

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL GLOKOMDA ERKEN VE GEÇ DÖNEM  
RİLIZOL VE RESVERATROL UYGULAMASININ NÖRON KORUYUCU  
ETKİSİ: İMMÜNFLORESAN VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEME**

Dr. Dilara PİRHAN

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2011

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL GLOKOMDA ERKEN VE GEÇ DÖNEM  
RİLUZOL VE RESVERATROL UYGULAMASININ NÖRON KORUYUCU  
ETKİSİ: İMMÜNFLORESAN VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEME**

Dr. Dilara PİRHAN

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı  
Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR

Etik Kurul Onayı İlk 06.01.2009 tarihli KOÜ/HADYEK – 2009/4  
Etik Kurul Onayı Son 28.12.2010 tarihli KOÜ/HADYEK – 11/3-2010

## İçindekiler Dizini

<b><u>Konu Başlığı</u></b>	<b><u>Sayfa</u></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>	4
2.1. Glokom ve Nöroproteksiyon	4
2.2. Glokomda Retinal Ganglion Hücre Kaybı	6
2.3. Glokomatöz Hasarın Patogenezi	7
2.4. Glokomatöz Hasarda Glutamatın Rolü ve Eksitotoksisite	9
2.5. Eksitotoksisite	11
2.6. Eksitatör Aminoasit Reseptörleri	14
2.7. Glutamat ve Oksidan Hasar	17
2.8. Eksitotoksisite ve Glokom İlişkisi	17
2.9. Glutamat Nörotoksisitesinin Oluşum Mekanizmaları	20
2.10. Retina Ganglion Hücre Ölüm Mekanizmaları	21
2.11. Glokomda Nöroprotektif Tedavi	23
2.11.1. Nöroproteksiyonun gerekçesi nedir?	23
2.11.2. Neden RGH glokomda nöron korunması için hedeftir?	24
2.11.3. Nöroproteksiyon glokom için gerçekçi bir tedavi stratejisi olabileceğine dair kanıtlar nelerdir?	24
2.12. Riluzol	27
2.12.1. Riluzolün farmakinetik özellikleri	28
2.12.2. Riluzolün etki mekanizması	29
2.13. Resveratrol	31
2.13.1. Resveratrolün tarihçesi	31
2.13.2. Resveratrolün fiziksel özellikleri, kimyasal yapısı ve	32

	kaynakları	
2.13.3.	Resveratrolün biyolojik etkileri ve etki mekanizması	33
2.13.4.	Resveratrolün prooksidan özelliği	34
3.	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	35
3.1.	Denekler	35
3.2.	Deneysel Glokom Modeli	37
3.3.	İlaçların Uygulanması	38
3.4.	Retina Ganglion Hücrelerinin Retrograd İşaretlenmesi	39
3.5.	Sakrifikasyon ve Kardiak Perfüzyon	40
3.6.	Retina Ganglion Hücrelerinin Sayım İşlemi	42
3.7.	Histopatolojik İnceleme ve Optik Sinir Değerlendirme	42
3.8.	Data Analizi	43
3.8.1.	İstatiksel değerlendirme	43
4.	<b>BULGULAR</b>	44
4.1.	Ratların Demografik Özellikleri	44
4.2.	Göz İçi Basınç Değerleri	44
4.3.	Retinal Ganglion Hücre Sayımları	48
4.4.	Optik Sinir Aksonlarına Ait Histokimyasal Değerlendirme	60
5.	<b>TARTIŞMA</b>	64
6.	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	76
7.	<b>ÖZET</b>	77
8.	<b>ABSTRACT</b>	79
9.	<b>KAYNAKLAR</b>	81



## Simgeler Ve Kısaltmalar Dizini

<b>ALS</b>	: Amyotrofik Lateral Skleroz
<b>AMPA</b>	: $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate
<b>BDNF</b>	: Beyin kökenli nörotrofik faktör
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>DETAB</b>	: Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DTMR</b>	: Dextran tetramethylrhodamine
<b>G</b>	: Glokom Grubu
<b>EAA</b>	: Eksitator aminoasit
<b>ERL</b>	: Erken Dönem Riluzol Grubu
<b>ERS</b>	: Erken Dönem Resveratrol Grubu
<b>ERG</b>	: Elektoretinografi
<b>ET-1</b>	: Endotelin-1
<b>GABA</b>	: Gamma aminobütirik asit
<b>GDNF</b>	: Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör
<b>GİB</b>	: Göz içi basıncı
<b>GRL</b>	: Geç Dönem Riluzol Grubu
<b>GRS</b>	: Geç Dönem Resveratrol Grubu
<b>ip</b>	: İntraperitoneal
<b>K</b>	: Kombine Tedavi Grubu
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	: Magnezyum
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinaz
<b>N</b>	: Kontrol Grubu
<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum
<b>NGF</b>	: Nöron büyüme faktörü
<b>NMDA</b>	: N-metil D-aspartat
<b>NO</b>	: Nitrit oksit
<b>NTF</b>	: Nörotrofik faktörler
<b>OSB</b>	: Optik sinir başı
<b>PKC</b>	: Protein kinaz C
<b>RES</b>	: Resveratrol
<b>RGH</b>	: Retina ganglion hücresi
<b>RLZ</b>	: Riluzol
<b>ROR</b>	: Reaktif oksijen radikalleri

**SOR** : Serbest oksijen radikalleri  
**SSS** : Santral sinir sistemi  
**TNF  $\alpha$**  Tümör nekrozis faktör alfa

## Şekiller Dizini

<u>Sekil numarası ve başlığı</u>	<u>Sayfa</u>
<u>Sekil 1:</u> Çeşitli optik nöropatilerde RGH ölümüne yol açan olaylar dizisi	8
<u>Sekil 2:</u> Glutamat salınımı ve geri alınımı	10
<u>Sekil 3:</u> Glutamat ve NO ilişkisi.	12
<u>Sekil 4:</u> Bir astrositten glutamat ve aspartatın salınması	12
<u>Sekil 5:</u> Glutamata bağlı eksitotoksitenin mekanizması	13
<u>Sekil 6:</u> Riluzolün kimyasal yapısı	28
<u>Sekil 7:</u> Resveratrolün kimyasal yapısı	32
<u>Sekil 8:</u> Deney planı	37
<u>Sekil 9:</u> Glokom indüksiyonu	38
<u>Sekil 10:</u> Optik sinir disseksiyonu	40
<u>Sekil 11:</u> Perfüzyon düzeneği	41
<u>Sekil 12:</u> Whole mount retina hazırlanması	41
<u>Sekil 13:</u> Whole mount retinanın incelenmeye hazır son hali	41
<u>Sekil 14:</u> Whole mount sıçan retinasının şematik gösterimi	42
<u>Sekil 15 A:</u> N grubu GİB seyri	45
<u>Sekil 15 B:</u> G grubu GİB seyri	45
<u>Sekil 15 C:</u> ERL grubu GİB seyri	46
<u>Sekil 15 D:</u> GRL grubu GİB seyri	46
<u>Sekil 15 E:</u> ERS grubu GİB seyri	47
<u>Sekil 15 F:</u> GRS grubu GİB seyri	48
<u>Sekil 15 G:</u> K grubu GİB seyri	48
<u>Sekil 16:</u> Gruplara ait ortalama RGH sayımı değerleri	53
<u>Sekil 17:</u> Grupların tüm RGH sayılarının izodansite haritalarında karşılaştırmalı şematik gösterimi	55
<u>Sekil 18:</u> Gruplara ait DTMR işaretli RGH'ların immunfloresan görüntüleri	56
<u>Sekil 19 A:</u> Kontrol grubuna ait immunfloresan görüntü	56
<u>Sekil 19 B:</u> G grubuna ait immunfloresan görüntü	57

<b><u>Sekil 19 C:</u></b>	ERL grubuna ait immunfloresan görüntü	57
<b><u>Sekil 19 D:</u></b>	GRL grubuna ait immunfloresan görüntü	58
<b><u>Sekil 19 E:</u></b>	ERS grubuna ait immunfloresan görüntü	58
<b><u>Sekil 19 F:</u></b>	GRS grubuna ait immunfloresan görüntü	59
<b><u>Sekil 19 G:</u></b>	Kombine tedavi grubuna ait immunfloresan görüntü	59
<b><u>Sekil 20 A:</u></b>	Glokom grubuna ait optik sinir kesiti	60
<b><u>Sekil 20 B:</u></b>	Kontrol grubuna ait optik sinir kesiti	61
<b><u>Sekil 20 C:</u></b>	ERL grubuna ait optik sinir kesiti	61
<b><u>Sekil 20 D:</u></b>	GRL grubuna ait optik sinir kesiti	62
<b><u>Sekil 20 E:</u></b>	ERS grubuna ait optik sinir kesiti	62
<b><u>Sekil 20 F:</u></b>	GRS grubuna ait optik sinir kesiti	63
<b><u>Sekil 20 G:</u></b>	Kombine tedavi grubuna ait optik sinir kesiti	63

## Tablolar Dizini

<b><u>Tablo numarası ve başlığı</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b><u>Tablo 1:</u></b> Deneklerdeki DTMR işaretli RGH değerlendirmesi	48
<b><u>Tablo 2:</u></b> RGH değerleri gruplar arası karşılaştırma	54

## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Glokom, en yaygın formlarıyla dünya genelinde yaklaşık 60 milyon insanı etkileyen, yaşa bağlı optik sinir hastalıklarının ve nöropatilerinin en sık görülenidir. Bu rakamın 2020 yılında 80 milyona yükselmesi beklenmektedir <sup>1</sup>.

Glokom, çeşitli tetikleyicilerin uyardığı olaylar ve sonuçta apoptozis ile retina ganglion hücre (RGH) ölümüne yol açan bir nörodejeneratif hastalıktır. Glokomatöz sinir hasarı için ana risk faktörü artmış göz içi basıncıdır (GİB). Optik sinir hasarına yol açan basamakları anlamaya çalışma çabası, sadece ilk hasarı hedeflemeyen ayrıca ikincil dejenerasyonun önüne geçebilecek veya geciktirebilecek yeni nöroprotektif tedavi stratejilerinin gelişmesine olanak sağlamaktadır. Buna ilaveten, görme yollarının nörodejenerasyonu, kök ya da öncül hücre ile repopülasyonu mümkün olmaktadır. Akson gelişiminin yönlendirilmesi ve RGH'ya dönüşebilecek öncül ve kök hücrelerin manipülasyonundaki aşamaların anlaşılmasının artması hayvan glokom modellerindeki ilk sonuçları kolaylaştırmaktadır <sup>1</sup>.

GİB düşürülmesi ve benzer tedaviler indirekt olarak nöroprotektif kabul edilse de, diğer sitoprotektif tedavilerle kıyaslanırsa ve tam tanımlamak gerekirse, nöroprotektif tedavi nöronun kendisini hedef alır <sup>2</sup>.

Glokomda nöroproteksiyonun amacı RGH'nın ve diğer nöronal hücrelerin ölümünü engellemektir. Tabii ki GİB'i düşürmek bu yorumla nöroprotektiftir, ama günümüz nöroprotektif çalışmaların amacı destrüktif hücresel olayları önlemek ya da zararlı uyaran sonrası hücresel sağ kalımı arttırmak, geri dönüşümsüz ganglion hücre kaybını azaltmaktır. Nöroproteksiyon, terapotik bir strateji olarak oküler hipotansif veya vazoaaktif tedavilerle birlikte kullanılabilir. Nöroproteksiyon tedavinin primer ya da sekonder amacı olabilir. Ne zaman sinir

hücre hasarı ve ölümü, glokom gibi bir patolojik süreçte yer alır ise, asıl nedenden bağımsız olarak nöroproteksiyon klinik olarak denenmelidir<sup>3,4</sup>.

Bugün glokomdaki RGH kaybının patofizyolojisine ait görüşlerin yoğunlaştığı temel konular; nörotrofik faktörlerin (NTF) retrograd aksoplazmik transport blokajı, azalan vasküler perfüzyona bağlı iskemi, serbest radikallerin oluşumu, nitrik oksit (NO) toksisitesi, glutamat aracılı eksitotoksikite ve genetik faktörler şeklinde olup, temelde bu süreçlerin biri veya birkaçının birlikteliği ve bu sürecin sonucunda oluşan apoptoz aracılı hücre ölümü üzerinde durulmaktadır<sup>5-7</sup>. Bu nedenle glokom tedavisinde etkili olabilecek bir nöron koruyucu ajanın etki mekanizması, glokomun etyopatogenezinde saklıdır. Akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklarda mitokondrial disfonksiyona yol açtığı bilinen “glutamat aracılı eksitotoksik hasar”ın, bugün için glokomatöz hasarın patogenezinde de anlamlı rol oynadığı düşünülmektedir<sup>8-10</sup>.

Bu çalışmada glutamat salınım inhibitörü olan riluzol (RLZ) ve çok güçlü bir antioksidan olan resveratrol (RES) sıçanda oluşturulan deneysel glokom modelinde sistemik olarak uygulanmıştır. Glokom sürecinin erken ve geç dönemlerinde uygulanan RLZ ve RES’in RGH’lar üzerindeki nöroprotektif etkisi immünfloresan ve histopatolojik olarak incelenmiştir.

Çalışmada;

1. Glokom indüksiyonu oluşturulması süreci ile birlikte verilmeye başlanan RLZ ya da RES, glokomatöz sürecin erken evresindeki eksitotoksik hasarın engellenmesine yönelik etkisi,
2. Glokom indüksiyonu sonrası tedavisiz olarak bir süre artmış GİB sürecine maruz kalmış deneklerde verilmeye başlanan RLZ ya da RES’in glokomatöz sürecin geç evresindeki eksitotoksik hasara etkisi,
3. Glokom indüksiyonu oluşturulması süreci ile birlikte verilmeye başlanan RLZ ve RES, glokomatöz sürecin erken evresindeki eksitotoksik hasarın engellenmesine yönelik kombine etkisi araştırılmıştır.

RLZ ve RES'in glokomatöz nöronal hasarlanma süreci üzerindeki etkinliği; retinal hücrelerin immünfloresan olarak değerlendirilmesiyle yorumlanmıştır. Çalışma ayrıca, optik sinirin histopatolojik incelenmesi ve ganglion hücre sayımı ile glokom modelinde RGH'ların hasarlanma ve ölüm mekanizmasını aydınlatmaya yönelik bulgular da içermektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Glokom ve Nöroproteksiyon

Glokom RGH gövdelerinin ve optik sinirdeki ganglion hücre aksonlarının hasarı sonucu oluşan karakteristik optik sinir başı (OSB) çukurlaşması ve görme alanı defektlerinin görüldüğü, progresif ancak yavaş ilerleyen multifaktöryel bir optik nöropatidir <sup>11</sup>.

RGH sayıları yaşla beraber yılda %0,5 oranında azalır <sup>12</sup>. Normal yaşam süresi çerçevesi içinde, buna rağmen, bu sayısal azalma görme kaybı semptomlarına yol açabilecekmiş gibi görünmemektedir. Asıl klinik olarak daha anlamlı olan, RGH'lerin progresif kaybı ve OSB çukurlaşması ile karakterize olan "glokom" olarak bilinen progresif nörodejeneratif bir durumdur.

Glokom halen dünya genelinde 60 milyon insanı etkilemektedir <sup>13</sup>. Bu rakamın 2020 yılında yaklaşık 80 milyon insanın glokom hastası olacağı öngörülmektedir. Bunlardan %10'unun kör olacağı hesaplanırsa, glokom körlük nedenleri arasında ikinci sıraya oturacaktır <sup>1</sup>.

Optik sinir hasarının gelişiminde GİB artışı halen en önemli risk faktörü olarak bilinmekle beraber son yıllarda glokomun etyopatogenezinde farklı mekanizmalarında rol oynadığı düşünülmektedir <sup>14,15</sup>.

Göz içi basıncı kontrol edilen bazı hastaların görme alanında görülen ilerleyici hasar ya da göz içi basıncı normal olan kişilerde izlenen glokom, göz içi basıncının bu hastalığın tek nedeni olmadığı bilinmektedir.

Randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; başarılı GİB kontrolüne rağmen görme alanı kaybının ya da GİB'in normal olduğu hastalardaki RGH hasarının önüne geçilememektedir <sup>16,17</sup>. Bu sonuçlar çok sayıda araştırmacıyı GİB'i düşürmeye yönelik klasik glokom tedavisine ek olarak, yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir.

Nöroproteksiyon RGH'ları canlı ve fonksiyonel kılmayı hedefleyen bir terapötik stratejidir. Anahtar kelime fonksiyonelliktir, çünkü hedefine bağlı olmayan ve optik sinir aracılığıyla vizüel sinyal gönderemeyen canlı bir RGH, ölü bir RGH kadar etkisizdir. Nöroproteksiyonun, glökom ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde geleneksel methodlarla ilişkisi yoktur. Çünkü GİB'den, oküler kan akımından ve diğer mekanizmalardan bağımsızdır. Bunun yerine, nöronun daha uzun yaşamasını hedefleyen bir stratejidir <sup>7</sup>. Nöroprotektanların klinik kullanımı uzun zamandır uygulanmakta olup standart değildir. Serbest radikal süpürücüler, antioksidant ajanlar, apoptozis inhibitörleri, antiinflammatuar ajanlar, NTF, metal iyon şelatörleri, iyon kanalı modülatörleri ve gen tedavisini içeren ve çeşitli hastalıklarda kullanılan 500'den fazla ürün nöroprotektif etkinliklerinden dolayı araştırılmaktadır. Araştırmaya değer görülen ajanlar eski yayınlanmış farmosötiklerden yeni biyoteknoloji ürünlerine kadar değişmektedir <sup>18</sup>.

Bugüne kadar, sadece iki nöroprotektan ilaç; RLZ ve memantine amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Alzheimer hastalığı için, US Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay almıştır. Her iki ilacın da glutamat aracılı oksitotoksisiteyi engellediği düşünülmektedir <sup>19</sup>. RLZ glutamat salıverilmesini inhibe ettiği ve nöron koruyucu etkisi olduğu için ALS hastalığında görülen motor nöron hasarının ilerlemesini azaltmaktadır <sup>20,21</sup>. ALS tedavisi için 1996'da FDA tarafından kullanımı onaylanmış ilk ve tek ilaçtır. Ülkemizde de yaklaşık 15 yıldır kullanılmaktadır.

Bir axonal hastalık<sup>22</sup> olan spinal kord travmasında<sup>23,24</sup> nöroproteksiyon çalışmalarının başarılı olduğu gösterilmişse de bu tartışmaya açıktır <sup>25</sup>. Hem ALS hem de Alzheimer hastalıklarının her ikisi de kronik, dejeneratif hastalıklardır. Bu yüzden öncesinde hazırlık için harcanan uzun zaman tedaviyi daha az kritik kılar. Glökom da hem kronik hem de aksonal nörodejeneratif hastalığın patofizyolojik özelliklerine sahip olduğundan; glökom tedavisinde nöroproteksiyonun etkili olabileceğine dair bir ümit oluşmaktadır <sup>18</sup>.

## 2.2. Glukomda Retinal Ganglion Hücre Kaybı

Son araştırmalar göstermiştir ki, RGH hem normal gelişim sırasında hem de çeşitli optik sinir hastalıklarında apopitoz denen bir tür hücre ölümü ile ölmektedir. Apopitoz ya da programlanmış hücre ölümü; kalıtsal olarak kodlanmış, hücrelere artık ihtiyaç kalmadığında veya bu hücreler ciddi olarak hasarlandığında aktive olan bir tür hücresel intihardır. Henüz tam olarak anlaşılamamış mekanizmalarla hücre ölüm sinyalinini alır. İlk olarak gerçekleşen olay hücresel hasarlanmadır. Bu proteinlerin yapılarının bozulması ve DNA'nın ayrışmasıyla olur. Daha sonra mitokondrilerden serbest oksijen radikalleri (SOR) açağa çıkar. Bu ilk hasarlanma bilinmeyen bir proteince düzenlenir, bu protein hücre ölümüne katkısı olan p53 proteinini aktifler. p53 de daha sonra apopitozu devam ettiren bax genini indüklerken antiapopitotik bcl-xl'i baskılar. Böylece bir tür proteaz enzim grubu olan kaspazlar harekete geçirilerek hücre apopitotik cisimciklere ayrılıp, makrofaj etkinliği gösteren komşu hücrelerce yok edilir. Nekrozdan farklı olarak apopitozda; belirli bir hücre grubu değil hücreler ayrı ayrı olaydan etkilenir ve bu durum kalıtsal olarakta kodlanmıştır. Yine apopitozda belirgin bir DNA ayrışması vardır. Apopitotik cisimcikler fagosite edilirken herhangi bir inflamasyon bulgusu izlenmez<sup>26</sup>.

Glukom hastalarının muayenelerinde retinal sinir lifi kaybı ile ilişkili OSB değişiklikleri izlenmektedir. Bu da yaygın ganglion hücre hasarını işaret etmektedir. Bununla birlikte ganglion hücre hasarı sadece glukoma özđü bir olay olmayıp, birçok diğer optik nöropati ve retinopatide de görülebilmektedir (Anterior iskemik optik nöropati, optik disk druseni, diabetik retinopati, santral retinal arter tıkanıklığı, travmatik optik nöropati, Alzheimer hastalığı, ALS). Bu benzerlikten hareketle yapılan çalışmalarda glukom hastalığının fizyopatolojisine veya biyokimyasına ışık tutacak yeterli veri ne yazık ki henüz elde edilememiştir.

### 2.3. Glokomatöz Hasarın Patogenezi

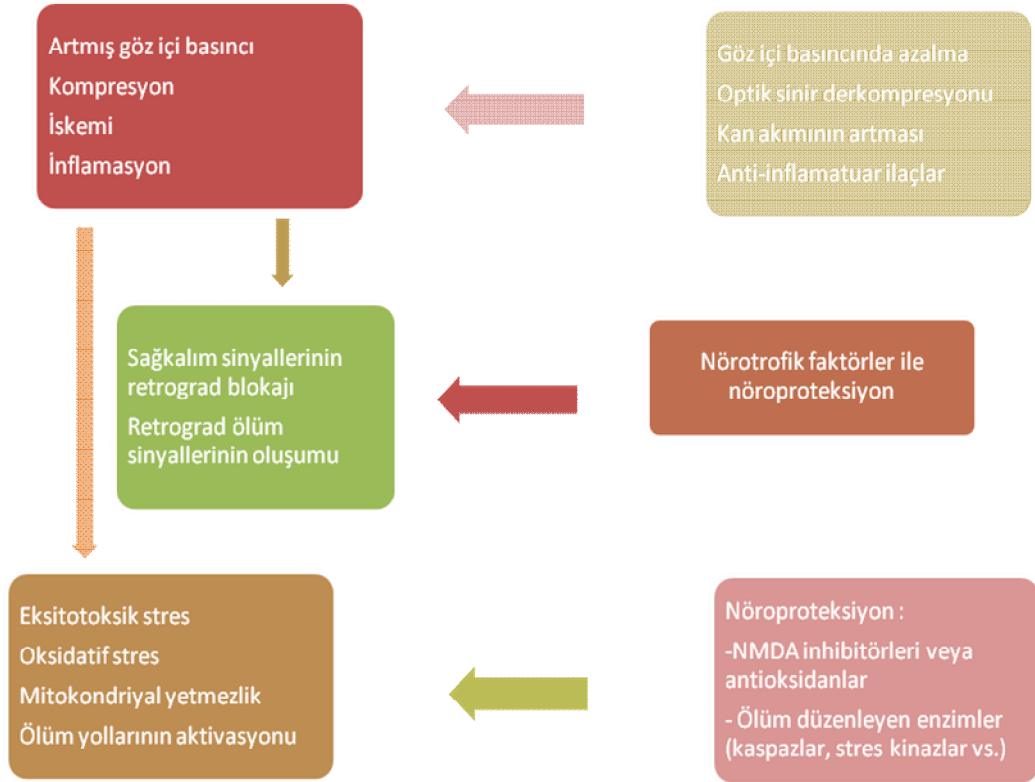
Glokomatöz optik sinir hasarı için ana risk faktörü yüksek GİB olmasına rağmen, bazı kişilerde bu basınç normal sınırlarda olmasına rağmen (Normal basınçlı glokom olarak da adlandırılan, ya da NTG) hasar olmaktadır. Aksine, yüksek GİB'e rağmen optik nöropati geliştirmeyen bireyler vardır. Bugün için glokomda optik sinir hasarını açıklayacak 3 temel görüş vardır. İlk ikisi vasküler ve mekanik mekanizmalara, üçüncüsü eksitotoksisiteye yoğunlaşmıştır.

Mekanik teori, yüksek basıncın RGH'larda direkt ve indirekt hasara neden olduğunu vurgulamaktadır. Bu mekanizmaya göre, lamina kribrozaya olan bası nedeniyle akson hasarı olmakta ve sonuçta akson taşıma sistemi engellenerek RGH hasarı oluşmaktadır. Aksoplazmik akımın obstruksiyonu RGH gövdesine NTF'in retrograd transportunu engeller ve bu faktörlerin lamina cribrosada birikimine neden olur<sup>27-30</sup>.

Deneysel modellerde, devamlı yüksek basınç RGH mitokondrisini de direkt olarak hasarlamaktadır<sup>31</sup>. Growth faktör açlığı ve mitokondriyal hasar, RGH gen ekspresyon dengesini hücre idamesinden pro-apoptotik yollara saptırabilir (Şekil 1).

Vasküler hipoteze göre optik sinir başını besleyen damarlardaki perfüzyon basıncının düşüklüğü doku beslenmesini etkiler ve akson atrofisine neden olur. Aksonal kayıp öncelikle bir iskeminin sonucudur. Çeşitli vasküler bozukluklarda buna hiperlipidemi, arteriyoskleroz, hipertansiyon ve vazospastik hastalıklar da dahil olmak üzere endotel disfonksiyonu olduğunu biliyoruz. Glokomlu hastalarda, plazma endotelin-1 (ET-1) düzeyi kontrol gurubu ve NTG grubunda daha yüksek bulunmuştur<sup>32</sup>.

Bazı glokom formlarında, OSB kan akımında kronik bozulmalara yola açabilecek vasküler disregülasyon olduğuna dair kanıtlar mevcuttur<sup>33</sup>.



**Şekil 1.** Çeşitli optik nöropatilerde RGH ölümüne yol açan olaylar dizisini gösteren akış şeması (solda), ve ilgili potansiyel tedaviler (sağda).

OSB perfüzyonundaki primer veya sekonder vasküler disregülasyonun sebep olduğu dalgalanmalar iskemi-reperfüzyon sinir hasarını uyarabilir. Primer vasküler disregülasyon vazospastik hastalık tablosu olarak bilinmekte ve Rayno fenomenini ve migreni kapsamaktadır. Sekonder vasküler disregülasyon sistemik ET-1 seviyelerinin arttığı, romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi hastalıklarda görülür <sup>34</sup>. Bazı glokom formlarında bir risk faktörü olan primer vasküler disregülasyon, RGH'larda oksidatif strese neden olan oküler kan akımındaki otheregülasyon bozukluklarından kaynaklanır. Diğer taraftan sekonder disregülasyon glokom için bir risk faktörü olarak görünmemektedir. Olası açıklamalar; bu durumlarda kan akımı global olarak azalır ya da göze patojenik olmayan sistemik seviyesi yükselmiş ET-1 gibi vazokonstriktif peptidlerin parakrin faktörler oluşu gerçeğini içermektedir.

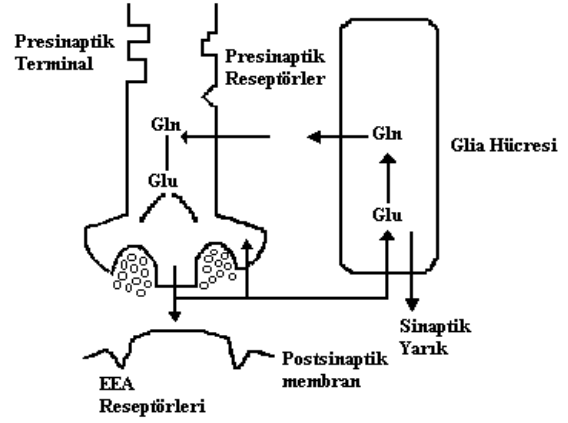
Birçok çalışma glokom hastalarında OSB kan akımının azaldığını göstermesine ve hayvan çalışmalarında bu hipotez desteklenmesine rağmen, RGH hasarı ile gerçek ilişkisi henüz açıklanamamıştır<sup>35,36</sup>. Son zamanlarda, iskemi veya iyonotropik glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması yani eksitotoksisite sonucu olduğu düşünülen glutamata bağlı toksisitenin de glokomda ganglion hücre ölümüne yol açabileceği bildirilmektedir<sup>37</sup>. Glutamata bağlı eksitotoksisite inme, travma, epilepsi, Huntington hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz ve AIDS demansında da gözlenmiştir<sup>38,39</sup>. Glokomda hasarlanan nöronların santral sinir sistemi ile ilişkili olduğu düşünülürse, eksituar aminoasitlerin glokomdaki ganglion hücre hasarında da rol oynayabileceği olası görünmektedir. Ganglion hücreleri lateral genikulata dek uzanmaları nedeniyle retinada özellikli durumdadır. Bu da ganglion hücrelerinde eksitotoksik hasarlanmaya karşı yatkınlık oluşturmaktadır.

#### **2.4. Glokomatöz Hasarda Glutamatın Rolü ve Eksitotoksisite**

Eksitator aminoasitlerin (EAA) ilk ortaya çıkışı 1957 yılında Lucas<sup>40</sup> ve Newton<sup>41</sup> isimli araştırmacıların rastlantısal gözlemlerine dayanır. Bu kişilerin retinal distrofiyi iyileştirmek için fare retinası üzerinde çeşitli maddeleri dener iken glutamatın subkutan enjeksiyonunun retinanın iç sinir katmanlarında ağır hasara yol açtığını gözlemlemesiyle glutamatın toksik potansiyeli olduğu anlaşılmıştır. Yirmi yıl sonra Olney ve Sharpe<sup>42</sup> sonradan eksitotoksisite olarak adlandırılacak bu nörotoksik etkinin yalnızca glutamat ve retinal nöronlar ile sınırlı olmadığını, EAA'ların santral nöronlar üzerinde genel bir etki oluşturduklarını bildirmişlerdir. Son yıllarda bu hipotez glutamat reseptör fonksiyonlarının ortaya konulması ve etkili glutamat antagonistlerinin gelişimi ile desteklenmiştir. Günümüzde kafa travması, spinal travma, serebral iskemi, epilepsi ve kronik dejeneratif hastalıkların fizyopatogeneğinde eksitotoksisitenin önemi kabul edilmektedir<sup>43,44</sup>. Glutamat ve aspartat gibi EAA'lar memeli santral

sinir sisteminin ana nörotransmitterleridir. Beyinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar (glutamat 10 mmol/l ve aspartat 4 mmol/L), sinir terminallerindeki sinaptik geçişi yönlendirir ve nöron içine iyon geçişini kontrol ederler. Nöronal yaşam, sinaptogenesis, nöronal plastisite, öğrenme ve hafıza üzerinde etkili bulunmuşlardır<sup>45,46</sup>. EAA'lar normalde sinir iletiminden sorumlu

oldukları halde, nörotoksisitenin de potansiyel kaynağıdır. Glutamatın anormal düşüklüğü normal eksitasyonun bozulmasına, aşırı yükselmesi ise kalsiyum homeostazisini bozarak eksitotoksititeye ve hücre ölümüne neden olabilir. Glutamat ve benzeri aminoasitlerin nöron



**Şekil 2.** Glutamat salınımı ve geri alımı

gövdesinde, dendridlerde, glialarda akut şişmeye ve daha yavaş olarak nöronal dejenerasyona yol açtıkları gösterilmiştir<sup>44,47</sup>. Bu nedenle normal şartlarda sinaptik aralıktaki glutamat seviyelerini düzenleyen hassas bir mekanizma mevcuttur. Bu mekanizma, sinir terminalinin presinaptik ucundaki reseptörler ve glia hücreleri aracılığıyla hücre dışı fazla glutamatın sinaptik aralıktan hücre içine geri alımına dayanır (Şekil 2)<sup>41</sup>. Bu mekanizma sayesinde fizyolojik koşullarda glutamat kuvvetli ve hızlı etki gösteren bir toksin olduğu halde glutamatın beyne direkt uygulanması bile hasar yaratmayacaktır<sup>48</sup>. Bununla beraber sistemin yetersizliğine yol açabilen veya çok yüksek glutamat salınımına neden olan patolojik durumlar ise nöron kaybına yol açacaktır.

## 2.5. Eksitotoksisite

Günümüzde santral sinir sistemini tutan akut veya kronik birçok hastalık sürecinde eksitator aminoasitlerin önemi bilinmektedir. Eksitotoksisite; EAA reseptörlerinin aşırı uyarılmasına bağlı olarak nöronal hasarın indüklenmesidir. Bu hasar ilk defa retinada tanımlanmış, sonrasında da SSS de iskemik ve travmatik hasarın patogenezinde önemli bir komponenti olarak gösterilmiştir. Buna ilaveten birçok kronik nörolojik hastalıkta eksitotoksisitenin rol aldığına dair kanıtlar vardır ve anti-eksitotoksik tedavi bu durumların bazılarında onaylanmıştır<sup>49</sup>.

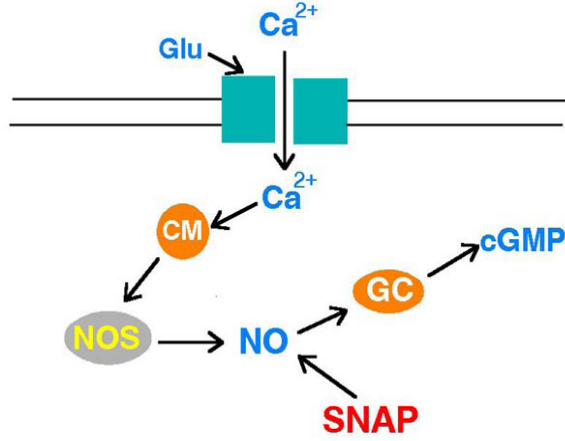
Eksitotoksisite terimi ilk olarak ekzojen uygulanan glutamat veya glutamat agonistlerinin neden olduğu nöronal ölümü ifade etmek için kullanılmıştır. Daha sonra bu terim endojen olarak ortaya çıkan glutamat aracılı nörotoksisite için de kullanılmaya başlanmıştır<sup>50</sup>.

Eksitotoksisitenin akut travmalardan (inme, hipoglisemi, travma, ve epilepsi) kronik nörodejeneratif hastalıklara (ör: Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, ALS, ve insan bağışıklık yetmezlik virusüne bağlı demans) kadar değişen çeşitli bozuklukların etiyolojisinde rol alabileceği düşünülmektedir; glokomda muhtemelen bunların arasında yer almaktadır<sup>51-54</sup>.

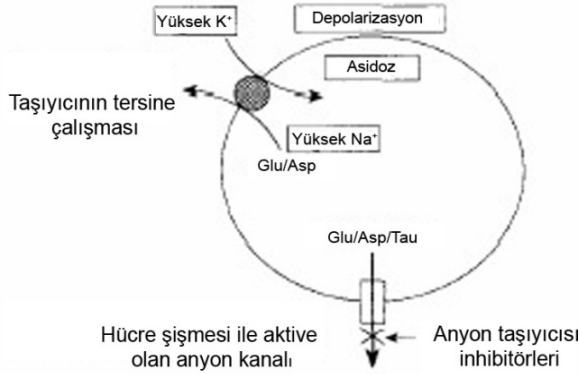
Deneysel glokom modellerinde, vitreus içerisinde yüksek glutamat konsantrasyonları, RGH'ya toksik olacak kadar yüksek düzeylerde bulunmuştur. Glokomlu insanlarda postmortem yapılan çalışmalarda da vitreus içerisinde yaklaşık iki katı glutamat yüksekliği tespit edilmiştir<sup>55-58</sup>. Eksitotoksisitenin glokoma katkısı bundan başka, glokom ve retinal hasar oluşturulmuş deneysel glokom modellerinde NMDA reseptör blokleri ajanların nöroprotektif etkisinin gösterildiği çalışmalar ile de desteklenmiştir<sup>59,60</sup>.



Marangos ve ark.'nın glutamat hipotezine göre nöronal toksisiteye bağlı hücre ölümü glutamat sentezindeki artıştan, glutamat geri alınımındaki veya



**Şekil 3.** Glutamat ve NO ilişkisi. PKC: protein kinaz C, NO: nitrik oksit, NOS: Nitrik oksit sentaz, Glu: Glutamat, CM: kalsiyum kalmodulin, GC: guanilat siklaz



**Şekil 4.** Bir astrositten glutamat ve aspartatın glutamat/aspartat taşıyıcısının tersine dönerek salınması. Anyon kanalı hücrenin şişmesiyle aktive olur ve taşınma tersine döner. Glu, glutamat; Asp, aspartat;

yıkımındaki azalmadan ya da eksitator nöronların

inhibisyonundaki

azalmadan kaynaklanmaktadır

<sup>50</sup>. Bu durumlar ortamdaki

glutamat miktarını artırmakta

ve önce ilerleyen bir nöron

dejenerasyona, daha sonra da

nöron ölümüne yol açmaktadır

<sup>50,61-63</sup>. Normal glutamaterjik

iletimde presinaptik sinir

ucundan salınan glutamat

sinaptik aralığı geçerek

postsinaptik reseptörlerine

bağlanarak onları uyarır.

Glutamatın neden olduğu

sinaptik eksitasyon non-

NMDA reseptörleri aracılığı

ile olmaktadır. Aferent

boşalmımlarla uyarılan

internöronlardan salınan

glutamat da ikinci sıra

nöronlarda NMDA reseptörleri

aracılığıyla eksitasyona neden

olur. Böylece hücre içi  $Ca^{+2}$

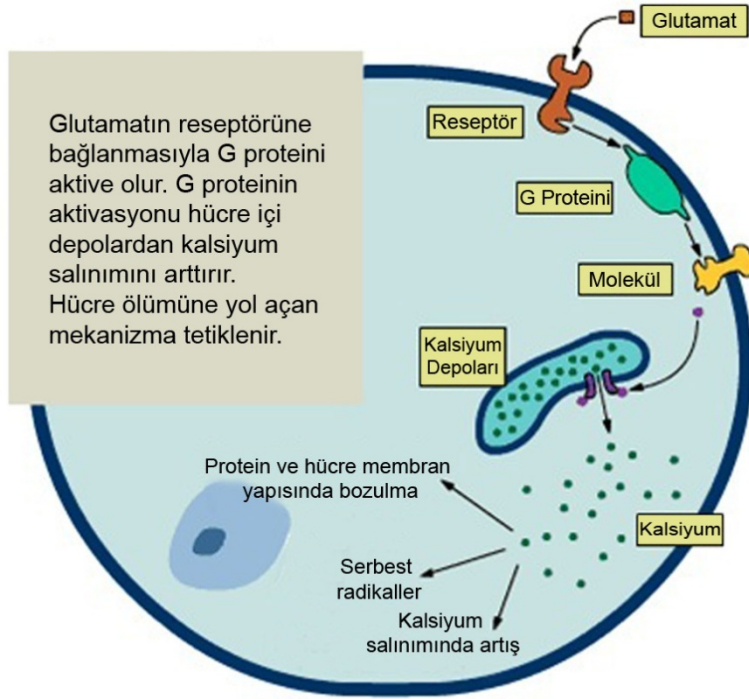
miktarı artarken protein kinaz

C (PKC) ve NOS aktivasyonu

gerçekleşir (Şekil 3) <sup>64</sup>. Salınan

NO, glutamat salınımını daha da artırır <sup>64</sup>. Glutamatın etkisi eksitatör sinyal perisinaptik glialarda bulunan glutamat re-uptake taşıyıcı protein tarafından sonlandırılır. Glutamat taşıyıcı sistemi anoksi/hipoksiye yol açan durumlarda bozulur. Glutamat geri alımı için eksternal Na<sup>+</sup> ve internal K<sup>+</sup>'a ihtiyaç vardır. Glutamat geri alınması Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> gradienti ile doğrudan ilişkilidir. Hücre içi asidoz, hücre şişmesi, araşidonik asit ve serbest radikal oluşumu da astrositlere glutamat geri alımını inhibe etmektedir (Şekil 4) <sup>65</sup>.

Hüresel pH yavaş yavaş asitleşirken, hücre dışında K<sup>+</sup> konsantrasyonu artar. Hücre dışı Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> azalır. K<sup>+</sup> artışı hücrelerin depolarizasyonuna ve yine glutamat salınımına neden olur <sup>66</sup>. Fazla glutamat saliverilmesine bağlı olarak glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması hücre içi Ca<sup>+2</sup> artışı ve serbest radikal oluşumuyla nöron hasarına yol açmaktadır (Şekil 5) <sup>67</sup>.



**Şekil 5.** Glutamata bağlı eksitotoksitenin mekanizması

## 2.6. Eksitator Aminoasit Reseptörleri

Eksitator aminoasit, glutamat (glutamik asit), postsinaptik hücre yüzeyindeki etkilerini glutamat reseptörlerine bağlanıp nöronal sinyali tetikleyerek oluştururlar. Glutamat reseptörleri iki majör kategoriye ayrılmıştır; iyonotropik (iletken iyonlar) ve metabotropik (biyokimyasal sinyali tetikleyen). İyonotropik reseptörler uyarıldıklarında hücre membranından hücre içine iyon geçişini doğrudan etkileyen reseptörlerdir.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$ 'a olan farklı geçirgenlikleri nedeniyle N-methyl-D-aspartate (NMDA),  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) ve kâinat olmak üzere 3'e ayrılırlar. Eksitotoksisite çoğunlukla bu iyonotropik reseptörler aracılığıyla yönetilir. Bütün bu ligand-kapılı iyon kanalları normalde ligand bağlandığında hücre içine katyon girişine olanak sağlar. NMDA, kâinat ve AMPA reseptörleri eksitator etkiler oluştururlar. Metabotropik glutamat reseptörlerinin ise hem eksitator hem de inhibitör etkileri bildirilmiştir.

NMDA reseptörleri hipokampus (stratum radiatum), striatum, talamus ve serebral ve serebellar kortekste yüksek dansitede bulunur. AMPA reseptörlerinin dağılımı da NMDA reseptörlerine benzer ancak NMDA reseptörleri serebellumda granüler hücre tabakasında yoğun iken AMPA reseptörleri moleküler tabakada daha fazladır. Kâinat reseptörleri ise hipokampusda (stratum lucidum), neokorteksin iç ve dış tabakalarında bulunurlar <sup>68</sup>.

NMDA reseptörleri üzerinde en çok çalışılan ve bilgi sahibi olunan reseptör kompleksidir. Monovalan katyonlara ek olarak,  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun da hücre membranından geçişini sağlar. Diğer iyonotropik reseptörlere kıyasla  $\text{Ca}^{+2}$ 'a karşı en az 5 kez daha fazla geçirgen olduğu gösterilmiştir <sup>69</sup>. NMDA reseptörünün işlevini kolaylaştırmak için önce glisin (kofaktör olarak rol oynar) bu reseptöre bağlanmalıdır. Sonrasında ise glutamat bu bölgeye bağlanır. Ancak normal membran potansiyeli halinde bu kanal Mg ile bloke edilmiş haldedir ve blok; ancak reseptörü içeren nöron kısmen depolarize olduğu zaman ortadan

kalkar. Nörotransmitter aracılı ligand kapılı iyon kanalları arasında hem kimyasal hem de voltaja bağlı açılabilen tek kanal NMDA reseptörüdür. Santral sinir sistemine yaygın olarak dağılmıştır. Duysal ileti ve iletinin integrasyonu ile motor fonksiyon ve aktivitenin koordinasyonu ve programlamasında yer alır<sup>48</sup>. Bu reseptör başlıca 6 bölge içerir. NMDA reseptörleri üzerindeki yoğun çalışmalar yakın zamanda birçok subünitin de ortaya konulmasını sağlamıştır. Bu subünitler değişik beyin bölgelerinde daha yoğun konsantrasyonlarda yer almakta ve canlılığın gelişim evresine göre de farklılıklar gösterebilmektedir. Bunlar; bağlayıcı NR1 alt ünitesi ile birlikte modülatör 4 farklı tipte NR2A-NR2D alt üniteleridir<sup>70-72</sup>. NMDA reseptörlerinin alt üniteleri, özellikle RGH, amakrin hücre gövdeleri ve iç pleksiform tabakada olmak üzere; immünohistokimyasal olarak kemirgenlerin iç retina katlarında ve NR1 alt ünitesi, sıçan optik sinirinin intraorbital bölgesinde gösterilmiştir<sup>70,73</sup>. Agonist olarak glutamat, kofaktör olarak glisin ve antagonist olarak çinkonun bağlanabileceği farklı bağlanma yerleri içeren NMDA reseptörleri, eksitotoksikite nedeniyle klinik olarak ayrı bir önem taşır. Özellikle kafa travması geçiren ya da inme gelişen hastalarda ketamin, dekstrometorfan, fensiklidin, Mg ve MK-801 gibi NMDA reseptör antagonistlerinin potansiyel olarak nöron koruyucu oldukları bildirilmiştir<sup>74</sup>. Normal sinaptik fonksiyonda, glutamatın eksitator aktivitesi, sinir terminalleri ve glialardaki geri alım mekanizmaları ile, sinapslardan etkili ayrılmadan dolayı hızlı sona erdirilir<sup>75</sup>. SSS de glutamat geri alımında astrositlerin çok önemli rolü olmasına rağmen, Müller hücreleri de bu mekanizmada oldukça aktiftir. Müller hücresi, retinal ekstraselüler alanın homeostazisinin sağlanması, retinal kan akımının regülasyonu ve patolojik koşullarda da reaktif yanıtların oluşturulması gibi fonksiyonları olan, vertebralı retinasının en önemli glial hücresidir<sup>76</sup>. Ayrıca Müller hücrelerinin RGH'lerini kültür çalışmalarında eksitotoksik hasarın önlenmesinde primer etkili olduğu<sup>77</sup>; eksitator glutamatın retinal ekstraselüler alandan alınması ve bir antioksidan olan glutatyonun ortama verilmesi gibi görevleri olduğu bildirilmiştir<sup>76</sup>.

Glutamatın glial hücreler ile geri alımından sonra, glutamat glutamine

dönüştürülür, ekstraselüler alana salınır, nöronlar tarafından alınır, tekrar glutamata dönüştürülür. Böylelikle, bu nöronal-gliyal metabolik geçiş formu, eksitator nörotransmitter metabolizmasının önemli bir komponentidir. Bu nöroglial sistemin disfonksiyonunun, artan ekstraselüler glutamat düzeyleri ile eksitotoksik hasara ilerlediği bilinmektedir <sup>78</sup>. Memeli RGH 3 iyonotropik reseptöründe içerir<sup>79</sup> ve NMDA reseptörleri RGH lerinde ve amakrin hücre alt gruplarında eksprese edilmektedir <sup>70,80</sup>.

Alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazole propionic acid (AMPA) reseptörleri monovalan katyonlar ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ) için daha seçicidirler. Hızlı eksitator sinaptik geçişde rol oynarlar. Bu kanalların açılması ile  $\text{Na}^+$  hücre içine girer ve depolarizasyon oluşur <sup>81</sup>. Kâinat reseptörleri hakkındaki bilgiler nisbeten daha azdır ve detaylı çalışmalar sürdürülmektedir <sup>45</sup>. Metabotropik reseptörler ikincil haberci olarak görev yaparlar. Uyarılmaları hücre içi inozitol trifosfat ve diaçil gliserol düzeylerini artırır, hücre içi havuzlardan  $\text{Ca}^{+2}$  salınımını sağlar <sup>82</sup>. Diaçilgliserol proteinkinaz C'yi aktive ederek voltaj bağımlı kalsiyum girişinin artmasına da yol açabilir <sup>83</sup>. AMPA ve kâinat reseptörleri  $\text{Na}^+$  iyonlarının hücre içine ve  $\text{K}^+$  iyonlarının hücre dışına akışına izin verir. Oligodendrositlerde ve spinal kordda bulduklarına dair kanıtlar mevcuttur ve bu reseptörlerin aşırı aktivasyonunun ak madde hasarı ile sonuçlanabileceği bilinmektedir <sup>84-86</sup>. Bir çalışmada, optik sinir hasarı sonrasında AMPA/kâinat reseptörlerinin inhibisyonunun NMDA reseptörlerinin inhibisyonuna göre hasarı daha fazla azalttığı gösterilmiştir de AMPA/kainat reseptörleri myelinize olmayan RGH aksonlarında gösterilememiştir <sup>86</sup>. AMPA ve kainate reseptörleri eksitotoksositeye katkıda bulunmalarına rağmen, NMDA reseptörleri önemli bir rol oynamaktadır <sup>87</sup>.

Eksitotoksite glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonun bir sonucudur ve yüksek ekstraselüler glutamat konsantrasyonu veya normal glutamat düzeylerinde reseptörlerin hiperaktivitesiyle başlayabilir. Örneğin merkezi sinir sistemi iskemisi sonrasında hem nöronlarda hem de glia da gerçekleşecek enerji metabolizması muazzam bozulmaya yol açıp ekstraselüler glutamat

konsantrasyonunun yükselmesine neden olacaktır. Bu koşullar altında glutamat, normalde glia içine alınırken ve hatta ters taşıma söz konusu olabilirken, glutamat taşıyıcıları tarafından tam temizlenemeyip salınımının artışı ile sonuçlanır<sup>88,89</sup>. Depolarizasyon NMDA reseptörlerinin  $Mg^{+2}$  ile blokajını rahatlatır<sup>90</sup>. Bu nedenle, fizyolojik  $Mg^{+2}$  blokaj yokluğunda, NMDA reseptör ile eşleşmiş kanallar yüksek ekstraselüler glutamat konsantrasyonu olmadan bile anormal aktif olurlar.

## **2.7. Glutamat ve Oksidan Hasar**

Birçok nörodejeneratif hastalıkta ortaya çıkan hasardan reaktif oksijen radikallerinin (ROR) sorumlu olduğu gösterilmiştir<sup>91</sup>. Glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı ve serbest radikal oluşumuyla nöron hasarına yol açmaktadır<sup>67,92</sup>. Dağınık bulunan glutamat reseptörlerinin yaygın aktivasyonu ve hücre içi serbest radikallerin oluşumu bu nöronal hasarda önemli rol oynar. Nöronlar gibi replikasyonu olmayan hücrelerde oksidatif stres birikmiş olabilmektedir. Beyin dokusunda yapılan postmortem çalışmalar esas olarak protein ve DNA yapılarındaki biyokimyasal değişikliklerin varlığını göstermektedir.

## **2.8. Eksitotoksisite ve Glokom İlişkisi**

Eksitotoksisitenin glokomun patofizyolojisinde yer alıp almadığı hala bir tartışma konusudur. Tartışmaya açık bir çalışma glokom hastalarında kontrollere göre vitreus glutamat seviyelerini daha yüksek bulurken<sup>58</sup>, diğer çalışmalar bu bulguyu desteklememektedir<sup>93</sup>. Bu arada, glutamat toksisitesi olduğu savunulan diğer retinal hastalığı olan hastalarda; örneğin proliferatif diyabetik retinopatisi olan hastaların vitreusunda ve retinal arter oklüzyonu olan hastaların aköz humöründe yüksek glutamat seviyeleri gözlemlenmiştir.<sup>94</sup> Önemli olan, buna

rağmen glokom patofizyolojisinde eksitotoksisite bileşenini gözlemlemek için glutamat seviyesinin yüksek olmasına gerek yoktur. Örneğin; RGH, enerji yetersizliğine yol açan herhangi bir sebepten ötürü tehlikeye girdiğinde, hücrelerin iyon pompaları çalışmamaya başlar ve depolarize olurlar. RGH membranının iç tarafı daha polarize hale gelir, diğer bir deyişle pozitif yüklenir. Pozitif yükler birbirini ittiğinden dolayı da iyon kanal boşluğunda lokalize  $Mg^{+2}$  iyonu itilecektir. Bundan sonra hasarlı, depolarize nöronlar  $Mg^{+2}$  blokajından kurtulurlar, hücreler normal seviyelerdeki glutamatla bile hasarlanmaya duyarlı hale gelirler<sup>53,90</sup>.

Nöronlar ve glia hem metabolizma için hem de nörotransmisyon için yüksek konsantrasyonda intrasellüler glutamat (~10mM) içerir<sup>95</sup>. Bununla birlikte, hücre içi depolanan glutamat zararlı değildir. Sadece “ekstrasellüler” glutamat reseptör aracılı mekanizmalarla eksitotoksisiteye yolaçabilir. Bu yüzden, glutamat lokalizasyonu kritiktir (intrasellüler veya ekstrasellüler), ve ekstrasellüler glutamat seviyelerini ölçmek dokulardaki total glutamat içeriğini ölçmekten çok daha anlamlıdır. Retinanın ekstrasellüler boşluğu olarak görülen vitreustaki lokal glutamat düzeyi ölçülmektedir. Fakat gerçek ekstrasellüler boşluk retinal hücreler arasındaki "intersellüler" boşluktur. İnsan retinasında böyle glutamat konsantrasyonu ölçümlerindeki teknik zorluklarından dolayı, gerçekte hiç kimse glokom hastalarında glutamat artışının olup olmadığını bilmemektedir. Buna rağmen Hare ve ark.<sup>96-98</sup> iyi bilinen bir maymun modelinde NMDA reseptör antagonistlerinin RGH'leri hem histolojik hem de elektrofizyolojik sonuçlarından koruduğunu göstermişlerdir.

Glokomda RGH yüksek GİB'e cevap olarak nasıl nasıl ölmektedir ve eksitotoksisite ile ilişkili midir?, soruları hala cevaplanmayı beklemektedir. Dahası, özellikle Asya'da, yüksek GİB olmaksızın glokomatöz optik nöropati ile kendini gösteren normotansif glokomun yüksek prevalansı, etiyojijiyi daha anlaşılabilir yapmaktadır.

Mekanik teoriye göre laminar yapılarda deformasyon sonucu retrograd aksonal transportun engellenerek NTF'in RGH'larına ulaşamadığı ve RGH'nin

ölümüne yol açtığı Quigley tarafından öne sürülmüştür<sup>28</sup>. Bu senaryoda bile, eksitotoksisite hasarlı hücrelerden dışarıya glutamat sızıntısı sonucu, oksidatif stresi tetikleyip, RGH ölümüne yol açarak glokom patofizyolojisine katılabilir. Bu mekanizma, nöronal dejenerasyona katkıda bulunan birçok nörolojik bozuklukta, ortak final yol olarak tanımlanmaktadır<sup>95</sup>.

Bazı otoriteler, glokomda OSB'nin iskemik olduğu kanısındadırlar<sup>99,100</sup>. Eğer bu doğru ise, eksitotoksisite kesinlikle glokom patofizyolojisinde yer alabilir, çünkü iskemik durumlarda glia tarafından glutamat klerensi azalır<sup>88,89</sup>. Bu bakımdan, glokom hastalarının retinaları belirgin düşük eksitatuvar aminoasit reseptör-1 (EAAT-1) immünreaktivitesi göstermişlerdir. Bu enzim glutamat klerensinden sorumludur<sup>101</sup>. Glokomatöz retinada metabolik olarak baskılanmış hücrelerde glutamatın yetersiz salınımı<sup>95,102</sup>, ekstraselüler glutamat yüksekliği ile beraber olabilir. Burada tekrar vurgularsak NMDA reseptörlerinin  $Mg^{+2}$  ile blokajı çözülmüşse, yüksek glutamat düzeyleri olmaksızın, RGH'de eksitotoksisite gündeme gelebilir<sup>53</sup>. İskemi süresince, enerji metabolizmasının bozulması RGH'nin depolarizasyonuna ve NMDA reseptörlerinin  $Mg^{+2}$  blokajının çözülmüşüne neden olacaktır<sup>90</sup>. Depolarizasyona ek olarak, arasında mekanik stresinde bulunduğu birçok faktör  $Mg^{+2}$  bloğunu bozabilir. Subletal germe, kortikal nöronlarda neredeyse tüm  $Mg^{+2}$  bloğunun kaybına neden olmuş<sup>103</sup> ve düşük konsantrasyonlardaki NMDA düzeyine hassas hale getirmiştir<sup>104</sup>. Aksonal hasar ve inflamasyon NMDA reseptörlerinin  $Mg^{+2}$  bloğuna engel olan diğer bildirilen faktörlerdir<sup>105</sup>. Sonuçta; iskemi, mekanik stres, aksonal hasar ve inflamasyon karşısında NMDA reseptörlerinin  $Mg^{+2}$  bloğu çözülebilir ve bunların hepsi glokomdaki yüksek GİB ve RGH hasarı ile ilintili olarak bildirilmiştir<sup>28,99,106-108</sup>.



## 2.9. Glutamat Nörotoksisitesinin Oluşum Mekanizmaları

İki ayrı yolak glutamatın oluşturduğu nörotoksisite için bildirilmiştir. Bunlar eksitotoksik yolak ve oksidatif yolaktır. Eksitotoksik yolak, NMDA ve diğer denzeri glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna ve sonuçta hızlı ve yavaş sitotoksik olayların her ikisinin de tetiklenmesine yol açar.

Eksitotoksik yolaktaki hızlı etkiler, NMDA reseptörünün aktivasyonuna bağlı olarak,  $Ca^{+2}$  iyonunun zararlı olan yüksek konsantrasyonda hücre içine girişine yol açar. Yavaş etkiler ise daha çok metabotropik glutamat reseptör aktivasyonu sonrası gelişir.

Oksidatif yolak, glutamat-sistin antiport sistemini bozar, glutatyon seviyelerini azaltır ve nörotoksik olan aşırı reaktif oksijen oluşumuna yol açar.

SOR; süperoksid dismutaz enzimlerinin, katalazın ve glutatyon peroksidazın sıkı kontrolü altındadır. Serbest radikallerin ana üreticisi mitokondridir. Oksijen radikalleri hücre, doku ve organ hasarı oluşumuna katkı yaparlar.

Salisilik Asit (SA),  $OH^-$  radikali yakalayıcı olarak glutamat ( $10^{-7}M$ ) ve kainik asit toksisitesini önlemede çok etkili bulunmuştur. Bu durum NMDA ve kainik asitin serbest radikal oluşturarak hücre ölümü yaptığını düşündürmektedir.

SOR glutamat alım inhibisyonu yapabilir. Ayrıca NMDA reseptör aktivasyonu yaparak, süperoksid salınımına, hücre içi  $Ca^{+2}$  artışına ve NO oluşumuna yol açabilir.

ROR'un, iskemi veya aksotomi nedeniyle hatta gelişim sırasında doğal olarak ortaya çıkan, birçok türde nöron ölümünde yer aldığı açıktır <sup>109</sup>. Sayısız intraselüler yolakları içermektedir ve nöroproteksiyon çabaları metilen mavisi <sup>110</sup>, tioredoksin <sup>111</sup>, serbest radikal süpürücü edaravone <sup>112</sup> ve NOS inhibitörleri ve koenzim Q10 <sup>113</sup> gibi çeşitli antioksidanları başarılı olarak kullanılmasına sağlamıştır.

## 2.10. Retina Ganglion Hücre Ölüm Mekanizmaları

İlk travmanın tipine bakmaksızın, aksonal hasar RGH'nin ölümünü apoptozis ile indüklemektedir <sup>28,114</sup>. RGH hasarının ilk belirtileri, dendritik ağacın incilmesi, sonrasında hücre gövde ve aksonlarında boyutlarında küçülmedir <sup>115</sup>.

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 NMDA reseptörlerini aktive eder.

Nitrik oksit (NO) etkisi: NMDA reseptörlerinin uyarılması ile NO sentaz 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 faktör, BDNF) reseptörü olan Trk B retinada 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 ne 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 ne yaşam sinyalleri ulaşamaz ve hücre ölümü hızlanarak devam eder. Memeli sinir sisteminde bu türden pek çok faktör vardır, ama ganglion hücreleriyle en yakından ilişkili olanı beyin kökenli nörotrofik faktördür (BDNF). 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 <sup>116</sup>.

Apoptozis: NMDA reseptörlerinin glutamat tarafından aktive edilmesi, hücreler için enerji kaynağı olan mitokondrilerde NO artışına ve mitokondride serbest radikal süperoksit anyonu ve peroksinitrit oluşumuna yol açar. Bu aktivasyon apoptozis olarak isimlendirilen inflamasyonsuz hücre ölümünün başlangıcıdır. Apoptozis normal ortamda planlanmış hücre ölümü iken, glokomda erken aktive edilmiş olur. NMDA reseptörlerinin uyarılması  $Ca^{+2}$  yükselmesine ve  $Ca^{+2}$ 'a bağımlı hücre içi enzim sisteminin çalışmasına neden olur. Apoptozisteki kimyasal olaylar proteolitik enzimlerle ilişkilidir. NMDA reseptör uyarımı ile hücre içi  $Ca^{+2}$  artmakta, kaspaz sistemi aktive olmakta, hücre içi yıkım başlamaktadır.

Glokomda erken dönemde sinir lifi harabiyeti ve ileri dönemde RGH ölümü tek bir mekanizma ile açıklanamayacak birçok faktörün rol oynadığı karmaşık olaylar dizisidir. Apoptozisin önlenmesi ve nöroprotektif yanıt için ilk unsur akson basısının azaltılması yani GİB' inin düşürülmesidir. Glokomda retrograd nörotrofik faktör akımının (BDNF) olmaması RGH ölümü için önemli bir nedendir. Bunun dışında NO sentaz enzim inhibitörleri, ilave NTF, kaspaz sistem inhibitörleri, NMDA reseptör antagonistleri gibi potansiyel nöroprotektif ajanlar araştırma safhasındadır <sup>78,117-119</sup>.

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 <sup>120</sup>. 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 <sup>121</sup>.

## 2.11. Glokomda Nöroprotektif Tedavi

Nöroproteksiyon terim olarak, asıl etken ortadan kaldırılmış olsa bile hasarlanma ihtimali halen olan, ölmüş veya ölmekte olan hücreler arasında bulunan sağlıklı nöronların muhafaza edilmesi anlamında kullanılmaktadır. Glokomda ise nöroproteksiyonun amacı stresli durumlarda hasarın hedeflediği nöronların yaşamını sürdürecektir sinyal yollarını açık tutmak ve nöron hücre kaybına sebep olan maddelerin veya yolların önüne geçerek RGH hasarını geciktirmek veya durdurmaktadır<sup>122</sup>. Yani RGH canlılığı ve fonksiyonelliği devam ediyor ise nöroproteksiyon tedavi stratejisi olarak kabul edilebilir. Nöroproteksiyonun, glokom ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde geleneksel methodlarla ilişkisi yoktur. Çünkü GİB'den, oküler kan akımından ve diğer mekanizmalardan bağımsızdır. Bunun yerine, nöronun daha uzun yaşamasını hedefleyen bir stratejidir<sup>7</sup>.

Özellikle nöroproteksiyonun yaklaşımı ve mantığı geleneksel tedavilerden bu kadar farklı iken yeni tedaviler konusunda şüpheli olmak doğaldır. Buna dair tartışmalar halen sürmektedir ve yaygın olarak tartışılan üç soru gündeme gelmektedir. Birincisi, GİB düşürülmesi sağlanmışken, neden nöroproteksiyona ihtiyaç duyulmaktadır? İkincisi, neden nöroproteksiyon RGH'ye yönelik olmalıdır? Üçüncüsü, nöroproteksiyonun gerçekçi bir strateji olduğuna dair kanıtlar nelerdir?

### 2.11.1. Nöroproteksiyonun gerekçesi nedir?

Bugün sahip olduğumuz güçlü ilaçlarla GİB'i düşürsek bile, gelecekte GİB'i daha fazla düşürebilecek daha potent ilaçların var olacağını ümit etmekte, yine başka bir tedavi yaklaşımına ihtiyaç vardır. Randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen verilere göre mükemmel GİB kontrolü olan bazı hastalarda bile ilerleme olmaktadır<sup>16,17</sup>. Bu sonuçlar çok sayıda araştırmacıyı

GİB'i düşürmeye yönelik klasik glokom tedavisine ek olarak, yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir.

Nöroproteksiyonun diğer bir gerekçesi de GİB düşürücü tedavinin yan etkilere sahip olmasıdır. Bazı hastalarda, gerek GİB düşürücü ajanlara iyi yanıt verilmemesi gerekse ilaçların ve cerrahinin yan etkilerinden dolayı, düşük basınçlar elde etmek zordur. Cerrahi tedavinin yan etkileri olabildiği gibi, GİB düşürmeye yönelik geleneksel mekanizmalar veya dışa akımı arttırıcı tedaviler etkilidir, ama her zaman yeterli ve iyi tolere edilememektedir<sup>7</sup>.

### **2.11.2. Neden RGH glokomda nöron korunması için hedeftir?**

Glokomda nöroproteksiyon mantığının hedefi RGH gövdesi, aksonu ve dendritik ağacıdır. Çünkü 1) RGH glokomatöz optik nöropati sonucu ölmektedir; 2) RGH kaybının geri dönüşümü olmamaktadır. Çünkü RGH'leri SSS nin bir uzantısıdır ve bir defa ölünce, retinadan kaybolmaktadır ve 3) RGH'leri retinadan çıkış nöronlarıdır ve bu sebeple görsel sinyallerin gözden beyindeki hedef bölgelere ulaştırılmasından sorumludurlar.

Bu üç dayanağa göre RGH kaybı, geri dönüşümsüz görme kaybına yol açmaktadır. Bu demek değildir ki, diğer hücre tipleri (örneğin astrositler ya da glia) nöroproteksiyon için önemsizdirler. Ancak optik nöropatinin sonucu RGH kaybı olup, nöroprotektif çabaların amacı bu hücrelerin yaşatmaktır<sup>7</sup>.

### **2.11.3. Nöroproteksiyonun glokom için gerçekçi bir tedavi stratejisi olabileceğine dair kanıtlar nelerdir?**

Nöroprotektif tedavinin amacı farmakolojik ya da başka yollarla çevresel karıştıkları azaltmak ve/veya hücrelere bu çevresel etkenlerle savaşma imkânı vermektir. Bu yaklaşıma göre, nöronlardaki herhangi bir kronik dejeneratif

problem, primer nedeni ne olursa olsun, herhangi bir zamanda, bazı nöronların çevresel karşıtlıkların halen zarar görmemiş nöronlara yayılmasına etki eden aktif bir dejenerasyon aşamasına girdiği bir süreç olarak görülebilir. Çeşitli akut SSS travma tiplerinde görülen sekonder dejenerasyon mediatörlerinin benzerliği gösteriyor ki, mediatörler nöral ölümlerin nedeni olmaktan çok bunların sonuçları olmaktadır. Bu, nöroprotektif tedavi oluşturulmasında kritik faktörün primer hasar olmasından çok travmanın olduğu hücre ortam olduğunu destekler niteliktedir. Farklı SSS bölgelerinden nöronların birçok ortak özelliği olduğu için, glokomdaki sekonder optik sinir hasarının yayılmasına neden olan bazı mediatörler, SSS'nin herhangi bir yerinde sekonder dejenerasyona neden olanlara benzerlik gösterebilirler. Bu teorisinin dayanağı ise glokomlu gözlerin vitreusundaki retina ganglion hücreleri için toksik olan konsantrasyonlarda eksitator amino asit glutamat bulunmasıdır<sup>58</sup>.

Klinik çalışmalarla ortaya konan bir sonuca göre; glokomatöz hasarlanma kronik bir süreç olduğu için, glokomda optik sinirin tüm aksonları ve retina ganglion hücrelerinin de hepsi aynı anda hatta aynı yıl veya aynı dekatta ölmektedir. Ama ilginç olarak, eğer optik sinir herhangi bir nedenle kesilir veya ezilmeye uğrarsa, ganglion hücrelerinin kısa süre içinde öldüğü görülmüştür. Nöron düzeyinde, örneğin apoptozla oluştuğunu düşünürsek dejenerasyonun başlayıp bitmesi 24 ile 36 saat arasında gerçekleşmektedir. Biliyoruz ki, apoptozla bir hücrenin ölmesi için bazı sinyallere gerek vardır. Bu durumda optik sinir aksonlarının aynı anda uyarılmadıklarını düşünmek yanlış olmayacaktır. İnsan optik sinirinde yaklaşık bir milyon aksonun olduğu düşünülecek olursa, glokomlu bir gözde herhangi bir anda ancak birkaç sinir hücresinin hasarlanma sürecinde olması olasıdır.

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.

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. Böyle olunca da ilginç bir soru ortaya çıkıyor; acaba glokomlu bir gözde geride kalan akson veya ganglion hücrelerini yani henüz hasarlanmamış olanları hasta mı yoksa sağlıklı mı kabul etmek gerekir. 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.

Bu teorileri glokoma da uyarlırsak; 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. Optik sinirin hasarlanmasında rol alan birincil ve ikincil mekanizmaların varlığı ilk olarak Schwartz ve ark. tarafından ortaya konmuştur. Erişkin ratın optik sinirinde kısmi, ölçülebilir ve kontrollü bir şekilde hasar oluşturularak yapılan deneyde glokomdakine benzer şekilde hasarlanmış hücrelerin apoptozla kaybedildiği görülmüştür. Dejenerasyon sürecinin kendi içerisinde de aktive olduğu ve ilk hasarlanmadan kurtulan nöronların daha sonra ortaya çıkan medyatörlere bağlı hasarlanmaya maruz kalıp, sonuçta yine bozulduğu izlenmiştir. Bu sonuca göre de eksituar aminoasitler, serbest radikaller ve  $K^+$  iyonu gibi toksik medyatörlerin hem sinir liflerinde hem de retinada muhtemelen var olduğu ve sağlam kalan akson ve hücrelerde sekonder hasarlanmayı tetiklediği sanılmaktadır. Böyle bir dejenerasyonun boyutlarının salınan toksik maddelerin miktarıyla ilgili olarak, ilk lezyonun ciddiyeti belirlemektedir. Bu belki de GİB normal sınırlara çekildiği halde glokomatoz hasarın bazı olgularda neden

ilerlediğini ve de olgudan olguya da farklılıklar gösterdiğini açıklayabilir <sup>117,123</sup>. Bu anlatılanların ışığında, glokomda nöronlar için normal, hasta, bozulma aşamasında ve bozulmuş olmak üzere en az dört durumdan bahsedilebilir. Bireysel farklılıklar, spesifik genlerdeki polimorfizm, mutasyonlar ve ailevi kalıtım gibi faktörler hasta veya sağlıklı hücrelerin durumunu ve hastalığın ilerleme şeklini belirlemektedir. Hasta hücrelerin endojen mekanizmalar veya egzogen faktörler tarafından kurtarılabilmesi sevindiriciyken, bozulmaya başlamış olanları kurtarmak için ancak gen ekspresyonunun değiştirilmesi gibi bugün için oldukça zor çözümler kalmaktadır. Öyleyse araştırılması gereken, sağlıklı bir hücreyi hasta olmaya zorlayan ve hasta bir hücrenin de bozulmasını engelleyen uyarılardır. Bu olaylar dizisinin ve altında yatan faktörlerin bilinmesi bizleri yeni farmakolojik gelişmelere ve nöron kurtarılması veya korunmasına doğru yönlendirecektir <sup>124</sup>.

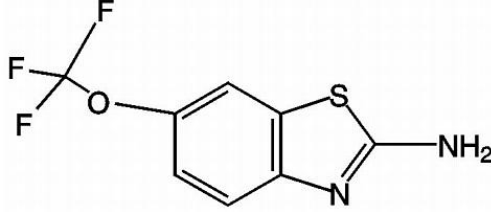
Son olarak, hücrelerin endojen savunma mekanizmalarını harekete geçirmek nöron korunmasında etkili ve alternatif bir yol olabilir. Bunlardan yola çıkarak glokomda nöron korunmasında etkili olabilecek çeşitli stratejiler ve tedavi seçenekleri geliştirilmiştir. Birçoğu halen deneysel düzeyde devam eden bu çalışmaların klinik kullanıma sunulmasıyla glokom tedavisinde şüphesiz ki yeni bir dönem başlayacaktır.

## **2.12. Riluzol**

RLZ (2-amino-6-(trifluoromethoxy) benzothiazole) (Şekil 6) voltaj bağımlı Na<sup>+</sup> kanallarını bloke ederek glutamat salıverilmesini inhibe eden nöron koruyucu bir ajandır <sup>125-127</sup>. Glutamat salıverilmesini inhibe ettiği ve nöron koruyucu etkisi olduğu için, ALS hastalığında görülen motor nöron hasarının ilerlemesini azaltmaktadır <sup>128</sup>. ALS tedavisi için 1996'da FDA tarafından kullanımı onaylanmış ilk ve tek ilaçtır. Ülkemizde de yaklaşık 10 yıldır kullanılmaktadır. Daha önce yapılmış çalışmalarda RLZ'nin myorelaksan,



psikotropik, antikonvülsan, sedatif, hipnotik, anestezik, hipotermik, global iskemi modellerinde iskemik hasara karşı koruyucu ve anoksi ya da eksitotoksik hasara karşı nöron koruyucu etkileri gösterilmiştir<sup>50,129</sup>. Sıçanlarda oluşturulan beyin travması modellerinde lezyonların yanı sıra nörolojik motor ve kognitif bozukluğu düzeltmektedir<sup>130</sup>.



**Şekil 6.** Riluzolün (2-amino-6-(trifluoromethoxy) benzothiazole) kimyasal yapısı

### 2.12.2. Riluzolün farmakinetik özellikleri

Oral verilen RLZ'nin absorpsiyonu oldukça iyidir (yaklaşık %90). RLZ'nin mutlak biyoyaralanımı ortalama %60'dır. 12 saatte bir uygulandığında 25–100 mg arası dozlarda lineer farmakokinetik özellik gösterir. Aç karnına alınması gerekir. Tekrarlayan dozlarda ortalama  $t_{1/2}$  12 saattir. Radyoaktif işaretli RLZ (<sup>14</sup>C- RLZ) tek doz 50 mg uygulandığında, verilşi takip eden 1. saatte SSS'ndeki RLZ radyoaktivitesi plazmadakinin 3 katı olmaktadır<sup>62</sup>.

RLZ'nin 6 ana metaboliti vardır. Bunlardan bazıları da aktiftir. Daha fazla oranda karaciğerde sitokrom P-450 enzimlerinden CYP1A2 aracılığıyla N-hidroksilasyona uğrar ve glukronidasyon ile metabolize olur. Bunun dışında CYP2D6, CYP 2C19, CYP 3A4 and CYP 2E1 enzimleri de RLZ metabolizmasında görev almaktadır. Tek sefer 150 mg dozda uygulanan <sup>14</sup>C-RLZ radyoaktivitesinin %90'ı idrarda, %5'i dışkıda 7 günden fazla süreyle gözlenmiştir. Glukronitler idrardaki metabolitlerinin %85'ini oluşturur. Yalnızca %2'si idrarla değişmeden atılır. Fare ve sıçanlar için kullanılan deneysel dozları 1–15 mg/kg arasında değişir. 15 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda doğrulma refleksinin kaybolmasına yol açar; anestezik etki gösterir. 4 mg/kg intraperitoneal (ip) doz için  $E_{max}$  40 dakikadır. Etkisi yaklaşık 3 saat devam eder<sup>131</sup>.

### 2.12.3. Riluzolün etki mekanizması

RLZ'nin başlıca etki mekanizması glutamaterjik impuls aşırımını bloke etmesidir <sup>128,131</sup>. RLZ hücrelerinde hem bazal hem de nöronal aktivasyon sonucu oluşan glutamik asit salınımını da presinaptik etkiyle ve yine pertussis toksine duyarlı bir mekanizmayla inhibe eder <sup>132</sup>. Bunun yanısıra striatal sinaptozomlarda GABA gerilimini inhibe ettiği gösterilmiştir <sup>133</sup>. Ayrıca farelerin beyin dokusunda aminoasitlerle uyarılan nörotransmitter salınımını da inhibe ettiği ileri sürülmektedir <sup>134</sup>. RLZ hipoglossal motor nöronlarda yapılan in vitro çalışmalarda NMDA ve kâinat reseptörlerinin uyarılması sonucu oluşan akımları inhibe ettiğinin görülmesi, etkisini bu reseptörler aracılığıyla yaptığı fikrinin ortaya atılmasına neden olmuştur <sup>135</sup>. Ancak, daha sonra yapılan hiçbir reseptör bağlanma çalışmasında RLZ'nin NMDA, AMPA veya kâinat reseptörlerine bağlandığı gösterilememiştir <sup>136</sup>. RLZ'nin presinaptik glutamat salınımını inhibe etmesinin yanısıra ekzojen olarak uygulanan glutamat ile oluşturulan membran depolarizasyonunun amplitüdünü de azaltması postsinaptik etkilerinin dolaylı olduğunu iddiasını desteklemektedir <sup>137</sup>. Nöron koruyucu etkide glutamat salınımının azaltılmasının yanısıra voltaja bağımlı iyon kanallarının modülasyonu da önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir <sup>92</sup>. RLZ myelinli sinir liflerinde voltaj bağımlı Na<sup>+</sup> kanallarını çok düşük konsantrasyonlarda bile bloke ederek nöronal depolarizasyonu önlemektedir <sup>138</sup>. Na<sup>+</sup> kanalları üzerindeki batrakotoksin-bağlanma bölgesine afinite gösterdiğinden depolarize nöronlarda da seçici etkisi vardır; aksiyon potansiyeli oluşumunu önlediği gösterilmiştir <sup>139</sup>. Na<sup>+</sup> kanal aktivatörü olan veratridin ile indüklenen eksitotoksisteyi RLZ hem in vitro, hem de in vivo çalışmalarda pertussis toksine bağımlı bir mekanizmayla önlediği bildirilmektedir <sup>132</sup>. RLZ'nin, sıçan serebellar granüler hücre kültüründe postsinaptik olarak glutamat ve NMDA reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak oluşan Ca<sup>+2</sup> mobilizasyonunu yüksek dozlarda G proteinlerini inaktive eden pertussis toksine duyarlı bir mekanizmayla bloke ettiği gösterilmiştir <sup>138</sup>.

RLZ glutamatın salıverilmesini önlemektedir. Ancak Urenjak ve ark.

RLZ'nin fizyolojik durumdaki glutamatın veziküler eksitozunu değil, enerji depleksiyonunda Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+</sup> kanalları aktive olmasıyla görülen glutamatın sitozolik efluksunu inhibe ettiği öne sürmüşlerdir <sup>140</sup>. Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+</sup> kanallarını bloke eden ilaçların global serebral iskemi ve diğer modellerde nöron hasarını azalttığı gösterilmiştir <sup>141</sup>. Ayrıca K<sup>+</sup> kanallarının aktivasyonu ve Cl<sup>-</sup> kanallarının blokajının da bu etkilerine aracılık ettiği öne sürülmektedir <sup>142</sup>.

RLZ hasar tehdidi durumlarında hücrenin direncini artırarak gösterdiği nöron koruyucu etkilerin yanısıra, onarım mekanizmalarını da devreye sokarak rejenerasyonu artırmaktadır <sup>61</sup>. Fare astrosit hücre kültüründe RLZ'nin NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) ve GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor) gibi intrinsik NTF'nin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir <sup>143</sup>. Özellikle NGF septal lezyonları takiben ödem oluşumunu azaltmaktadır <sup>144</sup>. Farklı travma modellerinde ilk yarım saat içinde uygulanan RLZ'nin beyin ödemi ve lezyon oluşumunu azalttığı gösterilmiştir <sup>145</sup>.

RLZ'nin eksitoksisiteye bağlı olarak ortaya çıkan oksidan hasarı önlemesinin yanısıra in vitro bir çalışmada da kortikal nöron hücre kültüründe glutamat antagonistlerinin varlığında FeCl<sub>3</sub> ile oluşturulan noneksitotoksik oksidatif hasarı doğrudan önlediği gösterilmiştir <sup>146</sup>. Bir başka çalışmada da RLZ'nin sıçanlarda MPP (metil fenil piridinyum) ile oluşturulan parkinson modelinde indirekt olarak ATP tüketimini ve Fe-III ile oluşan lipid peroksidasyonunu azalttığı, dopaminerjik nöronları oksidan hasara karşı koruduğu gösterilmiştir <sup>21</sup>. Noneksitotoksik oksidan hasardaki koruyucu etkilerinde fosfolipaz A<sub>2</sub> inhibisyonu ile araşidonik asit ve metabolitlerinin oluşumunu azaltmasının yanısıra, etkin bir protein kinaz C inhibisyonu yapmasının da rolü olduğu gösterilmiştir <sup>147</sup>.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda deneysel glokom modelinde antioksidan ve nöron koruyucu etkili bir ilaç olan RLZ'nin RGH üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırılmıştır.

## 2.13. Resveratrol

### 2.13.1. Resveratrolün tarihçesi

RES (3, 4', 5 – trihidroksistilben) (Şekil 7); ilk kez 1940'ta beyaz hellebore köklerinden (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) izole edilmiştir. Daha sonra 1963 yılında geleneksel Çin ve Japon ilacı (Kojokon) olarak bilinen *Polygonum cuspidatum* (Itadori çayı) köklerinden elde edilmiştir <sup>148</sup>.

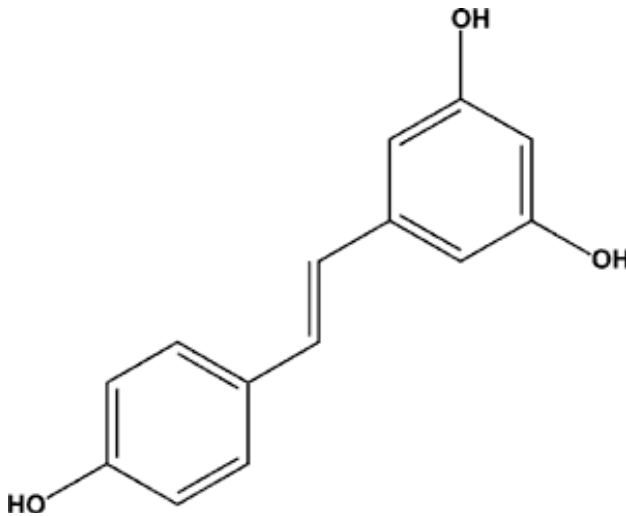
1976 yılında, Langcake ve Pryce tarafından, asma yaprağının, fungal infeksiyonlara (çoğunlukla *Botrytis cinerea*), soğuk hava koşullarına, patojen mikroorganizmalar veya ultraviyole ışığına maruz kaldığında bu etkenlere karşı korunma amaçlı olarak sentezlediği bileşik trans-resveratrol olarak tanımlanmıştır <sup>149,150</sup>. 1992 yılında, RES şarap içinde tespit edilmiştir. RES, 1992 yılında kırmızı şarabın kardiyoprotektif etkileri olduğu varsayımı "Fransız Paradoksu" (Güney Fransa da yüksek oranda doymuş yağ ile beslenmesine rağmen kardiyovasküler hastalık insidansinin düşük olması) açıklanana kadar fazla ilgi çekmemiştir <sup>148</sup>. Daha sonra yapılan çalışmalar, RES'in strese direncini artırarak ve mayadan omurgalılara birçok organizmanın yaşam süresini uzatarak kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve iskemik hasar dahil birçok hastalığı önleyebildiğini veya gelişimini yavaşlatabildiğini göstermiştir <sup>149</sup>.

RES üzerine yapılan ilk çalışmalar daha çok kardiyovasküler sistemin düzenlenmesindeki metabolik yollarda, lipid metabolizması ve trombosit fonksiyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. Daha sonra karsinogenezin murin modelinde kansere karşı koruyucu aktivitesi, araştırmaları RES'in farklı biyolojik etkilerinin moleküler mekanizmaları yönüne kaydırmıştır. Kanser önleyici etkisinin gösterildiği başlıca ilk kanıt 1997 yılında Jang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir. Bu çalışmada kimyasal karsinogenezin oluşturulduğu fare modelinde tümör oluşumunun anlamlı ölçüde azaldığı

gösterilmiştir<sup>20</sup>. Sonuç olarak, RES'in bazı önemli fizyolojik yollar üzerindeki pozitif ya da negatif etkilerinin, kansere karşı koruyucu, kardiyoprotektif ve nöroprotektif aktiviteler olduğu gösterilmiştir<sup>20</sup>.

### 2.13.2. Resveratrolün fiziksel özellikleri, kimyasal yapısı ve kaynakları

RES, molekül ağırlığı 228,2 g/mol olan, polifenol yapıda bir fitoaleksindir. Fitoaleksin; bitkilerin herhangi bir dış stres veya patojenik (fungal) atak sonucu ürettikleri antibiyotiktir<sup>42</sup>. Etanolde çözünür (50 g/L), dimetilsulfoksitte (DMSO) daha az (16 g/L) ve suda çok az (0.03 g/L) çözünür<sup>151</sup>. Cis ve trans izomer formlarında bulunur, ancak cis-izomeri henüz üzüm ekstraktında tespit edilmemiştir. Trans formu aktiftir. RES, viniferin isimli polimer ailesinin ana molekülüdür<sup>148</sup>.  $\alpha$ -viniferin ve RES'den daha yüksek antifungal ve antioksidan



Şekil 7. Resveratrolün kimyasal yapısı

aktivite gösteren  $\epsilon$ -viniferin mantar enfeksiyonunun ilerlemesini inhibe eder. Bu nedenle RES ve viniferinler bitki antibiyotikleri olarak bilinen fitoaleksin sınıfındadır<sup>100,152</sup>. RES, stilben türevi olan bir stilbenoldür ve bitkilerde stilben sentaz enzimi aracılığıyla sentezlenir. Bu enzim normal şartlarda aktif değildir, ancak UV ışınları ya da mantar enfeksiyonu sonrasında 6 saat içinde aktifleşir ve 30 saat içinde maksimum düzeye ulaşır<sup>152</sup>.

RES'in, stilben yapısı sentetik östrojen dietilstilbestrol ile benzerdir<sup>42</sup>. Stilbenler, kansere karşı koruyucu ajan olarak rol alan polifenolik bileşiklerdir

Meyve, sebze, çay, kahve, çikolata, bira ve şarapta bulunan polifenolik bileşikler, ROR süpürücü, metal şelatör ve enzim modülatörü gibi davranmaları nedeniyle antioksidan sistemde önemli rol oynarlar<sup>107,153</sup>.

RES yaprak epidermisinde ve üzüm kabuğunda sentezlenir, ancak etli meyvede sentezlenmez<sup>42</sup>. RES, en yüksek konsantrasyonda (50–100 mg/g) üzüm kabuğunda bulunur<sup>42,123</sup>. Kırmızı şarapla kıyaslandığında beyaz şarap daha az miktarda RES içerir<sup>148</sup>. Üzüm kabukları beyaz şarap yapımı sırasında fermente edilmediğinden, yalnızca kırmızı şarap görünür miktarda RES içerir<sup>154</sup>. RES içeriği; yetiştirilme, iklim, mantar infeksiyonları, UV ışığına maruz kalma ve şarap yapım işlemlerine göre değişiklik gösterir<sup>155</sup>.

### 2.13.3. Resveratrolün biyolojik etkileri ve etki mekanizması

Yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalarda RES'in antioksidatif, antiinflamatuvar, antikanserojen ve koruyucu etkileri ve östrojenik etkiler gibi çeşitli biyolojik etkileri tanımlanmaktadır<sup>156</sup>. RES'in etkileri günümüze kadar birçok biyolojik dokularda araştırılmıştır. Fakat antioksidan, antitrombosit, kalp koruyucu, damar gevşetici, antikanserojen ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiş olmakla beraber mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır<sup>45,157</sup>. RES, indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS)'ı inhibe ederek, nitrik oksit (NO)'in sitotoksik etkilerini engeller<sup>158</sup>. RES, karsinogenezin başlama, gelişme ve ilerleme aşamalarını engelleme yeteneğine sahiptir<sup>42,159</sup>.

RES'in, insan düşük yoğunluklu lipoproteinine (LDL) eklendiğinde bakır katalizli oksidasyonu azalttığı gösterilmiştir<sup>148,160</sup>. RES'in antioksidan özelliği ve bakır şelasyon kapasitesinin yüksekliği onun serbest radikal süpürücü özelliğinden kaynaklanmaktadır. Kırmızı şarap içenlerde total kolesterol, trigliserit ve HDL'de herhangi bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir<sup>161,162</sup>. Buna karşın LDL kolesterolde ve  $\alpha$ -lipoproteinde azalma ve membran akışkanlığında

artış olduğu gözlemlenmiştir <sup>157</sup>. Chanvitagaporgs ve ark. <sup>163</sup> yaptığı bir çalışmada RES'in, LDL oksidasyonunun önlenmesinde E ve C vitamininden daha güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür.

#### **2.13.4. Resveratrolün prooksidan özelliği**

Her antioksidan, bazı durumlarda serbest radikallere karşı koruyuculuğu olan ve serbest radikal oluşumunu geliştiren, antioksidan vitaminleri de kapsayan gerçekte bir redox (redüksiyonoksidasyon) ajandır <sup>164</sup>. Yapılan çalışmalar vitamin E <sup>165</sup> ve vitamin C <sup>166</sup> gibi antioksidanların, prooksidan etkilerini açığa çıkarmıştır. Her ne kadar RES'in bir antioksidan olduğuna dair geniş bir inanış olsa da RES'in prooksidan özellikleri olduğunu destekleyen literatürler de vardır <sup>164,167</sup>.

RES gibi fenol halkası ihtiva eden besinsel polifenolikler, peroksidaz/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından fenoksil radikallerine okside olurlar. RES fenoksil radikalleri eksilen elektronunu glutatyondan temin ederek, glutatyonu bir tiol radikali formuna dönüştürür. Sinyal radyoliz çalışmaları, disülfid radikal anyonu O<sub>2</sub>'i hızla süperoksit radikal anyonu ve glutasyon disülfid formuna indirgediğini göstermiştir <sup>168,169</sup>.

### 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, histopatolojik değerlendirilmeler ve görüntüleme işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. RGH sayımları Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi, Makina Eğitimi Bölümünde yapılmıştır. Çalışma Helsinki Bildirgesinde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

#### 3.1. Denekler

Çalışmada toplam 98 adet erişkin erkek Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Deneklerin ortalama ağırlığı  $372\pm 23$  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 (84 adet denek) ve kontrol grubu (N) denekleri (14 adet denek) olarak önce iki gruba ayrıldı. İntraperitoneal enjeksiyon, anestezi, GİB ölçümleri ve retrograd dextran tetramethylrhodamine (DTMR) işaretlemesi sırasında her gruptan 2 sıçanın toplam 14 sıçanın ölmesi üzerine ile 84 adet sıçan değerlendirmeye alındı. Kontrol grubunun ön kamaralarına 30 G enjektör ile girilerek salin enjeksiyonu yapıldı. Glokom

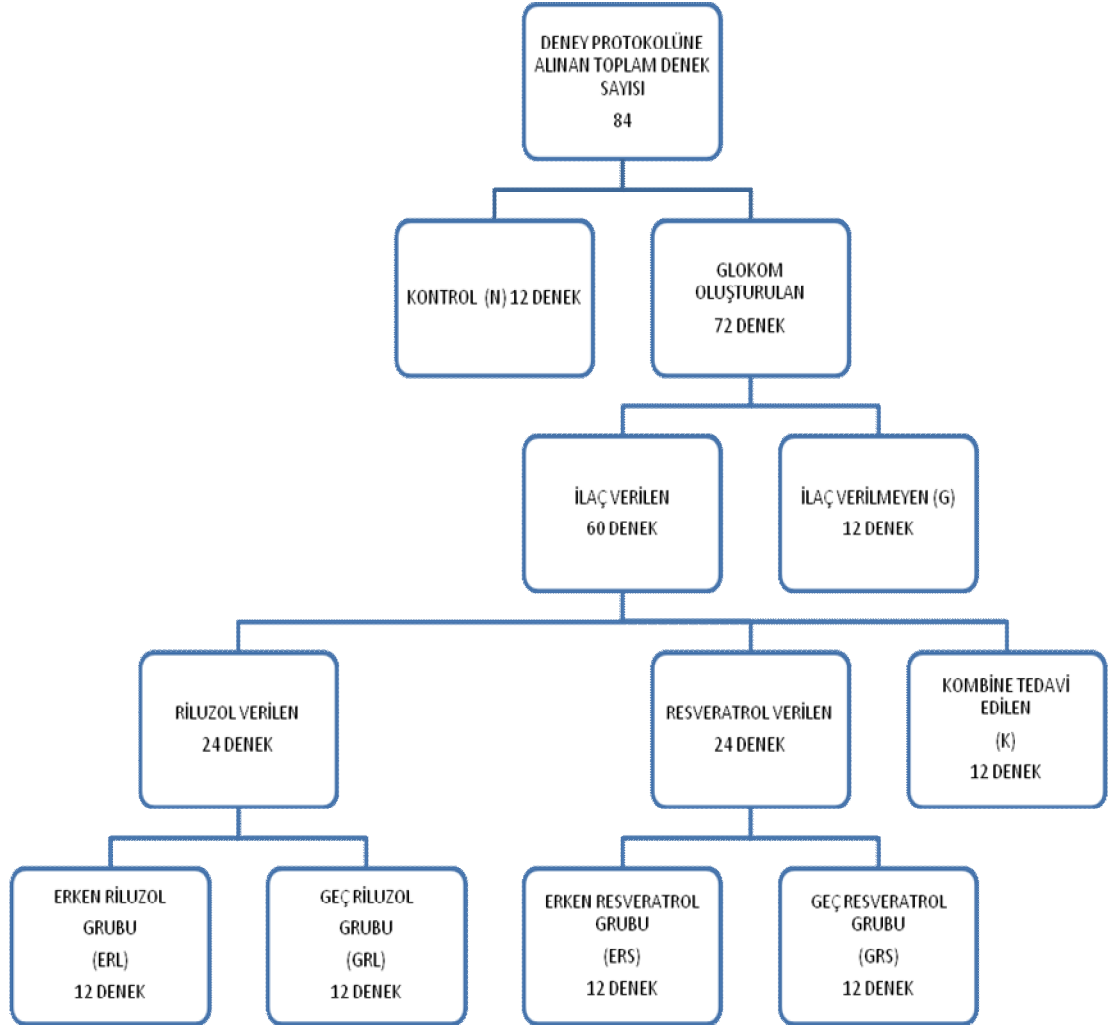


indüksiyonu başarıyla yapılan toplam 72 adet denek şu şekilde gruplandı (Şekil 8):

1. Glokom indüksiyonu sonrası 6. haftada sakrifiye edilen ve kontrol çözeltisi olarak fizyolojik %0,9 salin içinde %2 etanol enjeksiyonu yapılan denekler (Glokom Grubu – G; 12 adet denek)
2. Glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı 8 mg/kg/gün ip yoldan RLZ verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Erken Dönem RLZ Grubu – ERL; 12 adet denek)
3. Glokom indüksiyonu sonrası 3. haftadan itibaren 8 mg/kg/gün ip yoldan RLZ verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Geç Dönem RLZ Grubu – GRL; 12 adet denek)
4. Glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı 10 mg/kg/gün ip yoldan RES verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Erken Dönem Resveratrol Grubu – ERS; 12 adet denek)
5. Glokom indüksiyonu sonrası 3. haftadan itibaren 10 mg/kg/gün ip yoldan RES verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Geç Dönem Resveratrol Grubu – GRS; 12 adet denek)
6. Glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı 8 mg/kg/gün ip yoldan RLZ ve 10 mg/kg/gün intraperitoneal yoldan RES verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Kombine Tedavi Grubu –K; 12 adet denek)

Glokom grubuna herhangi bir ilaç uygulanmadı. Göz içi basınçları glokom indüksiyonunun sürdüğü 6 hafta boyunca işlem öncesi ve sonrasında haftalık olarak Tono- Pen (Medtronic Solan XL) ile ölçülerek kaydedildi.

6 haftanın sonunda gruplar kardiak paraformaldehit perfüzyonu yöntemi ile sakrifiye edildikten sonra, fikse edilmiş olan globlara enükleasyon gerçekleştirildi<sup>170</sup>.



Şekil 8. Deney planı

### 3.2. Deneysel Glokom Modeli

Sıçanlara ketamin hidroklorid (25 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) intramüsküler yoldan enjekte edilerek genel anestezi uygulandı. Anestezi uygulamasını takiben, 72 adet sıçanın her iki göz ön kamaralarına 30 G iğne ile Hyaluronik asid (Sigma katalog no 53750) enjekte edildi (Şekil 9). Cerrahi mikroskop olarak Topcon OMS 75 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 <sup>171</sup>. 12 adet kontrol grubu (N grubu) sıçana ilaç verilmeksizin ön kamaralarına 30 G enjektör ile girilerek aynı miktar salin enjeksiyonu yapıldı. Diğer glokom induksiyonu yapılan diğer gruplara birer hafta arayla 6 hafta süresince enjeksiyonlar tekrarlandı. Her enjeksiyondan hemen önce ve sonra GİB'leri ölçüldü. GİB ölçümleri 10 mg/kg ketamin hidroklorid ve 1 damla topikal %0,4 proparakain hydrochloride %0,5 ile hafif anestezi uygulamasını takiben, Tono-Pen ile yapıldı. Enjeksiyonlar ve ölçümler hep aynı saatte (08:00-10:00) yapıldı.



**Şekil 9.** Glokom induksiyonu. Hyaluronik asid enjeksiyonu ile iris damarlarının solması ve diğer göz ile farkı

### 3.3. İlaçların Uygulanması

Erken Dönem RLZ Grubuna (12 adet denek), glokom induksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı başlanarak her gün aynı saatte (10:00-12:00) tek doz 8 mg/kg/gün RLZ (Rilutek®; Sanofi Aventis İlaçları Ltd. Şti.) %0.9'luk salin içinde %0,05'lik ethanol ile çözülerek intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 42 doz RLZ uygulandı.

Geç Dönem RLZ Grubuna (12 adet denek), glokom indüksiyonunun başlangıcından 3 hafta sonrasında başlanarak her gün aynı saatte (10:00-12:00) tek doz 8 mg/kg/gün RLZ, %0.9'luk salin içinde %0,05'lik etanol ile çözülerek intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 21 doz RLZ uygulandı.

Erken Dönem Resveratrol Grubuna (12 adet denek), glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı başlanarak her gün aynı saatte (14:00-16:00) tek doz 10 mg/kg/gün resveratrol (Resveratrol®; Solgar İlaçları Ltd. Şti.) %0.9'luk salin içinde %0,2'lik etanol ile çözülerek intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 42 doz resveratrol uygulandı.

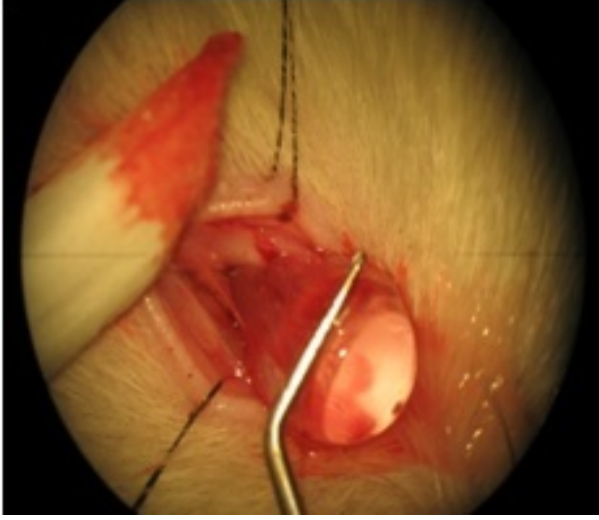
Geç Dönem RLZ Grubuna (12 adet denek), glokom indüksiyonunun başlangıcından 3 hafta sonrasında başlanarak her gün aynı saatte (14:00-16:00) tek doz 10 mg/kg/gün resveratrol, %0.9'luk salin içinde %0,2'lik etanol ile çözülerek intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 21 doz resveratrol uygulandı.

Kombine Tedavi Grubuna (12 adet denek), glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı başlanarak her gün aynı saatte (10:00-12:00) tek doz 8 mg/kg/gün RLZ %0.9'luk salin içinde %0,05'lik etanol ile çözülerek intraperitoneal yoldan ve glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı başlanarak her gün aynı saatte (14:00-16:00) tek doz 10 mg/kg/gün resveratrol %0.9'luk salin içinde %0,2'lik etanol ile çözülerek intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 84 doz kombine ilaç tedavisi uygulandı.

#### **3.4. Retina Ganglion 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 DTMR, sakrifikasyondan iki gün



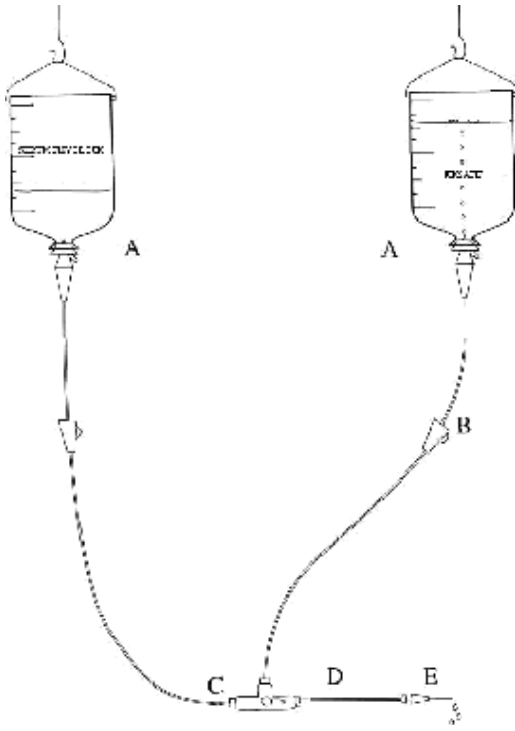
**Şekil 10.** Optik sinir disseksiyonu.

önce intraorbital olarak uygulandı. DTMR enjeksiyonu için Solomon ve ark.<sup>172</sup> 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

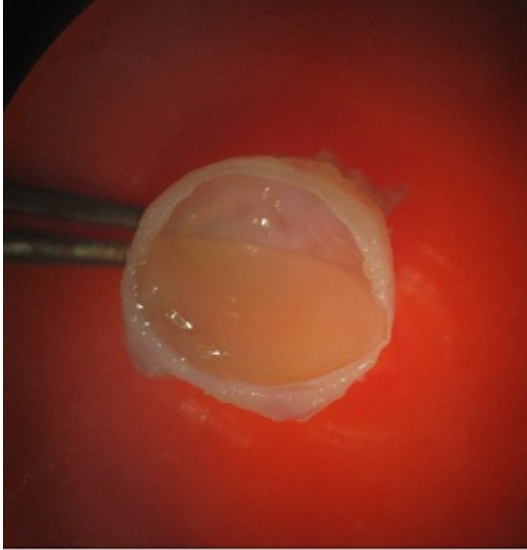
etrafındaki dokular ve ekstraoküler kaslar dissekte edildi (Şekil 10). Optik sinir etrafındaki nöral kılıf optik sinirin 3 mm gerisinden vasküler yapılara zarar vermeden 2 mm uzunluğunda açılarak, optik sinir tam kat olarak kesildi. 30 G iğne ile 50 µl DTMR (1 mg/ml) olacak şekilde enjekte edildi. Prosedür sonunda lateral kantotomiyi kapatmak için 3/0 ipek suture kullanıldı.

### 3.5. Sakrifikasyon ve Kardiyak Perfüzyon

DTMR uygulamasından 48 saat sonra denekler sakrifiye edildi. 150 IU/kg intraperitoneal heparin verilerek 10 dk. süre ile antikoagulan 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 kardiyak perfüzyon gerçekleştirildi (Şekil 11). Global oryantasyon için süperiordan suture ile limbustan işaretlendi, fikse edilmiş olan globlara enükleasyon gerçekleştirildi.



**Şekil 11.** Perfüzyon düzeneği



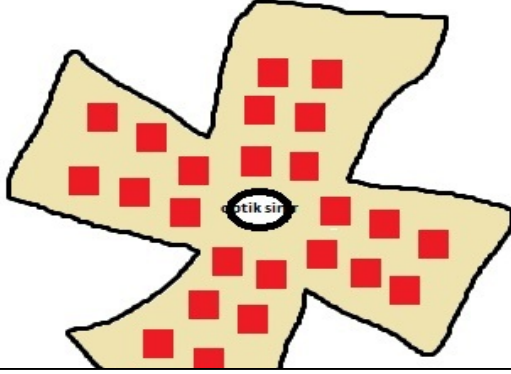
**Şekil 12.** Whole mount retina hazırlanması



**Şekil 13.** Whole mount retinanın incelenmeye hazır son hali

1 saat %4'lük paraformaldehit içerisinde bekletilen globlar, whole-mount yöntemi ile açıldı. Retinalar, whole mount yöntemiyle elde edildi (Şekil 12, Şekil 13). Açılırken süperior retina tekrar işaretlendi. İmmünofluoresan boyamalar Olympus BX51 marka fluoresan mikroskopta incelenerek fotoğraflandı. Ayrıca tüm anatomik bölgeler elektron mikroskopi ile ultrastrüktürel düzeyde incelendi.

### 3.6. Retina Ganglion Hücrelerinin Sayım İşlemi



Şekil 14. Whole mount sıçan retinasının incelenen bölgelerin şematik gösterimi

#### Whole mount sıçan retinası

büyütme alanında OSB 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 (Şekil 14). Sayım işlemi, uygulanan prosedüre ve yapılan tedavilere kör olan deneyimli bir gözlemci tarafından yürütüldü.

### 3.7. Histopatolojik İnceleme ve Optik Sinir Değerlendirmesi

Optik sinir başının 2 mm gerisinden alınan optik sinir kesitleri alındı. GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ile boyanmak üzere formalin içine alındı. Formalinde tespit edilmiş ve parafine gömülmüş bloklardan 3'er adet 0,6 mm'lik optik sinir örneği otomatik doku mikroarray cihazı (Beecher Instruments Microarray Technology, Woodland, MD) ile ayrı bloklara yerleştirildi. Bu bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler poly-L-lizin ile kaplı lamlar üzerine alındı. Kesitler ksilen ve etanol ile deparafinize ve rehidrate edildi. Daha sonra deiyonize su ile yıkandı ve non-spesifik zemin boyanmasını önlemek amacıyla Tris buffered saline (TBS) içerisinde %5 oranında dilue edilmiş at serumu ile oda sıcaklığında 10 dk. protein blokajı yapıldı ve primer antikor uygulamasına

geçildi. Kesitler insan PAK-1 proteinine yönelik poliklonal fare antikoruna PAK-1 (1:50 dilüsyonda; Cell signaling, Beverly, MA, USA) ile oda ısısında bir gece inkübe edilip, TBS ile 2 kez 5'er dakika yıkandı. Daha sonra preparatlar tekrar dilüe antikor ile 30 dakika inkübe edildi ve TBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Sekonder antikor işlemi için sırasıyla streptavidin-biotin (Lab Vision, Biotinylated Goat Anti-Mouse, Lot: MBN11 206A, CA, USA) ve streptavidinperoksidaz (Lab Vision Streptavidin Peroxidase, Lot: SHR1210) solüsyonlarında 15'er dakika inkübe edildi. Ardından kromojen olarak diaminobenzidin (Lab Vision, Lot: AHD2119, CA, USA) solüsyonunda 15 dakika bekletilip distile su ile yıkandı. Asitsiz ve alkolsüz Mayer hematoksilin ile zıt boyama yapıldıktan sonra deiyonize su ile yıkanarak %95 ve %100'lük alkollerden ve sonra ksilenden geçirildi ve kurutulularak kapatıldı.

### **3.8. Data Analizi**

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

#### **3.8.1. İstatistiksel değerlendirme**

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi "SPSS for Windows version 13" 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 N grubunda  $372 \pm 23$ , G grubunda  $367 \pm 12$ , ERL grubunda  $370 \pm 18$ , GRL grubunda  $367 \pm 17$ , ERS grubunda  $370 \pm 17$ , GRS grubunda  $365 \pm 10$ , K grubunda  $369 \pm 13$  gram idi. Bütün sıçanlar kilo aldı. Çalışma sonunda ortalama kilo sırasıyla  $416 \pm 22$ ,  $404 \pm 22$ ,  $412 \pm 15$ ,  $400 \pm 18$ ,  $401 \pm 17$ ,  $393 \pm 9$  ve  $394 \pm 11$  gram idi. Davranış bozukluğu ve iştah kaybına dair bir bulgu saptanmadı.

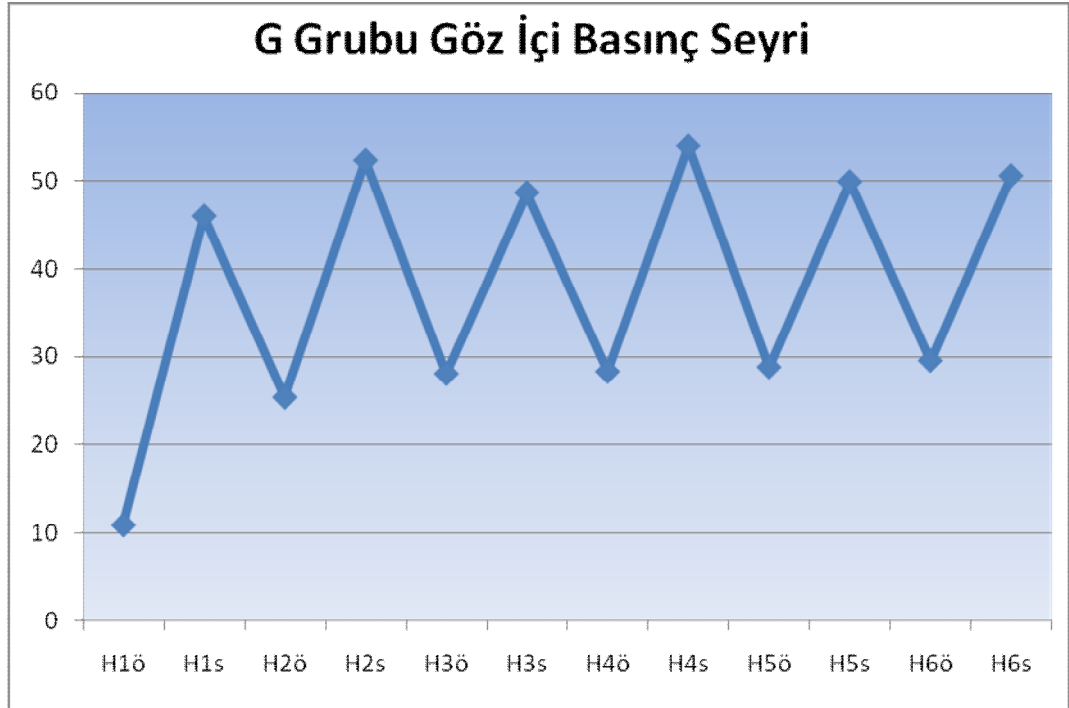
### 4.2. Göz İçi Basınç Değerleri

G, ERL, GRL, ERV, GRV, K grupları ile N grubu arasında GİB değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu. 6 hafta süresince tüm gruplarda yeterli GİB değerlerine ulaşıldı. Grupların deney süresince haftalık GİB seyirleri Şekil 15 (A-G) de gösterilmiştir.

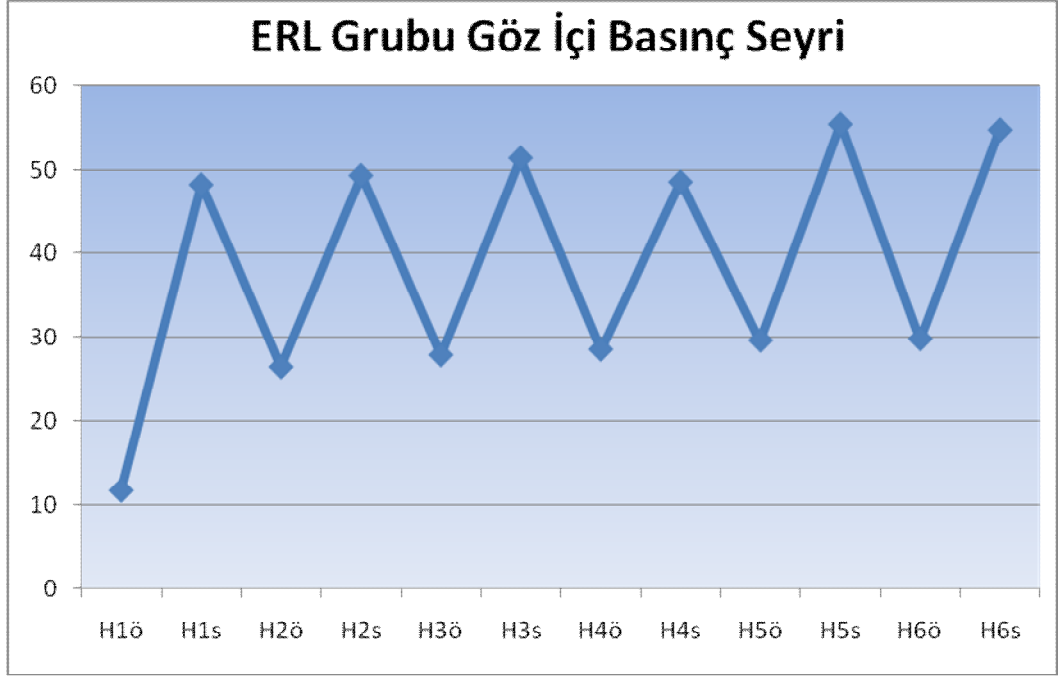
Glokom indüksiyonu yapılan bütün denekler ( $n=72$ ) GİB de yükselme göstermiştir. Ortalama GİB glokomatöz gözlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek idi ( $P<0.01$ ). Glokom ve diğer 5 farklı tedavi grubunda ortalama GİB değerleri benzerdi, anlamlı farklılık yoktu, bu da RGH sayımlarındaki farklılığın tedaviye bağlanabileceğini göstermiştir.



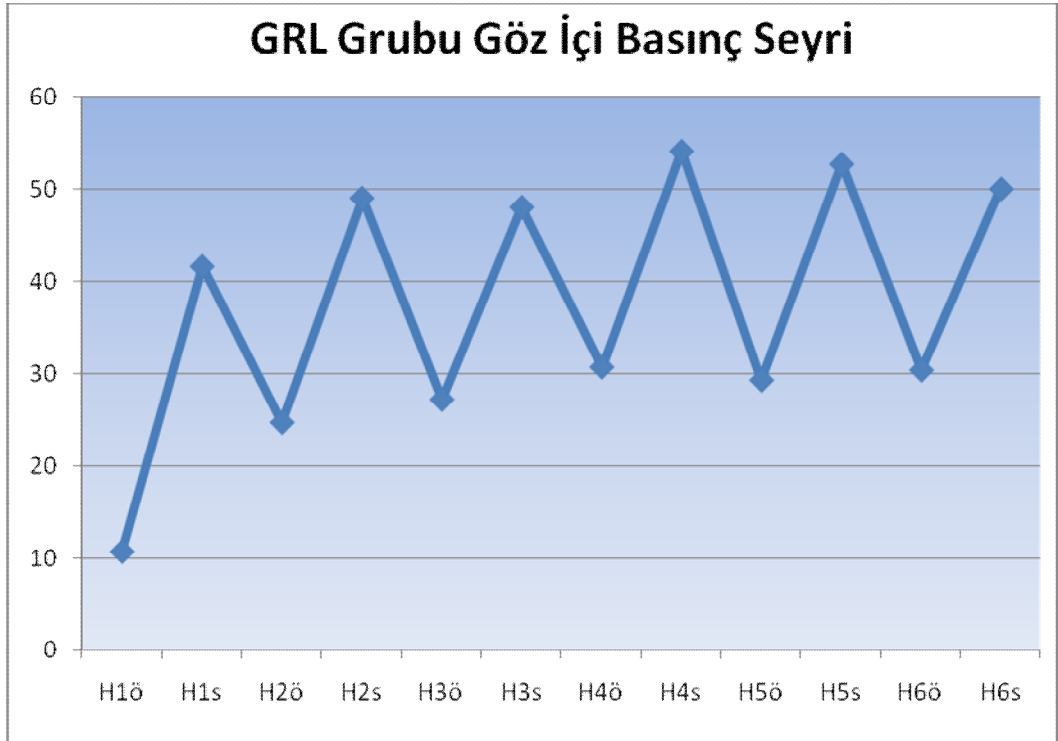
**Şekil 15 A.** N Grubu GİB seyri



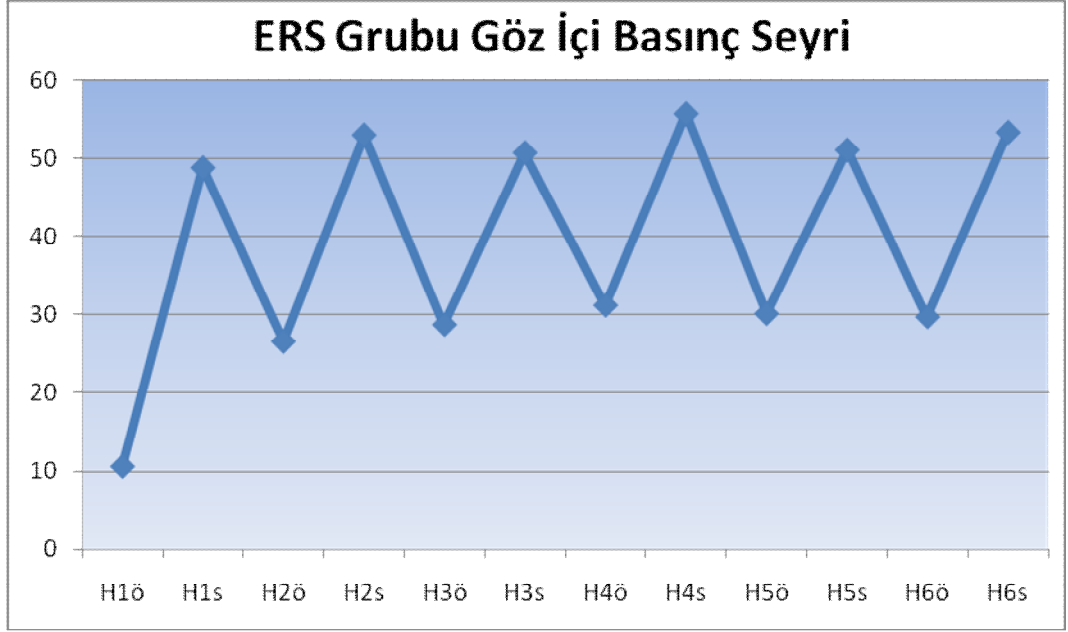
**Şekil 15 B.** G Grubu GİB seyri



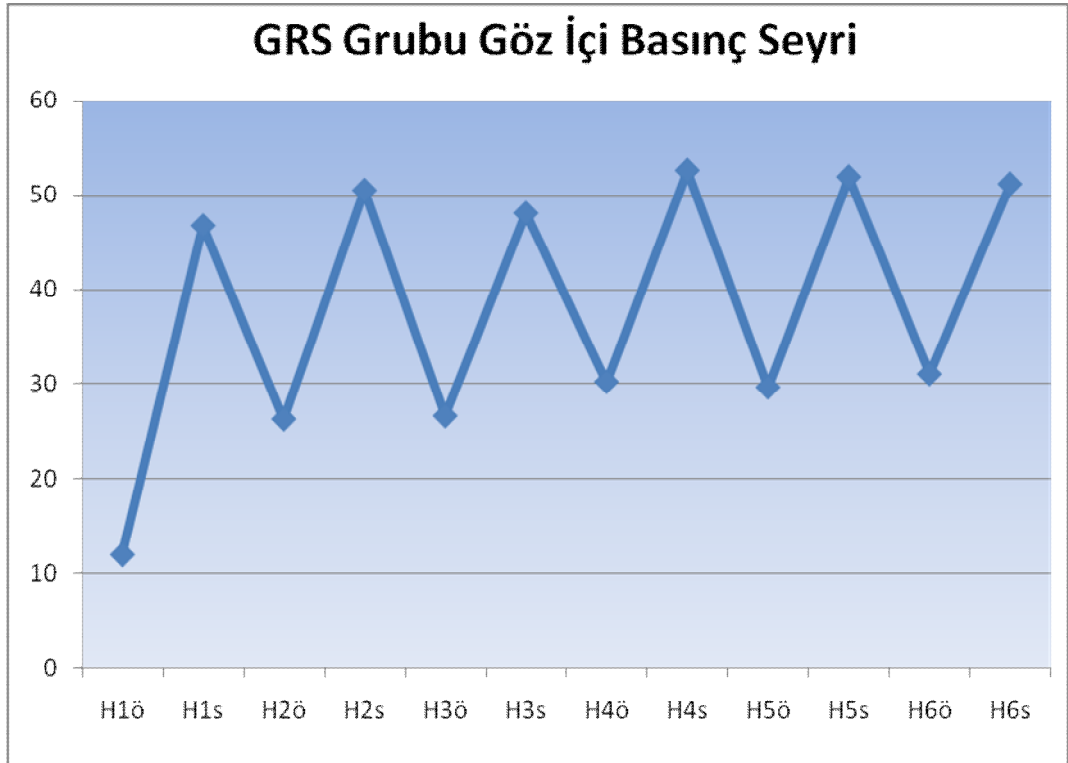
**Şekil 15 C.** ERL Grubu GİB seyri



**Şekil 15 D.** GRL Grubu GİB seyri



Şekil 15 E. ERS Grubu GİB seyri



Şekil 15 F. GRS Grubu GİB seyri



**Şekil 15 G. K Grubu GİB seyri**

#### 4.3. Retinal Ganglion Hücre Sayımları

Ortalama DTMR işaretli RGH (mm<sup>2</sup> de ortalama sayı ± standart deviasyon) dansitesi N grubunda 1207±56, G grubunda 404±65, ERL grubunda 965±56, GRL grubunda 714±25, ERS grubunda 735±29, GRS grubunda 667±20, K

Gruplar	Mm <sup>2</sup> deki Hücre Sayısı	Genel Toplam
Kontrol (N)	1207±56	6957±326
G Grubu	404±65	2328±376
ERL Grubu	965±56*	5558±325*
GRL Grubu	714±25*	4415±148*
ERS Grubu	735±29*	4236±170*
GRS Grubu	667±20*	3843±116*
K Grubu	1071±49*	6169±285*

**Tablo 1.** Deneklerdeki DTMR işaretli RGH değerlendirilmesi. \*p<0.01 Tedavi grupları ile glokom grubu karşılaştırılması (ANOVA, p<0,05).

grubunda  $1071 \pm 49$  şeklinde idi. Gruplar arası fark tabloda verilmiştir (Tablo 1). Grupların ortalama RGH sayımı değerleri Şekil 16'de gösterilmiştir. Tablo-2'te ise gruplar arası istatistiksel karşılaştırmaların (ANOVA, Post Hoc Bonferroni) anlamlılık değerleri özetlenmiştir. Grupların tüm RGH sayılarının izodansite haritalarında karşılaştırmalı şematik gösterimi şekil 17 de sunulmuştur.

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

N ve ERL grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre, ERL grubunun ortalama RGH sayımı değerleri N grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma görülmüştür. Bu analiz, erken dönem RLZ başlanan grupta ortalama RGH sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olduğunu gözstermektedir.

N ve GRL grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre, GRL grubunun ortalama RGH sayımı değerleri N grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma görülmüştür. Bu, geç dönem RLZ başlanan grupta ortalama RGH sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olduğunu göstermektedir.

N ve ERS grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Bu sonuca göre, ERS grubunun ortalama RGH sayımı değerleri N grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma görülmüştür. Bu, erken dönem RES başlanan grupta ortalama RGH sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olduğunu göstermektedir.

N ve GRS grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, GRS grubunun ortalama RGH sayımı değerleri N grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma görülmüştür. Bu, geç dönem RES başlanan grupta ortalama RGH sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olduğunu göstermektedir.

N ve K grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, K grubunun ortalama RGH sayımı değerleri N grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma görülmüştür. Bu, RLZ ve RES birlikte başlanan grupta ortalama RGH sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olduğunu göstermektedir.

G ve ERL grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, erken dönem RLZ 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 RLZ'nin RGH kaybını önlemede anlamlı etki gösterebileceğini destekler yönde bir bulgu olarak kabul edilebilir.

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

G ve ERS grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, erken dönem RES 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 RES'in RGH kaybını önlemede anlamlı etki gösterebileceğini destekler yönde bir bulgu olarak kabul

edilebilir.

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

G ve K grupları karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, RLZ ve RES birlikte verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerleri, glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fazlalık göstermektedir. Bu, RLZ ve RES'in birlikte kullanımının RGH kaybını önlemede anlamlı etki gösterebileceğini destekler yönde bir bulgu olarak kabul edilebilir.

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

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

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

ERL ve K grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, erken dönem RLZ



verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, K grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu K grubunda uygulanan ilaçların additif etki göstererek daha fazla RGH ni koruduğunu gösterebilir.

GRL ve ERS grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p=0,923$ ). Bu sonuca göre, geç dönem RLZ verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, erken dönem RES verilmeye başlanan glokomlu gruba göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

GRL ve GRS grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p=0,179$ ). Bu sonuca göre, geç dönem RLZ verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, geç dönem RES verilmeye başlanan glokomlu gruba göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

GRL ve K grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, RLZ ve RES birlikte verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH değerleri, geç dönem RLZ verilmeye başlanan glokomlu gruba, göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

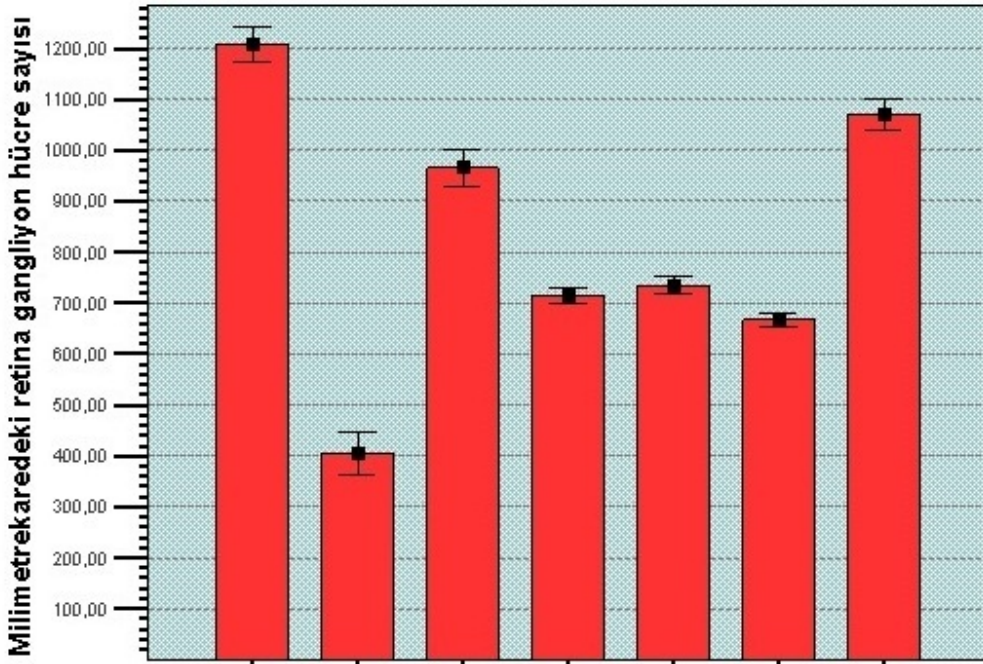
ERS ve GRS grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p=0,010$ ). Bu sonuca göre, erken dönem RES verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, geç dönem RES verilmeye başlanan glokomlu gruba göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

ERS ve K grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, RLZ ve RES birlikte verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH değerleri, erken dönem RES verilmeye başlanan glokomlu gruba, göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

GRS ve K grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Bu sonuca göre, RLZ ve RES birlikte verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH değerleri, geç dönem RES

verilmeye başlanan glokomlu gruba, göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Glokom indüksiyonundan 6 hafta sonra, ortalama RGH azalması kontrol grubu (n=12) ile kıyaslandığında glokom grubunda (n=12) %66±5, ERL grubunda (n=12) %19±5, GRL grubunda (n=12) %40±3, ERS grubunda (n=12) %38±3, GRS grubunda %44±5, kombine grubunda (n=12) %11±3 idi.



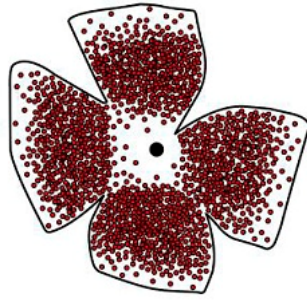
Şekil 16. Gruplara ait ortalama RGH sayımı değerleri (Ortalama±Standart deviasyon).

Tüm RGH sayısı ve mm<sup>2</sup> deki hücre sayısı ve yüzde azalma olarak değerlendirildiğinde glokom grubuna göre tüm tedavi gruplarında ganglion hücrelerinde anlamlı korunma olduğu saptandı (p<0.01).

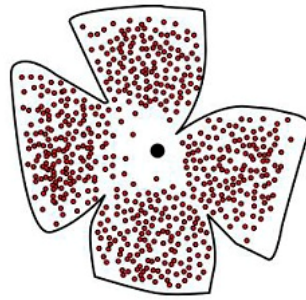
Hem RLZ hem de RES nöroprotektif etkinlik göstermekte olup kombine tedavi uygulanan grubun diğer tedavi gruplarına göre daha belirgin nöroprotektif etkinlik gösterdiği gözlenmiştir. Gruplara ait DTMR işaretli immunfloresan görüntüler Şekil 18 de karşılaştırmalı olarak ve Şekil 19 (A-G) de tek tek sunulmuştur.

<i>Grup</i>	<i>Karşılaştırılan Gruplar</i>	<i>p Değeri</i>
<b>N</b>	G	0,000*
	ERL	0,000*
	GRL	0,000*
	ERS	0,000*
	GRS	0,000*
	K	0,000*
<b>G</b>	N	0,000*
	ERL	0,000*
	GRL	0,000*
	ERS	0,000*
	GRS	0,000*
	K	0,000*
<b>ERL</b>	N	0,000*
	G	0,000*
	GRL	0,000*
	ERS	0,000*
	GRS	0,000*
	K	0,000*
<b>GRL</b>	N	0,000*
	G	0,000*
	ERL	0,000*
	ERS	0,923
	GRS	0,179
	K	0,000*
<b>ERS</b>	N	0,000*
	G	0,000*
	ERL	0,000*
	GRL	0,923
	GRS	0,010
	K	0,000*
<b>GRS</b>	N	0,000*
	G	0,000*
	ERL	0,000*
	GRL	0,179
	ERS	0,010
	K	0,000*
	<b>K</b>	N
G		0,000*
ERL		0,000*
GRL		0,000*
ERS		0,000*
GRS		0,000*

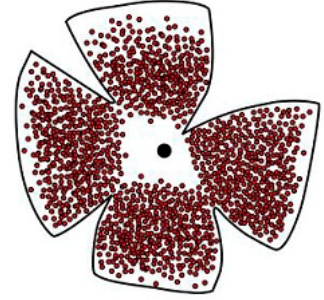
**Tablo 2.** RGH sayımları gruplar arası karşılaştırma. Deney gruplarına ait göz içi basınç ölçümlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Bonferroni testine göre p değerleri gösterilmiştir. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (\*) kabul edilmiştir.



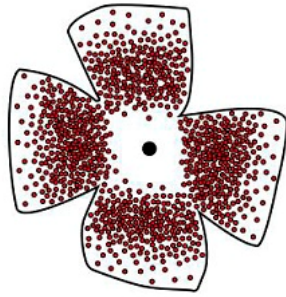
NORMAL



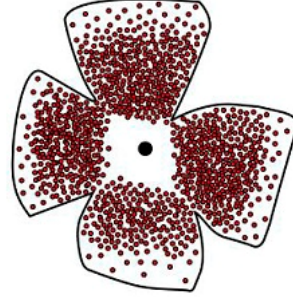
GLOKOM



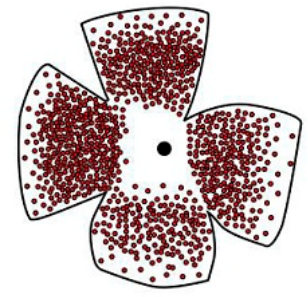
ERL



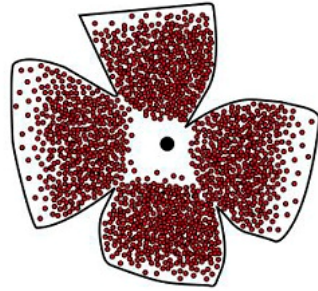
GRL



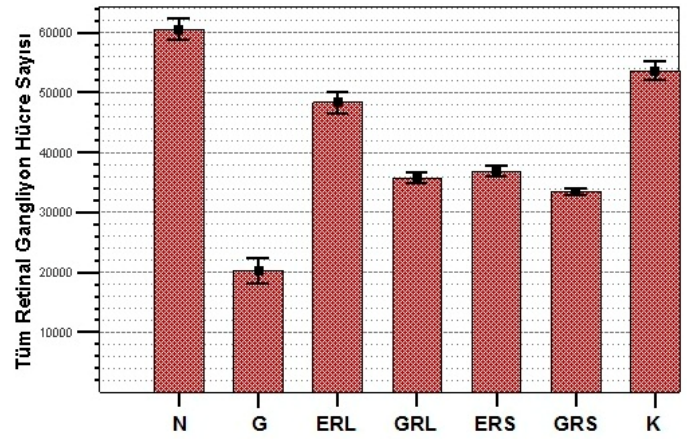
ERS



GRS

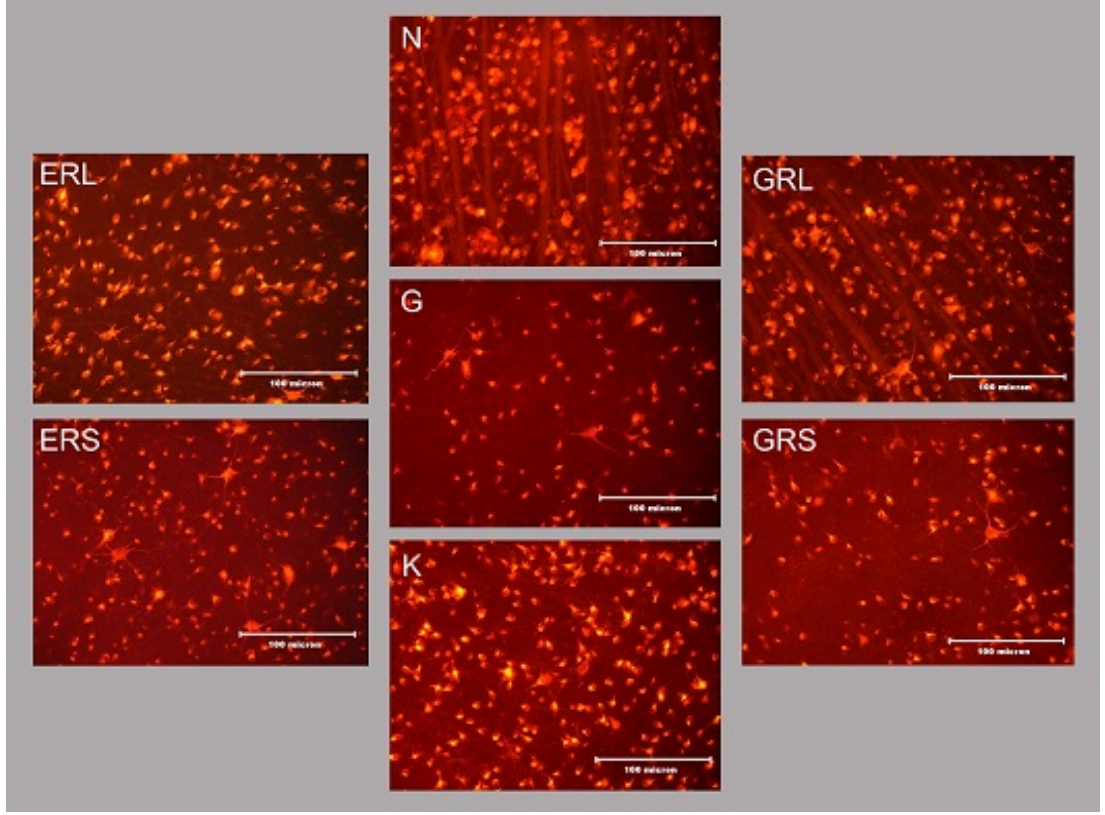


KOMBINE

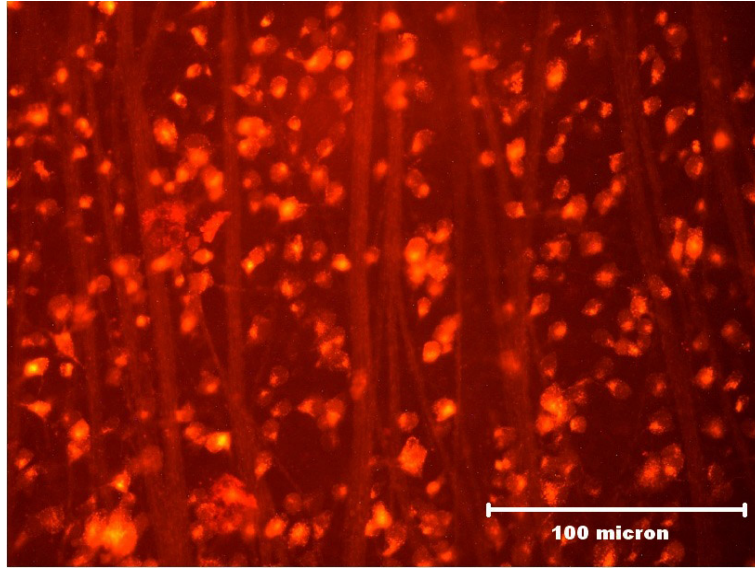


**Şekil 17.** Grupların tüm RGH sayılarının izodansite haritalarında karşılaştırmalı şematik gösterimi. İzodansite haritaları Adobe Freehand MX® programı ile manuel olarak çizilmiştir. İzodansite haritalarındaki her bir nokta 4 adet RGH'yı temsil etmekte olup her kadranda ayrı ayrı simülasyon yapılmıştır.

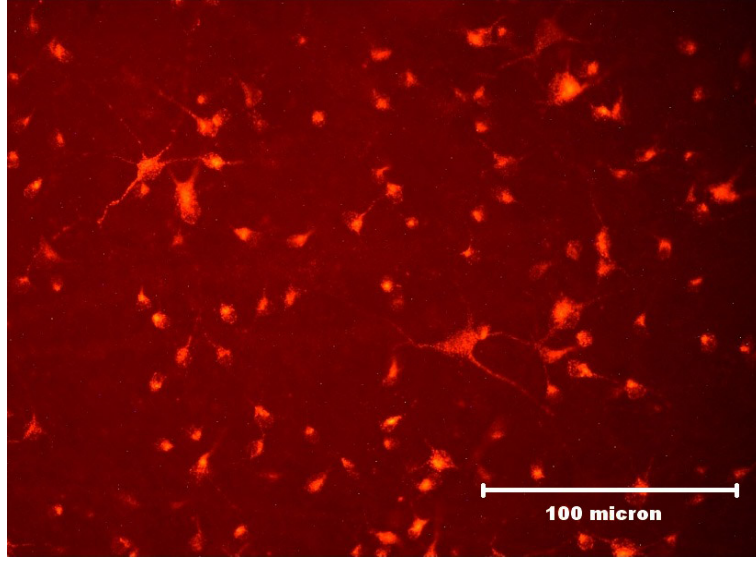




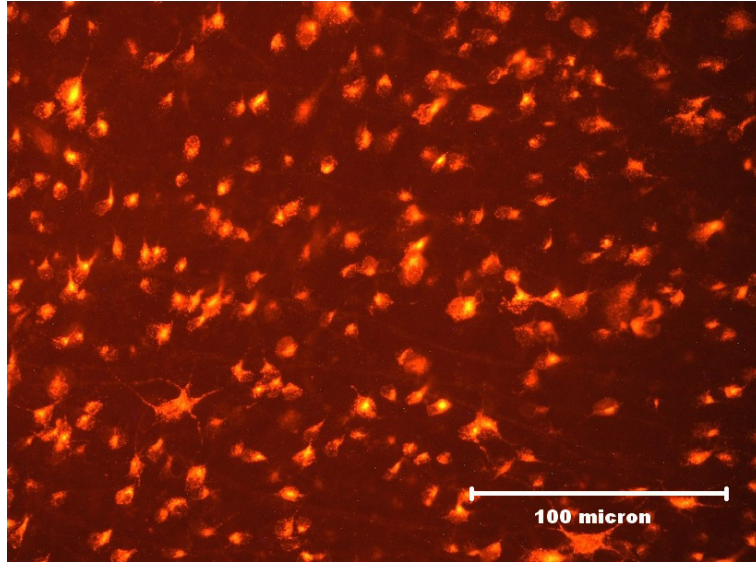
**Şekil 18.** Gruplara ait DTMR işaretli RGH'ların karşılaştırılmalı immunfloresan görüntüleri



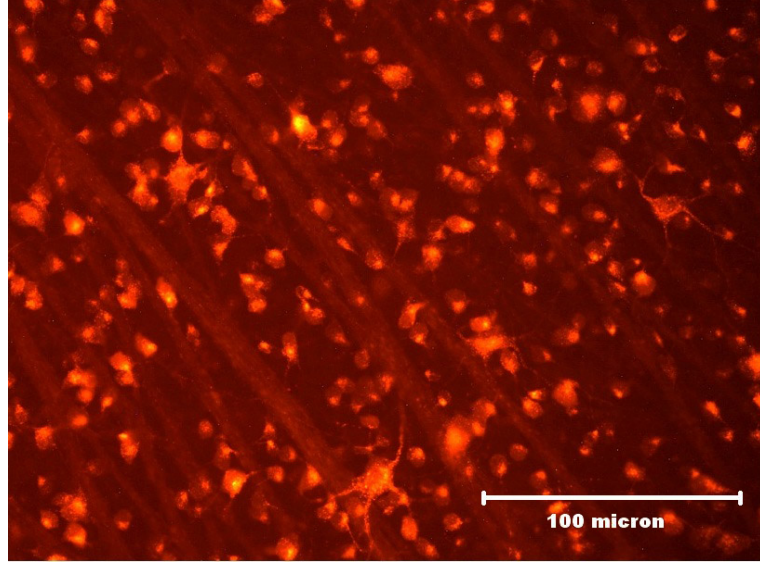
**Şekil 19 A.** Kontrol grubuna (N) ait DTMR ile işaretli retina ganglion hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200



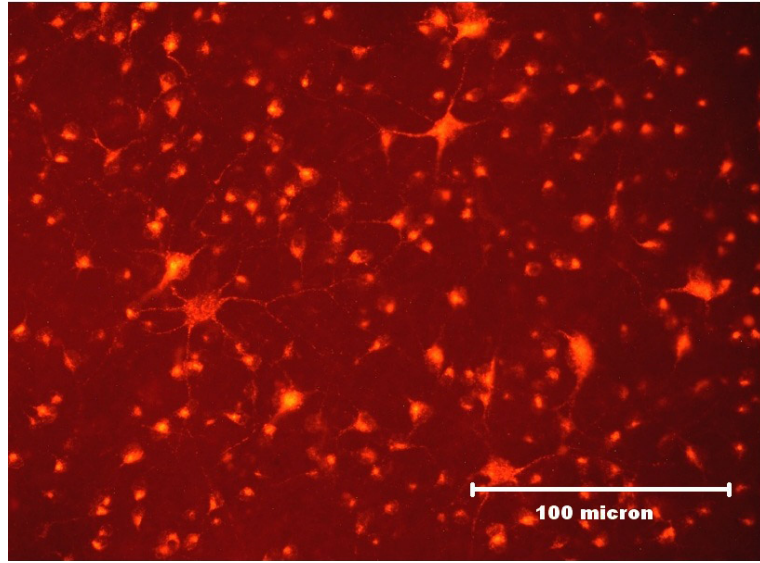
**Şekil 19 B.** Glokom grubuna (G) ait, DTMR ile işaretli retina ganglion hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200



**Şekil 19 C.** Erken riluzol grubuna (ERL) ait DTMR ile işaretli retina ganglion hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200

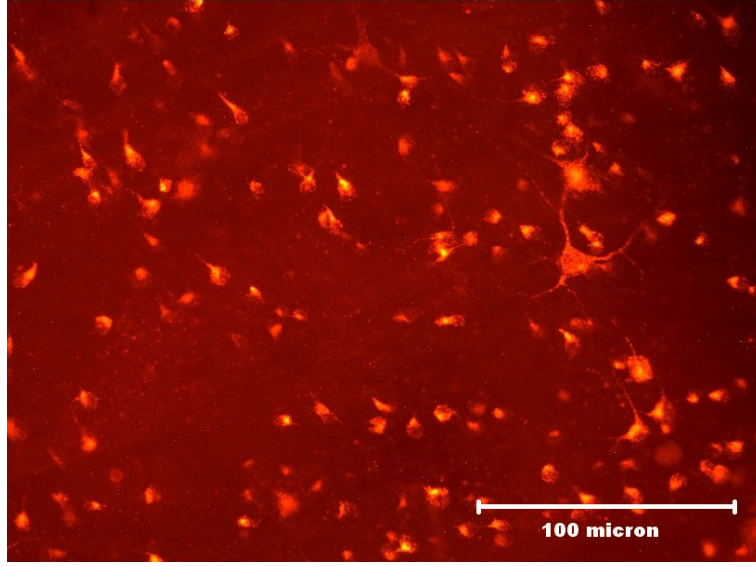


**Şekil 19 D.** Geç riluzol grubuna (GRL) ait DTMR ile işaretli retina ganglion hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200

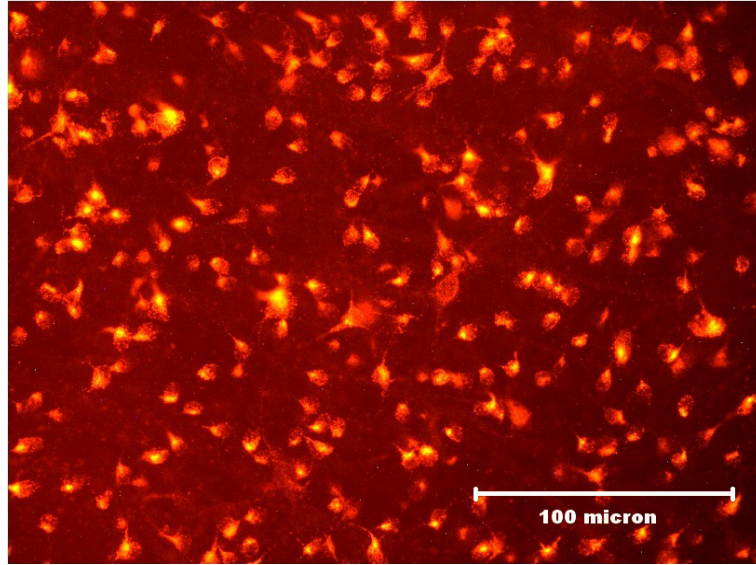


**Şekil 19 E.** Erken resveratrol grubuna (ERS) ait DTMR ile işaretli retina ganglion hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200





**Şekil 19 F.** Geç resveratrol grubuna (GRS) ait DTMR ile işaretli retina ganglion hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200

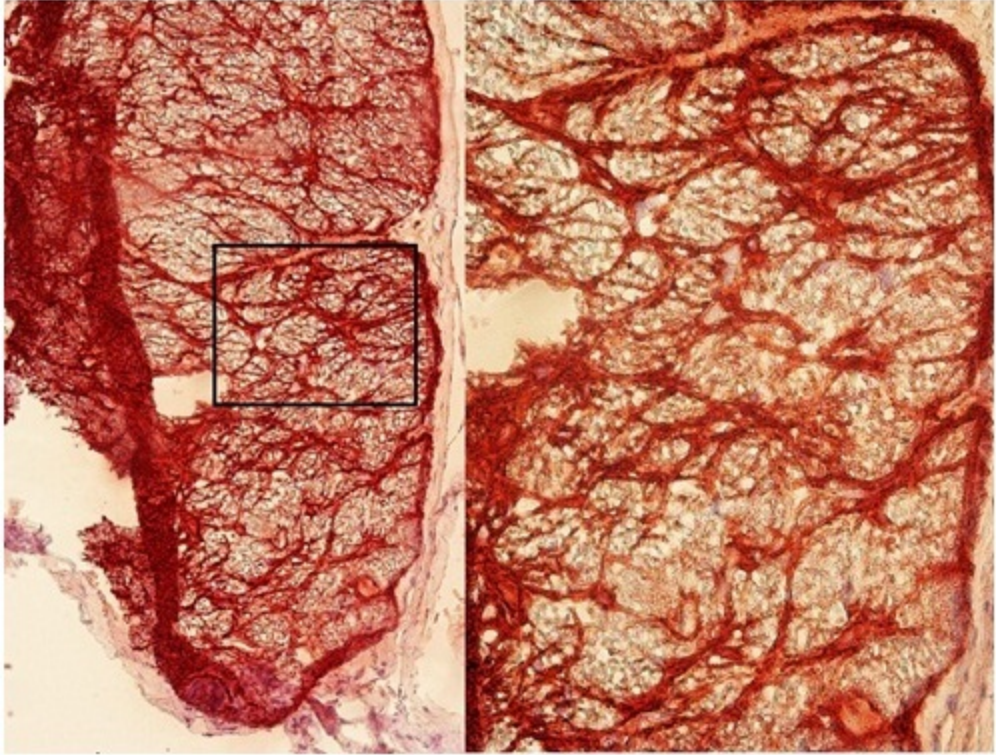


**Şekil 19 G.** Kombine tedavi grubuna ait DTMR ile işaretli retina ganglion hücrelerinin immunfloresan görüntüsü, x200



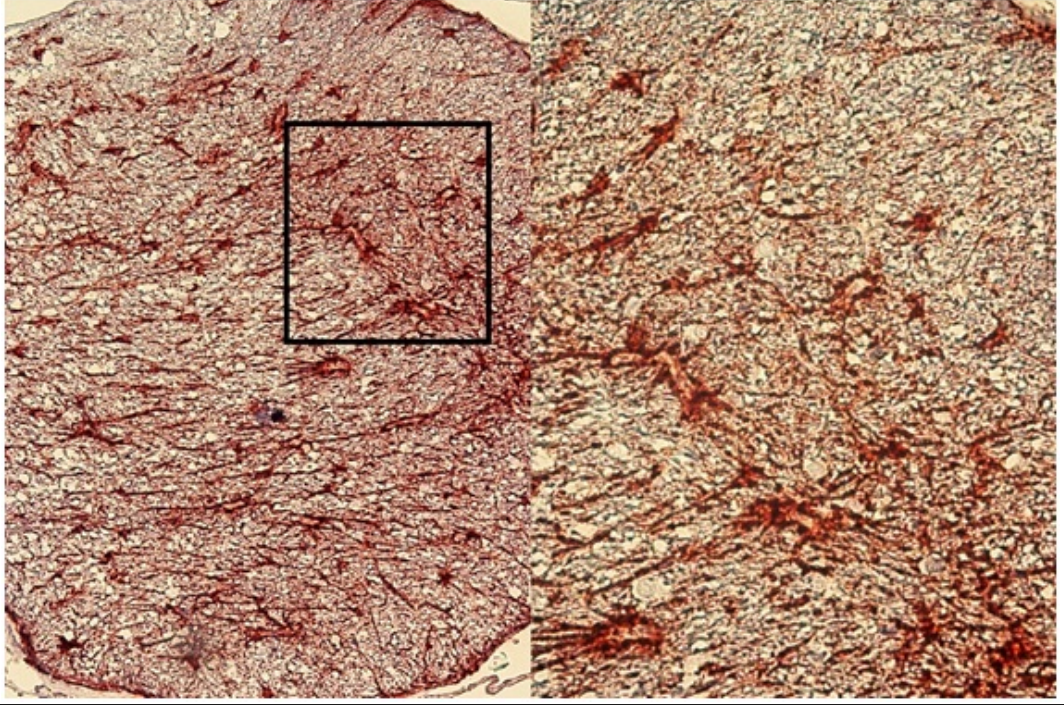
#### 4.4. Optik Sinir Aksonlarına Ait Histokimyasal Değerlendirme

Optik sinir başının 2 mm gerisinden alınan optik sinir kesitleri GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ile boyandıktan sonra değerlendirildi. Alınan kesitlerde özellikle G grubunda yaygın glial doku artışı olduğu, astrosit haciminde artışa bağlı olarak astrositlerde morfolojik değişiklikler olduğu gözlemlendi. Astrositlerin ağsı ve yumak benzeri hassas hücre iskelet yapısı nodüler bir görünümle yer değiştirip disorganize bir hücre morfolojisi göstermekte idi. Astrositik uzantılarında hipertrofiye ve hiperplaziye uğradığı izlenmekte idi. Tedavi gruplarında ise glokom grubunda görülen bu değişikliklerin kalitatif olarak daha az olduğu görüldü (Şekil 20 A-G). Gruplara ait GFAP ile mikroskopik görüntüler Şekil 20 (A-G)'te sunulmuştur.

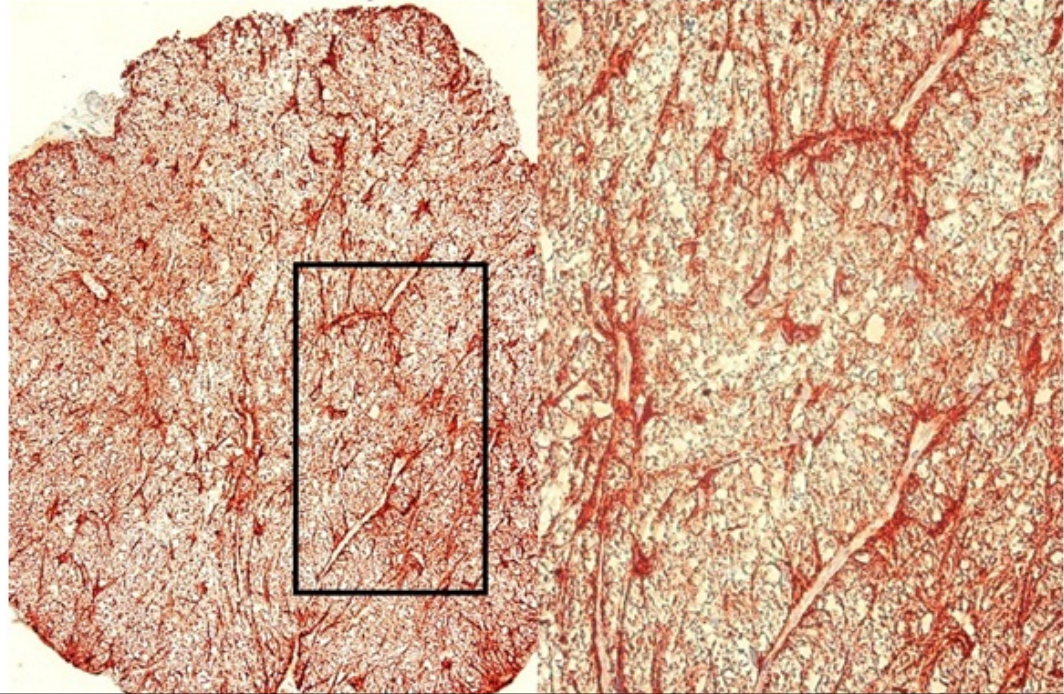


**Şekil 20 A.** Glokom grubu optik sinir kesitinde glial doku artışı ve astrosit hacminde şişme x20, x100



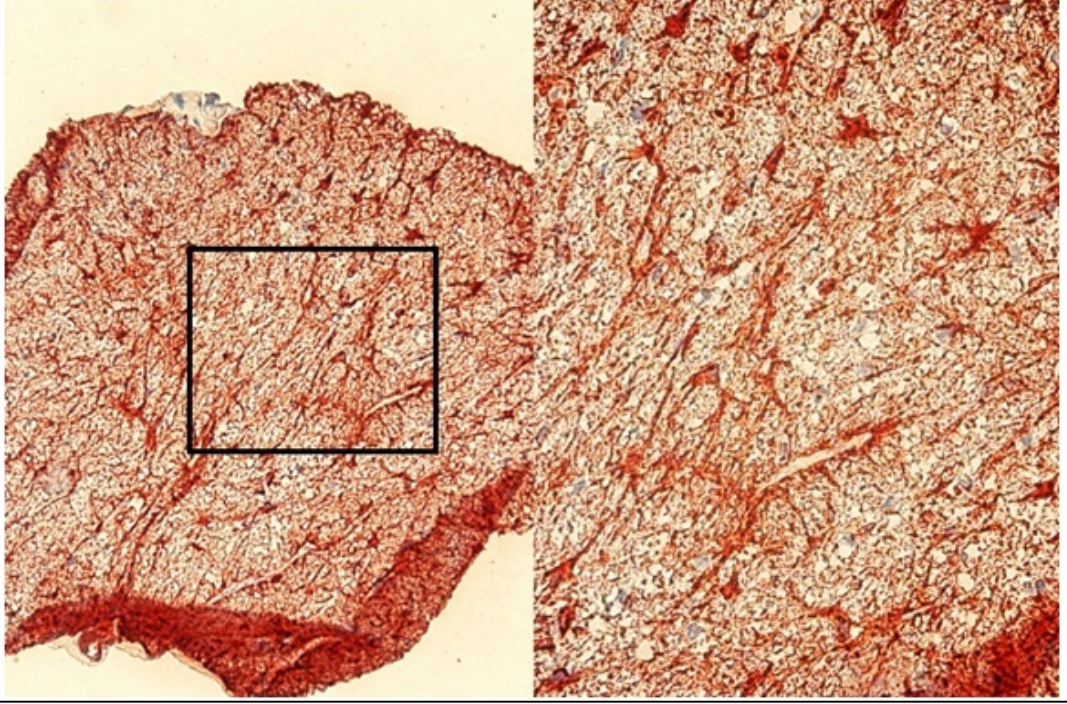


**Şekil 20 B.** Kontrol (N) grubunun optik sinir kesiti, normal ağsı görünümde hassas astrosit yapısı, x20, x100

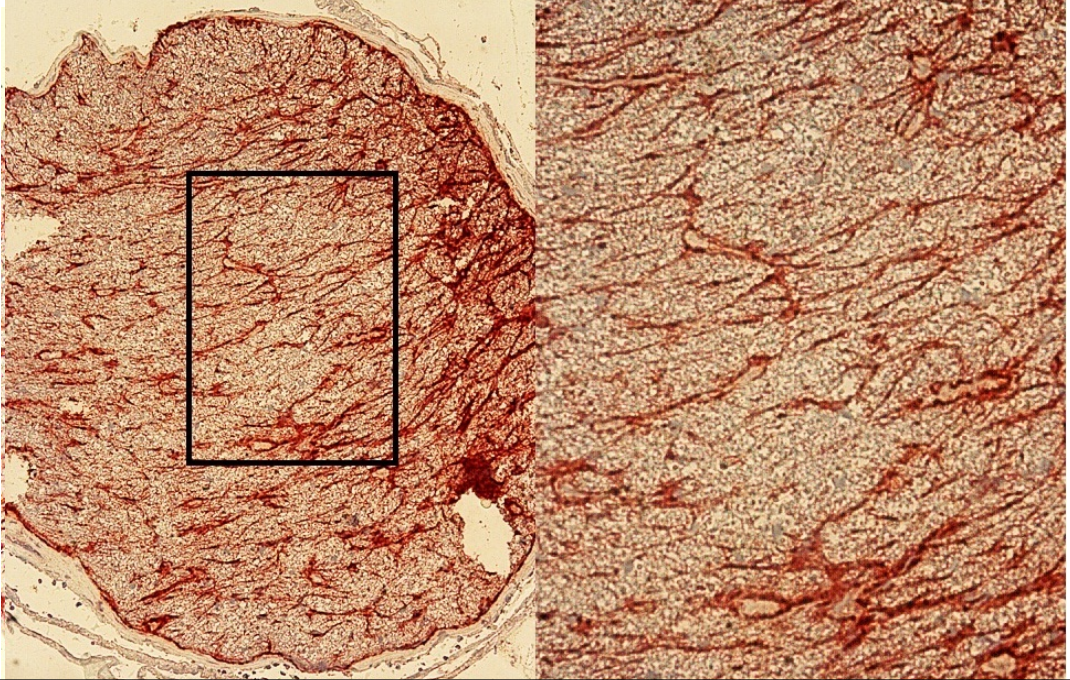


**Şekil 20 C.** Erken riluzol grubunun (ERL) optik sinir kesitinde normal görünümde ağsı hassas astrosit yapısı, x20, x100



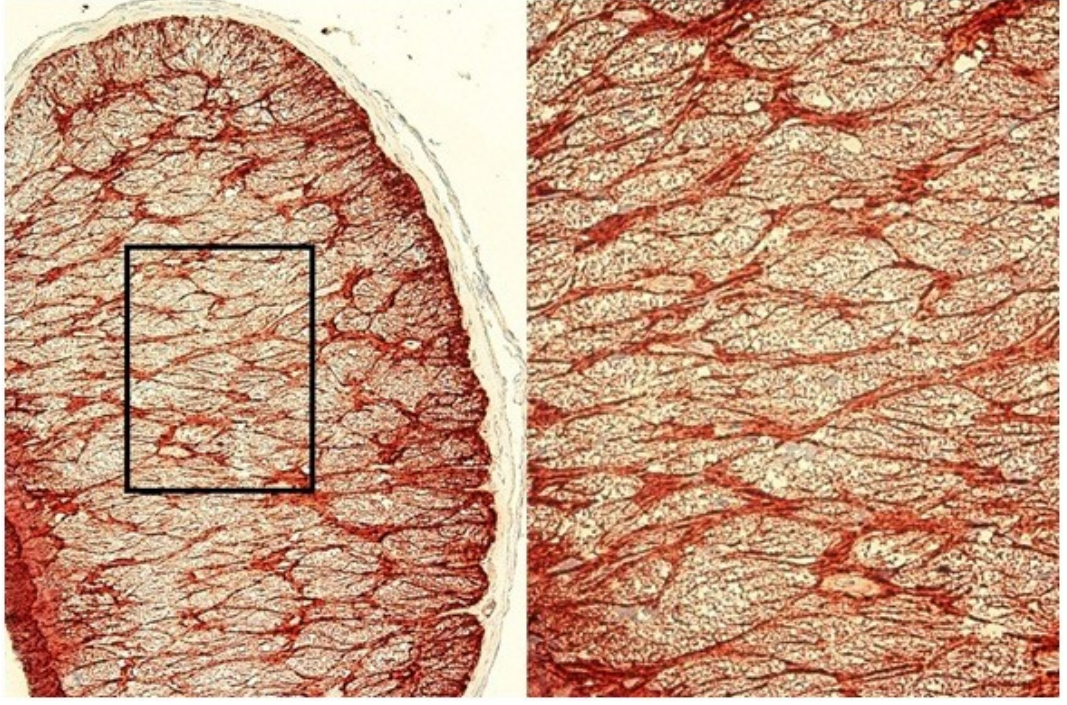


**Şekil 20 D.** Geç riluzol grubunun (GRL) optik sinir kesiti aksonlarında normale yakın görünümde hassas astrocit yapısı, x20, x100

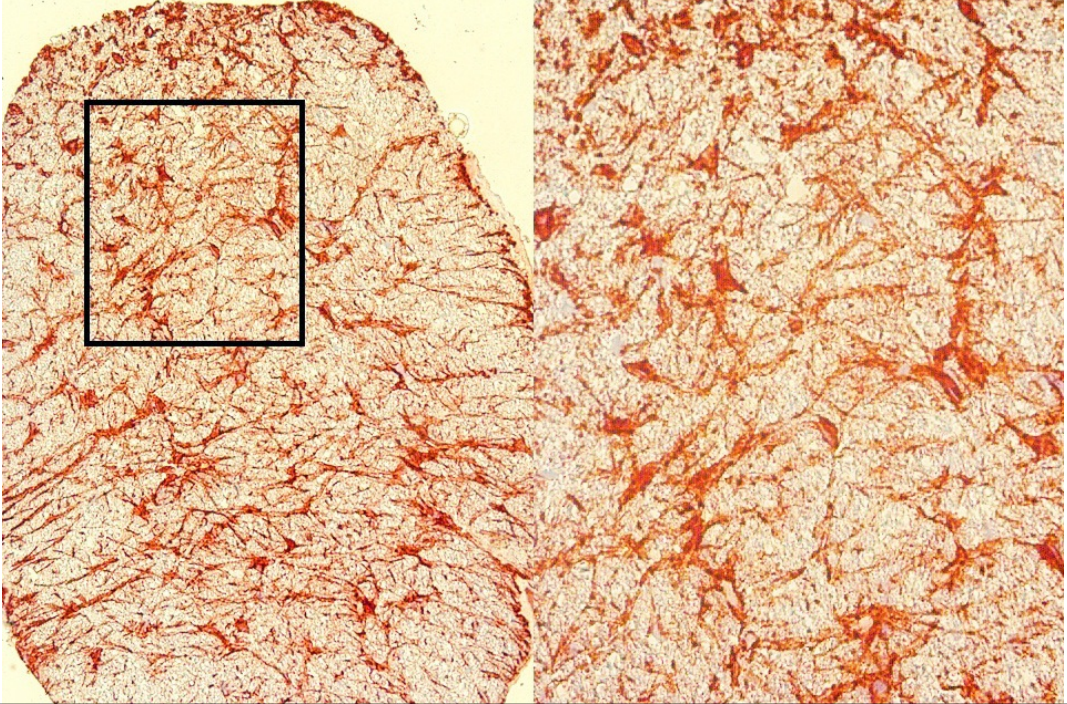


**Şekil 20 E.** Erken resveratrol grubunda (ERS) optik sinir kesitinde astrocit yapısındaki minimal değişim, x20, x100





**Şekil 20 F.** Geç resveratrol grubunda (GRS) optik sinir kesitinde astrositik uzantılarda minimal hipertrofi ve hiperplazi, x20, x100



**Şekil 20 G.** Kombine tedavi grubu (K) optik sinir kesitinde normale yakın görünümde hassas astrosit yapısı, x20, x100

## 5. TARTIŞMA

Glokom, çok parametrelili ve kompleks bir hastalık olmasına rağmen, en önemli risk faktörü ve bugün için tedavide kontrol edilebilir tek faktör GİB yüksekliğidir. Ancak etkin bir GİB düşürücü tedaviye rağmen hastalarda görme kaybının devam etmesi söz konusudur<sup>173</sup>. Bu durum glokom tedavisinde ek tedavi yöntemleri geliştirmeyi zorunlu hale getirmiştir. Bu nedenle günümüz araştırmalarında, RGH'ları ve santral görme yollarının nöronlarını korumaya yönelik nöroprotektif tedavi yaklaşımları üzerine yoğunlaşmıştır. Bugün için glokomun etyopatogenezi halen tam olarak aydınlatılamamışsa da glokomatöz hasarda özellikle RGH'leri ve onların aksonlarının etkilendiği iyi bilinmektedir. Önceki çalışmalarda glokomlu hastalarda ve deneysel glokom oluşturulan hayvan modellerinde vitreus glutamat düzeylerinin yüksek oluşu, etyopatogeneizde glutamat aracılı eksitotoksikite kavramını ortaya koymuştur<sup>55,58</sup>. Glutamat, santral sinir sistemi ve retinanın ana eksitatör nörotransmitteridir. RGH de yüksek oranda NMDA glutamat reseptörlerinin bulunması, bu hücreleri glutamat düzeylerindeki değişikliklere oldukça duyarlı hale getirir. Hücre dışı yüksek glutamat eksitotoksik nöron hasarına neden olabilir. 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 SOR'ların oluşumunu tetikler ve SOR'leri, hücrenin enerji deposu olan mitokondilerin fonksiyonlarını bozarak hücre çekirdeğinde kromatin kondansasyonuna sebep olur ve apoptozisi başlatır. Glokomatöz hasarda ROR'ların ve oksidatif stresin etkin olduğu çalışmalarla gösterilmiştir<sup>174-177</sup>.

RGH'lar ve optik sinir, SSS nin ayrılmaz parçaları, glokomda Alzheimer hastalığınıninkine benzer hücre ölüm mekanizmaları gösterdiğine ve glokomun bir

nörodejeneratif hastalık olduğuna işaret etmektedir <sup>173,178,179</sup>.

Eksitotoksisite olarak bilinen bu fenomen, geniş bir yelpazede nörodejeneratif hastalıklarla, özellikle ALS ve glokom, ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Eksitator aminoasitler tarafından glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu; NMDA tipi glutamat reseptörlerinin aşırı miktarda uyarılmasına ve sonrasında aşırı miktarda Ca hücre içine alınmasıyla başlayan NO sentaz aktivasyonu, aşırı serbest oksijen radikali birikimi, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, katabolik enzimlerin aktivasyonu gibi bir dizi zararlı sonuçlara yol açmaktadır <sup>180,181</sup>. Glutamat bağımlı eksitotoksisitenin oluşmasına eşlik eden birçok mekanizmanın birlikte işlediği ileri sürülmektedir. Ayrıca sinir terminalinden veziküler glutamatın Ca bağımlı salınımının iyice artması sonucu apoptoza giden yolun tetiklendiği gösterilmiştir <sup>182,183</sup>.

RLZ, ALS tedavisi için kullanılmakta olan antiglutamat bir ajandır. Postsinaptik NMDA ve kainat tipi glutamat reseptörlerinin blokajı ve voltaj bağımlı Na<sup>+</sup> kanallarını üzerine inhibisyon etkisi vardır. RLZ anti-iskemik, sedatif ve anti epileptik etkileri vardır <sup>184</sup> ve ALS progresyonunu yavaşlatıcı etkileri gösterilmiştir. RLZ'nin nöroprotektif etkisinin mekanizması tam aydınlatılmamış olsada, Na<sup>+</sup> kanal inhibisyonuna kısmen de olsa güvenilmesi gerektiği düşünülmektedir <sup>61</sup>. Çünkü Na<sup>+</sup> kanal inhibisyonu postiskemik nöron koruma ile ilişkilidir.

RLZ dinlenme halindeki Na<sup>+</sup> kanallarından çok inaktive durumdaki kanallar için daha çok afinitesi vardır. Bu durum hasarlı ya da depolarize sinirlerin selektif blokajı ve bunu izleyen presinaptik glutamat salınımı azalması ile sonuçlanmaktadır. RLZ voltaj kapılı N- tipi ve P/Q tipi kalsium kanallarını da bloke edebilmektedir, bu da nöroprotektif etkisine katkıda bulunur. Kalsium kanalları presinaptik nörotransmitter salınımını kontrol ettiği için, bu tür Ca kanallarının RLZ ile inhibisyonu presinaptik sinir terminallerinden glutamat salınımını azaltabilir. FDA onaylı bir nöroprotektif ajan olan RLZ'nin, memantin gibi eksitotoksik mekanizmayı içeren birçok deneysel nöronal hasarda etkili olduğu gösterilmiştir. Nöron koruyucu etkide glutamat salınımının azaltılmasının

yanısına voltaja bağımlı iyon kanallarının modülasyonu da önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir <sup>185,186</sup>.

RLZ, parkinson hastalığı olan sıçan ve primat hayvan modelleri dahil <sup>187-189</sup>, hücre kültürlerinde <sup>190,191</sup>, huntington hastalığı ve beyin iskemisi dahil akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklarda <sup>192-195</sup> nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir.

Retinal nöron hasarında da RLZ'nin nöroprotektif etkinliğine işaret eden çalışmalar mevcuttur <sup>196</sup>. Glokomda artmış glutamat düzeylerinin ve glutamat aracılı eksitotoksik nöron hasarlanmasının gündeme gelmesiyle, NMDA reseptör antagonistlerinin glokomdaki nöroprotektif etkisi yakın zamanda sıkça tartışılan konulardan birisidir ve özellikle glutamat antagonisti olan RLZ'nin glokomdaki nöroprotektif etkisine dair yayınlanmış bir çalışma olmamakla beraber nöroprotektif etkinliği birçok çalışmada gösterilmiştir <sup>197-199</sup>.

Lagrèze ve ark. NMDA reseptör antagonisti olan memantin retinal iskemide nöroprotektif etkinliğine dayanarak, yine bir NMDA reseptör antagonisti olan cerestat ve bir glutamat salınım inhibitörü olan RLZ'nin nöroprotektif etkinliğinin olup olmadığını araştırmışlardır <sup>200</sup>. Akut retinal iskemi modelinde profilaktik preiskemi tedavisi uygulanmış. 2 hafta sonunda yapılan histolojik incelemede memantin grubunda nöronların %47'si, cerestat grubunda %61'i, RLZ grubunda da %43'ü, kontrol grubunda ise %28'i korunmuş ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş.

Araştırmalar göstermiştir ki NTF'nin RGH'lara retrograd transportunun bozulması glokomun oluşum mekanizmasına katkıda bulunmaktadır. Transport blokajı OSB seviyesinde olur ve kemirgen ve primat hayvan modellerinde GİB yükseklığı ile gösterilmiştir <sup>201-203</sup>. Buna göre, RGH'ları, ya direkt olarak proteinin kendisi <sup>204,205</sup> veya endojen salınımını indükleyerek <sup>206-208</sup> NTF'ler ile desteklemenin optik sinir hastalıklarında ve glokom modellerinde nöron kaybını yavaşlattığı gösterilmiştir.

Mizuta ve ark. yaptığı bir çalışmada RLZ'nin fare astrosit hücre kültüründe



NGF, BDNF ve GDNF'yi arttırdığı gösterilmiştir <sup>143</sup>. Multipl etki mekanizması olan RLZ glomda NTF'yi uyararak nöroprotektif etki gösterebilir.

Müller hücrelerinin RGH kültür çalışmalarında eksitotoksik hasarın önlenmesinde koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir. Lebrun-Julien ve ark. NMDA-bağımlı hücre ölümünün, Müller hücrelerinde nükleer faktör kappaB (NF-kB) aktivasyonu ile başlayan aktivasyon hücrel olmayan bağımsız bir mekanizma ile potansiyelize olduğunu ve bu gliaların RGH lerine toksik olan tümör nekrozis faktör alfa (TNF $\alpha$ ) proteinini saldığını bildirmişlerdir <sup>209</sup>. Yine TNF $\alpha$ 'nın oküler hipertansiyon modelinde RGH ölümüne yol açtığına değinilmektedir <sup>210</sup>. Bu çalışmanın sonucu ile ilişkili olarak, RLZ'nin gösterdiği anti-eksitotoksik aktivite ile Müller hücresi üzerinde bir ölçüde "pozitif etki" veya "iş yükü azaltıcı" etki ortaya çıkarmış olabilmesi şeklinde düşünülebilir. RLZ, bu nedenle hem direkt hem de indirekt yoldan Müller hücreleri üzerinde koruyucu ve etki potansiyelize edici özellik gösteriyor olabilir.

Lösinden zengin tekrarlanan protein LINGO-1, nöronal sağkalımın negatif bir düzenleyicisi olarak bilinmektedir ve Fu ve ark. <sup>211</sup> oküler hipertansiyon olan ratlarda LINGO-1 antagonistinin RGH ölümünü azalttığını göstermişlerdir. Dahası LINGO-1 in trk B (BDNF nin nöronlardaki yüksek affiniteli özel reseptörü) ile ortak eksprese edildiğini ve trk B reseptörlerine bağlandığını ve BDNF ile beraber LINGO-1 enjeksiyonunun, trk B nin BDNF ile uyarılıp aktivasyonunun ve RGH'lara nöroprotektif etkisini arttırdığını açıklamışlardır <sup>205</sup>. Bu çalışmada deneysel glom modelinde RLZ ve RES'in sistemik tek tek ve kombine kullanımının retinal ganglion hücreleri üzerinde nöron koruyucu etkisi olduğu gösterildi.

DTMR ile işaretli retinal ganglion hücre sayısı hesaplanması için sayılan alan 8,4 mm<sup>2</sup> olup bu da 50,1 mm<sup>2</sup> olan Wistar sıçan retinasının %5,9'u anlamına gelmekte idi <sup>212,213</sup>. Çalışmamızda RLZ ve RES verilmiş olan gruplarda; RGH sayısının glom grubuna göre anlamlı düzeylerde korunmuş olduğu, ancak kombine tedavinin hasarın başladığı anda verilmeye başlanmasının neredeyse kontrol grubuna yakın bir koruma sağladığı gözlemlenmiştir. Altı haftalık süreç



sonunda tedavi verilemeyen deneklerde glokom grubunda ortalama RGH sayısı %66±5 azalma gösterirken, erken dönemde RLZ başlanan grupta %19±5, geç dönemde RLZ başlanan grupta %40±3, erken dönemde resveratrol başlanan grupta %38±3, geç dönemde resveratrol başlanan grupta %44±5, ve hasarın başladığı anda RLZ ve resveratrol birlikte başlandığı grupta bu kayıp sadece %11±3 oranında olduğu dikkat çekmekte idi. Tüm retinal hücre sayısı ve mm<sup>2</sup> deki hücre sayısı ve yüzde azalma olarak değerlendirildiğinde glokom grubuna göre tüm tedavi gruplarında ganglion hücrelerinde anlamlı korunma olduğu saptandı. Literatürde RLZ ve RES'in glokom üzerinde yapılmış nöroprotektif olduğuna dair bir çalışma olmamakla beraber, birçok yayında nöron koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir.

Wheeler ve ark.<sup>214</sup> 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. Bu çalışmadaki ilaç gruplarının glokom gruplarına göre iyi sonuçlara sahip olduğu gözönünde bulundurulursa RLZ ve RES'in retinaya etkin konsantrasyonda ulaşabildiği, yeterli reseptör etkileşiminde bulunduğu, nöronları toksik saldırıdan koruyabildiği söylenebilir.

Glutamat eksitotoksitesisi reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna ve mitokondrial hasara yol açabilir<sup>215</sup>. Artmış ROR nöronlara hasara uğratabilmektedir<sup>216</sup>. Oksidatif stres, ekstraselüler glutamat birikimine yol açan glutamat taşıyıcı protein GLT-1'i inhibe edebilir. Eksitotoksisite ve oksidatif stres birlikte neurodejeneratif hastalık gelişim riskini arttırabilir. Bir nörodejeneratif hastalık olan glokomun etyopatogenezinde eksitotoksisite ve oksidatif stres birlikte rol alıyor olabilir.

Bu çalışma deneysel glokom modelinde RLZ'nin RGH sayımına dayalı nöroproteksiyon etkisini ortaya koyan ilk çalışmadır. Literatürde RLZ'nin retina

iskemi modelinde nöroprotektif etkisini gösteren etkisini gösteren çalışmalardan bir tanesi de Ettaiche ve ark.<sup>217</sup> tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada ani GİB artışı ile sağladıkları basınca bağlı iskemi öncesi 8 mg/kg RLZ verilerek, elektroretinografi, apoptozis değerlendirilmesi ve histopatolojik inceleme yaparak nöroprotektif etkisi araştırılmış, retina hücre iskeleti organizasyonunda, nekrotik hücre hasarında, DNA fragmantasyonunda değişiklikleri azaltarak potent bir nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir<sup>217</sup>.

Lucas ve ark.<sup>40</sup> glutamatin iç retinal tabakalarda ve özellikle ganglion hücre tabakasına hasar oluşturduğunu göstermiştir. Onley benzer olarak glutamatin retinal toksisitesini göstermiş ve bu etkiyi eksitotoksikite olarak tanımlamıştır. Eksitotoksik ganglion hücre kaybı en çok NMDA reseptörleri alt tipi ile ilişkilendirmiştir<sup>218</sup>.

NMDA kanal blokerlerinin fare felç modelinde nöronal kaybı sınırlandırdığı gösterilmiştir. RLZ hem NMDA reseptör blokörü olup hem de Na<sup>+</sup> kanal aktivitesini inhibe eder. Kronik glokom modelinde retinal ganglion hücrelerindeki etkisi bu mekanizmalarla açıklanabilir.

Bizim çalışmamızda geç riluzol ve geç resveratrol grubunda erken riluzol ve erken resveratrol grubuna göre daha az sayıda hücrenin korunduğu gözlemlendi. Hasarın başlamasıyla beraber tedavi uygulanan gruplara 42 doz , hasar başlamasından 3 hafta sonra tedavi uygulanan gruplara 21 doz ilaç uygulanmıştır. Geç dönem tedavi gruplarında az sayıda RGH korunmuş olması; ya nöronal hasarın başlangıcında tedaviye başlamanın, hasarın progresyonunu azaltmada önemli olduğu ya da fazla doz ilacın koruyucu etkinliğinin fazla olduğunu düşündürmektedir. Vorwerk ve ark.<sup>196</sup> deneysel optik sinir sıkışma modelinde memantin, RLZ ve nimodipin başlanmış ve vitreus bazal glutamat düzeylerine bakılmıştır. Hasar oluşturmadan 7 gün önce intraperitoneal olarak memantin, 2 mg/kg/gün; RLZ, 8 mg/kg/gün; nimodipine, 10 mg/kg/gün olarak başlanmış ve hasar sonrası 7 gün daha devam etmişlerdir. 28 gün sonra değerlendirilen kontrol grubunda 20.4 ±2.1 µmol olan intravitreal glutamat düzeyleri tedavi verilmeyen hasar grubunda 103.1±23.1 µmol, memantin grubunda 36.1±12.4, RLZ grubunda

38.7±10.7 µmol, nimodipin grubunda ise 51.0±12.3 µmol olarak ölçülmüştür ve RGH sayısı ile intravitreal glutamat düzeyleri arasında ters bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Memantin ve RLZ'nin optik sinir hasarı ile indüklenen intravitreal glutamat artışını bloke ettiğini ve nöroprotektif etkili olduklarını savunmuşlardır. Bir hafta önce ilaç uygulanan grupta, hasar oluşturulan ve ilaç uygulanmayan gruba göre vitreusta daha düşük glutamat düzeyi saptamışlardır. Erken ilaç uygulamasının bizim çalışmamızda olduğu gibi nöron korunmasında etkili olduğunu savunmuşlardır<sup>196</sup>. Kronik glokom modelinde apoptotik hücre ölümü gerçekleşen ganglion hücrelerine bu ilaçların koruyucu etkisi olmayacağı kabul edilirse, geç RLZ grubunun daha az etkili olmasını açıklayabiliriz. Glokoma sekonder nöronal hasarın başladığı erken dönemde RLZ ve RES verilmesinin apoptoz sürecinin engellenmesinde anlamlı rolü olabileceği, nöronal hasarın ortaya çıkmaya başladığı geç dönemde başladığında ise kalan mevcut hücreleri apoptotik süreçten koruyarak hastalığın progresyonunu yavaşlatabileceği (veya durdurabileceği) düşünülebilir. Nöroprotektif etkinin oluşumunda RLZ'nin glutamat salıverilmesini inhibe etmesinin yanısıra, diğer nörotransmitterlerle, ikinci haberci sistemlerle ve iyon kanallarıyla etkileşmesi rol oynayabilir<sup>219</sup>. RLZ'nin RGH'lar üzerindeki koruyucu etkisinin kısmen oksidan-antioksidan dengenin sağlanması ile ilişkili olduğu gözükmele birlikte, diğer etkilerinin de göz önünde bulundurulması gerekir. Özellikle RLZ'nin Na<sup>+</sup> kanallarını bloke etmesi ve K<sup>+</sup> kanallarıyla etkileşmesi nöron koruyucu etki açısından anlamlıdır. Zira, Na<sup>+</sup> kanallarını bloke eden ajanların nöroprotektif etkileri bilinmektedir<sup>133,140,220</sup>.

Glokom sadece yüksek göz içi basıncının olduğu bir durum değil, basınçtan bağımsız risk faktörlerinin de sorumlu olduğu kabul edilen bir durumdur. Yeni başlatılan çalışmaların tedavi seçenekleri göze kan akımını arttıran ve nöroprotektif etkisi olan ilaçları içermektedir. Kalsiyum kanal blokörleri halihazırda glokomun bunlara benzer tedavisi için bulunmaktadır ve diğer nörolojik bozukluklarda olduğu gibi çalışmalarda kullanılan birçok nöroprotektan, henüz yaygın olarak kabul görüp uygulanmamaktadır<sup>221</sup>.

ROR'ların iskemi veya aksotomiye bağlı olarak birçok n6ronal 6l6m t6r6nde yer aldığı ve hatta gelişim sırasında doğal olarak oluştuğu açıktır <sup>109</sup>.

RES, maya *Saccharomyces cerevisiae*, nematod *Caenorhabditis elegans*, meyve sineği *Drosophila melanogaster*'ın 6mr6n6 arttırmaktadır. Daha sonra kısa 6m6rl6 yıllık balıkları olan *Nothobranchius furzeri*'nin 6mr6n6 uzattığı g6sterildi <sup>222</sup>. Y6ksek kalorili diyet uygulanan farelerde sağlık ve yaşamında artış g6r6lm6ř, yaşlılık hastalıklarını tedavi etmede yeni bir yaklaşıma işaret etmiştir <sup>223</sup>. RES'in çok y6nl6 işlevleri arasında, sirtuinleri; DNA onarımı, gen baskılama, kromozomal stabilitenin sağlanması ve uzun 6m6rl6l6k de rol oynayan bir protein ailesi, aktive etmesi de yer almaktadır <sup>224</sup>.

RES etkili bir antioksidandır <sup>163,225,226</sup>. D6ř6k yoğunluklu lipoprotein (LDL) lipid peroksidasyonunu inhibe eder, okside LDL'nin sitotoksisitesini engeller ve h6creleri lipid peroksidasyonuna karşı korur <sup>163</sup>. RES, n6ronları aksotomi sonrası dejenerasyona karşı korur <sup>227</sup>. Serebral iskeminin tetiklediği n6ron hasarında tek bir RES inf6zyonu, serbest radikal s6p6r6c6 etki ve NO salınımına bağlı serebral kan akımının artışıyla n6roprotektif etki g6sterebilir <sup>228</sup>. Onun antiapoptotik aktivitesi immunbaskılı durumlarda ve kronik dejeneratif hastalıklarda oksidatif hasarı en aza indirmek için RES'in yararlı bir besin takviyesi olabileceğine dair bir 6neri getirmiştir <sup>229</sup>. G6zde, RES selenit ile uyarılmış oksidatif stresi ve katarakt oluşumunu baskılar <sup>230</sup>. Yazarlar bu etkisine dayanarak, y6ksek RES t6kretiminin senil kataraktı engelleyebileceğini ileri s6rm6şlerdir. RES aynı zamanda retinal arteriollerin dilatasyonunu uyarmasından dolayı, retinal vask6ler hastalıkların tedavisinde yarar sağlayabileceğini g6stermişlerdir <sup>231</sup>.

RES'in birçok dokuda h6cre koruyucu etkisi g6sterilmiş olmakla birlikte retina dokusundaki etkileri 6zerine hen6z iyi bilinmemektedir. Luna ve ark. <sup>232</sup> trabek6ler h6cre k6lt6r6nde, kronik oksidatif stres oluşturarak, RES'in etkisini araştırmışlar ve oksidatif strese bağlı oluşan mark6rlerin 6retimini engellediğini g6stermişlerdir ve primer açık açılı glokom olgularında RES'in trabek6ler ağda oluşan hasarı 6nleyebileceği veya durdurabileceği fikrini 6ne s6rm6şlerdir. Bizim

çalışmamızda ise deneysel glokom modeli oluşturuldu ve retinal ganglion hücre sayımı yapıldı. Bu çalışma RES'in nöron koruyucu etkisini gösteren RGH sayımına dayalı literatürdeki ilk çalışmadır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda; RES'in antioksidatif, antiinflamatuvar, antikanserojen ve antitrombosit, kalp koruyucu, damar gevşetici etkileri ve östrojenik etkiler gibi çeşitli biyolojik etkileri tanımlanmaktadır <sup>45,156,157</sup>.

Son çalışmalar RES'in nöroproteksiyon etkisini onun antioksidan özelliklerinden bağımsız olarak antiapoptotik mekanizmasına bağlı olduğuna işaret etmektedir <sup>233</sup>. RES, histon deasetilaz ailesine ait olan sirtulinlerin (SIRT proteini, silent information regular two) agonisti olarak rol oynamaktadır <sup>223,234</sup>. SIRT1 hücre yaşamını uzatan, hasarlı DNA onarımını arttıran ve hücre bölünmesini azaltan selüler mekanizmaları düzenlemektedir <sup>149</sup>. Sirtülin-1 aktivatörlerinin (RES gibi) fare optik nörit ve multipl skleroz modellerinde nöroprotektif aktivite gösterdikleri bildirilmiştir <sup>235</sup>. Della-Morte ve ark. <sup>236</sup> RES profilaksisinin beyin hücrelerinde sirtulin-1 aktivitesini artırarak beyin hücrelerini koruduğunu serebral iskemik hasarı azalttığını göstermişlerdir. Wang ve ark. <sup>237</sup> deneysel Alzheimer hastalığı oluşturdukları çalışmada ılımlı şarap tüketiminin daha düşük Alzheimer hastalığı insidansı ile sonuçlandığı gösterilmiştir.

Oksidatif stres birçok dejeneratif hastalığın patogenezinde rol almaktadır <sup>238,239</sup>. Serbest radikaller RGH ve aksonlarda yoğun hasara yol açmaktadır <sup>240,241</sup>. Bu oksidatif strese giren hücrelerde biriken ROR, tıpkı Alzheimer ve Parkinson hastalığında ve Amyotropik lateral sklerozda olduğu gibi, serbest radikal oluşturmak için NO ile reaksiyona girerek mitokondriyal disfonksiyona yol açan bir dizi reaksiyona ve dolayısıyla DNA yıkılımına ve kaçınılmaz olarak hücre ölümüne neden olurlar <sup>242</sup>.

Bir nörodejeneratif hastalık olan glokomun mekanizmalarından biride oksidatif hasardır. Birçok hücre tipinde reaktif oksijen radikallerinin açığa çıkması ve apoptozis ile hücre ölümüne yol açan  $\beta$ -amiloid peptidin bu toksik etkisi RES ile bloke edilmiştir <sup>243-245</sup>.

Güncel bir araştırma konusu endotelial disfonksiyon birçok hastalık da olduğu gibi glokomun patogenezinde rol alabileceği öne sürülmektedir <sup>246,247</sup>. Kırmızı şarap polifenollerinin (RES), ET-1 sentezini inhibe ederek vazoprotektif etki gösterdiği ve ayrıca ekstraselüler VEGF seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir. Endotel fonksiyonunu etkileme mekanizması ise endotelial NO sentaz (eNOS) üretimini uyarması ve bunun sonucu olarak vazodilatasyonun görülmesidir <sup>248</sup>.

Sakata ve ark. <sup>249</sup> deneysel felç modelinde RES'in fare kortikal nöron hücre kültürlerinde eksitotoksisite ve serbest radikallere karşı nöroproteksiyon sağladığı bunu da hemoksijenaz induksiyonu yaparak sağladığı gösterilmiş ve nöropatolojik durumlara karşı hücre/organ direncini sağladığını savunmuştur. Savunulan bu multipl etki mekanizmaları ile RES'in kronik glokom modelinde nöron koruyucu etki gösterdiği düşünüldü.

RGH ölümü multi faktöryel olup farklı etki mekanizmasına sahip ilaçların additif etkileri göstermeleri mümkündür. Chen ve ark. <sup>250</sup> fare beyin hücrelerini eksitotoksisteden korumak amacıyla memantin ve çay polifenollerinin etkisini araştırmışlar ve kombine kullanımının daha etkili olduğunu bulmuşlardır.

RGH'ların farklı zamanlarda ölüyor olması glokomdaki görmenin ve görme alanı kaybının giderek kaybolmasını açıklayabilecek bir düşüncedir <sup>74</sup>. Önemli bir gözlem ise glokom başlangıcında farklı bir görme alanı kaybı olmasıdır <sup>251</sup>. Bu da bazı RGH'ların diğerlerine göre daha hassas olabileceğini gösterebilir. Bunu, bazı RGH diğerlerinden daha önce ölmeye başlamaktadır, ya da "bütün RGH aynı zamanda ölmeye başlamaktadır ama fonksiyonellikleri farklı oranlarda devam etmektedir" şeklinde yorumlayıp yorumlamamak gerektiği henüz açık değildir. Aslında glokom progresyonu açısından önem arzeden bu düşünceler ne kadar çabuk açıklığa kavuşursa ve RGH ölümü üzerine ne kadar çok bilgimiz olursa bir nöroprotektan ajanın geliştirilmesi o kadar kolay olur. Çünkü iyi bir nöroprotektan bu progresyonu yavaşlatmalıdır. Bu nasıl olacaktır? Nöroprotektan ajan, direkt veya indirekt olarak retinal nöronların ölümünü engellemelidir. Bu indirekt etki, diğer retinal hücreleri (nöron ya da glia) ganglion hücrelerine hasarı etkisiz kılacak kimyasalları üretmek şeklinde

olabilir. Eğer RGH farklı hızlarda ve zamanlarda ölmeye başlıyorsa, ölen hücreler diğer sağlam hücreleri ikincil hasarla ile hasarlıyorsa, nöroprotektif ajan, bu ikincil hasarı önlemeyi hedeflemelidir. Eğer bütün RGH aynı anda ölüyorsa, ama gerçekte farklı hızlarda ölmektedir, nöroprotektif madde bu ölüm sürecini yavaşlatmalıdır. İndirekt etkisini çevresel faktörleri düzenleyerek gösterebileceğini belirtmiştik. Normalde astrositler ve müller hücrelerinin ekstraselüler iyon, glukoz ve diğer metabolitleri, su, pH, glutamat ve GABA gibi transmitterleri sağlamaktadırlar <sup>252</sup>. Mevcut deliller astrositlerin ve mikroglanın optik sinir hasarı ve iskemi sonucunda aktif hale gelerek ekstraselüler boşluğa toksik maddeleri (glutamat, D-serine, NO, tümör nekrozis faktör  $\alpha$  ve  $\beta$ ) saldığını düşündürmektedir. Bu faktörler ganglion hücre hasarına yol açabilir <sup>253</sup>.

Bizim çalışmamızda glokom oluşturulmuş deneklerde optik sinir kesitlerinde astrosit işaretleyici olarak GFAP kullanıldı. Tedavi verilmiş olan gruplarda, bu bölgelerdeki GFAP pozitif astrositlerin morfolojilerindeki değişikliklerin glokom grubundan farkedilir düzeyde az olması, RLZ ve RES'in reaktif astrositozu azalttığını ve RGH'ları ikincil hasardan korumada etkili olabileceğini düşündürmektedir. Tedavi verilen gruplarda özellikle K ve ERL gruplarında diğer gruplara göre daha fazla RGH korunmuş olması, nöron ölümünü bir seviyede sınırlandırmış ve astrosit fonksiyonlarını koruyucu özellik göstermiş olması glokomatöz optik nöropatinin progresyonunu yavaşlatmak için RLZ ve resveratrolü ideal nöroprotektanlar olabileceğini düşündürmektedir. Glokoma sekonder nöronal hasarın başladığı erken dönemde RLZ ve resveratrol verilmesinin eksitotoksik sürecinin engellenmesinde anlamlı rolü olabileceği, nöronal hasarın ortaya çıkmaya başladığı geç dönemde başladığında ise kalan mevcut hücreleri apopitotik süreçten koruyarak hastalığın progresyonunu yavaşlatabileceği (veya durdurabileceği) düşünülebilir.

GFAP glial hücrelerde bulunan bir sitoskeletal protein olup, astrositlere fiziksel bir güç vererek hücresel mimarinin korunmasında rol oynar <sup>254</sup>. SSS hasarından sonra reaktif astrositozun görüldüğü ve karakteristik olarak GFAP ekspresyonunun arttığı ve morfolojik olarak da astrositik uzantılarda hipertrofi ve

hiperplazinin gözleendiği bildirilmiştir<sup>255</sup>.

Çeşitli deneysel ve genetik glokom modellerini kullanarak yapılan birçok çalışma, retinal astrositlerde ekspresyonda azalma ifade eden bazı kanıtlar olmasına rağmen, hem retinal hem de Müller hücrelerinde GFAP ekspresyonunun artmış olduğunu göstermektedir<sup>256-259</sup>. Bir fare glokom modelinde, yüksek GIB'e maruz kaldıklarında makroglia içindeki GFAP da proliferasyon olmaksızın bir up-regülasyon olduğu gsreilmiştir<sup>260</sup>.

Çalışmamızdaki immunfloresan immünohistokimyasal inceleme bulguları, bir antiglutamerjik ajan olan RLZ'nin ve bilinen en güçlü antioksidanlardan olan RES'in glokomda GIB'e anlamlı bir etkisi olmaksızın, anti-eksitotoksik etki ile nöronal koruma sağlayabileceğini işaret etmektedir. Verilerimiz, RLZ ve RES'in nöroprotektif etkinliğinin glokom sürecinin başlangıcında verilmesi ile daha da belirgin düzeyde olabileceğini düşündürür tarzdadır. Ağır hasar almış veya ölmüş bir ganglion hücresine hiçbir nöroprotektif tedavinin etki etmeyeceği açıktır. Bizim alışmamızda GRL ve GRS gruplarında diğer tedavi gruplarına göre daha az sayıda hücre korunmuştur. Bu noktada nöroprotektif ajanın nöronal hasarın başlangıcında kullanılmaya başlanmasının, hücrelerde işlevselliği koruduğunu ve progresyonu azaltmada önemli olduğu görülmektedir. Çünkü erken dönemde uygulanan tedavinin, hasar yaratan etkene karşı farklı düzeylerde dirence sahip hücreleri koruduğu, bununla beraber; bozulmuş şartlara uyum sağlamış, daha az sayıda ancak sağlam hücrelerin varlığı da ileri evrede uygulanan tedavinin, hücre ölümüne gidişi durdurabileceğini düşündürmektedir. Tüm bu sonuçlar, günümüzde giderek kabul gören glokomda glutamat tabanlı eksitotoksisitenin nöronal hasarda etkin olduğu düşüncesini destekler gözükmektedir.

Bizim alışmamızda da olduğu gibi, deneysel olarak etkinliği gösterilen RLZ ve RES'in, glokomda klinik kullanılabilirliği, günümüzde halen sürmekte olan geniş ölçekli, randomize klinik çalışmaların sonucunda ortaya konulabilecektir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda deneysel glokom modelinin erken ve geç dönemlerinde sistemik olarak uygulanan RLZ ve RES'in tek ve kombine kullanımının nöroprotektif etkinliği değerlendirildi. Tüm tedavi gruplarında RGH'ların glokom grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde korunmuş olduğu saptandı. Alınan optik sinir kesitlerinde özellikle G grubunda yaygın glial doku artışı olduğu, astrosit haciminde artışa bağlı olarak astrositlerde morfolojik değişiklikler olduğu gözlemlendi. Astrositlerin ağısı ve yumak benzeri hassas hücre iskelet yapısı nodüler bir görünümle yer değiştirip disorganize bir hücre morfolojisi göstermekte idi. Bu bulguların tedavi gruplarında minimal olması dikkat çekmekte idi.

Çalışmanın immunfloresan ve histopatolojik bulguları RLZ ve RES'in deneysel glokomda nöronal koruma sağlayabileceğini göstermekte ve bu sonuçlar, glokomda glutamat tabanlı eksitotoksitenin ve oksidatif stresin RGH hasarında etkin olduğunu ve glokomda hücre ölümünün önemli ölçüde apoptoz yoluyla gerçekleştiğini desteklemektedir. Veriler, RLZ ve RES'in nöroprotektif etkinliğinin, glokom sürecinin başlangıcında kombine olarak verilmesi ile daha anlamlı düzeylerde olabileceğini düşündürmektedir.

Glokom hem kronik ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojik özelliklerine sahip; dolayısıyla, RLZ ve RES glokom yönetiminde umut vaatmektedir. Bildiğimiz kadarıyla, RLZ ve RES'in deneysel glokom modelinde etkinlikleri henüz araştırılmamıştır. Bu bilgilere dayanarak, RLZ ve RES gibi güçlü antiapoptotik ilaçların deneysel glokom RGH sağkalımı üzerine nöroprotektif etkisi olduğu akılda tutulmalıdır.

## 7. ÖZET

### **DENEYSEL GLOKOMDA ERKEN VE GEÇ DÖNEM RİLÜZOL VE RESVERATROL UYGULAMASININ NÖRON KORUYUCU ETKİSİ: HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNİFLORESAN İNCELEME**

**Amaç ve kapsam:** Deneysel glokomun erken ve geç dönemlerinde sistemik olarak uygulanan riluzol (RLZ) ve resveratrolün (RES) tek ve kombine kullanımının nöroprotektif etkinlik yönünden araştırılması.

**Gereç ve Yöntem:** Wistar Albino türü sıçanların ön kamaralarına 6 hafta süreyle hyaluronik asit enjekte edilerek deneysel glokom modeli oluşturulmuştur. 12 adet kontrol grubu (N grubu) deneğe ilaç verilmeksizin ön kamaralarına salin enjeksiyonu yapıldı. Glokom indüksiyonu yapılan 72 deneğin 12 tanesine indüksiyonla birlikte aynı gün başlanarak intraperitoneal yoldan 8 mg/kg/gün RLZ (Erken RLZ grubu, ERL), 12 tanesine intraperitoneal yoldan 10 mg/kg/gün RES (Erken Resveratrol grubu, ERS), 12 deneğe ise glokom indüksiyonuyla birlikte aynı gün RLZ ve RES tedavisi birlikte (Kombine tedavi, K grubu) uygulandı. 12 deneğe glokom indüksiyonu sonrası 3. haftadan itibaren 8 mg/kg/gün intraperitoneal yoldan RLZ (Geç RLZ grubu, GRL), 12 deneğe glokom indüksiyonu sonrası 3. haftadan itibaren 10 mg/kg/gün intraperitoneal yoldan (Geç Resveratrol grubu, GRS) uygulandı. Glokom indüksiyonu yapılan (Glokom, G grubu) 12 deneğe ise kontrol çözeltisi olarak fizyolojik %0,9 salin içinde %2 etanol enjeksiyonu yapıldı. 6. haftanın sonunda retinal ganglion hücreleri (RGH) dextran tetramethylrhodamine (DTMR) ile retrograd olarak işaretlendi ve sağ kalan RGH dansitesi whole-mount retinalarda değerlendirildi. Optik sinir kesitleri elde edildi ve glial fibriller asidik protein (GFAP) için histopatolojik olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Milimetrekaredeki RGH sayısı, sırasıyla N grubunda 1207±56, G grubunda 404±56, ERL grubunda 965±56, GRL grubunda 714±25, ERS grubunda 735±29, GRL grubunda 667±20, K grubunda 1071±49 idi. Retinal ganglion hücre sayımlarında tedavi uygulanan grupların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde nöronal yapı ve işlevi koruyucu etki gösterdikleri saptandı. GFAP ile yapılan optik sinir inceleme sonuçları da bu bulguları destekler nitelikteydi. Yapılan optik sinir inceleme sonuçları da bu bulguları destekler nitelikteydi.

**Tartışma ve Sonuç:** Deneysel glokomda RLZ ve RES'in sistemik uygulanması nöroprotektif anlamda etkili sonuçlar vermiştir. Ancak bu ajanların kombine verilmesi, tekli uygulanmalarına göre anlamlı ölçüde daha belirgin bir koruyucu etkinlik göstermektedir. Çalışmanın bulguları bu ilaçların glokomda nöronal koruma sağlayabileceğini göstermekte ve bu sonuçlar glokomda glutamata dayalı eksitotoksitenin ve oksidatif stresin RGH hasarında etkin olduğunu desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Glokom, nöroproteksiyon, resveratrol, riluzol

## 8. ABSTRACT

### NEUROPROTECTIVE EFFECT OF RILUZOLE AND RESVERATROL ADMINISTRATION IN EXPERIMENTAL GLAUCOMA: IMMUNOFLUORESAN AND HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS

**Purpose:** To investigate the neuroprotective activity of single and combined use of systemically administered riluzole (RLZ) and resveratrol (RES) in early and late stages of experimental glaucoma.

**Materials and method:** Experimental glaucoma was induced by injecting sodium hyaluronate into the anterior chamber of Wistar albino rats in a period of six weeks. Twelve subjects in the control group (N group) had saline injection to their anterior chamber without being given any medicine. 8 mg/kg/day RLZ (ERL group) was injected intraperitoneally to 12 of 72 subjects that had glaucoma induction starting from the same day of induction, 10 mg/kg/day RES (ERS group) was injected intraperitoneally to other 12 subjects, and RLZ and RES treatment has been combined and applied to another 12 subjects (Combined treatment, K group). Starting with 3 weeks after glaucoma induction 8 mg/kg/day RLZ was applied intraperitoneally to 12 subjects (GRL group), 10 mg/kg/day RES was applied intraperitoneally to 12 subjects (GRS group). To the other 12 subjects that had glaucoma induction (G group), 2% ethanol inside physiological 0.9% saline solution was injected as control solution. At the end of the six 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 retinas. Optic nerve transection was achieved and examined by histopathologically for glial fibrillary acidic protein

(GFAP).

**Results:** The mean RGH number in mm<sup>2</sup> were 1207±56 in N group, 404±56 in G group, 965±56 in ERL group, 714±25 in GRL group, 735±29 in ERS group, 667±20 in GRS group, 1071±49 in K group respectively. It was established that the groups with applied treatment showed statistically significant protective effect of neuronal structure and function compared to the control group. Also the optic nerve transection studies that has been done by using (GFAP) supported these findings as well.

**Discussion:** Systemic administration of RLZ and RES in experimental glaucoma ended up with effective results in neuroprotective meaning. However, combined treatment of these agents has resulted with more protective activity distinctively compared to single treatments. Findings of this study showed that these medications can establish neuroprotection in glaucoma, as well as supporting that in glaucoma, glutamate based excitotoxicity and oxidative stress are quite effective in RGH damage.

**Key words:** Glaucoma, neuroprotection, resveratrol, riluzole

## 9.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. Levin LA. Neuroprotection and regeneration in glaucoma. *Ophthalmol Clin North Am* 2005; **18**: 585-96.
3. Whitcup SM. Clinical trials in neuroprotection. *Prog Brain Res* 2008; **173**: 323-35.
4. Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JP, Casson RJ, Melena J. Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye (Lond)* 2004; **18**: 1075-84.
5. Kaushik S, Pandav SS, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. *J Postgrad Med* 2003; **49**: 90-5.
6. 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**: 429-40.
7. Levin LA. Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2003; **48 Suppl 1**: S21-4.
8. Lipton SA. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. *Curr Drug Targets* 2007; **8**: 621-32.
9. Dreyer EB. A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *J Glaucoma* 1998; **7**: 62-7.
10. Dong CJ, Guo Y, Agey P, Wheeler L, Hare WA. Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**: 4515-22.
11. Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 1996; **80**: 389-93.
12. Harwerth RS, Wheat JL, Rangaswamy NV. Age-related losses of retinal ganglion cells and axons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**: 4437-43.
13. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006; **90**: 262-7.
14. Grunwald JE, Piltz J, Hariprasad SM, Dupont J, Maguire MG. Optic nerve blood flow in glaucoma: effect of systemic hypertension. *Am J Ophthalmol* 1999; **127**: 516-22.
15. Grunwald JE, Piltz J, Hariprasad SM, DuPont J. Optic nerve and choroidal circulation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 2329-36.
16. 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.
17. 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**: 487-97.
18. Levin LA, Peebles P. History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. *Am J Manag Care* 2008; **14**: S11-4.
19. Whitcup SM. Clinical trials in neuroprotection. In: *Clinical trials in neuroprotection*, New York, 2003; 291-301.
20. Pacher P, Liaudet L, Mabley JG, Cziraki A, Hasko G, Szabo C. Beneficial effects of a novel ultrapotent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in murine models of heart failure. *Int J Mol Med* 2006; **17**: 369-75.
21. Storch A, Burkhardt K, Ludolph AC, Schwarz J. Protective effects of riluzole on dopamine neurons: involvement of oxidative stress and cellular energy metabolism. *J Neurochem* 2000; **75**: 2259-69.
22. Levin LA. Extrapolation of animal models of optic nerve injury to clinical trial design. *J Glaucoma* 2004; **13**: 1-5.
23. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1405-11.
24. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL, Jr., Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA* 1997; **277**: 1597-604.
25. Coleman WP, Benzel D, Cahill DW, Ducker T, Geisler F, Green B, Gropper MR, Goffin J, Madsen PW, 3rd, Maiman DJ, Ondra SL, Rosner M, Sasso RC, Trost GR, Zeidman S. A critical appraisal of the reporting of the National Acute Spinal Cord Injury Studies (II and III) of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *J Spinal Disord* 2000; **13**: 185-99.
26. 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**: S151-61.
27. Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 764-74.
28. Quigley HA. Ganglion cell death in glaucoma: pathology recapitulates ontogeny. *Aust NZ J Ophthalmol* 1995; **23**: 85-91.
29. Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, Jimenez-Lopez M, Mayor-Torroglosa S, Aviles-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-

- Sanz M. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 2010; **90**: 168-83.
30. Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, Inman DM, Vetter ML, Horner PJ, Marsh-Armstrong N. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci* 2008; **28**: 548-61.
31. 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.
32. Kaiser HJ, Flammer J, Wenk M, Luscher T. Endothelin-1 plasma levels in normal-tension glaucoma: abnormal response to postural changes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; **233**: 484-8.
33. Flammer J, Mozaffarieh M. What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy? *Surv Ophthalmol* 2007; **52 Suppl 2**: S162-73.
34. Grieshaber MC, Mozaffarieh M, Flammer J. What is the link between vascular dysregulation and glaucoma? *Surv Ophthalmol* 2007; **52 Suppl 2**: S144-54.
35. Cioffi GA. Three common assumptions about ocular blood flow and glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2001; **45 Suppl 3**: S325-31; discussion S32-4.
36. Cioffi GA. Ischemic model of optic nerve injury. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2005; **103**: 592-613.
37. Seki M, Lipton SA. Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma. *Prog Brain Res* 2008; **173**: 495-510.
38. Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 1994; **344**: 796-8.
39. Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 1995; **38**: 357-66.
40. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 1957; **58**: 193-201.
41. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; **1**: 623-34.
42. Gusman J, Malonne H, Atassi G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 1111-7.
43. Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 1992; **31**: 119-30.
44. Siesjo BK, Memezawa H, Smith ML. Neurocytotoxicity: pharmacological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 1991; **5**: 755-67.
45. Goodman and Gilman's, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, . 2001.
46. Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci* 2001; **69**: 369-81.
47. Limbrick DD, Jr., Sombati S, DeLorenzo RJ. Calcium influx constitutes the ionic basis for the maintenance of glutamate-induced extended neuronal



- depolarization associated with hippocampal neuronal death. *Cell Calcium* 2003; **33**: 69-81.
48. Coyle JT, Bird SJ, Evans RH, Gulley RL, Nadler JV, Nicklas WJ, Olney JW. Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity, and mechanisms of action. Based on an NRP one-day conference held June 30, 1980. *Neurosci Res Program Bull* 1981; **19**: 1-427.
49. Casson RJ. Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2006; **34**: 54-63.
50. Obrenovitch TP, Urenjak J, Zilkha E, Jay TM. Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox. *Int J Dev Neurosci* 2000; **18**: 281-7.
51. Dreyer EB, Lipton SA. New perspectives on glaucoma. *JAMA* 1999; **281**: 306-8.
52. Lipton SA. Retinal ganglion cells, glaucoma and neuroprotection. *Prog Brain Res* 2001; **131**: 712-8.
53. Lipton SA. Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol* 2003; **48 Suppl 1**: S38-46.
54. Lipton SA. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 2004; **1**: 101-10.
55. Brooks DE, Garcia GA, Dreyer EB, Zurakowski D, Franco-Bourland RE. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res* 1997; **58**: 864-7.
56. Dreyer EB, Grosskreutz CL. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). *Clin Neurosci* 1997; **4**: 270-3.
57. Dreyer EB, Zhang D, Lipton SA. Transcriptional or translational inhibition blocks low dose NMDA-mediated cell death. *Neuroreport* 1995; **6**: 942-4.
58. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1996; **114**: 299-305.
59. Osborne NN. Memantine reduces alterations to the mammalian retina, in situ, induced by ischemia. *Vis Neurosci* 1999; **16**: 45-52.
60. WoldeMussie E, Yoles E, Schwartz M, Ruiz G, Wheeler LA. Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats. *J Glaucoma* 2002; **11**: 474-80.
61. Obrenovitch TP. Neuroprotective strategies: voltage-gated Na<sup>+</sup>-channel down-modulation versus presynaptic glutamate release inhibition. *Rev Neurosci* 1998; **9**: 203-11.
62. Obrenovitch TP, Urenjak J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol* 1997; **51**: 39-87.
63. Obrenovitch TP, Urenjak J. Glutamate release inhibitors: a critical assessment of their action mechanism. *Amino Acids* 1998; **14**: 143-50.
64. Yaksh TL. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci*

1999; **20**: 329-37.

65. Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int* 2002; **41**: 123-42.

66. Palmada M, Centelles JJ. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Front Biosci* 1998; **3**: d701-18.

67. Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 2003; **27**: 325-55.

68. Muller D, Joly M, Lynch G. Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 1988; **242**: 1694-7.

69. Schneggenburger R, Zhou Z, Konnerth A, Neher E. Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* 1993; **11**: 133-43.

70. Grunder T, Kohler K, Kaletta A, Guenther E. The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat. *J Neurobiol* 2000; **44**: 333-42.

71. Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 1994; **368**: 144-7.

72. Stephenson FA. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2001; **2**: 233-9.

73. Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F, Zurakowski D, McDermott LM, Quinto KM, Dreyer EB. Excitotoxicity can be mediated through an interaction within the optic nerve; activation of cell body NMDA receptors is not required. *Vet Ophthalmol* 2001; **4**: 201-4.

74. Osborne NN, Chidlow G, Nash MS, Wood JP. The potential of neuroprotection in glaucoma treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 1999; **10**: 82-92.

75. Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 462-8.

76. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 2006; **25**: 397-424.

77. Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ. Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 3444-50.

78. Osborne NN, Chidlow G, Wood J, Casson R. Some current ideas on the pathogenesis and the role of neuroprotection in glaucomatous optic neuropathy. *Eur J Ophthalmol* 2003; **13 Suppl 3**: S19-26.

79. Aizenman E, Frosch MP, Lipton SA. Responses mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. *J Physiol* 1988; **396**: 75-91.

80. Brandstatter JH, Hartveit E, Sassoe-Pognetto M, Wassle H. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci* 1994; **6**: 1100-12.

81. Furukawa T, Hoshino S, Kobayashi S, Asakura T, Takahashi M, Atsumi T,

- Teramoto A. The glutamate AMPA receptor antagonist, YM872, attenuates cortical tissue loss, regional cerebral edema, and neurological motor deficits after experimental brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2003; **20**: 269-78.
82. Orrenius S, Ankarcróna M, Nicotera P. Mechanisms of calcium-related cell death. *Adv Neurol* 1996; **71**: 137-49; discussion 49-51.
83. Nellgard B, Wieloch T. Postischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following transient severe cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; **12**: 2-11.
84. Matute C, Sanchez-Gomez MV, Martinez-Millan L, Miledi R. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 8830-5.
85. Park E, Liu Y, Fehlings MG. Changes in glial cell white matter AMPA receptor expression after spinal cord injury and relationship to apoptotic cell death. *Exp Neurol* 2003; **182**: 35-48.
86. Schuettauf F, Naskar R, Vorwerk CK, Zurakowski D, Dreyer EB. Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 4313-6.
87. Sucher NJ, Aizenman E, Lipton SA. N-methyl-D-aspartate antagonists prevent kainate neurotoxicity in rat retinal ganglion cells in vitro. *J Neurosci* 1991; **11**: 966-71.
88. Billups B, Attwell D. Modulation of non-vesicular glutamate release by pH. *Nature* 1996; **379**: 171-4.
89. Li S, Mealing GA, Morley P, Stys PK. Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport. *J Neurosci* 1999; **19**: RC16.
90. Zeevalk GD, Nicklas WJ. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg<sup>2+</sup> block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem* 1992; **59**: 1211-20.
91. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* 2005; **75**: 207-46.
92. Calabresi P, Picconi B, Saulle E, Centonze D, Hainsworth AH, Bernardi G. Is pharmacological neuroprotection dependent on reduced glutamate release? *Stroke* 2000; **31**: 766-72; discussion 73.
93. Honkanen RA, Baruah S, Zimmerman MB, Khanna CL, Weaver YK, Narkiewicz J, Waziri R, Gehrs KM, Weingeist TA, Boldt HC, Folk JC, Russell SR, Kwon YH. Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 2003; **121**: 183-8.
94. Wakabayashi Y, Yagihashi T, Kezuka J, Muramatsu D, Usui M, Iwasaki T. Glutamate levels in aqueous humor of patients with retinal artery occlusion. *Retina* 2006; **26**: 432-6.
95. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; **330**: 613-22.
96. Hare W, WoldeMussie E, Lai R, Ton H, Ruiz G, Feldmann B, Wijono M, Chun T, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open-

channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey. *Surv Ophthalmol* 2001; **45 Suppl 3**: S284-9; discussion S95-6.

97. Hare WA, WoldeMussie E, Lai RK, Ton H, Ruiz G, Chun T, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, I: Functional measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 2625-39.

98. Hare WA, WoldeMussie E, Weinreb RN, Ton H, Ruiz G, Wijono M, Feldmann B, Zangwill L, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, II: Structural measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 2640-51.

99. Flammer J, Orgul S. Optic nerve blood-flow abnormalities in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 1998; **17**: 267-89.

100. Gescher AJ, Steward WP. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; **12**: 953-7.

101. Naskar R, Vorwerk CK, Dreyer EB. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 1940-4.

102. Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci* 1994; **17**: 359-65.

103. Zhang L, Rzigalinski BA, Ellis EF, Satin LS. Reduction of voltage-dependent Mg<sup>2+</sup> blockade of NMDA current in mechanically injured neurons. *Science* 1996; **274**: 1921-3.

104. Arundine M, Chopra GK, Wrong A, Lei S, Aarts MM, MacDonald JF, Tymianski M. Enhanced vulnerability to NMDA toxicity in sublethal traumatic neuronal injury in vitro. *J Neurotrauma* 2003; **20**: 1377-95.

105. Furukawa Y, Okada M, Akaike N, Hayashi T, Nabekura J. Reduction of voltage-dependent magnesium block of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated current by in vivo axonal injury. *Neuroscience* 2000; **96**: 385-92.

106. Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JK, Hart RT. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res* 2005; **24**: 39-73.

107. Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Allah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacol Res* 2003; **48**: 461-5.

108. Tezel G, Wax MB. The immune system and glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; **15**: 80-4.

109. Castagne V, Gautschi M, Lefevre K, Posada A, Clarke PG. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Prog Neurobiol* 1999; **59**: 397-423.

110. Rojas JC, John JM, Lee J, Gonzalez-Lima F. Methylene blue provides behavioral and metabolic neuroprotection against optic neuropathy. *Neurotox Res*

2009; **15**: 260-73.

111. Munemasa Y, Ahn JH, Kwong JM, Caprioli J, Piri N. Redox proteins thioredoxin 1 and thioredoxin 2 support retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Gene Ther* 2009; **16**: 17-25.

112. 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**: 687-98.

113. Russo R, Cavaliere F, Rombola L, Gliozzi M, Cerulli A, Nucci C, Fazzi E, Bagetta G, Corasaniti MT, Morrone LA. Rational basis for the development of coenzyme Q10 as a neurotherapeutic agent for retinal protection. *Prog Brain Res* 2008; **173**: 575-82.

114. 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.

115. Weber AJ, Kaufman PL, Hubbard WC. Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 2304-20.

116. Johnson EC, Guo Y, Cepurna WO, Morrison JC. Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp Eye Res* 2009; **88**: 808-15.

117. Caprioli J. Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 1997; **75**: 364-7.

118. Huang X, Wu DY, Chen G, Manji H, Chen DF. Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 347-54.

119. Schwartz M. Neuroprotection as a treatment for glaucoma: pharmacological and immunological approaches. *Eur J Ophthalmol* 2003; **13 Suppl 3**: S27-31.

120. Frisen L. High-pass resolution perimetry and age-related loss of visual pathway neurons. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991; **69**: 511-5.

121. Girkin CA. Strategies for neuroprotection. *J Glaucoma* 2001; **10**: S78-80.

122. Schwartz M. Optic nerve crush: protection and regeneration. *Brain Res Bull* 2004; **62**: 467-71.

123. Ma ZH, Ma QY. Resveratrol: a medical drug for acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; **11**: 3171-4.

124. Örnek K. , Turaçlı E. Glokomda nöron korunması. *T Klin Oftalmoloji* 2000; **9**: 274-80.

125. Harvey PJ, Li Y, Li X, Bennett DJ. Persistent sodium currents and repetitive firing in motoneurons of the sacrocaudal spinal cord of adult rats. *J Neurophysiol* 2006; **96**: 1141-57.

126. Miles GB, Dai Y, Brownstone RM. Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J Physiol* 2005; **566**: 519-32.

127. Theiss RD, Kuo JJ, Heckman CJ. Persistent inward currents in rat ventral horn neurones. *J Physiol* 2007; **580**: 507-22.

128. Festoff BW, Suo Z, Citron BA. Prospects for the pharmacotherapy of amyotrophic lateral sclerosis : old strategies and new paradigms for the third

- millennium. *CNS Drugs* 2003; **17**: 699-717.
129. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Dupont H, Widmann C, Lazdunski M. Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J Vasc Surg* 2000; **32**: 179-89.
130. Wahl F, Stutzmann JM. Neuroprotective effects of riluzole in neurotrauma models: a review. *Acta Neurochir Suppl* 1999; **73**: 103-10.
131. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 1996; **47**: S233-41.
132. Azbill RD, Mu X, Springer JE. Riluzole increases high-affinity glutamate uptake in rat spinal cord synaptosomes. *Brain Res* 2000; **871**: 175-80.
133. Urenjak J, Obrenovitch TP. Pharmacological modulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage. *Pharmacol Rev* 1996; **48**: 21-67.
134. Jehle T, Bauer J, Blauth E, Hummel A, Darstein M, Freiman TM, Feuerstein TJ. Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br J Pharmacol* 2000; **130**: 1227-34.
135. Hubert JP, Delumeau JC, Glowinski J, Premont J, Doble A. Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. *Br J Pharmacol* 1994; **113**: 261-7.
136. Wang SJ, Wang KY, Wang WC. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 2004; **125**: 191-201.
137. Centonze D, Calabresi P, Pisani A, Marinelli S, Marfia GA, Bernardi G. Electrophysiology of the neuroprotective agent riluzole on striatal spiny neurons. *Neuropharmacology* 1998; **37**: 1063-70.
138. Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Differential inhibition by riluzole, lamotrigine, and phenytoin of sodium and calcium currents in cortical neurons: implications for neuroprotective strategies. *Exp Neurol* 1997; **147**: 115-22.
139. Benoit E, Escande D. Riluzole specifically blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibre. *Pflugers Arch* 1991; **419**: 603-9.
140. Urenjak J, TP O. Pharmacological modulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels by riluzole: an alternative to antiexcitotoxic actions. 1997; **8**: 237-46.
141. O'Neill MJ, Bath CP, Dell CP, Hicks CA, Gilmore J, Ambler SJ, Ward MA, Bleakman D. Effects of Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channel inhibitors in vitro and in global cerebral ischaemia in vivo. *Eur J Pharmacol* 1997; **332**: 121-31.
142. Lesage F. Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 2003; **44**: 1-7.
143. Mizuta I, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E, Kuno S. Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes. *Neurosci Lett* 2001; **310**: 117-20.
144. Janis LS, Stein DG. Intraseptal injections of NGF attenuates edema formation following septal lesions in the rat. *Neurosci Lett* 1996; **214**: 21-4.
145. Pratt J, Archambaud C, Bohme GA, Roux M, Rataud J, Imperato A,

- Stutzmann JM. The effect of riluzole and mannitol on cerebral oedema after cryogenic injury in the mouse. *Neurosci Lett* 1999; **272**: 143-5.
146. Mu X, Azbill RD, Springer JE. Riluzole improves measures of oxidative stress following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 2000; **870**: 66-72.
147. Noh KM, Hwang JY, Shin HC, Koh JY. A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C. *Neurobiol Dis* 2000; **7**: 375-83.
148. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000; **66**: 663-73.
149. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 493-506.
150. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 1997; **30**: 91-113.
151. W. C. de Baat. Sur l'acide dithionique et ses sels. *Recl Trav Chim Pays-Bas*, 1926; **45**: 237.
152. Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **302**: 369-73.
153. Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006; **142**: 317-27.
154. Wolter F, Ulrich S, Stein J. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in colorectal cancer: key role of polyamines? *J Nutr* 2004; **134**: 3219-22.
155. Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* 2003; **17**: 1975-85.
156. Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**: 482-94.
157. Sharpe PC, McGrath LT, McClean E, Young IS, Archbold GP. Effect of red wine consumption on lipoprotein (a) and other risk factors for atherosclerosis. *QJM* 1995; **88**: 101-8.
158. Ignatowicz E, Baer-Dubowska W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol* 2001; **53**: 557-69.
159. Aziz MH, Kumar R, Ahmad N. Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (review). *Int J Oncol* 2003; **23**: 17-28.
160. Garvin S, Ollinger K, Dabrosin C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Lett* 2006; **231**: 113-22.
161. Bentzon JF, Skovenborg E, Hansen C, Moller J, de Gaulejac NS, Proch J, Falk E. Red wine does not reduce mature atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001; **103**: 1681-7.
162. Chopra M, Fitzsimons PE, Strain JJ, Thurnham DI, Howard AN. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without

- affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin Chem* 2000; **46**: 1162-70.
163. Chanvitayapongs S, Draczynska-Lusiak B, Sun AY. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport* 1997; **8**: 1499-502.
164. Ahmad A, Syed FA, Singh S, Hadi SM. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol Lett* 2005; **159**: 1-12.
165. Burkitt MJ, Milne L. Hydroxyl radical formation from Cu(II)-trolox mixtures: insights into the pro-oxidant properties of alpha-tocopherol. *FEBS Lett* 1996; **379**: 51-4.
166. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 1998; **392**: 559.
167. Win W, Cao Z, Peng X, Trush MA, Li Y. Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro. *Mutat Res* 2002; **513**: 113-20.
168. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002; **177**: 91-104.
169. Tamba M, Simone G, Quintiliani M. Interactions of thiyl free radicals with oxygen: a pulse radiolysis study. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986; **50**: 595-600.
170. Miller DC. Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. *Arch Pathol Lab Med* 1998; **122**: 949.
171. 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.
172. 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.
173. Gupta N, Yucel YH. Glaucoma in the brain: a piece of the puzzle. *Can J Ophthalmol* 2006; **41**: 541-2.
174. 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.
175. 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.
176. 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.
177. 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.
178. Guo L, Salt TE, Maass A, Luong V, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF.



Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 626-33.

179. 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.

180. 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.

181. 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.

182. Ritch R. Neuroprotection: is it already applicable to glaucoma therapy? *Curr Opin Ophthalmol* 2000; **11**: 78-84.

183. Lipton SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 160-70.

184. Bryson HM, Fulton B, Benfield P. Riluzole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs* 1996; **52**: 549-63.

185. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 1999; **81**: 163-221.

186. MacIver MB, Amagasa SM, Mikulec AA, Monroe FA. Riluzole anesthesia: use-dependent block of presynaptic glutamate fibers. *Anesthesiology* 1996; **85**: 626-34.

187. Benazzouz A, Boraud T, Dubedat P, Boireau A, Stutzmann JM, Gross C. Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study. *Eur J Pharmacol* 1995; **284**: 299-307.

188. Barneoud P, Mazadier M, Miquet JM, Parmentier S, Dubedat P, Doble A, Boireau A. Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience* 1996; **74**: 971-83.

189. Boireau A, Dubedat P, Bordier F, Imperato A, Moussaoui S. The protective effect of riluzole in the MPTP model of Parkinson's disease in mice is not due to a decrease in MPP(+) accumulation. *Neuropharmacology* 2000; **39**: 1016-20.

190. Ates O, Cayli SR, Gurses I, Turkoz Y, Tarim O, Cakir CO, Kocak A. Comparative neuroprotective effect of sodium channel blockers after experimental spinal cord injury. *J Clin Neurosci* 2007; **14**: 658-65.

191. Dagci T, Yilmaz O, Taskiran D, Peker G. Neuroprotective agents: is effective on toxicity in glial cells? *Cell Mol Neurobiol* 2007; **27**: 171-7.

192. Mary V, Wahl F, Stutzmann JM. Effect of riluzole on quinolinate-induced neuronal damage in rats: comparison with blockers of glutamatergic neurotransmission. *Neurosci Lett* 1995; **201**: 92-6.

193. Kanthasamy AG, Yun RJ, Nguyen B, Truong DD. Effect of riluzole on the neurological and neuropathological changes in an animal model of cardiac arrest-induced movement disorder. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **288**: 1340-8.

194. Palfi S, Riche D, Brouillet E, Guyot MC, Mary V, Wahl F, Peschanski M,

- Stutzmann JM, Hantraye P. Riluzole reduces incidence of abnormal movements but not striatal cell death in a primate model of progressive striatal degeneration. *Exp Neurol* 1997; **146**: 135-41.
195. Guyot MC, Palfi S, Stutzmann JM, Maziere M, Hantraye P, Brouillet E. Riluzole protects from motor deficits and striatal degeneration produced by systemic 3-nitropropionic acid intoxication in rats. *Neuroscience* 1997; **81**: 141-9.
196. 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.
197. Chang G, Guo Y, Jia Y, Duan W, Li B, Yu J, Li C. Protective effect of combination of sulforaphane and riluzole on glutamate-mediated excitotoxicity. *Biol Pharm Bull* 2010; **33**: 1477-83.
198. Janahmadi M, Goudarzi I, Kaffashian MR, Behzadi G, Fathollahi Y, Hajizadeh S. Co-treatment with riluzole, a neuroprotective drug, ameliorates the 3-acetylpyridine-induced neurotoxicity in cerebellar Purkinje neurones of rats: behavioural and electrophysiological evidence. *Neurotoxicology* 2009; **30**: 393-402.
199. Siciliano G, Carlesi C, Pasquali L, Piazza S, Pietracupa S, Fornai F, Ruggieri S, Murri L. Clinical trials for neuroprotection in ALS. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; **9**: 305-13.
200. Lagreze WA, Otto T, Feuerstein TJ. [Neuroprotection in ischemia of the retina in an animal model]. *Ophthalmology* 1999; **96**: 370-4.
201. 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.
202. 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.
203. 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.
204. Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, Chen CF. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci Lett* 2001; **305**: 139-42.
205. 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.
206. 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.
207. Martin KR, Quigley HA. Gene therapy for optic nerve disease. *Eye (Lond)*

2004; **18**: 1049-55.

208. 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.

209. Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, Osswald I, Sapielha P, Bourgeois P, Dickson K, Bowie D, Barker PA, Di Polo A. Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci* 2009; **29**: 5536-45.

210. Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI. Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 2006; **26**: 12633-41.

211. Fu QL, Hu B, Wu W, Pepinsky RB, Mi S, So KF. Blocking LINGO-1 function promotes retinal ganglion cell survival following ocular hypertension and optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**: 975-85.

212. 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.

213. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Zack DJ, Pease ME, Valenta DF. A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 3388-93.

214. 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.

215. Carriedo SG, Yin HZ, Sensi SL, Weiss JH. Rapid Ca<sup>2+</sup> entry through Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA/Kainate channels triggers marked intracellular Ca<sup>2+</sup> rises and consequent oxygen radical production. *J Neurosci* 1998; **18**: 7727-38.

216. Rao SD, Yin HZ, Weiss JH. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *J Neurosci* 2003; **23**: 2627-33.

217. Ettaiche M, Fillacier K, Widmann C, Heurteaux C, Lazdunski M. Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; **40**: 729-36.

218. Olney JW. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 1969; **28**: 455-74.

219. Xu L, Enyeart JA, Enyeart JJ. Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of Kv1.4 potassium channels by a voltage-dependent oxidative mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **299**: 227-37.

220. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 2004; **129**: 1021-9.

221. Ritch R. Potential role for Ginkgo biloba extract in the treatment of glaucoma. *Med Hypotheses* 2000; **54**: 221-35.

222. Valenzano DR, Cellierino A. Resveratrol and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old molecule. *Cell Cycle* 2006; **5**: 1027-32.
223. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; **444**: 337-42.
224. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007; **404**: 1-13.
225. Shigematsu S, Ishida S, Hara M, Takahashi N, Yoshimatsu H, Sakata T, Korthuis RJ. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radic Biol Med* 2003; **34**: 810-7.
226. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993; **341**: 1103-4.
227. Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 2004; **305**: 1010-3.
228. Lu KT, Chiou RY, Chen LG, Chen MH, Tseng WT, Hsieh HT, Yang YL. Neuroprotective effects of resveratrol on cerebral ischemia-induced neuron loss mediated by free radical scavenging and cerebral blood flow elevation. *J Agric Food Chem* 2006; **54**: 3126-31.
229. Losa GA. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest* 2003; **33**: 818-23.
230. Doganay S, Borazan M, Iraz M, Cigremis Y. The effect of resveratrol in experimental cataract model formed by sodium selenite. *Curr Eye Res* 2006; **31**: 147-53.
231. Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, Kuo L. Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: 4232-9.
232. Luna C, Li G, Liton PB, Qiu J, Epstein DL, Challa P, Gonzalez P. Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Food Chem Toxicol* 2009; **47**: 198-204.
233. Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdager E, Folch J, Beas-Zarate C, Pallas M. An overview of investigational antiapoptotic drugs with potential application for the treatment of neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; **19**: 587-604.
234. Pallas M, Casadesus G, Smith MA, Coto-Montes A, Pelegri C, Vilaplana J, Camins A. Resveratrol and neurodegenerative diseases: activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection. *Curr Neurovasc Res* 2009; **6**: 70-81.
235. Shindler KS, Ventura E, Rex TS, Elliott P, Rostami A. SIRT1 activation confers neuroprotection in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: 3602-9.
236. Della-Morte D, Dave KR, DeFazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon

- MA. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience* 2009; **159**: 993-1002.
237. Wang J, Ho L, Zhao Z, Seror I, Humala N, Dickstein DL, Thiyagarajan M, Percival SS, Talcott ST, Pasinetti GM. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2006; **20**: 2313-20.
238. 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.
239. 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.
240. Levkovitch-Verbin H, Harris-Cerruti C, Groner Y, Wheeler LA, Schwartz M, Yoles E. RGC death in mice after optic nerve crush injury: oxidative stress and neuroprotection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 4169-74.
241. Tezel G, Wax MB. Hypoxia-inducible factor 1alpha in the glaucomatous retina and optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 2004; **122**: 1348-56.
242. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 2003; **85**: 1394-401.
243. Orallo F. Trans-resveratrol: a magical elixir of eternal youth? *Curr Med Chem* 2008; **15**: 1887-98.
244. Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, Delalle I, Baur JA, Sui G, Armour SM, Puigserver P, Sinclair DA, Tsai LH. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 2007; **26**: 3169-79.
245. Anekonda TS. Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 2006; **52**: 316-26.
246. 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.
247. Grieshaber MC, Flammer J. Blood flow in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2005; **16**: 79-83.
248. Mozaffarieh M, Grieshaber MC, Orgul S, Flammer J. The potential value of natural antioxidative treatment in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2008; **53**: 479-505.
249. 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.
250. Chen CM, Lin JK, Liu SH, Lin-Shiau SY. Novel regimen through combination of memantine and tea polyphenol for neuroprotection against brain excitotoxicity. *J Neurosci Res* 2008; **86**: 2696-704.
251. Anderson RS, O'Brien C. Psychophysical evidence for a selective loss of M ganglion cells in glaucoma. *Vision Res* 1997; **37**: 1079-83.
252. Ransom B, Behar T, Nedergaard M. New roles for astrocytes (stars at last).

*Trends Neurosci* 2003; **26**: 520-2.

253. Osborne NN, Melena J, Chidlow G, Wood JP. A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2001; **85**: 1252-9.

254. Galou M, Gao J, Humbert J, Mericskay M, Li Z, Paulin D, Vicart P. The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. *Biol Cell* 1997; **89**: 85-97.

255. Balaratnasingam C, Morgan WH, Bass L, Ye L, McKnight C, Cringle SJ, Yu DY. Elevated pressure induced astrocyte damage in the optic nerve. *Brain Res* 2008; **1244**: 142-54.

256. Lam TT, Kwong JM, Tso MO. Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 638-45.

257. Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML. Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 977-85.

258. Woldemussie E, Wijono M, Ruiz G. Muller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* 2004; **47**: 109-19.

259. Huang W, Fileta JB, Filippopoulos T, Ray A, Dobberfuhr A, Grosskreutz CL. Hsp27 phosphorylation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: 4129-35.

260. Inman DM, Horner PJ. Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia* 2007; **55**: 942-53.