

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL GLOKOMDA ERKEN VE GEÇ DÖNEM  
EDARAVONE UYGULAMASININ NÖRON KORUYUCU ETKİSİ:  
İMMÜNFLORESAN VE BİYOKİMYASAL İNCELEME**

Dr Arzu TORUK AKŞAR

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2013

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL GLOKOMDA ERKEN VE GEÇ DÖNEM  
EDARAVONE UYGULAMASININ NÖRON KORUYUCU ETKİSİ:  
İMMÜNFLORESAN VE BİYOKİMYASAL İNCELEME**

Dr Arzu TORUK AKŞAR

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı  
Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR

Etik Kurul Onayı 14.06.2011 tarihli KOÜ/HADYEK-6/2-2011/18  
Etik Kurul Onayı Son 06.09.2011 tarihli KOÜ/HADYEK-8/1-2011/18

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

<b>Konu Başlığı</b>	<b>Sayfa</b>
İç Kapak Sayfası	i
İçindekiler Dizini	ii-iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv-v
Şekiller Dizini	vi-vii
Tablo Dizini	viii
<b>1. AMAÇ VE KAPSAM</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>2.1. Glokomatöz Hasarın Patogenezi</b>	3
<b>2.1.1. Glokomatöz Hasarın Patogenezine Dair Teoriler</b>	3
<b>2.1.2. Glokomatöz Hasarda Oksidatif Stresin Rolü</b>	7
<b>2.1.2.1. Serbest Radikal Tanımı</b>	7
<b>2.1.2.2. Reaktif Oksijen Ürünleri ve Antioksidanlar</b>	7
<b>2.1.2.3. Retinadaki Antioksidanlar</b>	9
<b>2.1.2.4. Reaktif Nitrojen Türleri ve Kaynakları</b>	9
<b>2.1.2.5. Nitrik Oksit ve Oksijen Radikalleri Arasındaki Etkileşim</b>	10
<b>2.1.2.6. NO ve Glokom</b>	10
<b>2.1.2.7. Lipit Peroksidasyonu ve Glokom</b>	11
<b>2.2. Retina Ganglion Hücre Ölüm Mekanizmaları</b>	12
<b>2.3. Glokomda Nöroprotektif Tedavi</b>	15
<b>2.3.1. Glokomda Nöroprotektif Tedavinin Temeli ve Gerekçesi</b>	15
<b>2.3.2. Nöroproteksiyonda Hedef Neden Retina Ganglion Hücreleridir?</b>	17
<b>2.3.3. Nöroproteksiyon Glokom Tedavi Stratejisi Olabilir Mi?</b>	17
<b>2.4. Edaravone</b>	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	22
<b>3.1. Denekler</b>	22
<b>3.2. Deneysel Glokom Modeli</b>	24

3.3. İlaçların Uygulanması	25
3.4. Retina Ganglion Hücrelerinin Retrograd İşaretlenmesi	25
3.5. Sakrifikasyon ve Kardiak Perfüzyon	26
3.6. Retina Ganglion Hücrelerinin Sayım İşlemi	27
3.7. Biyokimyasal İnceleme	27
3.7.1. Nitrik Oksit Kadmiyum Metoduyla Ölçümü	27
3.7.1.1. Deprotezasyon	27
3.7.1.2. Kadmiyum Aktivasyonu	27
3.7.1.3. Deney	28
3.7.2. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü	29
3.7.2.1. Reaktif Hazırlanması	29
3.7.2.2. Numune Hazırlanması	29
3.7.2.3. Ölçüm	30
3.7.3. Malondialdehit Ölçümü	30
3.8. Data Analizi	31
3.8.1. İstatiksel Değerlendirme	31
<b>4. BULGULAR</b>	<b>32</b>
4.1. Ratların Demografik Özellikleri	32
4.2. Göz İçi Basınç Değerleri	32
4.3. Retinal Ganglion Hücre Sayımları	36
4.4. Retina Dokusuna Ait Biyokimyasal Değerlendirme	42
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>49</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>57</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>58</b>
<b>8. ABSTRACT</b>	<b>60</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>62</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ALS</b>	: Amyotrofik Lateral Skleroz
<b>ASK1</b>	: Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1
<b>BDNF</b>	: Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
<b>Ca+2</b>	: Kalsiyum
<b>DETAB</b>	: Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DTMR</b>	: Dextran Tetramethylrhodamine
<b>EDA</b>	: Edaravone
<b>EE</b>	: Erken Dönem Edaravone Grubu
<b>ERG</b>	: Elektoretinografi
<b>ET-1</b>	: Endotelin-1
<b>FALS</b>	: Familial Amyotrofik Lateral Skleroz
<b>G</b>	: Glokom Grubu
<b>GABA</b>	: Gamma Aminobütirik Asit
<b>GE</b>	: Geç Dönem Edaravone Grubu
<b>GİB</b>	: Göz İçi Basıncı
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH-R</b>	: Glutasyon Redüktaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HOCl</b>	: Hipoklorit
<b>İP</b>	: İntraperitoneal
<b>K</b>	: Kontrol Grubu
<b>K+</b>	: Potasyum
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>Mg+2</b>	: Magnezyum
<b>MMP</b>	: Matriks Metalloproteinaz

<b>Na+</b>	: Sodyum
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>NMDA</b>	: N-metil D-aspartat
<b>NO</b>	: Nitrit Oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik Oksit Sentaz
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
<b>nNOS</b>	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
<b>NTF</b>	: Nörotrofik Faktörler
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>OH.</b>	: Hidroksil Radikali
<b>ONOO-</b>	: Peroksinitrit
<b>OSB</b>	: Optik Sinir Başı
<b>PAAG</b>	: Primer Açık Açılı Glokom
<b>PKC</b>	: Protein Kinaz C
<b>PTP</b>	: Permeability Transition Pore
<b>PUFA</b>	: Poliansatüre Yağ Asitlerinden
<b>RES</b>	: Resveratrol
<b>RGH</b>	: Retina Ganglion Hücresi
<b>ROO.</b>	: Peroksil Radikali
<b>ROÜ</b>	: Reaktif Oksijen Ürünleri
<b>SOD</b>	: Superoksit Dismutaz
<b>SOR</b>	: Serbest Oksijen Radikalleri
<b>SSS</b>	: Santral Sinir Sistemi
<b>TAC</b>	: Total Antioksidan Kapasite
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa
<b>VMAT2</b>	: Veziküler Monamin Transporter 2

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Numarası ve Başlığı	Sayfa
Şekil 1. Glokomatöz Hasarın Patogenezi	6
Şekil 2 A. Moleküler Oksijenin Superoksit Radikaline İndirgenmesi	8
Şekil 2 B. Superoksit Radikalinin Hidrojen Peroksite İndirgenmesi	8
Şekil 2 C. Hidrojen Peroksitten Su ve Hidroksil Radikali Oluşumu	8
Şekil 3. Lipid Peroksidasyonu	11
Şekil 4. Nörotrofinlerin Blokajı ve RGC Hasarı	13
Şekil 5. Apoptozisin Başlıca Sinyal Bileşenleri	14
Şekil 6. Apoptozisin Başlıca Sinyal Bileşenleri	14
Şekil 7. Edaravone ve Tautomerik Formları	19
Şekil 8. Edaravonenin Dopaminerjik Nöronlardaki Nöroprotektif Etkisi	20
Şekil 9. Deney Planı	23
Şekil 10. Limbustan Ön Kamaraya Giriş Ve Hyaluronik Asid Enjeksiyonu	24
Şekil 11. Glokom İndüksiyonu	24
Şekil 12. Optik Sinir Disseksiyonu	26
Şekil 13. Perfüzyon Düzenegi	26
Şekil 14. Whole Mount Retinanın İncelenmeye Hazır Son Hali	26
Şekil 15 A. K Grubu GİB Seyri	33
Şekil 15 B. G Grubu GİB Seyri	33
Şekil 15 C. EE Grubu GİB Seyri	34
Şekil 15 D. GE Grubu GİB Seyri	34
Şekil 16. Gruplara ait Ortalama Milimetrekaredeki RGH Sayımı Değerleri	39
Şekil 17. Gruplara ait Ortalama Tüm RGH Sayımı Değerleri	39
Şekil 18. Grupların Tüm RGH Sayılarının İzodansite Haritalarında Karşılaştırmalı Şematik Gösterimi	40
Şekil 19 A. Kontrol Grubuna (K) ait DTMR ile İşaretli Retina Gangliyon Hücrelerinin İmmunfloresan Görüntüsü	41

<b>Şekil 19 B.</b>	Glokom Grubuna (G) ait, DTMR ile İşaretli Retina Gangliyon Hücrelerinin İmmunfloresan Görüntüsü	41
<b>Şekil 19 C.</b>	Erken Edaravone Grubuna (EE) ait DTMR ile İşaretli Retina Gangliyon Hücrelerinin İmmunfloresan Görüntüsü	42
<b>Şekil 19 D.</b>	Geç Edaravone Grubuna (GE) ait DTMR ile İşaretli Retina Gangliyon Hücrelerinin İmmunfloresan Görüntüsü	42
<b>Şekil 20.</b>	Deneklerin Retina Dokularındaki Ortalama TAC Değerleri	44
<b>Şekil 21.</b>	Deneklerin Retina Dokularındaki Ortalama MDA Değerleri	45
<b>Şekil 22.</b>	Deneklerin Retina Dokularındaki Ortalama NO Değerleri	47



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo Numarası ve Başlığı</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> İlave Solüsyon Miktarları	28
<b>Tablo 2.</b> Çözelti Hazırlama Miktarları	30
<b>Tablo 3.</b> Deneklere Ait Göziçi Basınç Ölçümleri	35
<b>Tablo 4.</b> Deneklerdeki DTMR İşaretli RGH Değerlendirmesi	36
<b>Tablo 5.</b> RGH Değerleri Gruplar Arası Karşılaştırma	37
<b>Tablo 6.</b> Deneklerin Retina Dokularındaki TAC, MDA ve NO Biyokimyasal Ölçüm Değerleri	43
<b>Tablo 7.</b> TAC Değerleri Gruplar Arası Karşılaştırma	44
<b>Tablo 8.</b> MDA Değerleri Gruplar Arası Karşılaştırma	46
<b>Tablo 9.</b> NO Değerleri Gruplar Arası Karşılaştırma	47

## 1.AMAÇ VE KAPSAM

Glokom retina ganglion hücreleri (RGH) gövdelerinin ve optik sinirdeki ganglion hücre aksonlarının hasarı sonucu oluşan karakteristik optik sinir başı çukurlaşması ve görme alanı defektlerinin görüldüğü, progresif multifaktöryel bir optik nöropatidir ve körlük nedenidir. Dünya genelinde 60 milyon insanı etkilemiştir ve 2020 yılında bu sayının 80 milyona ulaşması beklenmektedir (1).

Glokom hastalığının temelinde yatan patolojiyi ortaya koymak, ideal tedavi stratejisini oluşturmak için gereklidir. Glokom retina ganglion hücrelerinin apoptozis sonucu ölümüyle karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. En önemli risk faktörü olan göziçi basıncı (GİB) düşürülse bile hastalığın progresyonu devam edebilmektedir. Bu yüzden yeni tedavi arayışları içine girilmiştir. Nöronun direkt kendisini koruyacak tedaviye nöroprotektif tedavi diyebiliriz.

Bugün glokomdaki nöronal hücre kaybının patofizyolojisine ait temel görüş; retrograd aksoplazmik transport blokajı nedeniyle nörotrofinlerin kaybı, azalan vasküler perfüzyon ve buna bağlı iskemi, serbest radikallerin oluşumu, nitrik oksit (NO) toksisitesi ve glutamat aracılı eksitotoksosite süreçlerinin biri veya birkaçının birlikteliği sonucu oluşan nekroz ve/veya apoptozis aracılı hücre ölümü üzerinde yoğunlaşmaktadır (2-4).

Bu çalışmada, serbest radikal süpürücü olan Edaravone (EDA) sıçanda oluşturulan deneysel glokom modelinde sistemik olarak uygulanmıştır. Glokom sürecinin erken ve geç dönemlerinde uygulanan edaravonenin RGC üzerindeki nöroprotektif etkisi immünfloresan ve biyokimyasal olarak incelenmiştir. Çalışmada;

1. Glokom indüksiyonu oluşturulması süreci ile birlikte verilmeye başlanan edaravonenin, glokomatöz sürecin erken evresindeki oksidatif hasarın engellenmesine yönelik etkisi,

2. Glokom indüksiyonu sonrası tedavisiz olarak bir süre artmış GİB sürecine maruz kalmış deneklerde verilmeye başlanan edaravonenin glokomatöz sürecin geç evresindeki oksidatif hasara etkisi araştırılmıştır.

EDA'nın glokomatöz nöronal hasarlanma süreci üzerindeki etkinliği; retinal hücrelerin immünfloresan olarak değerlendirilmesiyle yorumlanmıştır.

Çalışma ayrıca, retinal ganglion hücre sayımı ile retina dokusunda yapılan malondialdehit (MDA) , nitrik oksit (NO) , total antioksidan kapasite (TAC) gibi biyokimyasal ölçümler ile glokom modelinde RGH'ların hasarlanma mekanizmasında oksidatif stresin rolünü aydınlatmaya yönelik bulgular da içermektedir.



## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Glokomatöz Hasarın Patogenezi**

#### **2.1.1. Glokomatöz Hasarın Patogenezinin Dair Teoriler**

Glokom, optik sinir başında oluşan karakteristik değişiklikler ile birlikte retina iç katlarında hasar, özellikle RGH'ların ölümü ve buna bağlı görme alanı kayıpları ile seyreden bir optik nöropati şeklinde tanımlanmaktadır (2). Glokom hastalığının temelinde yatan patolojiyi ortaya koymak, ideal tedavi stratejisini oluşturmak için gereklidir. Normotansif glokom hastalarının yanı sıra bilindiği gibi GİB belli bir noktaya düşürüldüğü halde görme alanı kaybının devam ettiği olgular vardır. Randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; başarılı göz içi basınç kontrolüne rağmen bazı hastalar progresyon göstermektedir (5-7).

Bu sonuçlar çok sayıda araştırmacıyı GİB'i düşürmeye yönelik klasik glokom tedavisine ek olarak yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir. Günümüzde glokoma ait araştırmaların çok önemli bir kısmını glokomdaki nöronal hücre kayıplarının engellenmesine yönelik çalışmalar oluşturmaktadır (8-11).

Bugün glokomdaki nöronal hücre kaybının patofizyolojisine ait temel görüş; retrograd aksoplazmik transport blokajı nedeniyle nörotrofinlerin kaybı, azalan vasküler perfüzyon ve buna bağlı iskemi, serbest radikallerin oluşumu, NO toksisitesi ve glutamat aracılı eksitotoksikite süreçlerinin biri veya birkaçının birlikteliği sonucu oluşan nekroz ve/veya apoptoz aracılı hücre ölümü üzerinde yoğunlaşmaktadır (2-4,12).

Glutamat, SSS'de en fazla bulunan eksitatör nörotransmitterdir. Glutamat kaynaklı eksitotoksikite, ekstrasellüler glutamat konsantrasyonunun artışı veya sinaptik aralıktan geri alınımında azalma nedeniyle oluşabilir. Oksidatif hasar ve serbest radikal hasarının da tetikciliğini yapabilmektedir. Yüksek konsantrasyonda glutamat N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörlerine bağlanarak hücre içerisine yoğun miktarda kalsiyum girişine neden olur. İntrasellüler kalsiyum birçok enzimin

aktivasyonunda ve membran iyon kanallarının geçirgenliğinde kritik role sahiptir. Sitoplazmada fazla miktarda bulunması ile kontrolsüz şekilde hücre içi proteazlar, nükleazlar ve lipazlar aktive olur. Ayrıca mitokondri fonksiyonları baskılanarak, hücre enerji yetmezliği ve serbest radikal oluşumunu başlatılır. Kalsiyum, önemli bir serbest radikal öncüsü olan nitrik oksit oluşumunu, uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS veya NOS-2) enzimini aktive ederek hızlandırır (13).

Nitrik oksit bir nörotransmitter olmasının yanı sıra birçok patolojik olaya da katılır. Retinanın rod hücreleri, bipolar hücreler ve amakrin hücrelerinin fizyolojik medyatörüdür. Ayrıca trabeküler ağ hücreleri üzerinden, hümeör aköz dinamiğinde de rolü vardır. Primer açık açılı glokomu olan hastaların optik sinir başında artmış NOS aktivitesi bildirilmiştir (14).

Eksitotoksisite teorisine göre ise nöronal dejenerasyonun glutamat, serbest oksijen radikalleri ve ölüme maruz kalan RGC'lerden salınan nitrik oksit gibi toksik faktörler tarafından sürdürüldüğüne inanılmaktadır (15).

Mekanik teoriye göre GİB artışı kompresyon etkisiyle direk olarak nöronların ölümünden sorumludur. Yüksek GİB'e bağılı olarak skleral duvarda oluşan gerilim, bağı dokusu desteğinin daha az olduğı lamina kribrozanın üst ve alt kutuplarında distorsiyona ve arkaya doğru çukurlaşmaya neden olur. Lamina kribrozada oluşan distorsiyon lateral genikülat nükleusa doğru olan aksoplazmik akımı bozar ve optik atrofiye yol açar (16). Schnabel ise aynı yüzyılın sonlarında nöral elemanlarda atrofi geliştiğini ve bunun sonucunda boş alanların oluştuğunu ve optik sinir başının arkaya doğru çekildiğini ifade etmiştir (17).

Mekanik teorisinin devamı olan mekaniko-vasküler hipoteze göre de yüksek GİB optik sinirin laminer ve prelaminer bölgelerindeki küçük çaplı damarlarda ve bunlardan çıkan küçük koroidal damarlarda bir kompresyon oluşturmakta, otoregölasyon mekanizmalarında oluşan bir bozulma nedeni ile kan debisi azalarak ağrıya neden olan ve sinir dokusunda harabiyetle sonuçlanan bir iskemi ortaya çıkmaktadır (18). Akson kaybının lamina kribrosanın en az konnektif doku desteğı olan optik sinir başı üst ve alt kadranlarında olması ve en fazla bozulma olan disklerde bile kan damarlarının kalan akson sayısına uygun oranda olması bu teoriyi destekler görünmektedir (19). Deneysel modellerde, devamlı yüksek basınç RGH mitokondrisini de direkt olarak hasarlamaktadır (20). Growth faktör açlığı ve

mitokondriyal hasar, RGH gen ekspresyon dengesini hücre idamesinden pro-apoptotik yollara saptırabilir.

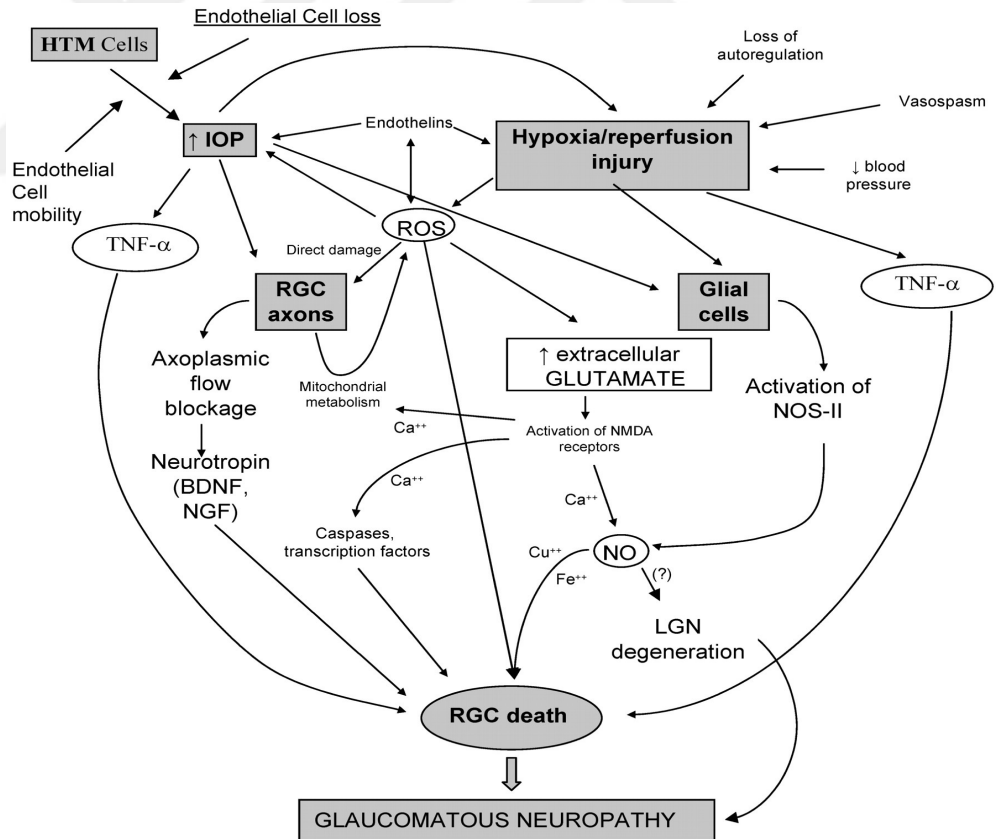
Glokomatöz hasarın her zaman yüksek GİB'de ortaya çıkmaması ve GİB'in düşürülmesine rağmen optik nöropatinin devam edebilmesi, yüksek GİB dışında başka faktörlerin de glokomun patolojisinde rol oynadığını düşündürmektedir. Vasküler teoride etkili olabileceği düşünülen mekanizmalar; optik sinir başının perfüzyon bozukluğu, anormal vasküler rezistans, sistemik hipotansiyon ve diğer faktörlerdir (16). Optik sinir başını besleyen damarlardaki perfüzyon basıncının düşüklüğü doku beslenmesini etkiler ve akson atrofisine neden olur. Oküler kan akımı perfüzyon basıncı ile doğru, vasküler rezistans ile ters orantılıdır (16). Retinal dokulardaki kan akımı, SSS'de olduğu gibi sempatik sinir sisteminden bağımsız olarak otoregülasyon adı verilen lokal (NO, prostaglandinler, endotelin ve renin-angiotensin sistemi) ve metabolik faktörlerle idare edilir. Sağlıklı bir gözde GİB'in 30-35 mmHg değerlerine kadar otoregülasyon normal bir şekilde sürer. Glokom olgularının migren ve Reynaud Fenomeni gibi hastalıklarla sıklıkla beraber görülmesi, etyolojide vazospastik bir komponentin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Sistemik hipotansiyon da perfüzyon basıncını düşüren önemli bir risk faktörüdür. Normotansif glokom olgularında ambulator olarak kan basıncının monitörize edilmesi sonucunda, noktürnal diastolik kan basıncında ciddi düşüşler saptanmıştır (16).

Artan GİB'e rağmen glokomatöz optik nöropati görülmeyen oküler hipertansiyonlu hastaların uzun dönem takip sonuçları ile vasküler faktörler ve optik sinir başının histolojik yapısı glokomatöz optik nöropati gelişiminde önem kazanmıştır. Optik sinir başının basınca karşı olan hassasiyeti tanımlanmış ve bu hassasiyetin nöral dokunun yapısal özelliklerine bağlı olduğu belirtilmiştir (21). Lamina kribrozanın strese karşı cevap verebilme yeteneği olan bir doku olduğu ve GİB değişimlerine göre kollajen tipleri ve elastin yapısı ve miktarını sentez ve/veya parçalanma ile değiştirdiği ancak bu mekanizmanın GİB artışına karşı koruyucu olduğu ve bu cevabın herkeste mevcut olmadığı gösterilmiştir (22).

Glokom taramasının sadece GİB ile yapılması halinde %50 hastanın atlanabileceğini, glokomatöz optik nöropatili hastaların %20 sinde GİB'in düşürülmesine rağmen optik nöropati progresyonunun devam ettiğini bildirmiştir. Bu

nedenle mikrosirkülatuar değişiklikler ve dolayısı ile vasküler teori, glokomatöz optik nöropati gelişiminde gerek primer bir faktör olarak gerekse de diğer faktörler ile beraber bozulmuş otoregülasyon altında GİB'e bağlı hasarı artıran bir yardımcı faktör olarak etkilidir (19). Kombine vasküler ve mekanik görüşe göre, yüksek tansiyonlu ve normal tansiyonlu glokomu açıklamak daha kolaydır (23,24).

Glokomda RGH'nin ölümünde, Apoptozis ve/veya Nekrozis teorisi de tartışılan konular arasındadır. Apoptozis; nekrozdan farklı olarak inflamasyonla beraber olmayan, genetik olarak programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozisin oluşumunu sağlayan nörotoksik eksitotoksinlerden birisi olan glutamat, glokomlu olguların vitreusunda yüksek düzeyde saptanmıştır. Yine yapılan çalışmalarda glokomlu olguların gangliyon hücrelerinde immunoglobulin birikimlerine rastlanmıştır. Bu bulgular RGH lerin, apoptozis tipi hücre ölümüne uğradığı fikrini desteklemektedir (16).



**Şekil 1.** Glokomatöz Hasarın Patogenezi

## 2.1.2. Glokomatöz Hasarda Oksidatif Stresin Rolü

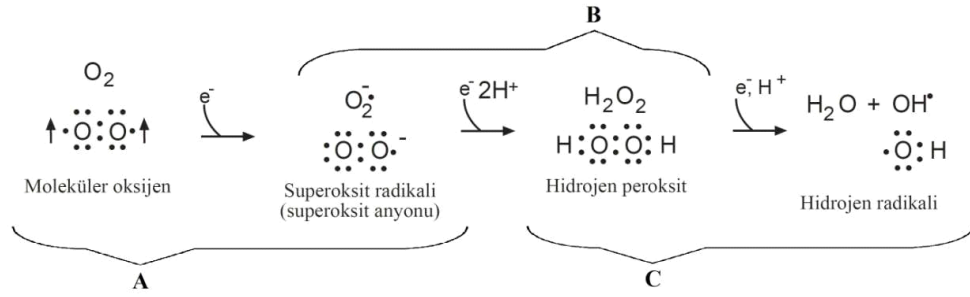
### 2.1.2.1. Serbest Radikal Tanımı

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 (25-27). Serbest radikaller rastlantısal bir şekilde metabolizmanın yan ürünleri olarak veya belli bir amaca yönelik olarak (ör: fagositoz) hücre içerisinde sürekli üretilirler.

### 2.1.2.2. Reaktif Oksijen Ürünleri ve Antioksidanlar

Reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) tek elektrona sahip atom veya moleküllerdir. Bu özellik onları diğer molekül türlerine göre oldukça reaktif yapmaktadır. ROÜ biyolojik sistemlerde radyoliz, fotoliz, organik materyalin termal yıkımı, metal iyonlarının ve enzimlerin katalize ettiği redoks reaksiyonu gibi çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşur (28,29). Örneğin ROÜ, oksijen varlığında doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmektedir (30). ROÜ'nün neden olduğu oksidan yıkım; iskemi, hiperoksijenizasyon ve doku inflamasyonu gibi birçok olayda yer alarak hastalıkların patogeneğinde rol oynar (31). ROÜ oluşumu, aerobik koşullar altında süren yaşam ile ve hem fizyolojik hem de patofizyolojik koşullar altında üretilen reaktif araçlar ile ilgilidir (32). ROÜ DNA, karbohidratlar ya da proteinler gibi biyolojik makro moleküllere hasar verebilme yeteneğine sahiptir. Bu oksijen metabolitleri ya hidroksil radikali (OH.), peroksil radikali (ROO.) gibi radikal ya da singlet oksijen ya da hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif radikal olmayan bileşiklerdir (33).

Süperoksit hücre içerisinde moleküler oksijenin redüksiyonu ile oluşan başlıca serbest radikaldir (32). Süperoksit anyonu elektron fazlasını bir başka elektron alıcısına vererek tekrar moleküler oksijene ( $O_2$ ) oksitlenebilir. Ya da bir elektron daha alarak peroksil anyonunu oluşturur, bu da ortamdan iki proton alarak ( $H^+$ )  $H_2O_2$  oluşumuna neden olur (33).



**Şekil 2. A.** Moleküler oksijenin superoksit radikaline indirgenmesi **B.** Superoksit radikalinin hidrojen peroksitine indirgenmesi **C.** Hidrojen peroksitten su ve hidroksil radikali oluşumu

Mitokondrideki respiratuar zincir serbest oksijen radikalleri (SOR) nin güçlü bir kaynağıdır (34). Bir diğer önemli SOR kaynağı inflamatuvar (özellikle kronik inflamasyon) reaksiyonlardır. Aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücreler çeşitli SOR'ları ( $H_2O_2$ , NO) ve hipokloriti (HOCl) serbest bırakırlar. Nötrofiller membrana bağlı çok bileşenli nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz olarak adlandırılan bir enzim kompleksine sahiptirler. NADPH oksidaz aktive edildiğinde büyük miktarda SOR üretir (35). Bu sistem nötrofil “respiratuar patlama”dan (fagositozda artmış solunum) sorumludur. Süperoksit anyonu, hücre membranlarından kolay geçemediği için kendisi doğrudan zarar vermemektedir (36). Süperoksitin asıl önemi, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve  $H_2O_2$  kaynağı olmasıdır. 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 (36,37).

Peroksil radikalleri, poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) hidrojen atomunun çıkarılması ile başlatılan lipit peroksidasyonu sırasında meydana getirilebilir (38). Peroksil radikalleri biyolojik sistemlerde önemli difüzyon kabiliyetine sahip ve oldukça uzun ömürlü türevlerdir. Ayrıca lipit peroksidasyonunda oluşan ürünler aldehitlerdir (39). 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 hücrenel metabolik disfonksiyon ile sonuçlanır (40).

### **2.1.2.3. Retinadaki Antioksidanlar**

Biyolojik sistemlerde serbest radikal temizlenmesi, univalan oksijenin yok edilmesi ve hidroperoksitlerin enzimatik indirgenmesi gibi birkaç antioksidan mekanizma gösterilmiştir. Nonenzimatik olanlar; askorbik asit (C vitamini), melanin, selenyum, vitamin E ve karotenoitlerdir (lutein, zeaksantin). Enzimatik olanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon transferaz ve glutatyon redüktazdan (GSH-R) oluşan glutatyon sistemidir (30,41).

### **2.1.2.4 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 (42). Çünkü nitrik oksit biyolojik membranlara kolayca penetre olabilen serbest bir gazdır. Nitrik oksit sentaz prekürsor aminoasit sustratı olan L-arjinini, terminal guanidino nitrojeninin oksidasyonunu enzimatik olarak katalizleyerek L-sitrüline çevirir ve NO'yu meydana getirir (43).

NO birçok hücre tipi tarafından sıkı bir regülasyonla üretildiği bilinen, atmosferik bir gazdır. NO, dokularda çözünebilir ve membranlarda serbestçe difüze olur (44). NO hem intrasellüler olarak plazma membran reseptörlerinin aktivasyonundan sorumlu ikincil haberci hem de ekstrasellüler olarak hücreler arasında bilgi taşıyan parakrin faktörü olarak geniş fonksiyonlara sahiptir (44). Bu serbest radikalın vasküler tonus üzerinde etkili olduğu, nörotransmisyonunda görev aldığı ve immünotoksitede (45,46) rolü olduğu gösterilmiştir. Nitrik oksitin kontrolsüz üretimi sonucu proteinlerin nitrolizasyonu, DNA kırılmaları ve diğer moleküler etkileşimler ile beyin dokusunda hasar meydana gelebilir (46).

Nitrik oksit sentaz izoformları genellikle iki kategoride incelenir (i)  $Ca^{2+}$ /kalmodülin bağımlı constitutive NOS (NOS1 ve NOS3) ve (ii) ekspresyonu sitokinler ve diğer inflamatuvar uyaranlar ile artan indüklenebilir NOS (NOS-2 veya

iNOS). Nöronal NOS (nNOS, NOS-I), indüklenebilir NOS (iNOS, NOS-II) ve endotelial (eNOS, NOS-III) olmak üzere üç NOS izoformu bulunmaktadır. Üçü de NADPH ve oksijene ko-substrat olarak ihtiyaç duyar. Nitrik Oksit Sentaz- 1 ve NOS-3 izoformları sırası ile insan retina ve retinal vasküler endotelial hücrelerden klonlanmıştır (47,48). Nitrik Oksit Sentaz-1 farklı türlerde amakrin hücrelerde, iç nükleer tabaka ve retina fotoreseptörlerinde immünohistokimya ile tanımlanmıştır (49). Nitrik Oksit Sentaz-2 izoformu artmış GİB ve üveit koşulları altında kornea, iris, silier cisim, nöronal retina, retinal glial hücreler ve optik sinir başında gösterilmiştir (44,50).

### **2.1.2.5 Nitrik Oksit ve Oksijen Radikalleri Arasındaki Etkileşim**

Süperoksit radikalının NO 'ya karşı afinitesi yüksektir. Nitrik oksit ve O<sub>2</sub>- arasındaki reaksiyon peroksinitrit (ONOO-) olarak adlandırılan yeni bir molekülü meydana getirir (51). 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 (51). Nitrik oksitin metalloproteinler, protein sülfidril ve oksijenden türeyen serbest radikaller ile reaksiyonu inflamasyon ve oksidatif strese aracılık etmesini sağlar (52).

### **2.1.2.6 NO ve Glokom**

Aköz damar dış akımın düzenlenmesinde yer alan trabeküler ağın NO veya endotelin ile gevşeyen ya da kontrakte olan intrinsik kontraktıl elemanları mevcuttur. Bu nedenle NO aköz humör dış akımını arttırabildiği ve böylece GİB' nı düşürdüğü fakat endotelinin GİB'in artmasına neden olacak dış akımı azalttığı tahmin edilmektedir (53).

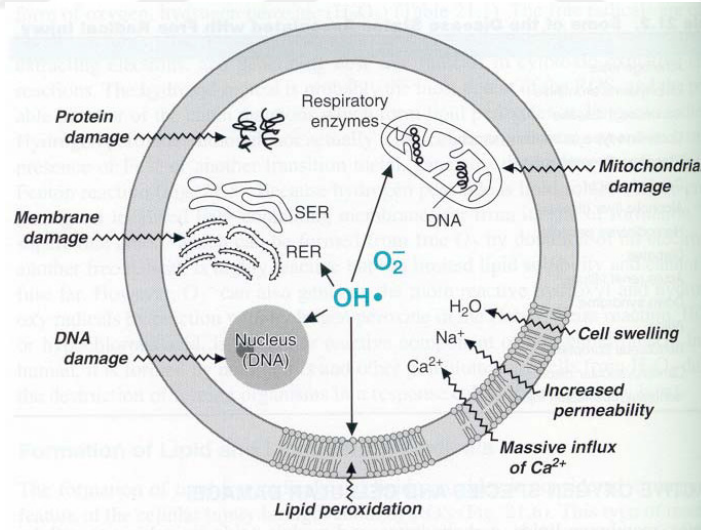
Glokom hastalarının gözlerinde NO üretiminde sorumlu enzim NOS'un belirgin şekilde azaldığı histolojik olarak da gösterilmiştir. Bundan dolayı glokomda gözlenen GİB yükselmesinde NO üretimindeki düşüşle direkt bağlantılı olabilir (54).

Nitrovazodilatörün retinal kan akımını arttırıcı ve glokomda hasarlanmış retina

hücrelerinin üzerinde faydalı etkileri de bulunmaktadır. İndüklenebilir NOS selektif inhibitörü ilacın RGC ölümünü azalttığı, nöroprotektif etkinliği sıçanlardaki glokom modelinde gösterilmiştir (55).

### 2.1.2.7. Lipit Peroksidasyonu ve Glokom

Oksidatif stres sırasında üretilen SOR lipidlerin (hem hücresel membran lipidleri hem de dolaşımda bulunan lipoprotein molekülleri) peroksidasyonunu indükler ve oldukça reaktif aldehytleri meydana getirir (56). Oluşan son ürünler MDA ya da 4-hidroksinanenal (4-HNE) oksidatif streste patolojik moleküler süreçte iyi bilinen markırlardır (57). Primer açık açılı glokom (PAAG) hastalarından toplanan 49 gözün lens, aköz humor ve trabeküler ağ dokusu lipid ekstraktlarında kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında glokom hastalarının aköz humor ve trabeküler dokuda lipid peroksidasyon ürünleri anlamlı düzeyde yüksek konsantrasyonda bulunmuştur (58). Benzer şekilde; yapılan bir diğer çalışmada artmış GİB'e sahip ratlarda MDA seviyeleri vitreus ve retinada yüksek olarak bulunmuştur (59,60).



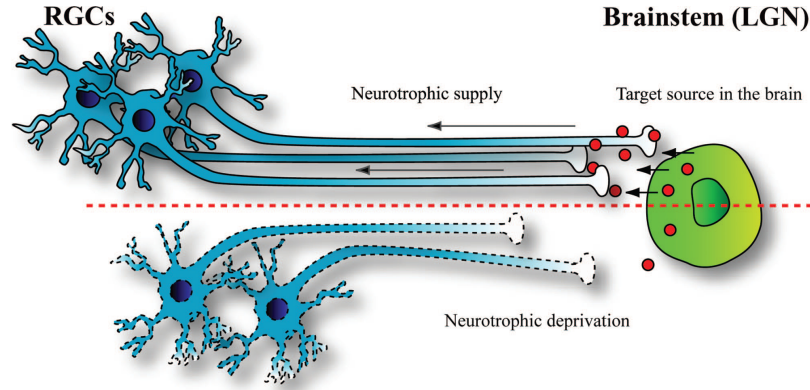
Şekil 3. Lipid Peroksidasyonu

## 2.2. Retina Ganglion Hücre Ölüm Mekanizmaları

İlk travmanın tipine bakmaksızın, aksonal hasar RGH'nin ölümünü apoptozis ile indüklemektedir (61). RGH hasarının ilk belirtileri, dendritik ağacın incilmesi, sonrasında hücre gövde ve aksonlarında boyutlarında küçülmedir (62). Glokomlu gözlerde GİB yükselmesi sonucu ortaya çıkan akson hasarı eksitatuar bir aminoasit olan glutamat artışına neden olur. Nöron kaybı ile ekstraselüler ortama glutamat salınır. Glokomda taşıyıcı düzeyinin azalması ile de glutamat düzeyi yükselir. Bu artış N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aktive eder.

Nitrik oksit etkisi: NMDA reseptörlerinin uyarılması ile NOS enzimi aktive olur. NO bir mesaj mediyatörüdür ve retinal kan akımının düzenlenmesinde, hümör aköz yapımında görev almaktadır. NO serbest oksijen ile birleşir ve çok güçlü bir toksin olan peroksinitrit anyonlarını oluşturur. Bu da apoptozise yol açar. NO glokomda RGH ölümünde önemli bir mediyatördür.

Nörotrofik Faktörlerin Etkisi: Beyin kökenli nörotrofik faktör (Brain derived neurotrophic factor, BDNF) reseptörü olan Trk B retina NO sentaz ile aynı lokalizasyondadır. BDNF ile Trk B uyarımı aynı zamanda NO sentaz enzimini de aktive etmektedir. NTF aksonal geri taşıma ile beyinden RGH ye gelen yaşam sinyalleridir. Nöron hasarında aksonal nörotrofik faktör taşıması artar. Ancak akson basısı devam ettiği sürece beyinden RGH ne ulaşan NTF'de azalma olur. Bu durumda RGH'ye yaşam sinyalleri ulaşamaz ve hücre ölümü hızlanarak devam eder. Bu faktör beyindeki hedef nöronlar tarafından salınır. Ganglion hücreleri de bu nöronlarla sinaps yapar ve nörotrofini alıp retinaya ulaştırır. Gelişim dönemi süresince BDNF bu yolla gelir, kullanılır ve tüm retina ganglion hücreleri de bu desteğe bağımlı kalır. Deneysel olarak eğer BDNF taşınımı bir şekilde engellenecek olursa, ganglion hücrelerinin hasara uğradığı görülmüştür. Nörotrofinlerin blokajı, hasar kaskadını başlatır ve hücreler normal fonksiyonunu sürdüremezler (63,64). Retinal gangliyon hücreleri normal fonksiyonlarını sürdüremez ve apoptozise uğrarlar.



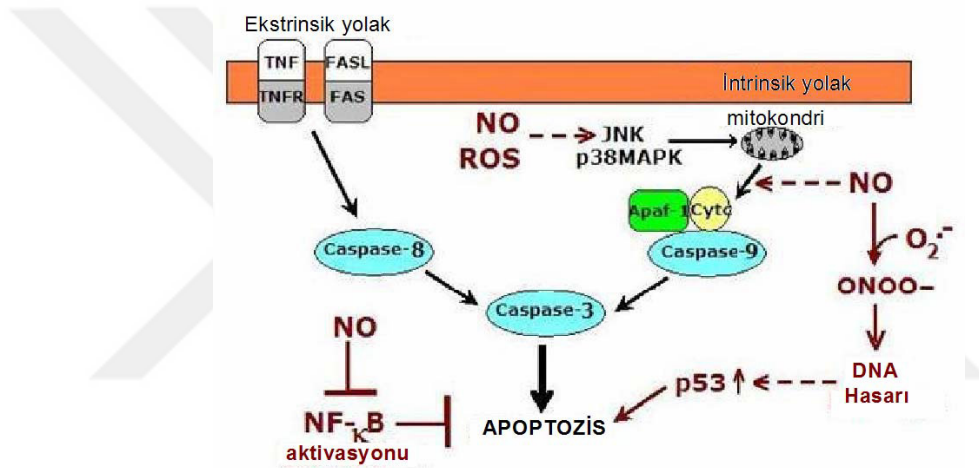
**Şekil 4.** Nörotrofinlerin blokajı ve RGC hasarı

Glokomda görme kaybının ana mekanizması, retinanın iç nükleer tabakası ve sinir lifi tabakasının zayıflamasına ve optik sinirde aksonal kayıba neden olan RGC apoptozisidir (65). Makrofajlar (66) , astrositler (67) ve nöronal hücrelerde (68) nitrik oksit in aracı olduğu sitotoksiste ve apoptozisi uyaran 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 tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) 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 (69). 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 (70). Nitrik oksit de tirozin nitrasyonu ile mitokondriden sitokrom c'nin direk olarak salınımını uyarır .

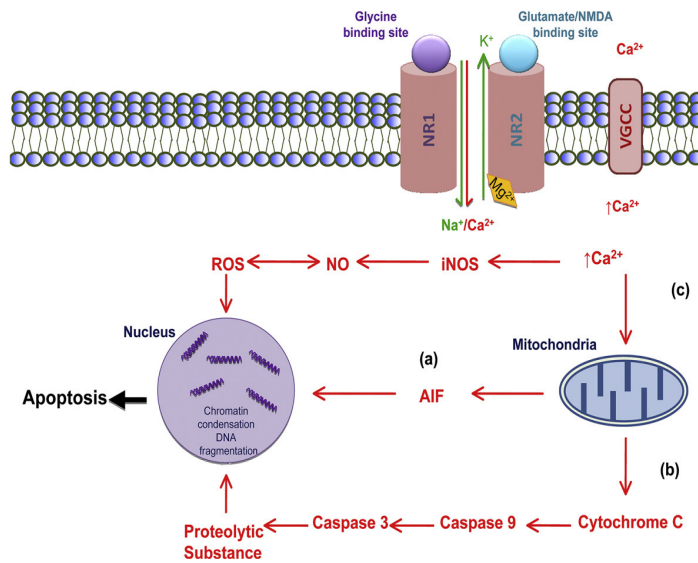
Nitrik oksit aracılı apoptozisin mekanizması tam olarak açıklanmamasına rağmen yüksek konsantrasyondaki NO ve peroksinitritin apoptozisin uyarılmasına ve p53'ü (apoptozise neden olduğu rapor edilen) aktive ederek hücre büyümesinin durmasına neden olarak DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir (71). Nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) antiapoptotik proteinleri kodlayan genleri artırarak apoptozise karşı koruyucu rol oynar (72). Nitrik oksit NF- $\kappa$ B inhibitörü alt ünitesi olan I $\kappa$ B $\alpha$ 'nın

ekspresyonunu ve NF- $\kappa$ B/ I $\kappa$ B $\alpha$  kompleksinin stabilizasyonunu uyararak NF-  $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe eder (71).

Nitrik oksitin tersine oksidatif stres NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilasyonuna yol açan I $\kappa$ B kinazı (IKK) aktive eder. I $\kappa$ B $\alpha$ '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. NO'nun başlattığı apoptotik hücre ölümünün başlıca sinyal bileşenleri Şekil 5 ve 6 'da gösterilmiştir. Apotozis'in en tanımlayıcı özelliği DNA fragmantasyonunun olmasıdır.



Şekil 5. Apoptozisin başlıca sinyal bileşenleri



Şekil 6. Apoptozisin başlıca sinyal bileşenleri

Glokomda tedavinin primer amacı RGH harabiyetini azaltmaktır. RGH kaybı yıllık 10 bin civarında olup 80 yaşında yaklaşık %30'u kaybolmaktadır. GİB yüksekliği ve diğer faktörlerle kayıp daha da artar (73).

Asıl nöron koruma, GİB düşürücü etkiden bağımsız glokomatöz optik nöropatinin potansiyel tedavisidir. Amaç, retina ganglion hücrelerinin devamının sağlanmasıdır, bunun için nöron koruyucunun hedef dokuya yeterli oranda geçmesi gerekir. Şu anda müdahale edebildiğimiz tek risk faktörü GİB dir. Bu da indirekt bir nöron koruma olarak değerlendirilebilir (74).

### **2.3. Glokomda Nöroprotektif Tedavi**

#### **2.3.1. Glokomda Nöroprotektif Tedavinin Temeli ve Gerekçesi**

Nöronal hücre ölümü, normal SSS gelişiminin akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklarının belirgin özelliğidir. Nöroproteksiyon terimi sıklıkla Alzheimer hastalığı, inme ve glokom gibi birçok nörodejeneratif hastalıktaki ortak son aşamanın patojenik faktörlerine karşı geliştirilen tedavi modellerini ifade etmektedir. Bu faktörler eksitotoksite, serbest radikaller, oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon, intrasellüler birikimler ve apoptozisin kendisidir (75).

Retina gangliyon hücre ölümü klinikte optik nöropati olarak bilinir. En sık görülen formu glokom olmakla birlikte birçok antiapoptotik ve nöroprotektif mekanizmalar üzerinde çalışılmaktadır. Glokomda önerilen nöroprotektif ilaçlar eğer retinaya ulaşabiliyorsa “direkt nöroproteksiyon”, eğer bir risk faktörü üzerinden etki ediyorsa “indirekt nöroproteksiyon” terimi kullanılmaktadır (76).

Direkt nöroproteksiyon mekanizmaları:

- a) Nöroprotektan, ganglion hücre membranı üzerinden etki gösterebilir.
- b) Nöroprotektan, retina ve/veya optik sinir glia hücreleri üzerinden etki gösterebilir.
- c) Nöroprotektan, gangliyon hücre aksonu üzerinden etki gösterebilir.
- d) Nöroprotektan, retina ve/veya optik sinir kan damarları üzerinden etkili olabilir.

e) Nöroprotektan herhangi bir retinal nöron üzerinden etki gösterebilir.

İndirekt nöroproteksiyon mekanizmaları:

- a) Hedeflenen göz içi basıncını sağlayabilir.
- b) Otoregülasyon mekanizmasındaki aksaklık giderilebilir.
- c) Lokal vazospazmlar düzeltilir.
- d) Sistemik arteriyel hipotansiyon uygun şekilde düzenlenebilir.

Nöroproteksiyon; nöronal yaşam süresini arttırmaya yönelik olarak geliştirilmiş bir tedavi yaklaşımıdır (8). Nöroproteksiyonun glokom tedavisindeki yeri ile ilgili tartışmalar halen sürmektedir. Bu yeni tedavinin yaklaşım ve mantığı geleneksel tedavi yöntemlerinden çok farklıdır. Tartışılan üç soru gündeme gelmektedir.

1. Çoğu hastada GİB düşürülebilir iken neden nöroproteksiyona ihtiyaç vardır?
2. Neden nöroproteksiyon RGH'ya yöneliktir?
3. Nöroproteksiyonun doğru strateji olduğunun kanıtları nelerdir?

Randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen bilgiler ile de gösterilmiştir ki; mükemmel GİB kontrolüne rağmen bazı hastalar progrese olmaktadır (21). İleri Glokom Girişimsel Çalışması (Advanced Glaucoma Intervention Study - AGIS) dahilindeki bir retrospektif analizde 2 yılda kötüleşme oranlarında artış tespit edilmiştir (5). Birleşik Normotansif Glokom Çalışma Grubunun (Collaborative Normal Tension Glaucoma Study) sonuçlarına göre; GİB %30 ve daha fazla düşürülmesine rağmen, hastaların %20'sinde 3-5 yılda progresyon gözlenmiştir. Sonuç olarak, anlamlı düzeyde GİB düşürülmesine rağmen hastalık progresyon gösterebilmektedir (6,7). Bu çalışmanın sonuçları da GİB düşürülen hastalarda nöroproteksiyonun rolünü destekler niteliktedir.

Geleneksel tedavinin yetersizlikleri ve yan etkiler nöroproteksiyonun diğer bir gerekçesidir. Bazı hastalarda düşük GİB elde etmek zordur. Bunun sebebi, bu tip hastaların GİB düşürücü ajanlara iyi yanıt vermemesi, ya da bu ilaçlara ve cerrahi prosedürlere karşı geliştirdikleri yan etkiler veya başedilmesi güç, hastaya ait faktörlerden doğan yanıtızsızlıklardır. Böylece GİB düşürmeye yönelik geleneksel

mekanizmalar veya dışa akımı arttırmaya yönelik tüm uygulamalar etkindir denilebilir ama bunlar her hastada yeterli ve iyi tolere edilir olamayabilmektedir (8).

### **2.3.2. Nöroproteksiyonda Hedef Neden Retina Ganglion Hücreleridir?**

Glokomda nöroproteksiyonun hedefi RGH gövdeleri, aksonları ve dendritleridir. Çünkü;

1)RGH'ler retinadan çıkış nöronlarıdır ve bu sebeple vizüel sinyallerin gözden beyne ulaştırılmasından sorumludurlar.

2) RGH'lerin ölümü glokomatöz optik nöropatinin sebebi gibi görünmektedir.

3) RGH kaybı geri dönüşümsüzdür çünkü RGH'ler SSS nöronlarıdır ve öldüğünde bu hücreler retinada görülmez olmaktadır.

Bu üç faktör göstermektedir ki; RGH kaybı geri dönüşsüz görme kaybına neden olabilmektedir. Retinadaki diğer nöroglial hücre tipleri (örneğin astrositler, glialar) da nöroproteksiyonun hedefidir. Ancak glokomatöz optik nöropatinin final ortak yolu RGH nin kaybıdır ve nöroproteksiyonun hedefi öncelikli olarak bu hücreleri yaşatmaktır (8).

### **2.3.3. Nöroproteksiyon Glokom Tedavi Stratejisi Olabilir Mi?**

Retinal ganglion hücrelerinde hasarı başlatan bir uyarı, daha sonra çevredeki sağlıklı hücrelerde de ikincil dejenerasyona sebep olabilecektir. Böyle bir süreçte bize görme alanındaki ilerleyici kaybı anlamaya yardımcı olacaktır. Optik sinirin hasarlanması akut dejeneratif süreçlerin bir toplamı olarak düşünüldüğünde, bunu başlatan nedenlerin ya da ikincil olayların bilinmesi de gerekmektedir. Glokomatöz optik nöropati için bu nedenle tüm optik sinirin kronik bir hasarlanma süreci değil de optik sinirin her bir aksonunun akut kaybı ile ya da ganglion hücrelerinin herbirinin ayrı ayrı ölümü ile oluşan bir süreç olduğunu söylemek belki de daha doğru olur (77).

Apoptozis ile ölmüş hücreler arasında ölüm emrini almış ama halen canlı olan ve henüz hasar emrini almamış hücreler bulunur. Nöroproteksiyon, bu iki grup hücrenin stresten kurtarılarak canlılıklarını koruma çabasıdır. Glokomda nöron koruyucu

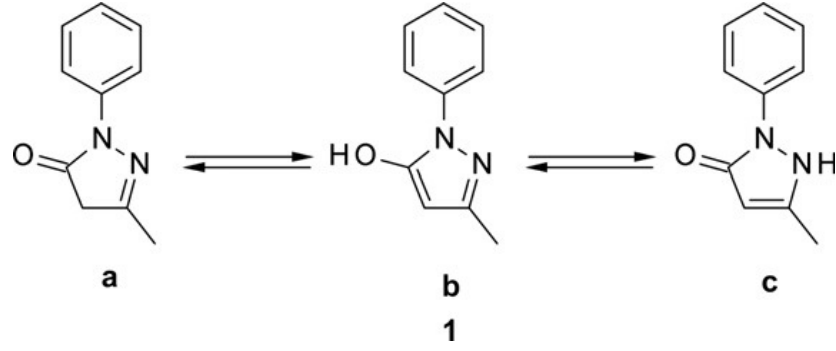
tedavinin amacı, iskeminin tetiklenmesi ile başlayan bir dizi ardışık reaksiyonlarla hücreyi ölüme götüren zincirin herhangi bir halkasına etki ile bu zinciri kırmak ve hücre yaşamının devamını sağlamaktır. Santral sinir sisteminde oluşan inmenin fizyopatolojisinden biliniyor ki akut bir iskemi sonrası gelişen nörodejenerasyona ikincil olarak daha sonra ortaya çıkan ve yine ilk hasarlandırıcı uyarana bağlı oluşan gecikmiş bir nöron kaybı ortaya çıkmaktadır.

Beyindeki iskemik hasar (inme veya miyokard enfarktüsü sonrası), beyin nöronlarının ölümünün sonucudur. Beyindeki nöronal hasarı azaltacak nöron koruyucu maddelerin araştırıldığı laboratuvar çalışmalarında kullanılan nöroprotektan maddeler hasar oluşmadan önce veya hasar anında kullanıldığında olumlu sonuçlara varılmıştır (78-80).

Glokomda RGH'lerin ölüm sebebi iskemi olabilir. İnme sürecinde dakikalar içerisinde meydana gelen nöron kaybı, glokomatöz nöropatide yıllar içerisinde görülmektedir. Her iki durumda da nöroprotektan kullanımının nöron kaybını azalttığı, ölüme giden süreci uzattığı görülmektedir (81). Nöron koruyucu tedavi ne kadar erken evrelerde başlanırsa ölüm hızını o kadar azaltacağı aşikardır. Optik disk alanında oküler kan akımının azaltıldığı glokom benzeri hasarlarda nöroprotektan verilmesi ile hücre ölümü sürecinin yavaşlatılabildiğini savunan çalışmalar mevcuttur (82,83).

#### **2.4. Edaravone**

Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, MC-186, EDA ) serbest radikal süpürücü olarak klinikte akut iskemik inme tedavisinde Japonya'da 2001'den beri kullanılmaktadır. Moleküler formülü:  $C_{10}H_{10}N_2O$  . Moleküler ağırlığı: 174.20 . 3 tane tautomerik formu olan asit pirazolin bir ilaçtır (Şekil 7).İnsan serum albuminine %92 oranında bağlanır. EDA verildikten 12 saat sonra idrarda metabolitleri glukronik asit kompleks ve sülfat kompleksleri %79,9 oranında atılır.



**Şekil 7.** Edaravone ve tautomerik formları

EDA' nın nöroprotektif , serbest radikal süpürücü , antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkileri çalışmalarla gösterilmiştir.

Serebral infarktındaki klinik kullanımında çok iyi sonuçlar elde edilmiştir (84-86). Munakata ve ark, anevrizmal subaraknoid hemorajili hastalarda edaravone tedavisi uygulanmasıyla gecikmiş iskemik nörolojik defisitlerin ve vazospazma bağlı serebral infarktın azaldığını , nöroprotektif etkinliği göstermişlerdir (87). EDA serebral tromboz ve emboli nedeniyle oluşan akut inme tedavisinde başarıyla kullanılan nöroprotektif ilaçtır. Faydalı etkilerini serbest radikal süpürücü etkisiyle sağlar (88). Reaktif oksijen radikallerinin üretimini baskılayarak kalp ve beyin reperfüzyon hasarından korur (89).

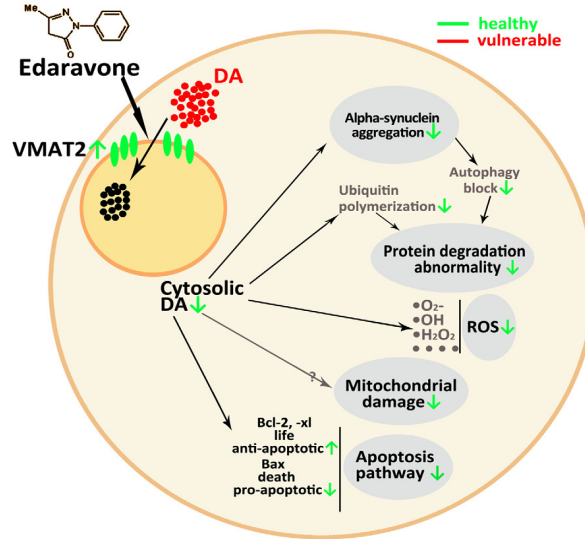
Okatani ve ark, edaravone uygulanan sıçanların karaciğerlerinde iskemi/reperfüzyon boyunca mitokondri fonksiyonlarının ve enerji düzeyinin korunduğunu göstermişlerdir (90). Retina ven dal oklüzyonu ilişkili maküla ödemi gelişmiş hastalara arteriovenöz sheathotomy uygulanıp edaravonenin serbest radikal süpürücü etkisi olduğu ve tedavi gruplarında maküla ödeminin gerilediği, görme keskinliklerinin arttığı gösterilmiştir (91).

İskemi periyodundan sonra reperfüzyon olduğunda serbest oksijen radikalleri ve Ca artışıyla mitokondri iç membranındaki permeability transition pore (PTP) denilen ve hücre hasarına neden olan nonspesifik por açılır. Siklik GMP'nin antiapoptotik etkisi mitokondrial PTP'nin inhibisyonu nedeniyle olabilir. Reperfüzyon başlamadan mitokondrial PTP'nin açılmasının baskılanması hücre hasarını azaltır. Rajesh ve ark edaravonenin kalbi reperfüzyon hasarından mitokondrial PTP'nin açılımını inhibe ederek koruduğunu göstermişlerdir (92). Edaravone Ca artışını inhibe ederek serbest

oksijen radikallerinin üretimini engeller ve mitokondrial PTP'nin açılmasını engelleyip mitokondrial şişmeyi engelleyip beyin hücrelerinin hasarlanmasını önler (93). Multipl etki mekanizması olan edaravone glokomda NTF'yi uyararak nöroprotektif etki gösterebilir.

Noor ve ark, 7 günlük sıçanlara hipoksik iskemik ensefalopati modeli uygulayıp edaravone tedavisi verip nöroprotektif etkinliğini davranış testleri ve histolojik olarak incelemişler. Aynı dozlardaki tedavilerde tedavi süresiyle ters orantılı olarak morfolojik ve davranışsal iyileşmenin olduğunu gözlemişler (94). Yine Yasuoka ve ark sıçan neonatal hipoksik iskemik ensefalopati modelinde edaravonenin apoptozis ve nekrozu azalttığını göstermişler (95). Edaravonenin antioksidan etkisi ve apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1 (ASK1) inhibisyonuyla yüksek basınçla indüklenen sol ventrikül hipertrofini azalttığı gösterilmiştir (96).

Parkinson hastalığında yoğun reaktif oksijen ürünleri, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun patogeneizde rol oynadığı bilinmektedir. Parkinson modelinde EDA tedavisi serbest oksijen radikallerinin üretilmesinde inhibisyon, apoptotik promotör Bax ekspresyonunda inhibisyon ve veziküler monamin transporter 2 (VMAT2) ekspresyonunda upregülasyon sağlamıştır (Şekil 8). VMAT2 sitozolik dopamin alımı yapar ve dopaminin sitotoksitesini azaltır (97,98).



**Şekil 8.** Edaravonenin dopaminerjik nöronlardaki nöroprotektif etkisi. VMAT2 ekspresyonunun edaravone tedavisiyle upregülasyonu, apoptotik yolun baskılanması, mitokondrial hasarın azalmasıyla dopaminerjik nöronlar daha sağlıklı olur.

Edaravonenin kranial radyasyon sonrası nöronları apoptozisten koruduğu gösterilmiştir (99). Yine insan nöral kök hücrelerini radyasyonun indüklediği apoptozisten korumuştur (100).

Edaravonenin antiinflamatuvar etkileri de mevcuttur. Deneysel multiple skleroz modelinde, edaravonenin klinik ciddiyeti, lenfosit infiltrasyonunu ve iNOS ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (101). Sıçandaki serebral anevrizma modelinde NF-kB aktivasyonu inhibisyonu, kemoatraktan protein-1, vasküler hücre adezyon molekül-1, matriks metalloproteinaz-2 ekspresyonunun azalması sağlayarak anevrizma duvarında makrofaj infiltrasyonunu azaltmıştır (102).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; glokom indüksiyonu, enjeksiyonlar, sakrifikasyon işlemi ve immunfloresan mikroskopik preparatların hazırlanması Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB) yapılmıştır. İmmunfloresan değerlendirmeler ve görüntüleme işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal değerlendirmeler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yapılmıştır. İmajlar Image Pro Plus (IPP 5.1 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) programıyla analiz edilmiştir. Çalışma Helsinki Bildirgesinde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

#### 3.1. Denekler

Çalışmada toplam 60 adet erişkin erkek Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Deneklerin ortalama ağırlığı  $383 \pm 21$  gram olarak hesaplandı. Denekler standart kafeslerde 7'li gruplar halinde, ad libidum standart yem ve su verilerek, ısısı ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması floresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00–18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

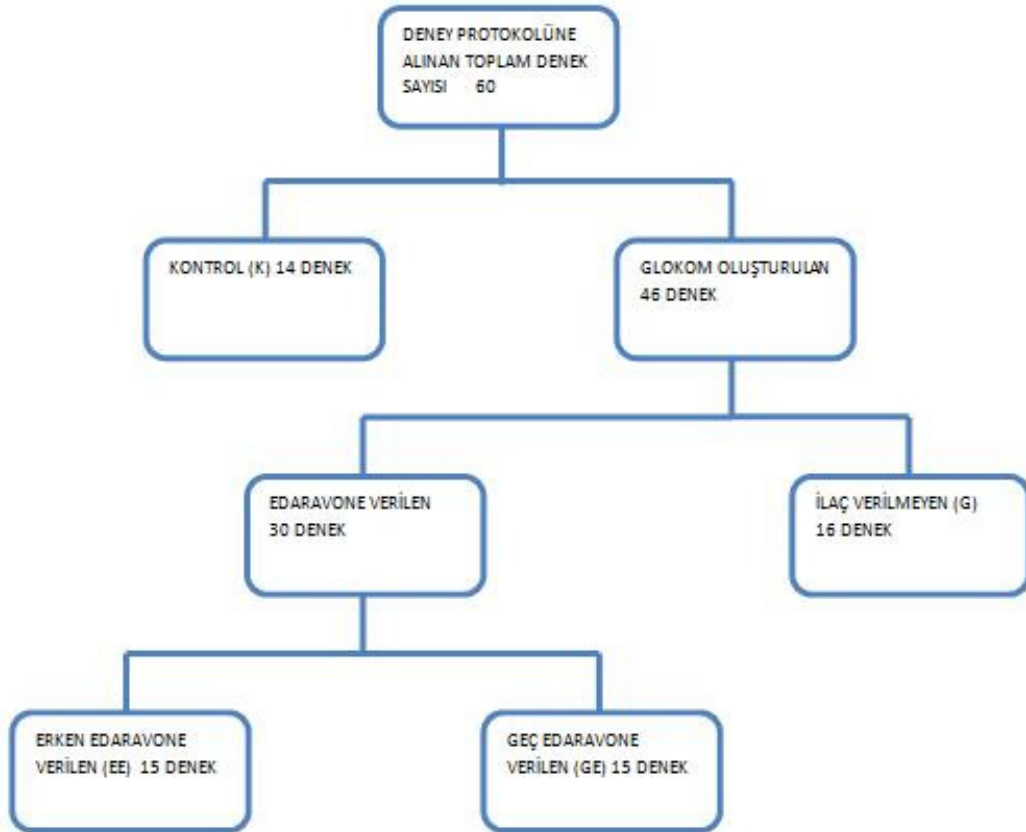
Denekler, glokom indüksiyonu uygulanan (46 adet denek) ve kontrol grubu (K) denekleri (14 adet denek) olarak önce iki gruba ayrıldı. Kontrol grubuna ilaç verilmeksizin ön kamaralarına 30 G enjektör ile girilerek salin enjeksiyonu yapıldı. Glokom indüksiyonu başarıyla yapılan toplam 46 adet denek şu şekilde gruplandı (Şekil 9):

Glokom indüksiyonu sonrası 6. haftada sakrifiye edilen ve kontrol çözeltisi olarak fizyolojik %0,9 salin içinde %0,5'lik dimetilsülfoksit (DMSO) enjeksiyonu yapılan denekler (Glokom Grubu – G; 16 adet denek)

Glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı 3 mg/kg/gün intraperitoneal yoldan edaravone verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Erken Dönem Edaravone Grubu – EE; 15 adet denek)

Glokom indüksiyonu sonrası 3. haftadan itibaren 3 mg/kg/gün intraperitoneal yoldan edaravone verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Geç Dönem Edaravone Grubu – GE; 15 adet denek)

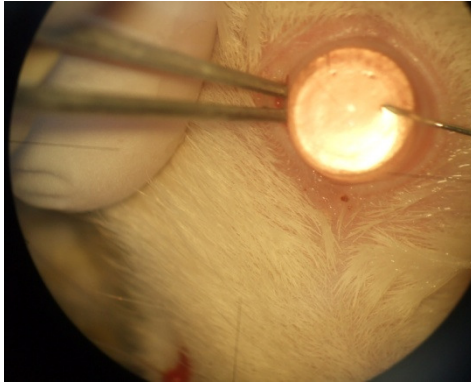
Glokom grubuna herhangi bir ilaç uygulanmadı. Kontrol grubuna (K) ise herhangi bir cerrahi uygulama yapılmadı. Göz içi basınçları glokom indüksiyonunun sürdüğü 5 hafta boyunca işlem öncesi ve sonrasında haftalık olarak Tono- Pen (Medtronic Solan XL) ile ölçülerek kaydedildi. 6 haftanın sonunda gruplar kardiyak paraformaldehit perfüzyonu yöntemi ile sakrifiye edildikten sonra, fikse edilmiş olan globlara enükleasyon gerçekleştirildi (103).



Şekil 9. Deney planı.

### 3.2. Deneysel Glokom Modeli

Sıçanlara ketamin hidroklorid (25 mg/kg, Ketalar®, Pfizer) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg, Rompun®, Bayer ) intramüsküler yoldan enjekte edilerek genel anestezi uygulandı. Anestezi uygulamasını takiben, 46 adet sıçanın her iki göz ön kamaralarına 30 G iğne ile Hyaluronik asid (Sigma catalog no. H1751; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) enjekte edildi (Şekil 10). Cerrahi mikroskop (model OMS-75; TOPCON, Tokyo, Japan) kullanıldı. Enjeksiyon, korneoskleral limbustan ön kamaraya self- sealing giriş yapılarak, iğne ucunun iris ve lens ile teması engellenerek ve deney süresince her hafta limbusta saat 12'den saat 6'ya doğru ilerleyerek uygulandı (104). 14 adet kontrol grubu (K grubu) sıçana ilaç verilmeksizin ön kamaralarına 30 G enjektör ile girilerek aynı miktar salin enjeksiyonu yapıldı. Glokom indüksiyonu yapılan diğer gruplara birer hafta arayla 5 hafta süresince enjeksiyonlar tekrarlandı. Her enjeksiyondan hemen önce ve sonra GİB ları ölçüldü. GİB ölçümleri 10 mg/kg ketamin hidroklorid ve 1 damla topikal %0,4 proparakain hydrochloride %0,5 (Alcaine®, Alcon) ile hafif anestezi uygulamasını takiben, Tono-Pen ile yapıldı. Enjeksiyonlar ve ölçümler hep aynı saatte (08:00-10:00) yapıldı.



**Şekil 10.** Limbustan ön kamaraya giriş ve hyaluronik asid enjeksiyonu



**Şekil 11.** Glokom indüksiyonu. Hyaluronik asid enjeksiyonu sonrası iris damarlarının solması

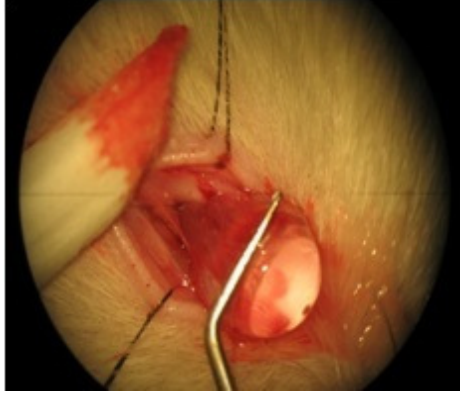
### **3.3. İlaçların Uygulanması**

Erken Dönem Edaravone Grubuna (EE) (15 adet denek), glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı başlanarak her gün aynı saatte (10:00-12:00) tek doz 3 mg/kg/gün Edaravone %0.9'luk salin içinde %0,5'lik DMSO ile çözülerek intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 42 doz edaravone uygulandı.

Geç Dönem Edaravone Grubuna (GE) (15 adet denek), glokom indüksiyonunun başlangıcından 3 hafta sonrasında başlanarak her gün aynı saatte (10:00-12:00) tek doz 3 mg/kg/gün Edaravone, %0.9'luk salin içinde %0,5'lik dimetilsülfoksit ile çözülerek intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 21 doz edaravone uygulandı.

### **3.4. Retina Gangliyon Hücrelerinin Retrograd İşaretlenmesi**

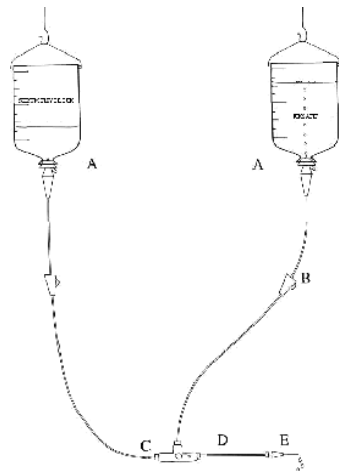
Hidrofilik bir nöron işaretleyicisi olan DTMR, 3000 MW (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) %0,9 lık NaCl içerisinde konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde çözüldü. Floresan işaretleyici dextran tetramethylrhodamine (DTMR), sakrifikasyondan iki gün önce intraorbital olarak uygulandı. DTMR enjeksiyonu için Solomon ve ark. (105) yöntemi kullanıldı. 2 mm lik bir lateral kantotomi sonrası sağ konjonktiva temporal limbus boyunca saat 1'den 4'e kadar açıldı. Lateral rektus kası bulunarak insersiyon yerinden kesildi. İnce kör makaslarla glob arkasındaki, optik sinir etrafındaki dokular ve ekstraoküler kaslar disseke edildi (Şekil 12). Optik sinir etrafındaki nöral kılıf optik sinirin 3 mm gerisinden vasküler yapılara zarar vermeden 2 mm uzunluğunda açılarak, optik sinir tam kat olarak kesildi. 30 G iğne ile 50 µl DTMR (1 mg/ml) olacak şekilde enjekte edildi. Prosedür sonunda lateral kantotomiyi kapatmak için 3/0 ipek sütür kullanıldı.



**Şekil 12.** Optik sinir disseksiyonu.

### 3.5. Sakrifikasyon ve Kardiak Perfüzyon

DTMR uygulamasından 48 saat sonra denekler sakrifiye edildi. 150 IU/kg intraperitoneal heparin verilerek 10 dk. süre ile antikoagülan etkinin oluşmasının ardından, intravenöz uygulanan 30 mg/kg sodyum pentotal ile anestezi gerçekleştirildi. V kesi ile sternum kaldırılarak toraks boşluğu açıldı. Kalbin tepesinden 18 gauge kelebek iğne sol ventriküle yerleştirildi. Daha sonra sağ atriyum kesildi ve fosfat tamponu içerisinde %4'lük paraformaldehit ile kardiak perfüzyon gerçekleştirildi (Şekil 13). Global oryantasyon için süperiordan sütür ile limbustan işaretlendi, fikse edilmiş olan globlara enükleasyon gerçekleştirildi. 1 saat %4'lük paraformaldehit içerisinde bekletilen globlar, whole-mount yöntemi ile açıldı. Retinalar, whole mount yöntemiyle elde edildi (Şekil 14). Açılırken superior retina tekrar işaretlendi. İmmünofluoresan boyamalar Leica DMI 4000 marka fluoresan mikroskopta incelenerek fotoğraflandı.



**Şekil 13.** Perfüzyon düzeneği



**Şekil 14.** Whole mount retinanın incelenmeye hazır son hali

### **3.6. Retina Gangliyon Hücrelerinin Sayım İşlemi**

Lam üzerine alınan whole mount retinalar hemen immunfloresan incelemeye alındı. Whole mount retinalar immünfloresan mikroskop ile (Leica DMI 4000) DTMR işaretli hücreleri görüntüleyen uygun bir filtrelemeyle gözlemlendi. DTMR ile retrograd olarak işaretlenen RGH 'leri 200x büyütme alanında optik sinir başı pozisyonuna göre iki yarıçapta 4 yönde (süperior, temporal inferior, nazal) sayıldı. Altı alan (her biri 0.24 mm<sup>2</sup>) toplamda retina başına 24 alan olacak şekilde sayıldı. Sayım işlemi uygulanan prosedüre ve yapılan tedavilere kör olan deneyimli bir gözlemci tarafından yürütüldü.

### **3.7. Biyokimyasal İnceleme**

#### **3.7.1. Nitrik Oksit Kadmiyum Metoduyla Ölçümü:**

##### **3.7.1.1. Deprotenizasyon**

Numunelerin (doku homojenatları) 300 mikrolitresine, 600 mikrolitre 55 milimolar sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi eklenip mikserle iyice karıştırıldı (en az 30 sn). Üzerine 600 mikrolitre 75 milimolar ZnSO<sub>4</sub> çözeltisi ilave edildi ve tekrar mikserle karıştırıldı (en az 30 sn). Ardından beyaz bulanık haldeki tüm numuneler soğutmalı santrifüj cihazına konarak 5000g'de 10°C 'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmındaki saf su berraklığındaki süpernatant kısmından alınarak bundan sonraki kademelerde kullanıldı (Not:Bu aşamada 5 kez dilüsyon yapılacaktır).

##### **3.7.1.2. Kadmiyum Aktivasyonu**

Küçük bir cam kavanozda bulunan ve en az 12 saat H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde bekletilmiş kadmiyum granülleri (çalışma için yeterli miktarda) üzerindeki H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> boşaltıldı. Daha sonra aynı kap içerisinde 3 kez yeterli miktarda saf su ile yıkanıp saf su boşaltıldı. Ardından her 100 gr kadmiyum için 15 ml CuSO<sub>4</sub> çözeltisi kadmiyum

üzerine ilave edilerek kavanozun kapağı kapatıldı. Kavanozu çalkalamadan hafifçe ve sürekli döndürerek mavi renkli solüsyonun berrak su rengine dönmesi sağlanıp berrak su dökülerek kavanozdaki kadmiyum (bu aşamada kadmiyumlar koyulaşmıştır) 3 kez yeterli miktarda glisin-NaOH çözeltisi ile yıkandı. En son yıkamadan sonra kavanozdaki glisin-NaOH tamamen boşaltılmadan kadmiyumun havayla temasını kesmek için yüzeyde bir miktar glisin-NaOH bırakıldı. Böylece kadmiyum aktivasyonu sağlanmış oldu. Bu andan itibaren kadmiyumların redüksiyon kapasitesinin azalmaması için en geç 1 saat içinde kullanılması gerekti.

### 3.7.1.3. Deney

Gerekli sayıda önceden saf sudan geçirilmiş temiz tüpler spora dizildi. (Standartlar, numuneler ve kör için uygun sayıda) Herbir tüpe yaklaşık 2 gr kadar aktive edilmiş kadmiyum, huniyle piset içine konulan glisin-NaOH'den bir miktar sıkılarak konuldu. Böylece hem kadmiyumların tüpe kolayca girmesi sağlandı hem de kadmiyumların havayla teması engellendi. Ardından tüm tüpler üzerindeki glisin-NaOH çözeltisi dışarıya dikkatlice döküldü. Bu sırada kadmiyumların dışarı dökülmemesine dikkat edildi. Daha sonra tüm tüplerdeki kalan glisin-NaOH ıslaklığı tüpün kenarından kaliteli bir kağıt peçete uygulaması ile tüpler yere paralel hale getirilerek ve kadmiyum kenarından peçeteye değdirilerek emdirildi. Hemen bu tüpe kadmiyumlar havayla temas etmeden 1000 mikrolitre glisin-NaOH ilave edildikten sonra diğer tüpe aynı işlem uygulandı ve bu şekilde tüm tüpler bitirildi. Daha sonra bu tüplere aşağıdaki ilaveler yapıldı. (Bu işlemler sırasında 4 kez daha dilüsyon yapıldı.)

	Standart tüpleri	Test tüpleri	Kör tüpü
Numune	-	500 mikrolitre	-
dH <sub>2</sub> O	500 mikrolitre	500 mikrolitre	1000 mikrolitre
Standartlar	500 mikrolitre	-	-

**Tablo 1.** İlave solüsyon miktarları

Tüm tüpler pipetlendikten sonra kapaklar kapatılarak elle veya bir cihazla 1.5

saat boyunca sürekli döndürüldü. Bu sırada tüpler çalkalanmadı. Ardından tüm tüpler 3000g'de 3 dakika santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki süpernatanttan 1000 mikrolitre alındı ve başka temiz saf sudan geçirilmiş yeni tüplere konuldu. Tüm tüplere süpernatantın üzerine 1000 mikrolitre gresse reaktifi konularak tüpler karanlık bir odada ışık görmeyecek şekilde 30 dakika renklendirmeye bırakıldı. Son olarak renklenen örnekler (kör, standart ve numuneler) 545 nanometre dalga boyunda okutulularak absorbanslar kaydedildi. Standart grafiği hazırlandı. Bu grafikten faydalanılarak numune konsantrasyonları tayin edildi.

NOT:Tüm numuneler deprotenizasyonda 5 kez, nitrite redüksiyon sırasında (kadmiyum safhası) 4 kez olmak üzere toplam 20 kez seyreltilmiştir. Bunu da göz önünde bulundurmak gerekir. Eğer standartlar deprotenizasyondan başlayarak tüm işlemlere numune gibi dahil edildiyse bir katsayıya gerek yoktur. Deprotenize edilmediyse sadece kadmiyum aşamasında girdiyse 4 katsayı, direkt nitrit (NaNO<sub>2</sub>) standartı söz konusuysa 20 katsayı göz önünde bulundurulmuştur. Bu son standartta ölçtüğümüz nitritin kendisi zaten varolduğu için deprotenizasyon ve kadmiyum işlemlerine gerek olmadı. Konsantrasyonlar nanomol/gram cinsindedir.

### **3.7.2. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü**

#### **3.7.2.1. Reaktif Hazırlanması**

Antioksidan bufferı, antioksidan kromojeni, antioksidan metmyoglobini, antioksidan troloxu ve antioksidan ölçümü için hidrojen peroksit solüsyonu Antioxidant Assay Kit, CAYMAN kit kataloğuna uygun şekilde hazırlandı.

#### **3.7.2.2. Numune Hazırlanması**

Numune alınarak buzlu ortamda 5 mmolar potasyum fosfat (ph 7,4), % 0,9 NaCl ve % 0,1 glukoz içeren solüsyonda homojenize edildi. Homojenizat 10000 g'de 15 dk santrifüje edildi (+4°C'de). Tüplerin üzerindeki süpernatant alınarak ölçüm için aynı gün kullanıldı. Eğer aynı gün kullanılmayacaksa -80°C'de 1 ay saklamaya alındı.

### 3.7.2.3. Ölçüm

Kontrol ve numuneler ilgili kit reaktifleri ELİSA platelerine uygun şekilde pipetlendi. Final hacimleri 210 mikrolitre idi. Sistemin oda sıcaklığına gelmesi beklenerek ELİSA cihazıyla ölçüm yapıldı. Bu ölçümler çift plate kullanılarak yapıldı. Okumalar 750nm ve 405nm plate okuyucuları kullanılarak yapıldı. Daha sonra datalar KİT prospektüsünde belirtildiği üzere trolox standart eğrisi oluşturularak konsantrasyona dönüştürüldü.

### 3.7.3. Malondialdehit Ölçümü

	<b>Kör (mL)</b>	<b>Standart (mL)</b>	<b>Numune (mL)</b>
<b>Standart</b>	-	0,1	-
<b>Örnek</b>	-	-	0,1
<b>SDS</b>	0,2	0,2	0,2
<b>HAc</b>	1,5	1,5	1,5
<b>TBA</b>	1,5	1,5	1,5
<b>Deiyonize su</b>	0,8	0,7	0,7

**Tablo 2.** Çözelti hazırlama miktarları

Numuneler yukarıdaki tabloya göre hazırlandıktan sonra 95°C’de 60 dakika su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüm numunelere 1 mL deiyonize su ve 5 mL n-butanol/piridin çözeltisinden eklendi. Tüm numuneler vortekslendikten sonra 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüjden sonra tüm örneklerin üstteki renkli organik kısımları alınarak spektrofotometrede 532 nanometrede okundu ve standart grafiği hazırlandı. Ardından numunelerin absorbansları bu standart grafiğiyle karşılaştırılarak konsantrasyonları hesaplandı ve dilüsyon faktörleriyle çarpıldı. Sonuçta numunede bulunan malondialdehit konsantrasyonları bulunmuş oldu. Konsantrasyonlar nanomol/gram olarak sunuldu.

### **3.8. Data Analizi**

Retina başına düşen yaşayan tüm retina gangliyon hücrelerinin sayısı milimetrekaredeki hücre sayısını tüm retina alanı ile çarparak bulundu. Datalar ortalama  $\pm$  SD olarak hesaplandı.

#### **3.8.1. İstatiksel Değerlendirme**

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi "SPSS for Windows version 19" yazılımı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde, değişkenlerin karşılaştırılmasında tüm gruplar için çoklu varyans analizi (ANOVA), grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise Post Hoc değerlendirme (Bonferroni testi) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. Metin içinde sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Ratların Demografik Özellikleri

Ortalama kilo taban seviyesi K grubunda  $367\pm14$ , G grubunda  $360\pm9$ , EE grubunda  $364\pm16$  ve GE grubunda  $368\pm7$  gram idi. Bütün sıçanlar kilo aldı. Çalışma sonunda ortalama kilo sırasıyla  $398\pm14$ ,  $379\pm7$ ,  $382\pm14$  ve  $386\pm6$  gram idi. Davranış bozukluğu ve iştah kaybına dair bir bulgu saptanmadı.

### 4.2. Göz İçi Basıncı Değerleri

G, EE, GE grupları ile K grubu arasında GİB değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu. 6 hafta süresince tüm gruplarda yeterli GİB değerlerine ulaşıldı.

Glokom indüksiyonu yapılan bütün denekler ( $n=60$ ) GİB’de yükselme göstermiştir. Ortalama GİB glokomatöz gözlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek idi ( $P<0.05$ ).

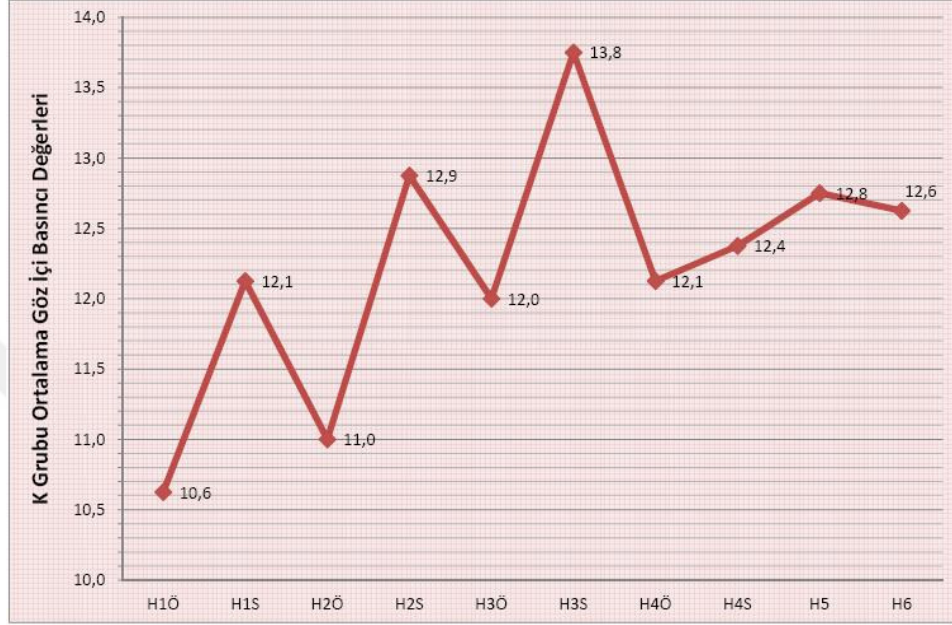
K ve G grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen G grubunun ortalama GİB değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin göz içi basınçlarında anlamlı yükselme sağlanmıştır.

K ve EE grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen EE grubunun ortalama GİB değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir.

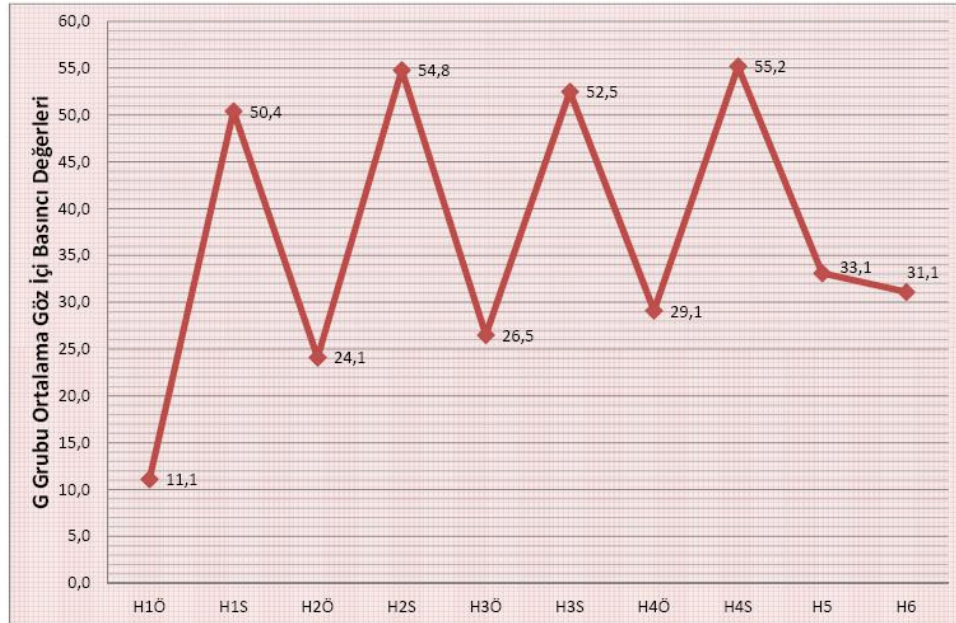
K ve GE grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen GE grubunun ortalama GİB değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir.

Glokom ve diğ er 2 farklı tedavi grubunda ortalama GİB değ erleri benzerdi, istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu, bu da RGH sayımlarındaki farklılığ ın tedaviye bağ lanabileceğ ini göstermiştir.

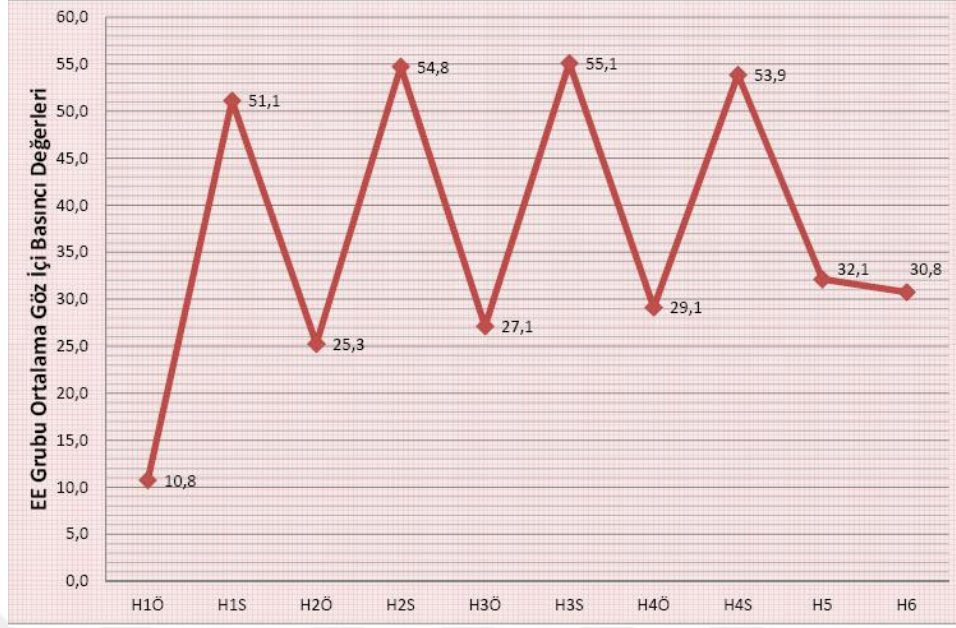
Grupların deney süresince haftalık GİB seyirleri Ş ekil 15 (A-D)'de gösterilmiştir.



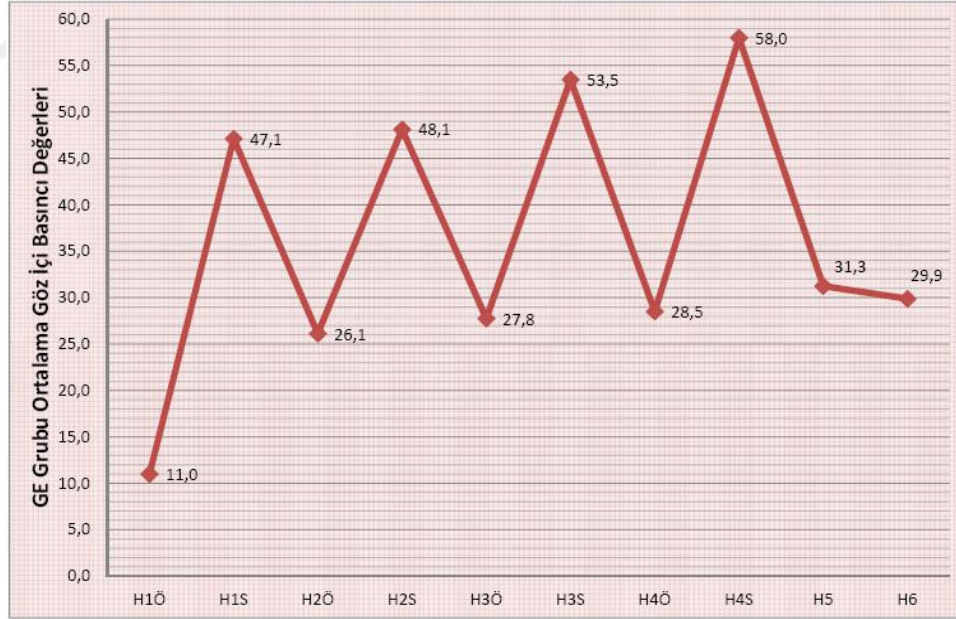
Ş ekil 15 A. K Grubu GİB seyri



Ş ekil 15 B. G Grubu GİB seyri



Şekil 15 C. EE Grubu GİB seyri



Şekil 15 D. GE Grubu GİB seyri

Grup	1. Hafta		2.Hafta		3.Hafta		4.Hafta		5. Hafta	6. Hafta
	Enj. önce	Enj. sonra	Enj. önce	Enj. sonra	Enj. önce	Enj. sonra	Enj. önce	Enj. sonra		
K Grubu	10	-	12	-	11	-	12	-	12	12
	9	-	10	-	10	-	12	-	12	12
	11	-	14	-	12	-	11	-	10	14
	13	-	14	-	10	-	13	-	13	12
	12	-	13	-	11	-	10	-	14	11
	11	-	12	-	12	-	9	-	12	13
	9	-	11	-	11	-	11	-	11	12
	10	-	11	-	11	-	10	-	13	12
	10	-	13	-	14	-	11	-	12	11
	11	-	12	-	13	-	12	-	13	13
	12	-	12	-	15	-	14	-	10	11
	14	-	13	-	10	-	9	-	11	13
	13	-	14	-	12	-	11	-	12	12
	13	-	13	-	13	-	11	-	13	14
G Grubu	10	47	27	56	26	48	28	56	32	29
	12	50	24	51	28	56	31	58	34	32
	10	55	23	57	27	59	30	54	33	33
	10	39	23	48	26	48	29	60	33	30
	10	51	25	59	28	46	30	52	32	34
	11	50	20	56	25	50	28	54	30	28
	13	53	22	55	26	54	25	55	34	31
	11	55	26	58	26	57	31	55	33	32
	12	53	25	56	25	56	29	53	35	31
	10	47	27	56	26	48	28	56	32	29
	12	50	24	51	28	56	31	58	34	32
	10	55	23	57	27	59	30	54	33	33
	10	39	23	48	26	48	29	60	33	30
	10	51	25	59	28	46	30	52	32	34
11	50	20	56	25	50	28	54	30	28	
13	53	22	55	26	54	25	55	34	31	
EE Grubu	10	49	28	54	30	55	30	57	34	32
	11	54	26	55	28	51	29	58	32	30
	9	44	24	51	26	59	27	54	30	28
	12	53	25	56	25	56	29	53	35	31
	11	55	26	58	26	57	31	55	33	32
	10	51	25	59	28	46	30	52	32	34
	12	53	23	55	28	57	29	48	30	30
	11	50	25	50	26	60	28	54	31	29
	10	44	28	54	30	55	30	57	34	32
	11	54	26	55	28	51	29	58	32	30
	9	44	24	51	26	59	27	54	30	28
	12	53	25	56	25	56	29	53	35	31
	11	55	26	58	26	57	31	55	33	32
	10	51	25	59	28	46	30	52	32	34
12	53	23	55	28	57	29	48	30	30	

**Tablo 3 .** Deneklere ait göziçi basınç ölçümleri

Grup	1.Hafta		2.Hafta		3.Hafta		4.Hafta		5. Hafta	6. Hafta
	Enj. önce	Enj. sonra	Enj. önce	Enj. sonra	Enj. önce	Enj. sonra	Enj. önce	Enj. sonra		
GE Grubu	9	44	26	42	27	61	27	61	34	30
	12	49	27	43	28	46	28	59	28	29
	13	45	24	45	26	50	28	60	31	30
	8	48	26	52	29	49	29	57	32	30
	10	51	25	50	29	58	27	59	34	31
	11	58	23	55	30	57	30	56	33	32
	12	42	28	48	26	52	31	58	30	29
	10	45	26	45	27	55	29	55	28	28
	9	44	26	42	27	61	27	61	34	30
	12	49	27	43	28	46	28	59	28	29
	13	45	24	45	26	50	28	60	31	30
	8	48	26	52	29	49	29	57	32	30
	10	51	25	50	29	58	27	59	34	31
	11	58	23	55	30	57	30	56	33	32
12	42	28	48	26	52	31	58	30	29	

**Tablo 3 (devam).** Deneklere ait göziçi basınç ölçümleri

### 4.3. Retinal Gangliyon Hücre Sayımları

Ortalama DTMR işaretli RGH ( $\text{mm}^2$  de ortalama sayı  $\pm$  standart deviasyon) dansitesi K grubunda  $1520 \pm 95$ , G grubunda  $822 \pm 110$ , EE grubunda  $1366 \pm 79$  ve GE grubunda  $1125 \pm 74$  şeklinde idi. Gruplar arası fark tabloda verilmiştir (Tablo 4). Gruplar arası karşılaştırma tabloda verilmiştir (Tablo 5).

Gruplar	$\text{mm}^2$ deki Hücre Sayısı	Genel Toplam
Kontrol (K)	$1520 \pm 95$	$10856 \pm 684$
G Grubu	$822 \pm 110$	$5869 \pm 789$
EE Grubu	$1366 \pm 79^*$	$9753 \pm 567^*$
GE Grubu	$1125 \pm 74^*$	$8033 \pm 534^*$

**Tablo 4.** Deneklerdeki DTMR işaretli RGH değerlendirmesi.  $*P < 0.01$  Tedavi grupları ile glokom grubu karşılaştırılması (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

<b>GRUP</b>	<b>KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR</b>	<b>P DEĞERİ</b>
<b>K</b>	G	0,000*
	EE	0,033*
	GE	0,000*
<b>G</b>	K	0,000*
	EE	0,000*
	GE	0,000*
<b>EE</b>	K	0,033*
	G	0,000*
	GE	0,000*
<b>GE</b>	K	0,000*
	G	0,000*
	EE	0,000*

**Tablo 5.** RGH değerleri gruplar arası karşılaştırma. Deney gruplarına ait RGH değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Bonferroni testine göre p değerleri gösterilmiştir. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (\*) kabul edilmiştir.

K ve G grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre, G grubunun ortalama RGH sayımı değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom induksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma görülmüştür.

K ve EE grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre, EE grubunun ortalama RGH sayımı değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom induksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma görülmüştür. Bu analiz, erken dönem EDA başlanan grupta ortalama RGH sayısının kontrol grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür.

K ve GE grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre, GE grubunun

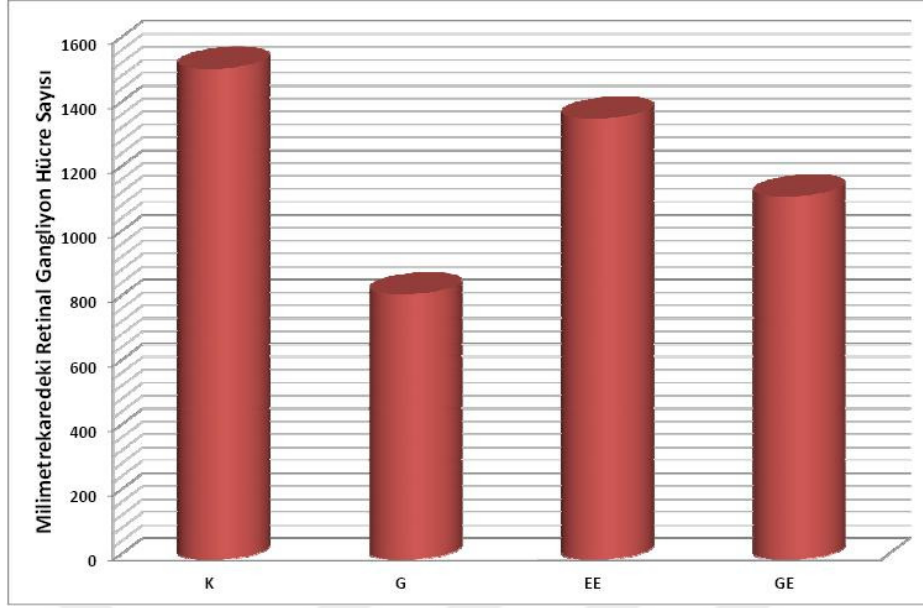
ortalama RGH sayımı değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma görülmüştür. Bu, geç dönem EDA başlanan grupta ortalama RGH sayısının kontrol grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür.

G ve EE grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre erken dönem EDA verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerleri, glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fazlalık göstermektedir. Bu, erken dönem başlanan Edaravone retina gangliyon hücre kaybını önlemede anlamlı etki gösterebileceğini destekler yönde bir bulgu olarak kabul edilebilir.

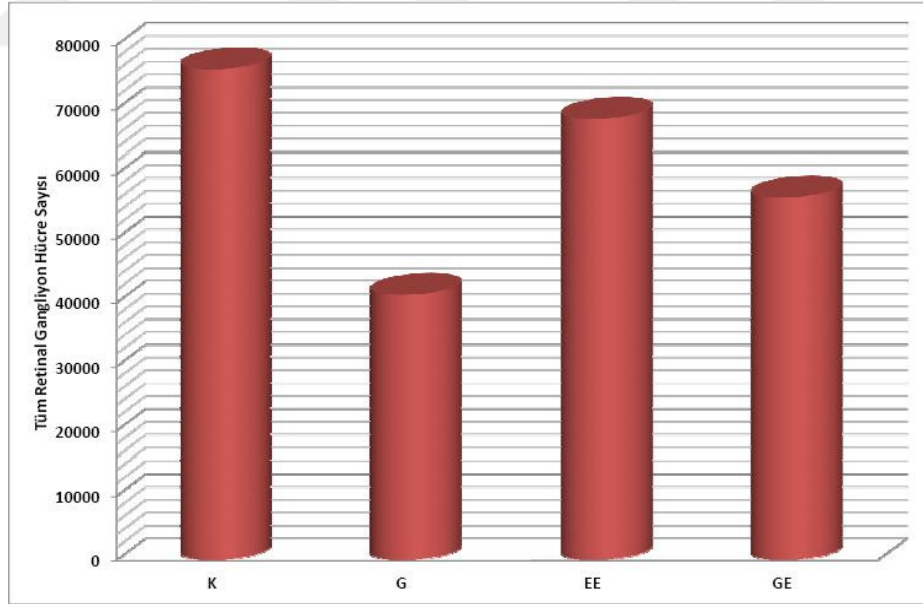
G ve GE grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre, geç dönem EDA verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, Edaravone verilmeyen glokomlu gruba göre daha fazla bulunmuştur.

EE ve GE grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre, erken dönem Edaravone verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, geç dönem Edaravone verilmeye başlanan glokomlu gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur.

Glokom indüksiyonundan 6 hafta sonra ortalama retinal gangliyon hücre azalması kontrol grubu ( $n=14$ ) ile kıyaslandığında glokom grubunda ( $n=16$ )  $\%45 \pm 5$ , EE grubunda ( $n=15$ )  $\%10 \pm 3$ , GE grubunda ( $n=15$ )  $\%25 \pm 4$  idi.



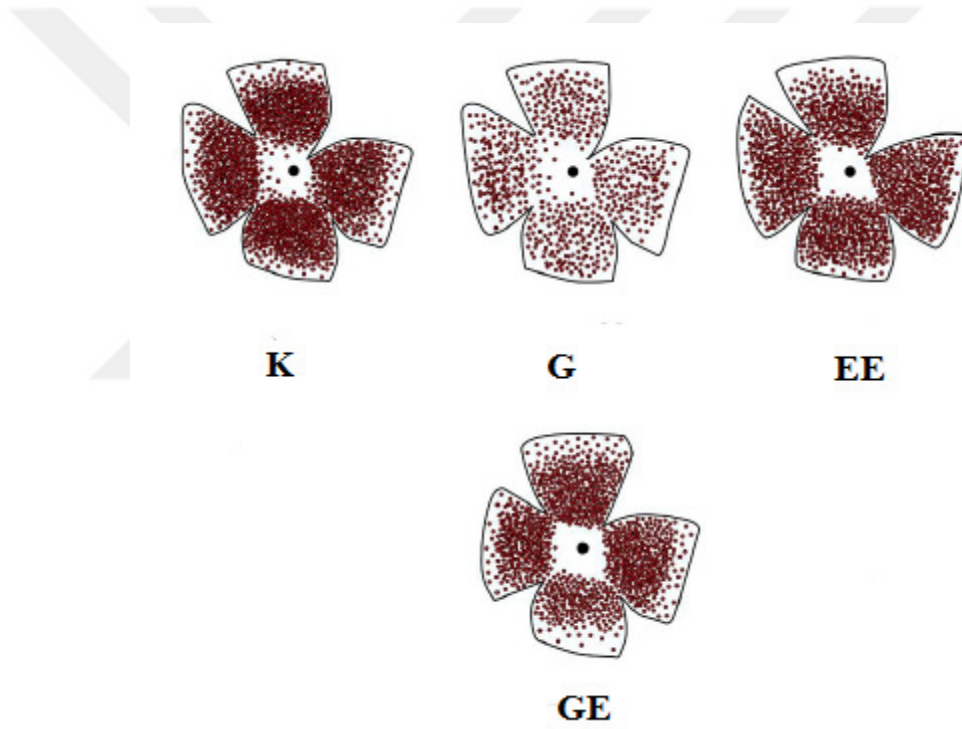
**Şekil 16.** Gruplara ait ortalama milimetrekaredeki RGH sayımı değerleri (Ortalama±Standart deviasyon).



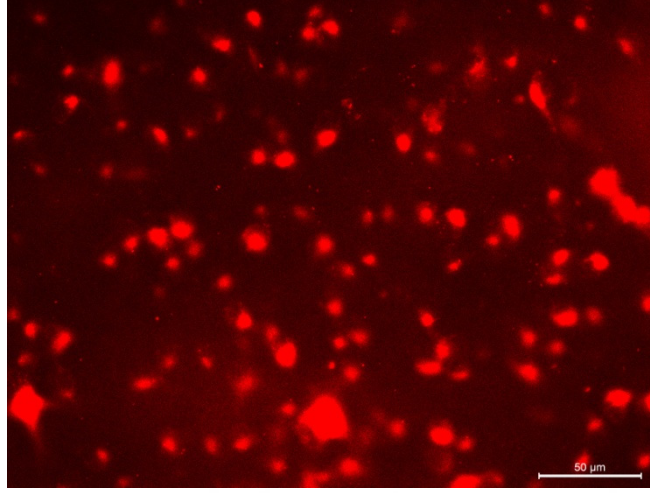
**Şekil 17.** Gruplara ait ortalama tüm RGH sayımı değerleri (Ortalama±Standart deviasyon).

Tüm retinal hücre sayısı ve mm<sup>2</sup> deki hücre sayısı ve yüzde azalma olarak değerlendirildiğinde glokom grubuna göre tüm tedavi gruplarında gangliyon hücrelerinde anlamlı korunma olduğu saptandı (P<0.05).

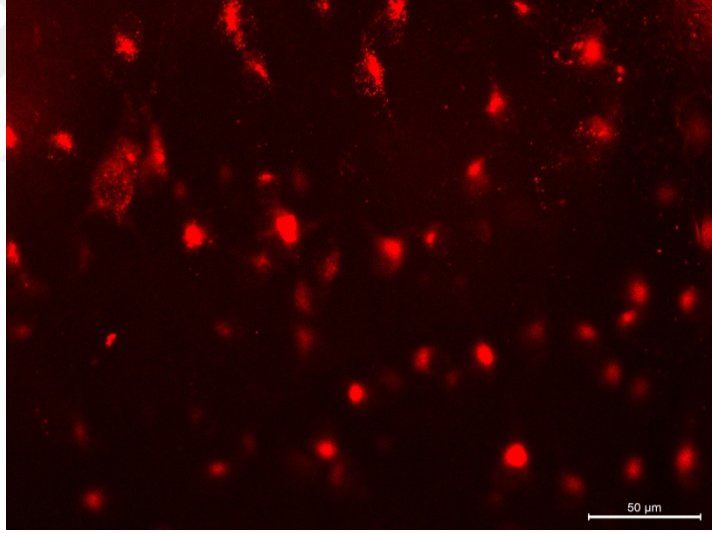
Edaravone tedavisinin nöroprotektif etkinlik gösterdiği gözlenmiştir. Grupların tüm RGH sayılarının izodansite haritalarında karşılaştırmalı şematik gösterimi Şekil 18’ de gösterilmiştir. Gruplara ait DTMR işaretli immunfloresan görüntüler Şekil 19 (A-D) de tek tek sunulmuştur.



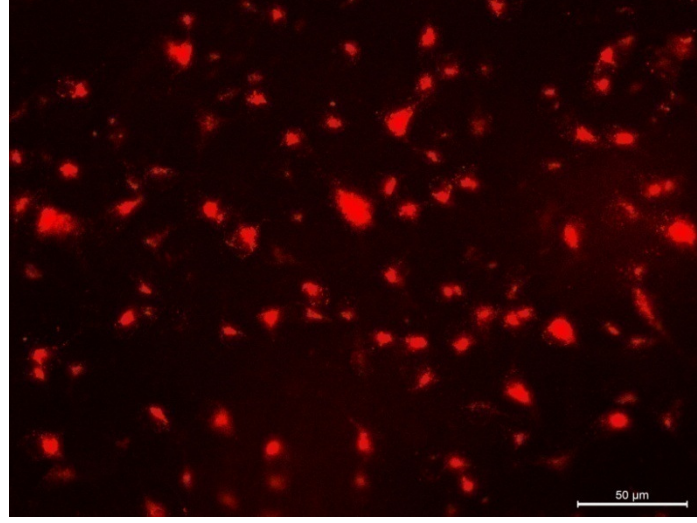
**Şekil 18.** Grupların tüm RGH sayılarının izodansite haritalarında karşılaştırmalı şematik gösterimi. İzodansite haritaları Adobe Freehand MX® programı ile manuel olarak çizilmiştir. İzodansite haritalarındaki her bir nokta 4 adet RGH’yi temsil etmekte olup her kadrana ayrı ayrı simülasyon yapılmıştır.



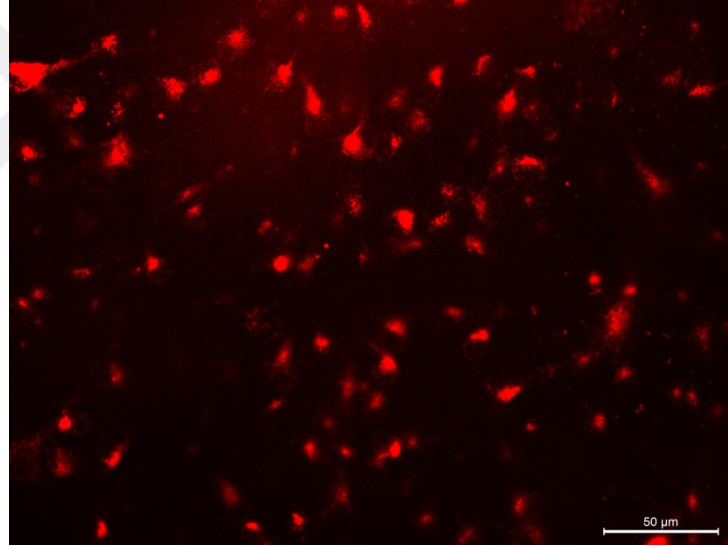
**Şekil 19 A.** Kontrol grubuna (K) ait DTMR ile işaretli retina gangliyon hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200



**Şekil 19 B.** Glokom grubuna (G) ait, DTMR ile işaretli retina gangliyon hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200



**Şekil 19 C.** Erken edaravone grubuna (EE) ait DTMR ile işaretli retina gangliyon hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200



**Şekil 19 D.** Geç edaravone grubuna (GE) ait DTMR ile işaretli retina gangliyon hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200

#### **4.4. Retina Dokusuna Ait Biyokimyasal Değerlendirme**

Whole mount çıkarılıp biyokimyasal ölçümler yapılan retina dokularının ortalama ıslak doku ağırlıkları kontrol grubunda  $18,08 \pm 5,25$  mg , glokom grubunda  $15,80 \pm 4,12$  mg, erken edaravone grubunda  $14,56 \pm 3,52$  mg ve geç edaravone

grubunda  $15,28 \pm 5,71$  mg idi. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

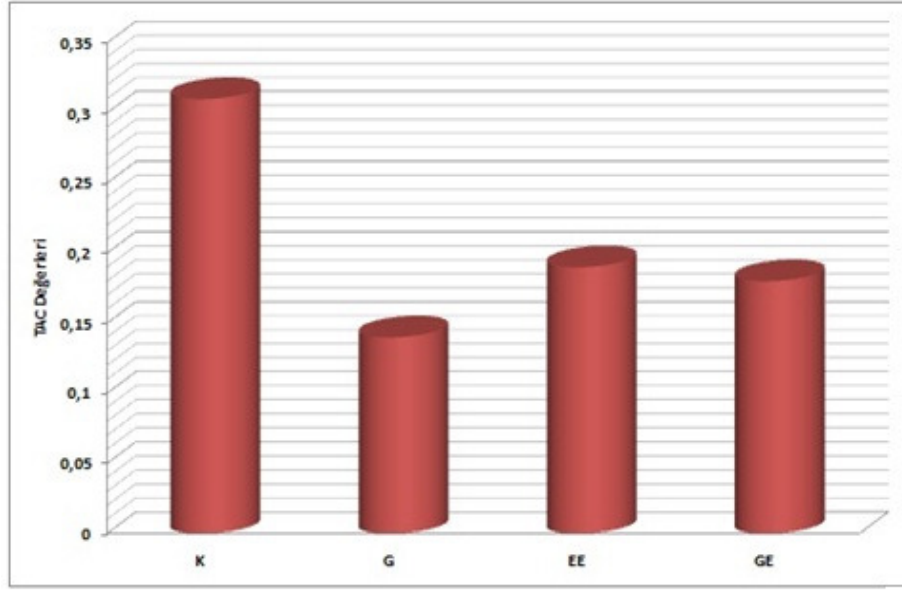
<i>GRUPLAR</i>	<i>TAC DEĞERİ</i>	<i>MDA DEĞERİ</i>	<i>NO DEĞERİ</i>
K Grubu	$0,31 \pm 0,12$	$4,15 \pm 0,6$	$25,73 \pm 5,3$
G Grubu	$0,14 \pm 0,04$	$7,95 \pm 1,2$	$18,39 \pm 6,0$
EE Grubu	$0,19 \pm 0,05$	$5,82 \pm 0,5^*$	$28,03 \pm 7,2^*$
GE Grubu	$0,18 \pm 0,05$	$7,93 \pm 0,2$	$27,61 \pm 7,5^*$

**Tablo 6.** Deneklerin retina dokularındaki TAC, MDA ve NO biyokimyasal değerlendirmesi \* $P < 0.01$  Tedavi grupları ile glokom grubu karşılaştırılması (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Retina dokularında yapılan ölçümlerde ortalama TAC değerleri K grubunda  $0,31 \pm 0,12$  mikromol/gram, G grubunda  $0,14 \pm 0,04$  mikromol/gram, EE grubunda  $0,19 \pm 0,05$  mikromol/gram, GE grubunda  $0,18 \pm 0,05$  mikromol/gram idi.

MDA değerleri K grubunda  $4,15 \pm 0,6$  nanomol/gram, G grubunda  $7,95 \pm 1,2$  nanomol/gram, EE grubunda  $5,82 \pm 0,5$  nanomol/gram, GE grubunda  $7,93 \pm 0,2$  nanomol/gram idi.

NO değerleri K grubunda  $25,73 \pm 5,3$  nanomol/gram, G grubunda  $18,39 \pm 6,0$  nanomol/gram, EE grubunda  $28,03 \pm 7,2$  nanomol/gram, GE grubunda  $27,61 \pm 7,5$  nanomol/gram idi.



**Şekil 20.** Deneklerin retina dokularındaki ortalama TAC değerleri

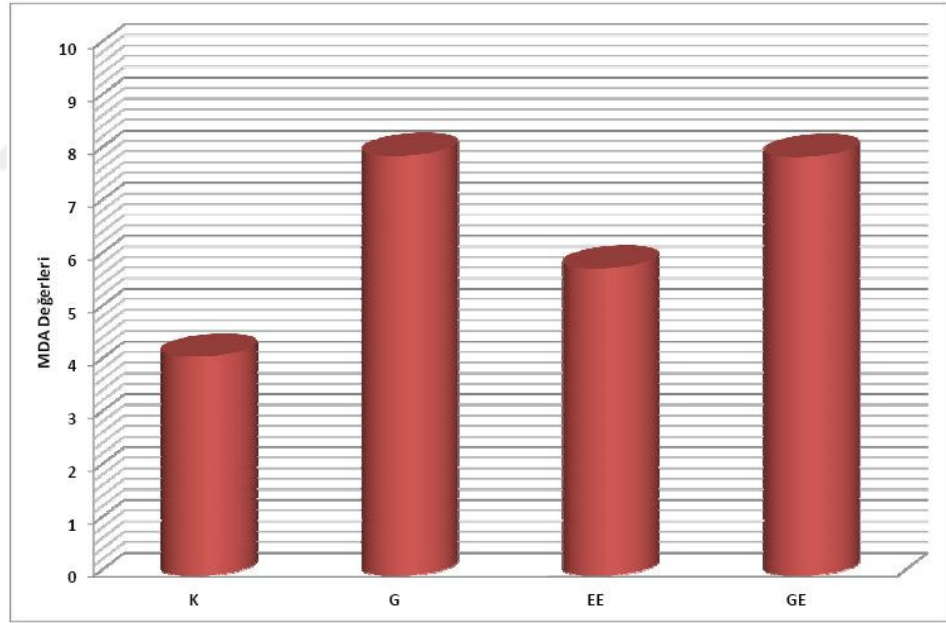
<i>GRUP</i>	<i>KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR</i>	<i>P DEĞERİ</i>
<b>K</b>	G	0,000*
	EE	0,013*
	GE	0,009*
<b>G</b>	K	0,000*
	EE	1,000
	GE	1,000
<b>EE</b>	K	0,010*
	G	1,000
	GE	1,000
<b>GE</b>	K	0,009*
	G	1,000
	EE	1,000

**Tablo 7.** TAC değerleri gruplar arası karşılaştırma Deney gruplarına ait TAC ölçüm değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Bonferroni testine göre p değerleri gösterilmiştir. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (\*) kabul edilmiştir.

K grubuyla G, EE ve GE grupları karşılaştırıldığında gruplar arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre G, EE ve GE gruplarının ortalama TAC değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin retina dokularındaki TAC değerlerinde anlamlı azalma olduğu görülmüştür.

Tedavi verilen EE ve GE gruplarının ortalama TAC değeri tedavi verilmeyen G grubuna göre yüksek bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamıştır (Bonferroni,  $p > 0,05$ ).

EE ve GE grupları karşılaştırıldığında EE grubu ortalama TAC değeri GE grubundan daha yüksek bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamıştır (Bonferroni,  $p > 0,05$ ).



**Şekil 21.** Deneklerin retina dokularındaki ortalama MDA değerleri

<i>GRUP</i>	<i>KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR</i>	<i>P DEĞERİ</i>
<b>K</b>	G	0,000*
	EE	0,020*
	GE	0,000*
<b>G</b>	K	0,000*
	EE	0,000*
	GE	1,000
<b>EE</b>	K	0,021*
	G	0,000*
	GE	0,000*
<b>GE</b>	K	0,000*
	G	1,000
	EE	0,000*

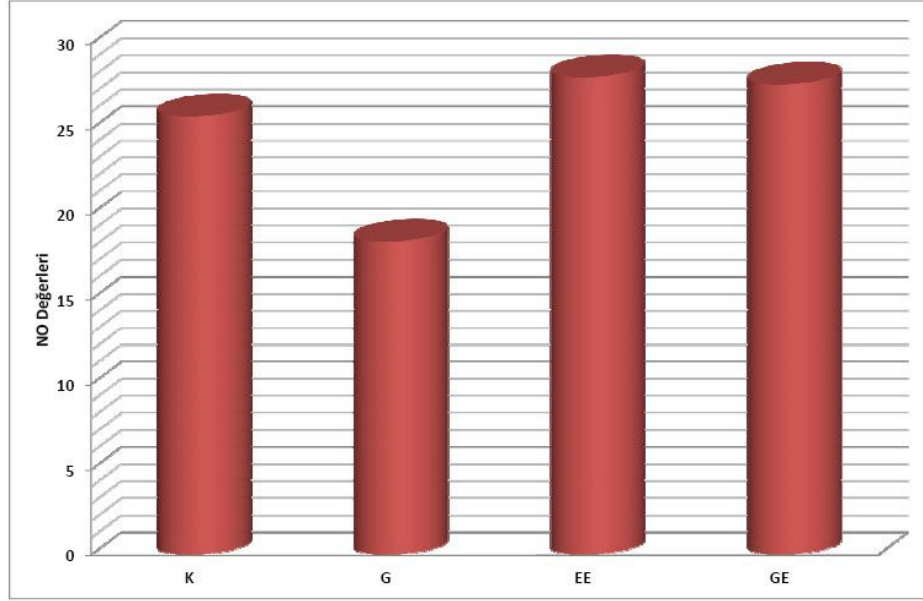
**Tablo 8.** MDA değerleri gruplar arası karşılaştırma Deneş gruplarına ait MDA ölçüm değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Bonferroni testine göre p değerleri gösterilmiştir. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (\*) kabul edilmiştir.

K grubuyla G, EE ve GE grupları karşılaştırıldığında gruplar arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre G, EE ve GE gruplarının ortalama MDA değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin retina dokularındaki MDA değerlerinde anlamlı düzeyde artış olduğu bulunmuştur.

G ve EE grupları karşılaştırıldığında gruplar arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Bonferroni,  $p > 0,05$ ). Erken tedavi verilen EE grubunda MDA değeri tedavi verilmeyen G grubundan daha düşük bulunmuştur.

G ve GE grupları karşılaştırıldığında geç tedavi verilen GE grubunda MDA değeri tedavi verilmeyen G grubundan daha düşük bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamıştır (Bonferroni,  $p > 0,05$ ).

EE ve GE grupları karşılaştırıldığında gruplar arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Bonferroni,  $p > 0,05$ ). Erken tedavi verilen grubun ortalama MDA değeri geç tedavi verilen grubunkinden daha düşük bulunmuştur.



**Şekil 22.** Deneklerin retina dokularındaki ortalama NO değerleri

<i>GRUP</i>	<i>KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR</i>	<i>P DEĞERİ</i>
<b>K</b>	G	0,15
	EE	1,000
	GE	1,000
<b>G</b>	K	0,15
	EE	0,025*
	GE	0,047*
<b>EE</b>	K	1,000
	G	0,025*
	GE	1,000
<b>GE</b>	K	1,000
	G	0,047*
	EE	1,000

**Tablo 9.** NO değerleri gruplar arası karşılaştırma Deney gruplarına ait NO ölçüm değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Bonferroni testine göre p değerleri gösterilmiştir. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (\*) kabul edilmiştir.

K grubuyla G, EE ve GE grupları karşılaştırıldığında gruplar arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Bonferroni,  $p>0,05$ ). G grubunda en düşük NO değeri olduğu bulunmuştur.

G grubuyla EE ve GE grupları karşılaştırıldığında gruplar arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Bonferroni,  $p<0,05$ ). Glokom indüksiyonu yapılan gruplar arasında tedavi verilen gruplarda NO değerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur.

EE ve GE grupları karşılaştırıldığında EE grubu ortalama NO değerinin GE grubundan daha yüksek bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamıştır (Bonferroni,  $p>0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Glokom, optik sinir başında oluşan karakteristik değişiklikler ile birlikte retina iç katlarında hasar, özellikle RGH lerinin ölümü ve buna bağlı görme alanı kayıpları ile seyreden bir optik nöropati şeklinde tanımlanmaktadır (2). Glokom hastalığının temelinde yatan patolojiyi ortaya koymak, ideal tedavi stratejisini oluşturmak için gereklidir. Bugün için tedavide kontrol edilebilir tek faktör GİB yüksekliğidir. Ancak etkin bir GİB düşürücü tedaviye rağmen hastalarda görme kaybının devam etmesi söz konusudur (97). Bu sonuçlar çok sayıda araştırmacıyı GİB'ni düşürmeye yönelik klasik glokom tedavisine ek olarak, yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir. Günümüzde glokoma ait araştırmaların çok önemli bir kısmını glokomdaki nöronal hücre kayıplarının engellenmesine yönelik çalışmalar oluşturmaktadır (8-11).

Sıçanda oluşturulan deneysel glokom modelinin kullanıldığı bu çalışmada, sistemik olarak verilen edaravonenin glokomun erken ve geç dönemlerindeki nöroprotektif etkinliği RGH sayımı ile gösterilmeye çalışılmıştır. Ek olarak; edaravone ile ilgili araştırmalarda gösterilmiş olan antioksidatif etkinliğini ilk defa denenen glokom modelinde de göstermek için retina dokusunda NO, MDA ve TAC değerlerine bakılmıştır.

Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) serbest radikal süpürücü olarak akut iskemik inme tedavisinde Japonya'da 2003'ten beri kullanılmaktadır. Edaravone birçok deneysel modelde denenmiş ve farklı mekanizmalarla nöroproteksiyon sağladığı görülmüştür. Edaravonenin glokomdaki nöroprotektif etkisine dair yayınlanmış bir çalışma olmamakla beraber nöroprotektif etkinliği birçok çalışmada gösterilmiştir (94,95,107).

Glokomatöz hasarda özellikle RGH'lerin ve onların aksonlarının etkilendiği iyi bilinmektedir. RGH'ler ve optik sinir, SSS nin ayrılmaz parçalarıdır. Glokomda Alzheimer hastalığının kine benzer hücre ölüm mekanizmaları olduğuna ve glokomun bir nörodejeneratif hastalık olduğuna işaret etmektedirler (108-110). Bu da nörodejeneratif hastalıklarda klinik ve deneysel kullanılan Edaravone tedavisinin glokomda da etki edebileceğini düşündürmektedir.

DTMR ile işaretli retinal ganglion hücre sayısı hesaplanması için sayılan alan

7,14 mm<sup>2</sup>, Wistar sıçan retinası 50,1 mm<sup>2</sup> dir (111,112). Çalışmamızda EDA tedavisi verilmiş olan gruplarda; RGH sayısının glokom grubuna göre anlamlı düzeylerde korunmuş olduğu, özellikle de glokom indüksiyonuyla beraber tedavi başlanan grupta RGH değerlerinin glokom inüksiyonundan 3 hafta sonra tedavi başlanan gruba göre düzeylerde korunduğu gözlemlenmiştir. Glokom indüksiyonundan 6 hafta sonra, ortalama retinal gangliyon hücre azalması kontrol grubu (n=14) ile kıyaslandığında glokom grubunda (n=16) %45±5, EE grubunda (n=15) %10±3, GE grubunda (n=15) %25±4 olarak bulunmuştur. Vorwerk ve ark erken ilaç uygulamasının bizim çalışmamızda olduğu gibi nöron korunmasında etkili olduğunu savunmuşlardır (113). Kronik glokom modelinde apoptotik hücre ölümü gerçekleşen ganglion hücrelerine bu ilaçların koruyucu etkisi olmayacağı kabul edilirse, geç EDA grubunun daha az etkili olmasını açıklayabiliriz.

Literatürde edaravone tedavisi uygulanan glokom modeli bulunmamaktadır. Retinal iskemi ve fototoksisite modellerinde edaravone tedavisinin nöroprotektif etkinliği değerlendirilmiş fakat DTMR ile işaretli RGC inceleme yapılmamıştır (114-117).

Wheeler ve ark. göre; iyi bir nöroprotektanın retina ve/veya optik sinirde bağlanabileceği özel reseptörü olması, bu hedef reseptörün aktive edilmesi ile nöronun strese karşı dayanıklılığını arttıracak yolları tetikleyebilmesi veya toksik saldırıyı bastırabilmesi, ilacın retina ve vitreusa farmakolojik olarak etkin konsantrasyonlarda ulaşabilmesi ve ajanın nöroprotektif aktivitesinin klinik çalışmalar ile gösterilebilmesi bir ilacın nöron koruyucu adını alabilmesi için yeterlidir (118). Bu çalışmadaki ilaç gruplarının glokom gruplarına göre iyi sonuçlara sahip olduğu gözönünde bulundurulursa EDA'nın retinaya etkin konsantrasyonda ulaşabildiği, yeterli reseptör etkileşiminde bulunduğu, nöronları toksik saldırıdan koruyabildiği söylenebilir.

Edaravone nöroprotektif etkinliğini farklı mekanizmalarla sağlamaktadır, bu birçok çalışmayla gösterilmiştir. Munakata ve ark, anevrizmal subaraknoid hemorajili hastalarda edaravone tedavisi uygulanmasıyla gecikmiş iskemik nörolojik defisitlerin ve vazospazma bağlı serebral infarktın azaldığını, nöroprotektif etkinliği göstermişlerdir (87). Edaravonenin ve kafeinolün, inme modelinde kortikal infarktı ve nörolojik kaybı azalttığı gösterilmiştir (119). Yasuoka ve ark, edaravonenin

hipokampus ve kortekste iskemi sonrası sitokrom C salınımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe ettiğini ayrıca serbest radikal oluşumunu bloke ederek nöral ve glial hücre dejenerasyonunu engellediğini göstermişlerdir (95). Tatsuki ve ark, sıçanlarda oluşturdukları travmatik beyin hasarı modelinde hasar alanındaki nöral kök hücreleri immünohistokimyasal yolla göstermişler, edaravone verdikleri grupta nestin-pozitif hücrelerin daha büyük ve daha fazla sayıda olduğunu ve lipid peroksidasyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir (107). Beyin hasarından sonra edaravone JNK (c-Jun N-terminal kinase) ve aktivasyonunu inhibe eder, serbest radikallerin indüklediği nöral hücre dejenerasyonunu ve ölümünü bloke eder (120).

Araştırmalar göstermiştir ki NTF'nin RGH'lara retrograd transportunun bozulması glokomun oluşum mekanizmasına katkıda bulunmaktadır. Transport blokajı OSB seviyesinde olur, kemirgen ve primat hayvan modellerinde GİB yüksekliği ile gösterilmiştir (108,121,122). RGH'ları ya direkt olarak proteinin kendisi (123) veya endojen salınımını indükleyerek (124,125) NTF'ler ile desteklemenin optik sinir hastalıklarında ve glokom modellerinde nöron kaybını yavaşlattığı gösterilmiştir (126).

HT22 hücreleri fare hipokampal nöronal hücrelerdir. HT22 hücreleri NMDA reseptörü eksprese etmez fakat glutamat-sistin antiporter reseptörü eksprese ederler. Glutamat sistin antiporter sistin alıp endojen antioksidan glutatyon üretir. Yoğun glutamat salınımı bu antiporteri inhibe edip antioksidan üretimini engelleyip HT22 hücrelerinde oksidatif ölüme yol açar. Brian ve ark edaravone tedavisi verilen grupta HT22 hücre ölümünde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yine edaravone tedavisi verilen grupta primer sıçan astrositlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına bağlı hücre ölümünde azalma bulmuşlardır. Serebral endotelyal hücrelerde sodyum nitroprusside bağlı hasar değerlendirilmiş, serebral endotelyal hücreler oksidatif hücre ölümüne dirençlidir fakat oksidatif stresle nörotrofik faktörlerin üretiminde azalma olur. Edaravone tedavisi verilen grupta sodyum nitroprusside bağlı BDNF üretimindeki azalmada düzelme olduğu görülmüştür (127). Multipl etki mekanizması olan edaravone glokomda NTF'yi uyarak nöroprotektif etki gösterebilir.

Glokomda serbest radikal üretiminin primer mi yoksa sekonder mi geliştiği halen anlaşılamamıştır. Trabeküler ağ hücresel komponentlerindeki oksidatif hasar ekstrasellüler matriks yapısının regülasyonunu etkileyebilir ve aköz humor akışında

değişmelere yol açabilir. Gözün akış sisteminde meydana gelen bu bozukluk GİB artışına yol açarak glokomun klinik başlangıcına sebep olabilir. Bu tip durumlarda oksidatif stres glokom patogenezinde sekonder bir olay olarak göz önünde tutulabilir. Artmış GİB ya da normotansif glokom hayvan modellerinde retinal oksidatif hasar, RGC tabakasına direk olarak zarar vererek glokomatöz optik nöropatiye yol açabilir (128). 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 üretildiği spesifik bölgelerin hedeflenmesidir. Yapılacak yeni çalışmalar ve klinik denemeler glokomda nöronal dejenerasyonun mekanizmasının anlaşılmasını sağlayacak ve daha etkili tedavilerin dizayn edilmesine yardımcı olabilecektir.

Glokomda artan ekstraselüler glutamat düzeyleri, uzun bir süre hücre membranlarında bulunan iyon kanallarının açık kalmasını sağlar. Bu durumda hücre içerisine yüksek oranda kalsiyum akışı olur. Yüksek kalsiyum düzeyleri; NO sentaz aktivasyonu, aşırı serbest oksijen radikali birikimi, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, katabolik enzimlerin aktivasyonu gibi bir dizi zararlı sonuçlara yol açar (129,130). Artmış serbest oksijen radikalleri hücrenin enerji deposu olan mitokondilerin fonksiyonlarını bozarak hücre çekirdeğinde kromatin kondansasyonuna sebep olur ve apoptozisi başlatır. Glokomatöz hasarda SOR'ların ve oksidatif stresin etkin olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (131-135).

Glokomla bağlı artış gösteren oksijen metabolitlerinin detoksifikasyonu oküler antioksidanlara oldukça bağımlıdır. Oluşturduğumuz deneysel glokom modelinde nöroprotektif ve serbest radikal süpürücü özelliğe sahip olan edaravonenin etkisini araştırdık. Oksidatif stres birçok dejeneratif hastalığın patogenezinde rol almaktadır (136-138). EDA da oksidatif stres oluşturulan farklı modellerde denenmiş ve serbest radikal süpürücü etkisi gösterilmiştir.

Parkinson hastalığında yoğun reaktif oksijen ürünleri, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Parkinson modelinde Edaravone tedavisi serbest oksijen radikallerinin üretilmesinde inhibisyon yapmıştır (139,140).

Sporadik amyotrophic lateral sclerosis (ALS) ve familial ALS (FALS)' de sinir dokusunda oksidatif lezyonlar gösterilmiştir (141). ALS' nin patogenezinde

oksidatif stresin rolü vardır (142,143). Süperoksit dismutaz 1 mutasyonu ile ALS oluşturulan farelerde edaravone tedavisiyle motor nöronların hasarlanmasında yavaşlama elde edilmiştir (144,145). Yoshino ve ark 19 ALS hastasına EDA tedavisi uygulayıp motor fonksiyonlardaki gerilemenin yavaşladığını bildirmişlerdir (146). Oksidatif hücre hasarının göstergesi olan ve sporadik ALS hastalarının serebrospinal sıvılarında artan 3-nitrotirozin miktarı EDA tedavisiyle azaldığı gösterilmiştir (147).

Spinal kord yaralanması sonucu hemen gelişen fiziksel hasar ( primer hasar) ve haftalar içinde radikallerin indüklediği lipid peroksidasyonu sonucu gelişen nöron hasarı (sekonder hasar)dır (148,149). Sıçanlarda oluşturulan spinal kord hasarında Edaravone ile tedavi edilen grupta lipid peroksidasyonunun inhibe olduğu ,MDA seviyelerinde azalma olduğu, fonksiyonel iyileşmenin daha fazla olduğu yani EDA' nın sekonder nöron hasarını engellediği gösterilmiştir (150).

Görüldüğü gibi birçok nörodejeneratif hastalık modelinde ve nöron iskemisi durumlarında EDA tedavisiyle serbest oksijen radikalleri baskılanmış, antioksidan ve nöroprotektif etkinlik sağlanmıştır. Glokomun patogeneğinde de nörodejenerasyon ve oksidatif stresin rol oynadığı bilindiğine göre EDA 'nın glokom tedavisinde etkin olabilecek nöroprotektif ve antioksidan bir ajan olabileceğini düşünebiliriz.

Çalışmamızda oksidatif stresin göstergesi olan parametreler de değerlendirilmiştir. MDA oksidatif süreçte gerçekleşen lipid peroksidasyonunun bir ürünüdür. GİB artışı yapılan sıçanların vitreus ve retinalarında yüksek MDA değerleri bulunmuştur (151,152). Yıldırım ve ark; primer açık açılı glokomlu hastalarda plazma MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu, katalaz ve myeloperoksidaz aktivitelerinin de hastalar ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı farklılık olmadığını göstermişlerdir (153). Yi Song ve ark ; sıçanlarda oluşturulan retinal iskemi modelinde iskemi öncesi ve sonrası edaravone tedavisi uygulayıp doku MDA seviyesi, SOD aktivitesi, apoptozis ve elektoretinogramları değerlendirmişlerdir. Retina dokularında ölçülen MDA kontrol grubuna göre iskemi oluşturulan grupta daha yüksek, tedavi grubunda ise daha düşük değerler elde edilmiştir. SOD aktivitesi tedavi grubunda daha yüksek bulunmuştur. ERG amplitüdülerinde tedavi grubundaki düşüşlerin tedavi almayan gruba göre daha az olduğunu göstermişlerdir (116). Edaravone sıçanlarda oluşturulan geniş yanık modelinde serum ve doku MDA, ksantin oksidaz miktarlarını azaltmış, iyileşmeyi

hızlandırmıştır ve serbest radikal prekürsörlerinin, metabolitlerinin oluşumunu azaltmıştır (154).

Glokom modelimizde MDA ölçümlerinde kontrol grubunda en düşük değerler, glokom grubunda ise en yüksek değerler bulunmuştur. Kontrol grubunda en düşük değerleri elde edip glokom indüksiyonu yapılan gruplarda yüksek değerler elde etmemiz glokomda oksidatif stresin patogeneizde rol oynadığını göstermektedir. Erken Edaravone tedavisi verilen grupta ise tedavi vermediğimiz glokom grubuna göre daha düşük değerler elde etmemiz EDA'nın SOR azaltıcı etkisiyle lipid peroksidasyonunu azalttığını düşündürmektedir.

Gözde bulunan önemli bir antioksidan olan GSH organizmanın genotoksik ajanlara karşı korunmasında büyük rol oynar. 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 (155,156). Yüksek GİB'nin neden olduğu oksidatif stresin retinal dokuda GSH seviyelerini düşürdüğü Moreno ve ark. tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir (157). Antioksidan enzimler olarak kadavra trabeküler ağlarında süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri ölçülmüştür (158).

Çalışmamızda retinal antioksidan etkinliğin göstergesi TAC'yi değerlendirdik. Kontrol grubunda en yüksek değerler elde edilirken tedavi verilmeyen glokom grubunda en düşük değerler bulunmuştur. Yani glokom indüksiyonu yaptığımız gruplarda oksidatif stresin etkisiyle koruyucu antioksidan etkinlik düşmüştür. Daha önce retinal dokuda TAC ölçümü yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Özgiray ve ark spinal kord hasarı oluşturulan sıçanlarda metilprednizolon ve edaravone tedavisini karşılaştırmışlar ve serum ve doku NO, MDA seviyeleri, SOD aktivitesi, glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi ve doku TAC değerlendirmişlerdir. Edaravone ile tedavi edilen gruplarda tedavi verilmeyen gruplara göre doku NO değerleri düşük, doku SOD ve GSH-Px aktiviteleri yüksek, doku MDA değerleri düşük, TAC değerleri yüksek bulunmuştur. Serumda ise NO değerleri düşük, SOD aktivitesi tüm gruplarda aynı, serum MDA değerleri yüksek bulunmuştur (159). Çalışmamızda Edaravone tedavisi verilen gruplardaki TAC değerlerini tedavi verilmeyen gruba göre daha yüksek bulduk fakat istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildi.

Siu ve ark retina NO seviyelerinin GİB yükselmesiyle arttığını göstermişlerdir (160). Neufeld ve ark optik sinir başında NOS izoformlarının GİB yükselmesiyle arttığını göstermişlerdir (161) ve NOS inhibitörleriyle RGC'nin dejenerasyondan korunduğunu göstermişlerdir (162). Çalışmamızda NO ölçümlerimizde glokom grubunda en düşük , tedavi verilen gruplarda daha yüksek değerler bulduk. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Glokomda yükselen NO değerleri bildirilen çalışmaların aksine bizim çalışmamızda düşük çıkmıştır. NO'nun biyolojik değerindeki bir azalma NOS yetmezliği sonucu yani NOS içeren hücrelerin apoptozis sonucu kaybı, dimetil arginine veya superoksid yoluyla NO'nun hızla metabolize olması gibi endojen NOS düzeyinde artış sonucu olabilir (163).

Aşağıdaki nedenlere bağlı olarak NO azalabilir (164):

- ET-1 tarafından damarın gecikmiş daralması,
- superoksid düzeyinin yükselmesinin neden olduğu oksidatif stres,
- artmış damar daralmasının uyardığı hem kan akım gerginliğini hem de oksidatif stres sonucu proenflamatuvar mediatörlerin etkinleşmesi,
- platelet agregasyonu ve trombozis.

PAAG'li olguların humor aközünde NO'nun azaldığı Doğanay ve ark. tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada ilk defa vurgulanmıştır (165). Bu çalışmayı takiben, Galassi ve ark. PAAG'lu olguların plasma ve humor aközlerinde normal gözlere göre NO markerlarından cGMP ve NO<sub>2</sub> düzeylerinde anlamlı bir düşüş bulmuşlardır (166). NO trabekulumda vazodilatasyon yapar, kontraktileti artırır bu da göziçi basıncını düşürücü etki ve antiapoptotik etki gösterir. PAAG olan hastalarda trabekülektomi sonrası trabekulum fragmanlarında NOS bakılmış ve glokom hastalarında daha düşük bulunmuştur (167-169). Inokuchi ve ark NMDA ile indüklenen retinal hasar oluşturup edaravone tedavisinin antioksidan etkinliğini değerlendirmişler, Trolox ve N-asetilsistein gibi antioksidanlara göre edaravonenin daha potent olduğunu göstermişlerdir (170). Edaravone'nin glokomda da antioksidan etkinlik gösterebileceğini söyleyebiliriz.

Glokomda RGH ölümünün apoptozisle olduğu bilinmektedir. Edaravonenin kranial radyasyon sonrası nöronları apoptozisten korumuştur (171). Yine insan nöral kök hücrelerini radyasyonun indüklediği apoptozisten korumuştur (172).

Edaravonenin antiinflamatuvar etkileri de mevcuttur. Deneysel multiple skleroz modelinde edaravone klinik ciddiyeti, lenfosit infiltrasyonunu ve iNOS ekspresyonunu azaltmıştır (173).

Edaravone'nin glokom modelinde 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. Antioksidan bir ajanın glokom oluşturulan deneklerde oksidatif hasarı bloklayarak nöron koruyucu olarak davranması aynı zamanda hasarın etyopatogenezini de ortaya koyacaktır. Çünkü geliştirilen nöron koruyucu ajan; RGH lerin ölüm hızını yavaşlatmalıdır. Bu noktada ölüm hızını azaltmak için öncelikle hücrelerin nasıl öldüklerini bilmek gerekmektedir. Bugüne kadar yapılmış nöroproteksiyon çalışmalarında amaç, hem uygun ajanı bulmak hem de glokom etyopatogenezini aydınlatmak olmuştur. Bu çalışmada edaravonenin nöroprotektif özellik göstermesi glokom etyolojisinde oksidatif stresin varlığını destekler niteliktedir. Bizim çalışmamızda da olduğu gibi deneysel olarak etkinliği gösterilen edaravonenin glokomda klinik kullanılabilirliği geniş ölçekli, randomize klinik ve deneysel çalışmaların sonucunda ortaya konulabilecektir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda deneysel glokom modelinin erken ve geç dönemlerinde sistemik olarak uygulanan EDA' nın kullanımının nöroprotektif etkinliği değerlendirildi. Tüm tedavi gruplarında RGH'ların glokom grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde korunmuş olduğu saptandı. Verilerimiz, edaravonenin nöroprotektif etkinliğinin glokom sürecinin başlangıcında verilmesi ile daha da belirgin düzeyde olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda biyokimyasal bulgular edaravonenin deneysel glokomda oksidatif hasara karşı koruma sağlayabileceğini göstermektedir ve bu sonuçlar glokomda oksidatif stresin RGH hasarında etkin olduğunu destekler niteliktedir.

Glokom kronik ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojik özelliklerine sahiptir dolayısıyla, edaravone glokom yönetiminde umut vermektedir. Edaravonenin deneysel glokom modelinde etkinlikleri henüz araştırılmamıştır. Edaravone gibi antioksidan, antiapoptotik ilaçların deneysel glokomda RGH sağkalımı üzerine nöroprotektif etkisi olduğu akılda tutulmalıdır, ileri düzeyde ve klinik deneyleri kapsayan çalışmalar gerekmektedir.

## 7. ÖZET

### DENEYSEL GLOKOMDA ERKEN VE GEÇ DÖNEM EDARAVONE UYGULAMASININ NÖRON KORUYUCU ETKİSİ:İMMÜNFLORESAN VE BİYOKİMYASAL İNCELEME

**Amaç:** Deneysel glokomun erken ve geç dönemlerinde sistemik olarak uygulanan edaravone kullanımının nöroprotektif etkinlik yönünden araştırılması.

**Gereç-Yöntem:** Çalışmada 60 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. 46 deneğin ön kamaralarına 5 hafta süreyle haftada bir kez hyaluronik asit enjekte edilerek deneysel glokom modeli oluşturuldu. 14 denek ise ilaç verilmeden ve herhangi cerrahi işlem yapılmadan kontrol grubu olarak alındı. Glokom indüksiyonu yapılan 30 deneğin 15 tanesine indüksiyonla birlikte aynı gün başlanarak intraperitoneal yoldan 3 mg/kg/gün Edaravone, 15 deneğe glokom indüksiyonu sonrası 3. haftadan itibaren 3 mg/kg/gün intraperitoneal yoldan Edaravone uygulandı. Glokom indüksiyonu yapılan 16 deneğe ise herhangi bir tedavi uygulanmadı. 6. haftanın sonunda retinal gangliyon hücreleri (RGH) dextran tetramethylrhodamine ile retrograd olarak işaretlendi, 48 saat sonra denekler kardiyak perfüzyon yöntemi ile tespit edilerek sakrifiye edildi. Sağ kalan RGH dansitesi whole-mount retinalarda değerlendirildi. Whole-mount retina dokuları homojenize edilerek nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasite (TAC) değerleri biyokimyasal olarak ölçüldü.

**Bulgular:** Retinal gangliyon hücrelerinin İmage-Pro Plus programıyla yapılan sayımlarında tedavi uygulanan grupların glokom grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korunmuş olduğu saptandı. Edaravonenin nöroprotektif etkinliğinin, glokom sürecinin başlangıcında verilmesi ile daha fazla olduğu tespit edildi. NO düzeyleri glokom grubunda en düşük iken, tedavi verilen glokom gruplarında tedavi verilmeyen glokom grubuna göre daha yüksek değerler bulundu, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. MDA düzeylerinin glokom indüksiyonu yapılmayan grupta en düşük, glokom grubunda en yüksek olduğu saptandı. TAC

düzelelerinin glokom indüksiyonu yapılan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu ve edaravone tedavisi verilen gruplarda tedavi verilmeyen gruplara göre daha yüksek olduğu saptandı.

**Tartışma ve Sonuç:** Deneysel glokomda edaravone sistemik uygulanması nöroprotektif anlamda etkili sonuçlar vermiştir. Erken ilaç uygulamasının da daha etkili olduğu bulunmuştur. Biyokimyasal veriler glokomda oksidatif stresin RGH hasarında etkili olduğunu desteklemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Glokom, edaravone, nöroproteksiyon, oksidatif stres



## 8. ABSTRACT

### NEUROPROTECTIVE EFFECT OF EDARAVONE ADMINISTRATION IN EXPERIMENTAL GLAUCOMA: IMMUNOFLUORESAN AND BIOCHEMICAL ANALYSIS

**Purpose:** To investigate the neuroprotective activity of systemically administered edaravone (EDA) in early and late stages of experimental glaucoma.

**Materials and method:** In this study, 60 Wistar albino rats were used. Experimental glaucoma model was induced by injecting hyaluronic acid into the anterior chamber of 46 subjects once a week for 5 weeks. 14 subjects were observed as control group (K group) without medication and without any surgical procedure. 3 mg/kg/day EDA was injected intraperitoneally on the same day as induction to 15 of 30 subjects (EE group) that were undergone induction of glaucoma. The same procedure was applied to 15 of the remaining 30 subjects (GE group) three weeks after the induction of glaucoma. 16 subjects (G group) which applied induction of glaucoma were not applied any treatment. At the end of the 6 weeks retrograde labelling of retinal ganglion cells (RGH) with Dextran tetramethylrhodamine (DTMR) was carried out and the density of the surviving RGH was evaluated in whole-mount retina, after 48 hours all animals were underwent cardiac perfusion and sacrifice. Nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) were measured of homogenized whole mouse retinal tissue.

**Results:** Counting of retinal ganglion cells by Image-Pro Plus indicates that statistically treated groups were preserved significantly according to glaucoma group. It is found that using Edaravone at the beginning of glaucoma process supplies much neuroprotective activity. The glaucoma group had the lowest NO level. Also treated groups has higher levels than groups which was not treated. Difference between NO levels of treated group and untreated group was found statistically significant. It is seen that MDA level is the lowest in the group which has not

glaucoma induced, and it is the highest in the glaucoma group. TAC levels of glaucoma induced groups are significantly lower than TAC levels of control group and also it is higher in Edaravone treated groups than untreated groups.

**Discussion:** Systemic administration of edaravone in experimental glaucoma ended up with effective results in neuroprotective meaning. Also it was found that early drug administration was more effective. Biochemical markers supported that oxidative stress in glaucoma is effective in RGH damage.

**Key words:** Edaravone, glaucoma, neuroprotection, oxidative stress



## 8. KAYNAKLAR

1. Dahlmann-Noor AH, Vijay S, Limb GA, Khaw PT. Strategies for optic nerve rescue and regeneration in glaucoma and other optic neuropathies. *Drug Discov Today* 2010 Apr; **15(7-8)**: 287-99.
2. Kaushik S, Pandav SS, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. *J Postgrad Med* 2003; **49**: 90-95.
3. Osborne NN, Chidlow G, Nash MS et al. The potential of neuroprotection in glaucoma treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 1999; **10**:82–92.
4. Gülgün Tezel. Oxidative Stress in Glaucomatous Neurodegeneration:Mechanisms and Consequences. *Prog Retin Eye Res.* 2006 September ; **25(5)**: 490–513.
5. The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators *Am J Ophthalmol* 2000; **130**: 429-440.
6. The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal –Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1998; **126**: 498-505.
7. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal –Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1998; **126**: 487-497.
8. Levin LA. Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2003; **48 (Suppl 1)**: 21-24.
9. Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D et al. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells: toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**:1618-1624.
10. Helen V. Danesh-Meyer and Leonard A. Levin, Neuroprotection: Extrapolating from Neurologic Diseases to the Eye, *Am J Ophthalmol* 2009;**148**:186–191.
11. Helen V. Danesh-Meyer, Neuroprotection in glaucoma: recent and future

- directions, *Current Opinion in Ophthalmology* 2011, **22**:78–86
12. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, et al. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1996; **114**: 299–305.
  13. Nickells RW. The molecular biology of retinal ganglion cell death: caveats and controversies. *Brain Res Bull* 2004; **62**: 439-446.
  14. Nickells RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol* 1999; **43 Suppl 1**: S151-S161.
  15. Dreyer E, Grosskreutz C. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). *Clin Neurosci* 1997; **4**: 270–273.
  16. Yalvaç I, Önal M, Glokom, Bölüm 11, *Temel Göz Hastalıkları*, 1. Baskı, Aydın P, Akova YA eds, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001, 259-285.
  17. Shields MB. *Textbook of glaucoma*. Williams and Wilkins, Baltimore Third edition, 1992, 84-125.
  18. Boles-Carenini B, Brogliatti B, Boles-Carenini A, et al. Ischemia and glaucoma. *New Trends in Ophthalmol* 1993; **8**: 75-80.
  19. Quigley HA, Hohman RM, Addicks EM et al. Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1983; **95**: 673-691.
  20. Ju WK, Kim KY, Lindsey JD, Angert M, Patel A, Scott RT, Liu Q, Crowston JG, Ellisman MH, Perkins GA, Weinreb RN. Elevated hydrostatic pressure triggers release of OPA1 and cytochrome C, and induces apoptotic cell death in differentiated RGC-5 cells. *Mol Vis* 2009; **15**: 120-34.
  21. Van Buskirk EM, Cioffi GA. Predicted outcome from hypotensive therapy for glaucomatous optic neuropathy. *Am J Ophthalmol*. 1993; **116**: 636-640.
  22. Hernandez MR, Gong H. Extracellular matrix of the trabecular meshwork and optic nerve head. *The glaucoma, Glaucoma Therapy*, Vol 1. The Mosby Co. 2nd edition, 1996, 213-249.
  23. Grunwald JE, Piltz JR, Hariprasad SM. Optic nerve blood flow in glaucoma: effect of systemic hypertension. *Am J Ophthalmol* 1999; **127**: 516- 522.
  24. Fechtner RD, Weinreb RN. Mechanisms of optic nerve damage in primary

- open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1994; **39**: 23-42.
25. Toyokuni, S., Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999; **49(2)**: 91-102.
26. Ferrari, R., C. Ceconi, S. Curello, A. Cargnoni, E. Pasini, F. De Giulia, Albertini, Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 1991; **53(1 Suppl)**: 215S-222S.
27. Cheeseman, K.H.T.F. Slater, An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; **49(3)**: 481-93.
28. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; **68(7-8)**: 989-98.
29. Athar M, Abdulla H, Sultana S, Favier A, Pero R. Free radicals and trace elements. *J Trace Elem Exp Med* 1993; **6**: 65-73.
30. Free radicals and antioxydants. In: Fundamentals and Principles of Ophthalmology. *American Academy of Ophthalmology. San Francisco: American Academy of Ophthalmology*; 2008. vol Section 2, Part IV, Chapter 16, p. 365-76.
31. Simsek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. *T Klin J Pediatr* 1999; **8(1)**: 42-7.
32. Freeman, B.A.J.D. Crapo, Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; **47(5)**: 412-26, 1982.
33. Bergamini, C.M., S. Gambetti, A. Dondi, C. Cervellati, Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 2004; **10(14)**: 1611-26.
34. Chance, B., H. Sies, A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; **59(3)**: 527-605.
35. Babior, B.M., J.D. Lambeth, W. Nauseef, The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; **397(2)**: 342-4.
36. Yu, B.P., Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; **74(1)**: 139-62.
37. Aruoma, O.I., B. Halliwell, E. Gajewski, M. Dizdaroglu, Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1991; **273 ( Pt 3)**: 601-4.
38. 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* 2006; **41(3)**: 362-87.
39. Esterbauer, H., R.J. Schaur, H. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; **11(1)**: 81-128.
40. 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 FattyAcids* 2002; **67(2-3)**: 151-62.
41. Yu BP. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; **74**: 139-62.
42. Hogg, N., B. Kalyanaraman, J. Joseph, A. Struck, S. Parthasarathy, Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 1993; **334(2)**: 170-4.
43. Alderton, W.K., C.E. Cooper, R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; **357(Pt 3)**: 593-615.
44. Becquet F, Courtois Y, Goureau O :Nitric oxide in the eye:Multifaceted roles and diverse outcomes. *Sur Ophthalmol.* 1997; **42**:71-82.
45. Arthur H. Neufeld. Nitric Oxide: A Potential Mediator of Retinal Ganglion Cell Damage in Glaucoma. *Sur Ophthalmol.* 1999 ; **43** :129-135
46. Calabrese, V., T.E. Bates, A.M. Stella, NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res* 2000; **25(9-10)**: 1315-41.
47. Park, C.S., K. Pardhasaradhi, C. Gianotti, E. Villegas, G. Krishna, Human retina expresses both constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205(1)**: 85-91.
48. Chakravarthy, U., A.W. Stitt, J. McNally, J.R. Bailie, E.M. Hoey, P. Duprex, Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res* 1995; **14(4)**: 285-94.
49. Perez, M.T., B. Larsson, P. Alm, K.E. Andersson, B. Ehinger, Localisation of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in rat and rabbit retinas. *Exp Brain Res* 1995; **104(2)**: 207-17.

50. Aslan, M., I. Yucel, A. Ciftcioglu, B. Savas, Y. Akar, G. Yucel S. Sanlioglu, Corneal protein nitration in experimental uveitis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; **232(10)**: 1308-13.
51. Beckman, J.S., T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall B.A. Freeman, Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87(4)**: 1620-4.
52. Rubbo, H., V. Darley-Usmar B.A. Freeman, Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol* 1996 ; **9(5)**: 809-20.
53. Behar-Cohen FF, Goureau O, O' Hermis F, Counois Y: Decreased intraocular pressure induced by nitric oxide donors is correlated to nitrite production in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**: 1711-1715
54. Ivan Haefliger ve Eike S: Dettmann Nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma: An overview. In Nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma, Haefliger IO, Flammer J eds. *New York : Lippincott-Raven*; 22-33
55. Arthur H. Neufeld, Sucharita Das, Smita Vora, Elizabeth Gachie, Shin-ichiro Kawai, MD, Pamela T. Manning and Jane R. Connor, A Prodrug of a Selective Inhibitor of Inducible Nitric Oxide Synthase is Neuroprotective in the Rat Model of Glaucoma, *Journal of Glaucoma* 2002; **11**: 221–225.
56. Esterbauer, H., R.J. Schaur H. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; **11(1)**: 81-128.
57. Poli, G.R.J. Schaur, 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* 2000; **50(4-5)**: 315-21.
58. Babizhayev, M.A.A. Bunin, Lipid peroxidation in open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1989; **67(4)**: 371-7.
59. 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* 2005; **39(3)**: 365-73.
60. Yucel, I., Y. Akar, G. Yucel, M.A. Ciftcioglu, N. Keles M. Aslan, Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. *Vision Res* 2005; **45(9)**: 1107-14.

61. Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997; **115**: 1031-5.
62. Weber AJ, Kaufman PL, Hubbard WC. Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 2304-20.
63. Rudzinski, M., T.P. WongH.U. Saragovi, Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol* 2004; **58(3)**: 341-54.
64. Frederic Lebrun-Julien and Adriana Di Polo, Molecular and Cell-Based Approaches for Neuroprotection in Glaucoma, *Optom Vis Sci* 2008; **85**:E417–E424
65. Fechtner, R.D.R.N. Weinreb, Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1994; **39(1)**: 23-42.
66. Sarih, M., V. SouvannavongA. Adam, Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **191(2)**: 503-8.
67. Hu, J.L.J. Van Eldik, S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1313(3)**: 239-45.
68. Heneka, M.T., P.A. Loschmann, M. Gleichmann, M. Weller, J.B. Schulz, U. WullnerT. Klockgether, Induction of nitric oxide synthase and nitric oxidemediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem* 1998; **71(1)**: 88-94.
69. Reed, J.C., Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; **157(5)**: 1415-30.
70. Saeki, K., N. Kobayashi, Y. Inazawa, H. Zhang, H. Nishitoh, H. Ichijo, K. Saeki, M. IsemuraA. 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 receptormediated apoptosis. *Biochem J* 2002; **368(Pt 3)**: 705-20.
71. Peng, H.B., P. LibbyJ.K. Liao, Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995; **270(23)**: 14214-9.
72. Chen, F., V. Castranova, X. ShiL.M. Demers, New insights into the role of

nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; **45**(1): 7-17.

73. Frisen L. High-pass resolution perimetry and age-related loss of visual pathway neurons. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991; **69**: 511-5.
74. Girkin CA. Strategies for neuroprotection. *J Glaucoma* 2001; **10**: S78-80.
75. Farkas RH, Grosskreutz CL. Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death: an overview. *Int Ophthalmol Clin* 2001; **41**: 111-130.
76. Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JP, Casson RJ, Melena J. Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye* 2004; **18**: 1075-1084.
77. Robert N. Weinreb, MD. Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it needed? *Can J Ophthalmol* 2007; **42**: 396-8
78. The European Ad Hoc Consensus Group. Neuroprotection as initial therapy in acute stroke. Third Report of an Ad Hoc Consensus Group Meeting. *Cerebrovasc Dis* 1998; **8**: 59-72.
79. Dyker AG, Lees KR. Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke. *Stroke* 1998; **29**: 535-542.
80. Del Zoppo GJ, Wagner S, Tagaya M. Trends and future developments in the pharmacological treatment of acute ischaemic stroke. *Drugs* 1997; **54**: 9-38.
81. Neil R. Miller, Optic Nerve Protection, Regeneration, and Repair in the 21st Century: LVIII Edward Jackson Memorial Lecture, *Am J Ophthalmol* 2001; **132**: 811-818
82. Caprioli J. Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmol* 1997; **75**: 364-367.
83. Osborne NN. *Neuroprotection to the retina: relevance in glaucoma. In Risk Factors and Neuroprotection in Glaucoma.* Edited by Drance SM. Amsterdam: Kugler Publications; 1997: 139-155.
84. Edaravone Acute Brain Infarction Study Group. Effect of novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. *Cerebrovasc Dis.* 2003; **15**: 222-229.
85. Otomo E, Tohgi H, Kogure K, et al. Clinical efficacy of a free radical scavenger, MCI-186, on acute cerebral infarction: early phase II clinical trial. *Ther Res.* 1998;

**185:** 841-863.

86. Houkin K, Nakayama N, Kamada K, Noujou T, Abe H, Kashiwaba T. Neuroprotective effect of the free radical scavenger MCI-186 in patients with cerebral infarction: clinical evaluation using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 1998; **7**: 1-9.
87. Akira Munakata, M.D., Hiroki Ohkuma, M.D. Effect Of A Free Radical Scavenger, Edaravone, In The Treatment Of Patients With Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery* 2009; **64**: 423–429.
88. Adriana Perez - Gonzalez and Annia Galano. On the Outstanding Antioxidant Capacity of Edaravone Derivatives through Single Electron Transfer Reactions. *J. Phys. Chem. B* 2012; 116: 1180–1188
89. Watanabe T, Yuki S, Egawa M, Nishi H. Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant action. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; **268**: 1597–1604.
90. Okatani Y, Wakatsuki A, Enzan H, Miyahara Y. Edaravone protects against ischemia /reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Eur J Pharmacol.* 2003; **465**: 163–170
91. T Maeno, R Tano, H Takenaka, T Mano, Edaravone (MCI-186) is effective as a free radical scavenger following arteriovenous sheathotomy for treatment of macular oedema associated with branch retinal vein occlusion, *Br J Ophthalmol* 2009; **93**: 1479–1482
92. Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, Maeda H. Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; **285**: H2171–H2178.
93. Yuko Takayasu, Junko Nakaki, Toshiyuki Kawasaki, Ken Koda, Yukio Ago, Akemichi Baba, and Toshio Matsuda. Edaravone, a Radical Scavenger, Inhibits Mitochondrial Permeability Transition Pore in Rat Brain. *J Pharmacol Sci* 2007; **103**: 434 – 437.
94. Jesmin I. Noor, MD; Tomoaki Ikeda, MD; Kenichi Mishima, MD; Naoya Aoo, MD; Sumie Ohta, MD; Nobuaki Egashira, MD; Katsunori Iwasaki, MD; Michihiro Fujiwara, MD; Tsuyomu Ikenoue, MD. Short-Term Administration of a New Free

Radical Scavenger, Edaravone, Is More Effective Than its Long-Term Administration for the Treatment of Neonatal Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *Stroke*. 2005; **36**: 2468-2474.

95. Yasuoka N, Nakajima W, Ishida A, Takada G. Neuroprotection of edaravone on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Dev Brain Res*. 2004; **151**: 129 – 139.

96. Ikuko Tsujimoto, Shungo Hikoso, Osamu Yamaguchi, Kazunori Kashiwase, Atsuko Nakai, Toshihiro Takeda, Tetsuya Watanabe, Masayuki Taniike, Yasushi Matsumura, Kazuhiko Nishida, Masatsugu Hori, Mikihiro Kogo, and Kinya Otsu. The Antioxidant Edaravone Attenuates Pressure Overload–Induced Left Ventricular Hypertrophy. *Hypertension*. 2005; **45**: 921-926.

97. Nian Xiong, Jing Xiong, Ghanshyam Khare, Chunnuan Chen, Jinsha Huang, Ying Zhao, Zhentao Zhang, Xian Qiao, Yuan Feng, Harrish Reesaul, Yongxue Zhang, Shenggang Sun, Zhicheng Lin, Tao Wang, Edaravone Guards Dopamine Neurons in a Rotenone Model for Parkinson’s Disease. *PLoS ONE* June 2011; **6**: 1-11

98. Yuan WJ, Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Agari T, et al. Neuroprotective effects of edaravone-administration on 6-OHDA-treated dopaminergic neurons. *BMC Neurosci* 2008; **9**: 75.

99. Motomura K, Ogura M, Natsume A, Yokoyama H, Wakabayashi T . A free-radical scavenger protects the neural progenitor cells in the dentate subgranular zone of the hippocampus from cell death after X-irradiation. *Neurosci Lett* 2010; **485**: 65-70.

100. Bemeur C, Ste-Marie L, Desjardins P, Vachon L, Butterworth RF, et al. Dehydroascorbic acid normalizes several markers of oxidative stress and inflammation in acute hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neurochem Int* 2005; **46**: 399-407.

101. Moriya M, Nakatsuji Y, Miyamoto K, Okuno T, Kinoshita M, et al. Edaravone, a free radical scavenger, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett* 2008; **440**: 323-326.

102. Aoki T, Nishimura M, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, et al. Reactive oxygen species modulate growth of cerebral aneurysms: a study using the free

- radical scavenger edaravone and p47phox(-/-) mice. *Lab Invest* .2009; **89**: 730-741.
103. Miller DC. Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. *Arch Pathol Lab Med* 1998; **122**: 949.
104. Moreno MC, Marcos HJ, Oscar Croxatto J, Sande PH, Campanelli J, Jaliffa CO, Benozzi J, Rosenstein RE. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res* 2005; **81**: 71-80.
105. Solomon AS, Lavie V, Hauben U, Monsonego A, Yoles E, Schwartz M. Complete transection of rat optic nerve while sparing the meninges and the vasculature: an experimental model for optic nerve neuropathy and trauma. *J Neurosci Methods* 1996; **70**: 21-5.
106. Gupta N, Yucel YH. Glaucoma in the brain: a piece of the puzzle. *Can J Ophthalmol* 2006; **41**: 541-2.
107. Tatsuki Itoh , Takao Satou , Shozo Nishida , Masahiro Tsubaki , Shigeo Hashimoto, Hiroyuki Ito . The Novel Free Radical Scavenger, Edaravone, Increases Neural Stem Cell Number Around the Area of Damage Following Rat Traumatic Brain Injury. *Neurotox Res* 2009; **16**: 378–389.
108. Murphy JA, Clarke DB. Target-derived neurotrophins may influence the survival of adult retinal ganglion cells when local neurotrophic support is disrupted: Implications for glaucoma. *Med Hypotheses* 2006; **67**: 1208-12.
109. Guo L, Salt TE, Maass A, Luong V, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF. Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucomarelated retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 626-33.
110. Weber AJ, Chen H, Hubbard WC, Kaufman PL. Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 1370-9.
111. Blair M, Pease ME, Hammond J, Valenta D, Kielczewski J, Levkovitch-Verbin H, Quigley H. Effect of glatiramer acetate on primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**: 884-90.
112. John Danias, Fran Shen, David Goldblum, Bin Chen, Jerome Ramos-Esteban, Steven M. Podos, and Thom Mittag, Cytoarchitecture of the Retinal Ganglion Cells in the Rat *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, March 2002 ; **43**: 587-594
113. Vorwerk CK, Zurakowski D, McDermott LM, Mawrin C, Dreyer EB. Effects

of axonal injury on ganglion cell survival and glutamate homeostasis. *Brain Res Bull* 2004; **62**: 485-90.

114. Hiroki Shimazaki, Kohei Hironaka, Takuya Fujisawa,<sup>3</sup> Kazuhiro Tsuruma,<sup>1</sup> Yuichi Tozuka,<sup>3</sup> Masamitsu Shimazawa,<sup>1</sup> Hirofumi Takeuchi and Hideaki Hara, Edaravone-Loaded Liposome Eyedrops Protect against Light-Induced Retinal Damage in Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, September 2011; 52, No. 10

115. Inokuchi, Y., Imai, S., Nakajima, Y., Shimazawa, M., Aihara, M., Araie, M., Hara, H., Edaravone, a free radical scavenger, protects against retinal damage in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2009; **329**: 687–698.

116. Yi SONG, Yuan-yuan GONG, Zheng-gao XIE, Cai-hong LI, Qing GU, Xing-wei WU. Edaravone (MCI-186), a free radical scavenger, attenuates retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2008 Jul; **29**(7): 823–828

117. Shunsuke Imai, Yuta Inokuchi, Shinsuke Nakamura, Kazuhiro Tsuruma, Masamitsu Shimazawa, Hideaki Hara. Systemic administration of a free radical scavenger, edaravone, protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *European Journal of Pharmacology* 2010; **642**: 77–85

118. Wheeler LA, Gil DW, WoldeMussie E. Role of alpha-2 adrenergic receptors in neuroprotection and glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2001; **45 Suppl 3**: S290-4;discussion S5-6

119. Xiurong Zhao, Jaroslaw Aronowski, Guang-hua Sun, Jie Zhang, Roger Strong, Yujian Zhang, James C. Grotta, Edaravone and Caffeinol are Neuroprotective After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats, *Journal of Neurological Sciences [Turkish]* 2005; **22**: 374-381.

120. p38 Niyaz M, Numakawa T, Matsuki Y, Kumamaru E, Adachi N, Kitazawa H, Kunugi H, Kudo M MCI-186 prevents brain tissue from neuronal damage in cerebral infarction through the activation of intracellular signaling. *J Neurosci Res* 2007; **85**: 2933–2942

121. Martin KR, Quigley HA, Valenta D, Kielczewski J, Pease ME. Optic nerve dynein motor protein distribution changes with intraocular pressure elevation in a rat model of glaucoma. *Exp Eye Res* 2006; **83**: 255-62.

122. Iwabe S, Moreno-Mendoza NA, Trigo-Tavera F, Crowder C, Garcia- Sanchez

- GA. Retrograde axonal transport obstruction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its TrkB receptor in the retina and optic nerve of American Cocker Spaniel dogs with spontaneous glaucoma. *Vet Ophthalmol* 2007; **10 Suppl 1**: 12-9.
123. Fu QL, Li X, Yip HK, Shao Z, Wu W, Mi S, So KF. Combined effect of brain-derived neurotrophic factor and LINGO-1 fusion protein on long-term survival of retinal ganglion cells in chronic glaucoma. *Neuroscience* 2009; **162**: 375-82.
124. Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, Hauswirth WW. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 4357-65.
125. Pease ME, Zack DJ, Berlinicke C, Bloom K, Cone F, Wang Y, Klein RL, Hauswirth WW, Quigley HA. Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 2194-200.
126. William Cheung, Li Guo and M. Francesca Cordeiro, Neuroprotection in Glaucoma: Drug-Based Approaches, *Optom Vis Sci* 2008; **85**: E406-E416
127. Brian J. Lee, Yasuhiro Egi, Klaus van Leyen, Eng H. Lo, and Ken Arai. Edaravone, a free radical scavenger, protects components of the neurovascular unit against oxidative stress in vitro. *Brain Res.* 2010 January 11; **1307**: 22-27.
128. Joseph Caprioli, Yasunari Munemasa, Jacky M. K. Kwong and Natic Piri , Overexpression of Thioredoxins 1 and 2 Increases Retinal Ganglion Cell Survival After Pharmacologically Induced Oxidative Stress, Optic Nerve Transection, and In Experimental Glaucoma, *Trans Am Ophthalmol Soc* 2009; **107**: 161-166
129. Sucher NJ, Lei SZ, Lipton SA. Calcium channel antagonists attenuate NMDA receptor-mediated neurotoxicity of retinal ganglion cells in culture. *Brain Res* 1991; **551**: 297-302.
130. Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R, Vantini G. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci* 1992; **8**: 567-73.
131. Munemasa Y, Kim SH, Ahn JH, Kwong JM, Caprioli J, Piri N. Protective effect of thioredoxins 1 and 2 in retinal ganglion cells after optic nerve transection and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**: 3535-43.
132. Shimazawa M, Nakajima Y, Mashima Y, Hara H. Docosahexaenoic acid

(DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells. *Brain Res* 2009; **1251**: 269-75.

133. Zanon-Moreno V, Marco-Ventura P, Lleo-Perez A, Pons-Vazquez S, Garcia-Medina JJ, Vinuesa-Silva I, Moreno-Nadal MA, Pinazo-Duran MD. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 2008; **17**: 263-8.

134. Yildirim O, Ates NA, Ercan B, Muslu N, Unlu A, Tamer L, Atik U, Kanik A. Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma. *Eye (Lond)* 2005; **19**: 580-3.

135. Mozaffarieh M, Grieshaber MC, Orgul S, Flammer J. The potential value of natural antioxidative treatment in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2008; **53**: 479-505.

136. Sakata Y, Zhuang H, Kwansa H, Koehler RC, Dore S. Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. *Exp Neurol* 2010; **224**: 325-9.

137. Potashkin JA, Meredith GE. The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* 2006; **8**: 144-51.

138. Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, Markesbery WR, Butterfield DA. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis* 2006; **22**: 76-87.

139. Nian Xiong, Jing Xiong, Ghanshyam Khare, Chunnuan Chen, Jinsha Huang, Ying Zhao, Zhentao Zhang<sup>1</sup>, Xian Qiao, Yuan Feng<sup>1</sup>, Harrish Reesaul, Yongxue Zhang, Shenggang Sun, Zhicheng Lin, Tao Wang Edaravone Guards Dopamine Neurons in a Rotenone Model for Parkinson's Disease. *PLoS ONE* June 2011; **6**: 1-11

140. Yuan WJ, Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Agari T, et al. Neuroprotective effects of edaravone-administration on 6-OHDA-treated dopaminergic neurons. *BMC Neurosci* 2008; **9**: 75.

141. Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, et al., Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 1997; **69**: 2064-2074.

142. Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, et al. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of*

*neurology* 1997; **42**: 644-654.

143. Shibata N, Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 2001; **21**: 82-92.

144. Ito H, Wate R, Zhang J, Ohnishi S, Kaneko S, et al. Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Exp Neurol* 2008; **213**: 448-455.

145. Ryosuke Takahashi. Edaravone in ALS. *Experimental Neurology*, 2009; **217**: 235–236

146. Yoshino H, Kimura A, Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study). *Amyotroph Lateral Scler* 2006; **7**: 241-245.

147. Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, et al. , Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 1997; **42**: 644-654.

148. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991; **75**: 15–26.

149. Taoka Y, Naruo M, Koyanagi E, et al. Superoxide radicals play important roles in the pathogenesis of spinal cord injury. *Paraplegia* 1995; **33**: 450–3.

150. Souichi Ohta, Yasushi Iwashita, Hideaki Takada, Sadako Kuno and Takashi Nakamura . Neuroprotection and Enhanced Recovery With Edaravone After Acute Spinal Cord Injury in Rats. *SPINE* 2005; **30**: 1154–1158 Lippincott Williams & Wilkins, Inc.

151. Ko ML, Peng PH, Ma MC, Ritch R, Chen CF, Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free Radic Biol Med* 2005; **39**: 365–73.

152. Yucel I, Akar Y, Yucel G, Ciftçioğlu MA, Keles, N, et al., Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. *Vision Res* 2005; **45**: 1107–14.

153. Ö Yıldırım, NA Ateş, B Ercan, N Muşlu, A Ünlü, L Tamer, U Atik and A Kanık . Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma. *Eye* 2005; **19**: 580–583.

154. Takeo Koizumi, Hideharu Tanaka, Seiki Sakaki, Shuji Shimazaki, The Therapeutic Efficacy of Edaravone in Extensively Burned Rats *Arch Surg*. 2006; **141**: 992-995
155. Costarides, A.P., M.V. Riley K. Green, Roles of catalase and the glutathione redox cycle in the regulation of anterior-chamber hydrogen peroxide. *Ophthalmic Res* 1991; **23(5)**: 284-94.
156. Riley, M.V., Physiologic neutralization mechanisms and the response of the corneal endothelium to hydrogen peroxide. *Clao J* 1990; **16(1 Suppl)**: 16-21; discussion S21-2.
157. Moreno, M.C., J. Campanelli, P. Sande, D.A. Sanez, M.I. Keller Sarmiento R.E. Rosenstein, Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med* 2004; **37**: 803-12.
158. De La Paz, M. A.; Epstein, D. L. Effect of age on superoxide dismutase activity of human trabecular meshwork. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996, **37**: 1849–1853.
159. Ozgiray E, Serarslan Y, Oztürk OH, Altaş M, Aras M, Söğüt S, Yurtseven T, Oran I, Zileli M. Protective effects of edaravone on experimental spinal cord injury in rats. *Pediatr Neurosurg*. 2011; **47(4)**: 254-60.
160. Siu, A.W.; Leung, M.C.; To, C.H.; Siu, F.K.; Ji, J.Z. & So, K.F. Total retinal nitric oxide production is increased in intraocular pressure elevated rats. *Experimental Eye Research* 2002; **75**: 401-406.
161. Neufeld, A.; Hernandez, M.R. & Gonzalez, M. Nitric oxide synthase in human glaucomatous optic nerve head. *Archives of Ophthalmology* 1997; **115**: 497-503
162. Neufeld, A.; Sawada, A. & Becker, B. Inhibition of nitric oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in rat model of chronic glaucoma, 1999, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; **96**: 9944-9948.
163. Resch H, Garhofer G, Fuchsijäger-Maryl G. et al. Endothelial dysfunction in glaucoma *Acta Ophthalmol.* 2009; **87**: 4-12.
164. Hikmet ÖZÇETİN. Endotelial Damar Hastalıkları ve Glokom. *Glo-Kat* 2009; **4**: 137-142
165. Polak K, Luksch A, Berisha F, et al.: Altered nitric oxide system in patients

- with open-angle glaucoma, *Arch Ophthalmol.* 2007; **125**: 494-498.
166. Galassi F, Renien G, Sodi A, et al.: Nitric oxide proxides and ocular perfusion pressure in primary open angle glaucoma, *Br J Ophthalmol.* 2004; **88**: 757-760
167. Stefan C, Dumitrica DM, Ardeleanu C. The future started: nitric oxide in glaucoma *Oftalmologia.* 2007; **51(4)**: 89-94.
168. Cleary C, Buckley CH, Henry E, McLoughlin P, O'Brien C, Hadoke PW. Enhanced endothelium derived hyperpolarising factor activity in resistance arteries from normal pressure glaucoma patients: implications for vascular function in the eye. *Br J Ophthalmol* 2005; **89**: 223-8.
169. Grieshaber MC, Flammer J. Blood flow in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2005; **16**: 79-83.
170. Inokuchi, Y., Imai, S., Nakajima, Y., Shimazawa, M., Aihara, M., Araie, M., Hara, H., 2009. Edaravone, a free radical scavenger, protects against retinal damage in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **329**: 687–698.
171. Motomura K, Ogura M, Natsume A, Yokoyama H, Wakabayashi T ,A free-radical scavenger protects the neural progenitor cells in the dentate subgranular zone of the hippocampus from cell death after X-irradiation. *Neurosci Lett* 2010; **485**: 65-70.
172. Bemeur C, Ste-Marie L, Desjardins P, Vachon L, Butterworth RF, et al. Dehydroascorbic acid normalizes several markers of oxidative stress and inflammation in acute hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neurochem Int* 2005; **46**: 399-407.
173. Moriya M, Nakatsuji Y, Miyamoto K, Okuno T, Kinoshita M, et al. Edaravone, a free radical scavenger, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett* 2008; **440**: 323-326.