in old atherosclerotic monkeys. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 232(12): 745-52, 1994.
49. Hennis, A., S.Y. Wu, B. NemesureM.C. Leske, Hypertension, diabetes, and longitudinal changes in intraocular pressure. *Ophthalmology*, 110(5): 908-14, 2003.
50. McGwin, G., Jr., S. McNeal, C. Owsley, C. Girkin, D. EpsteinP.P. Lee, Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 122(6): 822-6, 2004.
51. Yucel, I., Y. Akar, G. Yucel, M.A. Ciftcioglu, N. KelesM. Aslan, Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. *Vision Res*, 45(9): 1107-14, 2005.
52. Montoliu, C., M. Llansola, P. Monfort, R. Corbalan, I. Fernandez-Marticorena, M.L. Hernandez-ViadelV. Felipo, Role of nitric oxide and cyclic GMP in glutamate-induced neuronal death. *Neurotox Res*, 3(2): 179-88, 2001.
53. Chiappa, K., *Evoked potentials in clinical medicine*. New York: Raven Press, 1983.
54. Halliday AM, M.W., Mushin J., Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet*, 1: 982-985, 1972.
55. Otto, D., K. Hudnell, W. Boyes, R. JanssenR. Dyer, Electrophysiological measures of visual and auditory function as indices of neurotoxicity. *Toxicology*, 49(2-3): 205-18, 1988.

56. Wright, C.E., G.F. Harding A. Orwin, The flash and pattern VEP as a diagnostic indicator of dementia. *Doc Ophthalmol*, 62(1): 89-96, 1986.
57. Wright, C.E., N. Drasdo G.F. Harding, Pathology of the optic nerve and visual association areas. Information given by the flash and pattern visual evoked potential, and the temporal and spatial contrast sensitivity function. *Brain*, 110 (Pt 1): 107-20, 1987.
58. Lehman, D.M.J.M. Harrison, Flash visual evoked potentials in the hypomyelinated mutant mouse shiverer. *Doc Ophthalmol*, 104(1): 83-95, 2002.
59. Hudnell, H.K., W.K. Boyes D.A. Otto, Rat and human visual-evoked potentials recorded under comparable conditions: a preliminary analysis to address the issue of predicting human neurotoxic effects from rat data. *Neurotoxicol Teratol*, 12(4): 391-8, 1990.
60. Richer, S.P.R.C. Rose, Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vision Res*, 38(19): 2881-8, 1998.
61. Garland, D.L., Ascorbic acid and the eye. *Am J Clin Nutr*, 54(6 Suppl): 1198S-1202S, 1991.
62. Behndig, A., B. Svensson, S.L. Marklund K. Karlsson, Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(3): 471-5, 1998.
63. Huang, W.B. Akesson, Radioimmunoassay of glutathione peroxidase in human serum. *Clin Chim Acta*, 219(1-2): 139-48, 1993.
64. Martin-Alonso, J.M., S. Ghosh M. Coca-Prados, Cloning of the bovine plasma selenium-dependent glutathione peroxidase (GP) cDNA from the ocular ciliary epithelium: expression of the plasma and cellular forms within the mammalian eye. *J Biochem*, 114(2): 284-91, 1993.
65. Vander, A.J., S.J. A.L. D.S., *Human Physiology The sensory systems*. Vol. 9. 249-257, 1994.
66. www.tfot.info/articles/57,
67. Guyton, A., *Tibbi fizyoloji*. Vol. 10. 566-602, 2001.
68. www.kumc.edu/instruction/medicine/anatomy/histoweb/eye_ear/eye_ear.htm

69. Kandel ER, S.J., Jessell TM. , Principles of neural science. Vol. 26 507-522, 2000.
70. Curcio, C.A., K.R. Sloan, R.E. KalinaA.E. Hendrickson, Human photoreceptor topography. J Comp Neurol, 292(4): 497-523, 1990.
71. <http://www.brainconnection.com/med/medart/l/anat/990303.jpg>,
72. Khurana, A. Comprehensive ophthalmology 14-15, 2007.
73. Purves, D., Viktor Hamburger 1900-2001. Nat Neurosci, 4(8): 777-8, 2001.
74. http://www.mitre.org/news/the_edge/september_99/fifth.html,
75. Ganong, W., Vision. Review of Medical Physiology, ed. G. W. Vol. 3. 287-354, 1996.
76. Livingstone M, H.D., Segregation of form, color, meovement and depth: Anatomy, physiology and perception. Science, 240: 740-749, 1981.
77. www.medicallook.com
78. Taylor, W.R.D.I. Vaney, New directions in retinal research. Trends Neurosci, 26(7): 379-85, 2003.
79. Neitz, J.G.H. Jacobs, Reexamination of spectral mechanisms in the rat (Rattus norvegicus). J Comp Psychol, 100(1): 21-9, 1986.
80. Gabelt, B.T., J. Gottanka, E. Lutjen-DrecolP.L. Kaufman, Aqueous humor dynamics and trabecular meshwork and anterior ciliary muscle morphologic changes with age in rhesus monkeys. Invest Ophthalmol Vis Sci, 44(5): 2118-25, 2003.
81. www.med-ed.virginia.edu/MMHndt_Eye.html(www.merck.com,
82. Nelson JD, C.J., The conjunctiva: anatomy and physiology. 2 ed. Cornea, ed. M.M. Krachmer JH, Holland EJ Vol. 1. Philadelphia: Elsevier Inc. 37-44, 2005.
83. www.ahaf.org/glaucoma/about/aqueousflowBorder.jpg

84. Bill, A., Some aspects of aqueous humour drainage., in *Eye* 14-19, 1993.
85. Lutjen-Drecoll, E., Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Prog Retin Eye Res*, 18(1): 91-119, 1999.
86. Acott TS, W.M., Biochemistry of aqueous outflow. 2 ed. *The glaucomas.*, ed. S.M. Rich R, Krupin T. StLouis: Mo: Mosby-Year Book Inc. 281-305, 1996.
87. Flammer, J., I.O. Haefliger, S. OrgulT. Resink, Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage? *J Glaucoma*, 8(3): 212-9, 1999.
88. Tripathi, R.C., W.F. Chan, J. LiB.J. Tripathi, Trabecular cells express the TGF-beta 2 gene and secrete the cytokine. *Exp Eye Res*, 58(5): 523-8, 1994.
89. Yun, A.J., C.G. Murphy, J.R. Polansky, D.A. NewsomeJ.A. Alvarado, Proteins secreted by human trabecular cells. Glucocorticoid and other effects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30(9): 2012-22, 1989.
90. Thylefors, B.A.D. Negrel, The global impact of glaucoma. *Bull World Health Organ*, 72(3): 323-6, 1994.
91. Haefliger, I.O., E. Dettmann, R. Liu, P. Meyer, C. Prunte, J. MesserliJ. Flammer, Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. *Surv Ophthalmol*, 43 Suppl 1: S51-8, 1999.
92. Cernea, P., [The resistance to drainage of the aqueous humor]. *Oftalmologia*, 37(4): 289-98, 1993.
93. Grierson, I., A. Swalem, H. Davies, P. Hogg, M. BatterburyP. Watson, Pathological dilemmas in the outflow system in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*, (220): 7-12; discussion 13-4, 1997.
94. Tomarev, S.I., Eyeing a new route along an old pathway. *Nat Med*, 7(3): 294-5, 2001.
95. Armaly, M.F., D.E. Krueger, L. Maunder, B. Becker, J. Hetherington, Jr., A.E. Kolker, R.Z. Levene, A.E. Maumenee, I.P. PollackR.N. Shaffer, Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study. I. Summary report of the risk factors for glaucomatous visual-field defects. *Arch Ophthalmol*, 98(12): 2163-71, 1980.

96. Quigley, H.A., Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 18(1): 39-57, 1999.
97. Rudzinski, M., T.P. WongH.U. Saragovi, Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol*, 58(3): 341-54, 2004.
98. Leske, M.C., A. Heijl, M. Hussein, B. Bengtsson, L. HymanE. Komaroff, Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol*, 121(1): 48-56, 2003.
99. Halpern, D.L.C.L. Grosskreutz, Glaucomatous optic neuropathy: mechanisms of disease. *Ophthalmol Clin North Am*, 15(1): 61-8, 2002.
100. Sowka, J., New thoughts on normal tension glaucoma. *Optometry*, 76(10): 600-8, 2005.
101. Sycha, T., C. Vass, O. Findl, P. Bauer, I. Groke, L. SchmettererH. Eichler, Interventions for normal tension glaucoma. *Cochrane Database Syst Rev*, (4): CD002222, 2003.
102. Vorwerk, C.K., R. NaskarE.B. Dreyer, [The excitotoxicity theory of glaucoma]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 214(1): 2-11, 1999.
103. Hollows, F.C.P.A. Graham, Intra-ocular pressure, glaucoma, and glaucoma suspects in a defined population. *Br J Ophthalmol*, 50(10): 570-86, 1966.
104. Quigley, H.A., Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol*, 80(5): 389-93, 1996.
105. Omoti, A.E.O.T. Edema, A review of the risk factors in primary open angle glaucoma. *Niger J Clin Pract*, 10(1): 79-82, 2007.
106. Jorg J., H.H., Evozierte potentiale (VEP, SEP, AEP) in klinik und praxis., Berlin: Springer-Verlag. 1-69, 1984.
107. Sokol, S., Visually evoked potentials: theory, techniques and clinical applications. *Surv Ophthalmol*, 21(1): 18-44, 1976.
108. Espinoza, S.G.H.C. Thomas, Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the hooded rat. *Brain Res*, 272(1): 137-44, 1983.

109. Herr, D.W., D. King, S. Barone, Jr.K.M. Crofton, Alterations in flash evoked potentials (FEPs) in rats produced by 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN). *Neurotoxicol Teratol*, 17(6): 645-56, 1995.
110. Kraut, M.A., J.C. ArezzoH.G. Vaughan, Jr., Intracortical generators of the flash VEP in monkeys. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 62(4): 300-12, 1985.
111. Dyer, R.S., K.F. JensenW.K. Boyes, Focal lesions of visual cortex--effects on visual evoked potentials in rats. *Exp Neurol*, 95(1): 100-15, 1987.
112. Öztürk, N., Dose-Dependent Effect of Nutritional Sulfite Intake on Visual Evoked Potentials, in *Biophysics. Akdeniz: Antalya*. 20-47,2008.
113. Shozo Tobimatsu, G.G.C., Studies of human visual pathophysiology with visual evoked potentials. *Clinical Neurophysiology.*, 117: 1414-1433, 2006.
114. Regan, D., Comparison of transient and steady-state methods. *Ann N Y Acad Sci*, 388: 45-71, 1982.
115. Sanaç, A.Ş., Visual evoked potential. *Türk Oftalmoloji Gazetesi*, 18: 84-107, 1988.
116. Gücükoğlu, A., Retrobulber nevrinin VER ile tanısı ve klinik değeri. *Türk Oftalmoloji Gazetesi*, 16: 424-435, 1988.
117. Halliday, A.M., Visually evoked responses in optic nerve disease. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 96(3): 372-6, 1976.
118. Agar, A., V. Kucukatay, P. Yargicoglu, B. Aktekin, S. Kipmen-Korgun, D. GumusluC. Apaydin, The effect of sulfur dioxide inhalation on visual evoked potentials, antioxidant status, and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic rats. *Arch Environ Contam Toxicol*, 39(2): 257-64, 2000.
119. Gumuslu, S., S. Bilmen, D.K. Korgun, P. YargicogluA. Agar, Age-related changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in lungs of control and sulfur dioxide exposed rats. *Free Radic Res*, 34(6): 621-7, 2001.
120. Aydin, S., P. Yargicoglu, N. Derin, Y. Aliciguzel, I. AbidinA. Agar, The effect of chronic restraint stress and sulfite on visual evoked potentials (VEPs): relation to lipid peroxidation. *Food Chem Toxicol*, 43(7): 1093-101, 2005.

121. Kucukatay, V., G. Hacioglu, F. Savcioglu, P. Yargicoglu A. Agar, Visual evoked potentials in normal and sulfite oxidase deficient rats exposed to ingested sulfite. *Neurotoxicology*, 27(1): 93-100, 2006.
122. Toyokuni, S., Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int*, 49(2): 91-102, 1999.
123. Ferrari, R., C. Ceconi, S. Curello, A. Cargnoni, E. Pasini, F. De Giulio A. Albertini, Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr*, 53(1 Suppl): 215S-222S, 1991.
124. Cheeseman, K.H.T.F. Slater, An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49(3): 481-93, 1993.
125. Kusterer, K., G. Pihan S. Szabo, Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH, or ischemia. *Am J Physiol*, 252(6 Pt 1): G811-6, 1987.
126. Freeman, B.A.J.D. Crapo, Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47(5): 412-26, 1982.
127. Bergamini, C.M., S. Gambetti, A. Dondi C. Cervellati, Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des*, 10(14): 1611-26, 2004.
128. Stahl W, S.H., Reactive oxygen species. *Research Monographs*.: 1-2, 2002.
129. Chance, B., H. Sies A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59(3): 527-605, 1979.
130. Loschen, G., A. Azzi, C. Richter L. Flohe, Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*, 42(1): 68-72, 1974.
131. Fantone, J.C.P.A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol*, 107(3): 395-418, 1982.
132. Babior, B.M., J.D. Lambeth W. Nauseef, The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 397(2): 342-4, 2002.
133. Yu, B.P., Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74(1): 139-62, 1994.

134. Aruoma, O.I., B. Halliwell, E. GajewskiM. Dizdaroglu, Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 273 (Pt 3): 601-4, 1991.
135. Nikjoo, H., P. O'Neill, M. TerrissD.T. Goodhead, Modelling of radiation-induced DNA damage: the early physical and chemical event. *Int J Radiat Biol*, 66(5): 453-7, 1994.
136. Park JL, L.B., Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.*, 689: 1905-1912, 1999.
137. Spiteller, G., Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med*, 41(3): 362-87, 2006.
138. Esterbauer, H., R.J. SchaurH. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11(1): 81-128, 1991.
139. Kanner, J., J.B. GermanJ.E. Kinsella, Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 25(4): 317-64, 1987.
140. Spiteller, G., Do changes in the cell membrane structure induce the generation of lipid peroxidation products which serve as first signalling molecules in cell to cell communication? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 67(2-3): 151-62, 2002.
141. Hogg, N., B. Kalyanaraman, J. Joseph, A. StruckS. Parthasarathy, Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett*, 334(2): 170-4, 1993.
142. Lancaster, J.R., Jr., A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*, 1(1): 18-30, 1997.
143. Alderton, W.K., C.E. CooperR.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357(Pt 3): 593-615, 2001.
144. Calabrese, V., T.E. BatesA.M. Stella, NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res*, 25(9-10): 1315-41, 2000.

145. Park, C.S., K. Pardhasaradhi, C. Gianotti, E. VillegasG. Krishna, Human retina expresses both constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(1): 85-91, 1994.
146. Chakravarthy, U., A.W. Stitt, J. McNally, J.R. Bailie, E.M. HoeyP. Duprex, Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res*, 14(4): 285-94, 1995.
147. Perez, M.T., B. Larsson, P. Alm, K.E. AnderssonB. Ehinger, Localisation of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in rat and rabbit retinas. *Exp Brain Res*, 104(2): 207-17, 1995.
148. Aslan, M., I. Yucel, A. Ciftcioglu, B. Savas, Y. Akar, G. YucelS. Sanlioglu, Corneal protein nitration in experimental uveitis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 232(10): 1308-13, 2007.
149. Beckman, J.S., T.W. Beckman, J. Chen, P.A. MarshallB.A. Freeman, Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(4): 1620-4, 1990.
150. Rubbo, H., V. Darley-UsmarB.A. Freeman, Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol*, 9(5): 809-20, 1996.
151. Radi, R., A. DenicolaB.A. Freeman, Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Methods Enzymol*, 301: 353-67, 1999.
152. Aslan, M.B.A. Freeman, Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med*, 43(11): 1469-83, 2007.
153. Stadtman, E.R.C.N. Oliver, Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem*, 266(4): 2005-8, 1991.
154. Shacter, E., Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*, 319: 428-36, 2000.
155. Reznick, A.Z.L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 233: 357-63, 1994.
156. Stadtman, E.R.B.S. Berlett, Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*, 10(5): 485-94, 1997.

157. Schmalhausen, E.V., N.K. Nagradova, S. Boschi-Muller, G. BranlantV.I. Muronetz, Mildly oxidized GAPDH: the coupling of the dehydrogenase and acyl phosphatase activities. *FEBS Lett*, 452(3): 219-22, 1999.
158. Olsen, K.W., D. MorasM.G. Rossmann, Sequence variability and structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 250(24): 9313-21, 1975.
159. Danshina, P.V., E.V. Schmalhausen, A.V. AvetisyanV.I. Muronetz, Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis. *IUBMB Life*, 51(5): 309-14, 2001.
160. Lindquist, S.E.A. Craig, The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22: 631-77, 1988.
161. Caprioli, J., S. KitanoJ.E. Morgan, Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(12): 2376-81, 1996.
162. Caprioli, J., Y. IshiiJ.M. Kwong, Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 101: 39-50; discussion 50-1, 2003.
163. Albrecht, J., U. Sonnewald, H.S. WaagepetersenA. Schousboe, Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci*, 12: 332-43, 2007.
164. Linser, P.J., M. SorrentinoA.A. Moscona, Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Brain Res*, 315(1): 65-71, 1984.
165. Poli, G.R.J. Schaur, 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life*, 50(4-5): 315-21, 2000.
166. Poli, G., G. Leonarduzzi, F. BiasiE. Chiarpotto, Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*, 11(9): 1163-82, 2004.
167. Yeo, H.C., H.J. Helbock, D.W. ChyuB.N. Ames, Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 220(2): 391-6, 1994.
168. Pratico, D., F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis*, 147(1): 1-10, 1999.

169. Morrow, J.D., The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev*, 32(3-4): 377-85, 2000.
170. Babizhayev, M.A.A. Bunin, Lipid peroxidation in open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 67(4): 371-7, 1989.
171. Kruman, I., A.J. Bruce-Keller, D. Bredesen, G. WaegM.P. Mattson, Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 17(13): 5089-100, 1997.
172. Malone, P.E.M.R. Hernandez, 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res*, 84(3): 444-54, 2007.
173. Dickinson, D.A., A.L. Levonen, D.R. Moellering, E.K. Arnold, H. Zhang, V.M. Darley-UsmarH.J. Forman, Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med*, 37(8): 1152-9, 2004.
174. Dickinson, D.A., K.E. Iles, N. Watanabe, T. Iwamoto, H. Zhang, D.M. KrzywanskiH.J. Forman, 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. *Free Radic Biol Med*, 33(7): 974, 2002.
175. Moreno, M.C., J. Campanelli, P. Sande, D.A. Sanz, M.I. Keller SarmientoR.E. Rosenstein, Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med*, 37(6): 803-12, 2004.
176. Brownlee, M., A. CeramiH. Vlassara, Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*, 318(20): 1315-21, 1988.
177. Fu, M.X., K.J. Wells-Knecht, J.A. Blackledge, T.J. Lyons, S.R. ThorpeJ.W. Baynes, Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*, 43(5): 676-83, 1994.
178. Lapolla, A., P. TraldiD. Fedele, Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem*, 38(2): 103-15, 2005.
179. Bierhaus, A., M.A. Hofmann, R. ZieglerP.P. Nawroth, AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*, 37(3): 586-600, 1998.

- 180.** Tezel, G., C. LuoX. Yang, Accelerated aging in glaucoma: immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the human retina and optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(3): 1201-11, 2007.
- 181.** Yucel, I., G. Yucel, Y. Akar, N. Demir, N. GurbuzM. Aslan, Transmission electron microscopy and autofluorescence findings in the cornea of diabetic rats treated with aminoguanidine. *Can J Ophthalmol*, 41(1): 60-6, 2006.
- 182.** Vasan, S., P. FoilesH. Founds, Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys*, 419(1): 89-96, 2003.
- 183.** Dizdaroglu, M., Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*, 275(3-6): 331-42, 1992.
- 184.** Shigenaga, M.K., E.N. Aboujaoude, Q. ChenB.N. Ames, Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol*, 234: 16-33, 1994.
- 185.** Collins, A.R.E. Horvathova, Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 2): 337-41, 2001.
- 186.** Mannervik, B., P. Alin, C. Guthenberg, H. Jansson, M.K. Tahir, M. WarholmH. Jornvall, Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(21): 7202-6, 1985.
- 187.** Cassina, A.M., R. Hodara, J.M. Souza, L. Thomson, L. Castro, H. Ischiropoulos, B.A. FreemanR. Radi, Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem*, 275(28): 21409-15, 2000.
- 188.** MacPherson, J.C., S.A. Comhair, S.C. Erzurum, D.F. Klein, M.F. Lipscomb, M.S. Kavuru, M.K. SamoszukS.L. Hazen, Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol*, 166(9): 5763-72, 2001.
- 189.** Aslan, M., T.M. Ryan, T.M. Townes, L. Coward, M.C. Kirk, S. Barnes, C.B. Alexander, S.S. RosenfeldB.A. Freeman, Nitric oxide-dependent generation

of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem*, 278(6): 4194-204, 2003.

190. Neufeld, A.H., A. Sawada, B. Becker, Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17): 9944-8, 1999.
191. Rubbo, H., R. Radi, M. Trujillo, R. Telleri, B. Kalyanaraman, S. Barnes, M. Kirk, B.A. Freeman, Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269(42): 26066-75, 1994.
192. Williamson, K.S., S.P. Gabbita, S. Mou, M. West, Q.N. Pye, W.R. Markesbery, R.V. Cooney, P. Grammas, U. Reimann-Philipp, R.A. Floyd, K. Hensley, The nitration product 5-nitro-gamma-tocopherol is increased in the Alzheimer brain. *Nitric Oxide*, 6(2): 221-7, 2002.
193. Lim, D.G., S. Sweeney, A. Bloodsworth, C.R. White, P.H. Chumley, N.R. Krishna, F. Schopfer, V.B. O'Donnell, J.P. Eiserich, B.A. Freeman, Nitrooleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25): 15941-6, 2002.
194. Baker, P.R., F.J. Schopfer, S. Sweeney, B.A. Freeman, Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(32): 11577-82, 2004.
195. Diggory, P.W. Franks, Medical treatment of glaucoma--a reappraisal of the risks. *Br J Ophthalmol*, 80(1): 85-9, 1996.
196. Lewis, P.R., T.G. Phillips, J.W. Sassani, Topical therapies for glaucoma: what family physicians need to know. *Am Fam Physician*, 59(7): 1871-9, 1999.
197. Khaw, P.T., P. Shah, A.R. Elkington, Glaucoma--2: treatment. *Bmj*, 328(7432): 156-8, 2004.
198. Nelson, W.L., F.T. Fraunfelder, J.M. Sills, J.B. Arrowsmith, J.N. Kuritsky, Adverse respiratory and cardiovascular events attributed to timolol ophthalmic solution, 1978-1985. *Am J Ophthalmol*, 102(5): 606-11, 1986.

199. Messmer, C., J. FlammerD. Stumpfig, Influence of betaxolol and timolol on the visual fields of patients with glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 112(6): 678-81, 1991.
200. Kaiser, H.J., J. Flammer, D. StumpfigP. Hendrickson, Longterm visual field follow-up of glaucoma patients treated with beta-blockers. *Surv Ophthalmol*, 38 Suppl: S156-9; discussion S160, 1994.
201. Famà F, S.S., Comparison of the ocular effects of three beta-blockers: timolol, carteolol, and betaxolol. *Ann Ophthalmology* 28: 317-320, 1996.
202. Hartwick, A.T., Beyond intraocular pressure: neuroprotective strategies for future glaucoma therapy. *Optom Vis Sci*, 78(2): 85-94, 2001.
203. Kaushik, S., S.S. PandavJ. Ram, Neuroprotection in glaucoma. *J Postgrad Med*, 49(1): 90-5, 2003.
204. Kaufman, P.L., B.T. GabeltM. Cynader, Introductory comments on neuroprotection. *Surv Ophthalmol*, 43 Suppl 1: S89-90, 1999.
205. Schwartz, M., M. Belkin, E. YolesA. Solomon, Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy: neuroprotection and neuroregeneration. *J Glaucoma*, 5(6): 427-32, 1996.
206. Chew SJ, R.R., Neuroprotection: the next breakthrough in glaucoma? Proceedings of the Third Annual Optic Nerve Rescue and Restoration Think Tank. *J Glaucoma*, 6: 263-266, 1997.
207. Netland, P.A., N. ChaturvediE.B. Dreyer, Calcium channel blockers in the management of low-tension and open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 115(5): 608-13, 1993.
208. Eschweiler, G.W.M. Bahr, Flunarizine enhances rat retinal ganglion cell survival after axotomy. *J Neurol Sci*, 116(1): 34-40, 1993.
209. Caprioli, J., Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand*, 75(4): 364-7, 1997.
210. Gao, H., X. Qiao, L.B. CantorD. WuDunn, Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells. *Arch Ophthalmol*, 120(6): 797-803, 2002.

211. Vorwerk, C.K., S.A. Lipton, D. Zurakowski, B.T. Hyman, B.A. SabelE.B. Dreyer, Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(8): 1618-24, 1996.
212. Lagreze, W.A., R. Knorle, M. BachT.J. Feuerstein, Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(6): 1063-6, 1998.
213. Hare, W.A., E. WoldeMussie, R.K. Lai, H. Ton, G. Ruiz, T. ChunL. Wheeler, Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, I: Functional measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(8): 2625-39, 2004.
214. Yucel, Y.H., N. Gupta, Q. Zhang, A.P. Mizisin, M.W. KalichmanR.N. Weinreb, Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 124(2): 217-25, 2006.
215. Naskar, R.E.B. Dreyer, New horizons in neuroprotection. *Surv Ophthalmol*, 45 Suppl 3: S250-5; discussion S273-6, 2001.
216. Rabacchi, S.A., M. Ensini, L. Bonfanti, A. GravinaL. Maffei, Nerve growth factor reduces apoptosis of axotomized retinal ganglion cells in the neonatal rat. *Neuroscience*, 63(4): 969-73, 1994.
217. Fridovich, I., Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 58: 61-97, 1986.
218. Costarides, A.P., M.V. RileyK. Green, Roles of catalase and the glutathione redox cycle in the regulation of anterior-chamber hydrogen peroxide. *Ophthalmic Res*, 23(5): 284-94, 1991.
219. De La Paz, M.A.D.L. Epstein, Effect of age on superoxide dismutase activity of human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(9): 1849-53, 1996.
220. Riley, M.V., Physiologic neutralization mechanisms and the response of the corneal endothelium to hydrogen peroxide. *Clao J*, 16(1 Suppl): S16-21; discussion S21-2, 1990.
221. May, J.M., Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *Faseb J*, 13(9): 995-1006, 1999.

222. Asregadoo, E.R., Blood levels of thiamine and ascorbic acid in chronic open-angle glaucoma. *Ann Ophthalmol*, 11(7): 1095-1100, 1979.
223. Kang, J.H., L.R. Pasquale, W. Willett, B. Rosner, K.M. Egan, N. Faberowski S.E. Hankinson, Antioxidant intake and primary open-angle glaucoma: a prospective study. *Am J Epidemiol*, 158(4): 337-46, 2003.
224. Gruszecki, W.I.K. Strzalka, Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta*, 1740(2): 108-15, 2005.
225. Kloer, D.P.G.E. Schulz, Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci*, 63(19-20): 2291-303, 2006.
226. Romer, S.P.D. Fraser, Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta*, 221(3): 305-8, 2005.
227. Bouvier, F., C. Suire, J. Mutterer B. Camara, Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell*, 15(1): 47-62, 2003.
228. Giuliano, G., S. Al-Babili J. von Lintig, Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci*, 8(4): 145-9, 2003.
229. Camara, B.F. Bouvier, Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, 430(1): 16-21, 2004.
230. Papas, A.M., *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*: CRC Press, 1999.
231. Mortensen, A.e.a., Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett.*, 418: 91-97, 1997.
232. Beutner, S.e.a., Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of b-carotene in antioxidant functions. *J. Sci. Food Agric.*, 81: 559-568, 2001.
233. Mortensen, A., L.H. Skibsted T.G. Truscott, The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys*, 385(1): 13-9, 2001.

234. Ruano-Ravina, A., A. Figueiras, M. Freire-Garabal J.M. Barros-Dios, Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Curr Pharm Des*, 12(5): 599-613, 2006.
235. Kirsh, V.A., R.B. Hayes, S.T. Mayne, N. Chatterjee, A.F. Subar, L.B. Dixon, D. Albanes, G.L. Andriole, D.A. Urban U. Peters, Supplemental and dietary vitamin E, beta-carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 98(4): 245-54, 2006.
236. Moriarty-Craige, S.E., J. Adkison, M. Lynn, G. Gensler, S. Bressler, D.P. Jones P. Sternberg, Jr., Antioxidant supplements prevent oxidation of cysteine/cystine redox in patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*, 140(6): 1020-6, 2005.
237. Wamsley, S., S.M. Patel, M.G. Wood, R. Villalobos, D.M. Albert V.V. Mootha, Advanced keratomalacia with descemetocoele in an infant with cystic fibrosis. *Arch Ophthalmol*, 123(7): 1012-6, 2005.
238. Giugliano, D., Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 10(1): 38-44, 2000.
239. Jyonouchi, H., S. Sun M. Gross, Effect of carotenoids on in vitro immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances in vitro immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen. *Nutr Cancer*, 23(2): 171-83, 1995.
240. Guerin, M., M.E. Huntley M. Olaizola, *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol*, 21(5): 210-6, 2003.
241. Lorenz, R.T.G.R. Cysewski, Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol*, 18(4): 160-7, 2000.
242. Chitchumroonchokchai, C., J.A. Bomser, J.E. Glamm M.L. Failla, Xanthophylls and alpha-tocopherol decrease UVB-induced lipid peroxidation and stress signaling in human lens epithelial cells. *J Nutr*, 134(12): 3225-32, 2004.
243. O'Connor, I.a.O.B., N. , Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 16: 226-230, 1998.

244. Kurashige, M.e.a., Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. . *Physiol. Chem. Phys. Med.*, 22: 27-38, 1990.
245. Jacques, P.F., The potential preventive effects of vitamins for cataract and age-related macular degeneration. *Int J Vitam Nutr Res*, 69(3): 198-205, 1999.
246. Lyle, B.J., J.A. Mares-Perlman, B.E. Klein, R. KleinJ.L. Greger, Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol*, 149(9): 801-9, 1999.
247. Seddon, J.M., U.A. Ajani, R.D. Sperduto, R. Hiller, N. Blair, T.C. Burton, M.D. Farber, E.S. Gragoudas, J. Haller, D.T. Miller et al., Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *Jama*, 272(18): 1413-20, 1994.
248. Landrum, J.T., R.A. Bone, L.L. MooreC.M. Gomez, Analysis of zeaxanthin distribution within individual human retinas. *Methods Enzymol*, 299: 457-67, 1999.
249. Tso, M.O.M.a.L., T-T., Method of Retarding and Ameliorating Central Nervous System and Eye Damage., in U.S,1996.
250. Østerlie, M.e.a., Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z isomers in plasma lipoproteins of after single dose administration of astaxanthin. *J. Nutr. Biochem.*, 11: 482-490, 2000.
251. Naguib, Y.M.A., Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1150-1154, 2000.
252. Parisi, V., M. Tedeschi, G. Gallinaro, M. Varano, S. SavianoS. Piermarocchi, Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy italian study: multifocal electroretinogram modifications after 1 year. *Ophthalmology*, 115(2): 324-333 e2, 2008.
253. Bloomer, R.J., A. Fry, B. Schilling, L. Chiu, N. HoriL. Weiss, Astaxanthin supplementation does not attenuate muscle injury following eccentric exercise in resistance-trained men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 15(4): 401-12, 2005.
254. Mayne, S.T., Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *Faseb J*, 10(7): 690-701, 1996.

255. Chew BP, P.J., Wong M, Wong TS, A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res*, 19: 1849-1853, 1999.
256. Wang, X., R. WillenT. Wadstrom, Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(9): 2452-7, 2000.
257. Sawada, A.A.H. Neufeld, Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res*, 69(5): 525-31, 1999.
258. Moore, C.G., S.T. MilneJ.C. Morrison, Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34(2): 363-9, 1993.
259. Kim, J.H., S.K. Choi, S.Y. Choi, H.K. KimH.I. Chang, Suppressive effect of astaxanthin isolated from the *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(7): 1300-5, 2005.
260. Kim, J.H., Y.S. Kim, G.G. Song, J.J. ParkH.I. Chang, Protective effect of astaxanthin on naproxen-induced gastric antral ulceration in rats. *Eur J Pharmacol*, 514(1): 53-9, 2005.
261. Hetzler, B.E., W.K. Boyes, J.P. CreasonR.S. Dyer, Temperature-dependent changes in visual evoked potentials of rats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 70(2): 137-54, 1988.
262. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-54, 1976.
263. Fielder, A.R., C. BentleyM.J. Moseley, Recent advances: ophthalmology. *Bmj*, 318(7185): 717-20, 1999.
264. Tuck, M.W.R.P. Crick, The age distribution of primary open angle glaucoma. *Ophthalmic Epidemiol*, 5(4): 173-83, 1998.
265. Ramrattan RS, W.R., Panda-Jonas S, et al., Prevalence and causes of visual field loss in the elderly and associations with impairment in daily functioning: the Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol*, 120: 1788-1794, 2002.

266. Quigley, H.A.S. Vitale, Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(1): 83-91, 1997.
267. Tuck, M.W.R.P. Crick, The projected increase in glaucoma due to an ageing population. *Ophthalmic Physiol Opt*, 23(2): 175-9, 2003.
268. Wensor, M.D., C.A. McCarty, Y.L. Stanislavsky, P.M. LivingstonH.R. Taylor, The prevalence of glaucoma in the Melbourne Visual Impairment Project. *Ophthalmology*, 105(4): 733-9, 1998.
269. Hare, W., H. Ton, E. Woldemussie, G. Ruiz, B. FeldmannM. Wijono, Electrophysiological and histological measures of retinal injury in chronic ocular hypertensive monkeys. *Eur J Ophthalmol*, 9 Suppl 1: S30-3, 1999.
270. Watts, M.T., P.A. GoodE.C. O'Neill, The flash stimulated VEP in the diagnosis of glaucoma. *Eye*, 3 (Pt 6): 732-7, 1989.
271. Graham, S.L.A. Klistorner, Electrophysiology: a review of signal origins and applications to investigating glaucoma. *Aust N Z J Ophthalmol*, 26(1): 71-85, 1998.
272. Good, P.A., J.B. MarstersM.J. Mortimer, Flash stimulation evoked potentials in diagnosis of chronic glaucoma. *Lancet*, 1(8544): 1259-60, 1987.
273. Howe, J.W.K.W. Mitchell, Visual evoked potential changes in chronic glaucoma and ocular hypertension. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 105 (Pt 4): 457-62, 1986.
274. KW., M., The visual evoked potential in the differential diagnosis of ocular hypertension and chronic simple glaucoma. Newcastle upon Tyne: United Kingdom, 1987.
275. Motolko, M., S.M. DranceG.R. Douglas, The early psychophysical disturbances in chronic open-angle glaucoma. A study of visual functions with asymmetric disc cupping. *Arch Ophthalmol*, 100(10): 1632-4, 1982.
276. Yargicoglu, P., N. Yaras, A. Agar, S. Gumuslu, S. BilmenG. Ozkaya, The effect of vitamin E on stress-induced changes in visual evoked potentials (VEPs) in rats exposed to different experimental stress models. *Acta Ophthalmol Scand*, 81(2): 181-7, 2003.

277. Yargicoglu, P., A. Agar, M. Edremitlioglu, Y. OguzC. Apaydin, The effect of cadmium on visual evoked potentials in alloxane-induced diabetic rats: relation to lipid peroxidation. *Acta Diabetol*, 36(4): 197-204, 1999.
278. Boyes, W.R., Isaasson and K. Jensen EDS. , Testing visual system toxicity using visual evoked potentials. In *vulnerable brain. . Pleauin New York. , 1 (Malnutrition and toxins)*, 1991.
279. Goto, S., K. Kogure, K. Abe, Y. Kimata, K. Kitahama, E. YamashitaH. Terada, Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta*, 1512(2): 251-8, 2001.
280. Barros, M.P., E. Pinto, P. ColepicoloM. Pedersen, Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe(2+)-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochem Biophys Res Commun*, 288(1): 225-32, 2001.
281. Suzuki, Y., K. Ohgami, K. Shiratori, X.H. Jin, I. Ilieva, Y. Koyama, K. Yazawa, K. Yoshida, S. KaseS. Ohno, Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway. *Exp Eye Res*, 82(2): 275-81, 2006.
282. Ohgami, K., K. Shiratori, S. Kotake, T. Nishida, N. Mizuki, K. YazawaS. Ohno, Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(6): 2694-701, 2003.
283. Investigators., T.A., The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am J Ophthalmol.*, 130(The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS):7.): 429-440, 2000.
284. Naumann, G.O., U. Schlotzer-SchrehardtM. Kuchle, Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations. *Ophthalmology*, 105(6): 951-68, 1998.
285. Yagci, R., I. Ersoz, M. Erdurmus, A. GurelS. Duman, Protein carbonyl levels in the aqueous humour and serum of patients with pseudoexfoliation syndrome. *Eye*, 22(1): 128-31, 2008.
286. S. De Flora, C.B., D. Serra, A. Izzotti, C.F. Cesarone , Boca Raton, Role of glutathione and N-acetylcysteine as inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Absorption and Utilization of Amino Acids*, ed. M. Friedman. Vol. 3. Florida: CRC Press. 19-53, 1989.

- 287.** Kahn, M.G., F.J. Giblin, D.L. Epstein, Glutathione in calf trabecular meshwork and its relation to aqueous humor outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 24(9): 1283-7, 1983.
- 288.** Lee, S.J., S.K. Bai, K.S. Lee, S. Namkoong, H.J. Na, K.S. Ha, J.A. Han, S.V. Yim, K. Chang, Y.G. Kwon, S.K. Lee, Y.M. Kim, Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol Cells*, 16(1): 97-105, 2003.
- 289.** Kholodenko, R., I. Kholodenko, V. Sorokin, A. Tolmazova, O. Sazonova, A. Buzdin, Anti-apoptotic effect of retinoic acid on retinal progenitor cells mediated by a protein kinase A-dependent mechanism. *Cell Res*, 17(2): 151-62, 2007.
- 290.** Chucair, A.J., N.P. Rotstein, J.P. Sangiovanni, A. During, E.Y. Chew, L.E. Politi, Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(11): 5168-77, 2007.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül ÇÖRT, 1983 yılında Antalya'da doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2005 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu ve aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.