

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**FARE GÖZÜNDE DENEYSEL OLARAK ENDOTOKSİNLE
OLUŞTURULAN ÜVEİT MODELİNDE ENDOTELİN
PEPTİDLERİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

DR. HASAN ALİ TUFAN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MERAL OR

ANKARA-2008

TEŞEKKÜR

Oftalmoloji eğitimi ve disiplinini kazanmamdaki değerli katkılarından dolayı tüm hocalarıma; tezimi hazırlamada her aşamada göstermiş oldukları yardım ve destek için tez danışmanım Prof. Dr. Meral Or'a; bu çalışmanın yürütülmesi için gerekli maddeleri, laboratuvar şartlarını ve fikirleri sağlayan Gazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Sevim Ercan'a; Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Doç. Dr. Ümit Bağrıaçık'a ve histopatolojik değerlendirmelerdeki katkılarından dolayı Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anabilim Dalı'ndan sayın Doç. Dr. Oğuz Kul'a teşekkürü borç biliyorum.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ.....	4
GENEL BİLGİLER	
Üveitler.....	6
Üveal İmmünoloji.....	12
İntraoküler Enflamasyon Mekanizmaları.....	16
Deneysel Üveit Modelleri.....	18
Endotelin Peptidler.....	22
Araşidonik Asit Metabolitleri.....	31
Nitrik Oksit	34
GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
BULGULAR.....	46
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
ÖZET.....	63
İNGİLİZCE ÖZET.....	67
KAYNAKLAR.....	70

GİRİŞ

Üveit, primer olarak üveal dokunun (iris, silier cisim ve koroid) etkilendiği, aynı zamanda çevre dokuların da (vitreus, retina, optik sinir) iştirak edebildiği, görmeyi tehdit eden intraoküler enflamasyondur.

Üveit, genel olarak 20-50 yaş arası popülasyonu etkileyen ve 14-52/100,000 insidansla görülen bir hastalık olup son 10 yılda görülme sıklığı 40 yıl öncesine göre 3 kat artmıştır (1, 2). Kistoid makula ödemi, katarakt, glokom gibi ciddi sekellere neden olan üveit gelişmiş ülkelerde legal körlüklerin %5-20 gibi önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Orta yaş grubunu etkilemesi üveiti aynı zamanda sosyoekonomik bir problem haline de getirmektedir. Enfeksiyöz ve otoimmün mekanizmalar dışında günümüzde halen hastalığın patogenezi ile ilgili sınırlı bilgiye sahibiz. Bu nedenle intraoküler enflamasyon fizyopatolojisini anlamaya ve tedavisini geliştirmeye yönelik çalışmalar halen devam etmektedir.

Endotoksinle indüklenen üveit (EIU); deney hayvanlarına çeşitli yollarla (intravenöz, intraperitoneal, intravitreal) sublethal dozda lipopolisakkarid (LPS) verilmesiyle genelde 24 saat sonra ortaya çıkan göze lokalize enflamatuvar cevapla karakterize akut fakat geçici bir olaydır. İlk olarak Lewis ratlarında gösterilmesine rağmen bugün birçok hayvana uygulanabilmektedir. EIU bir akut ön üveit modeli olup bu hastalığın hem patofizyolojisinin değerlendirilmesinde hem de potansiyel tedavi seçeneklerinin araştırılmasında kullanılmaktadır (3).

1988 yılında Yanagisawa ve arkadaşları tarafından domuz aorta endotelinden izole edilen endotelin-1 (ET-1), 21 aminoasitten oluşan bir nöropeptid olup bilinen en potent vasokonstrüktör maddedir. Makrofajlar, astrositler ve endotelyal hücrelerce endojen olarak üretilmektedir. ET-1, embriyogenez ve hemostaz gibi hayati olaylarda esansiyel olup gözde de çeşitli olaylarda rol almaktadır.

Endotelin-1'in göz üzerine olan etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda belli başlı bazı özellikler ön plana çıkmaktadır. Bu etkiler; göz içi basıncı, pupil çapı, koryo-retinal dolaşım, korneal endotel ve epitel, aköz protein konsantrasyonu ve intraoküler enflamasyon üzerindeki değişikliklerdir.

EIU modelinde, aköz ve serum ET-1 düzeyinin yükseldiği izlenmiş ve ET-1'in üveit gelişiminde önemli bir mediatör olduğu belirtilmiştir. ET-1'in oküler enflamasyonda araşidonik asit yolu üzerinden etki ettiği ve bu etkinin non-selektif siklooksijenaz (COX) inhibitörleri (indometazin, diklofenak) ile engellenebildiği izlenmiştir. Oküler enflamasyon gelişiminde rol oynayan bir diğer önemli mediatör de nitrik oksittir (NO). Gerek ET-1 gerekse NO endotel kaynaklı olup pek çok fizyolojik olayda birbirleriyle belirli bir uyum içinde sentez edilmekte ve salıverilmektedir. EIU modelinde, tüm bu bahsi geçen mediatörlerin kan-aköz bariyerinde oluşturduğu hasarın ortak sonucu olarak humor aköz (HA) protein konsantrasyonu artmaktadır.

Bu çalışmada:

1. Farelerde endotoksinle oluşturulan üveit modelinde serum ve HA ET-1 düzeyinde ve HA protein konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikler ile histopatolojik değişiklikler,
2. Sistemik yolla uygulanan ET-1 reseptör antagonistlerinin, COX ve NO sentaz enzim inhibitörlerinin üveit tablosundaki etkileri araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Üveitler

Üvea sözcük olarak, Yunanca'da üzüm anlamına gelen “uva”dan gelmekte olup gözün kanlanmasını sağlayan iris, silier cisim ve koroid dokularını tanımlamaktadır. Üveit ise üvea dokusunun enflamatuvar hastalığı olarak tanımlanabilir. Üveit terimi günümüzde sadece üveayı değil aynı zamanda komşuluğunda bulunan dokuları (vitreus, retina, optik disk) da tutan birçok intraoküler enflamasyonu tanımlamaktadır.

Hastalığın anatomik lokalizasyonu, kliniği, etyolojisi ve patolojisi göz önünde bulundurularak çeşitli üveit sınıflamaları yapılabilmektedir.

Anatomik Sınıflama

- a) Anterior (ön) üveit
- b) İntermediate (orta) üveit
- c) Posterior (arka) üveit
- d) Panüveit

Klinik Sınıflama

- a) Akut üveit
- b) Kronik üveit

Etyolojik Sınıflama

- a) Ekzojen
- b) Endojen

1-Sistemik hastalıklara sekonder: Ankilozan spondilit, Tbc, sarkoidoz

2-Parazitik: Toksoplazma, toksokara

3-Viral: CMV, Herpes Simpleks

4-Fungal: Kandidiazis

- c) İdiopatik-spesifik üveitler
- d) İdiopatik-nonspesifik üveitler

Patolojik Sınıflama

- a) Granülomatoz
- b) Non-granülomatoz

Literatürde en sık yapılan sınıflandırma, inflamasyonun yerleştiği anatomik bölgeye göre yapılan sınıflandırmadır (4). Ancak çoğu hastalık, seyri sırasında birbirinin içine geçen bulgularla seyretmekte, bu da sınıflandırmada

güçlükler doğurmaktadır. Üveit tablosunun tanı, takip ve tedavisinde böyle bir sınıflama faydalı olsa da, bu sınıflamaların kesin sınırlarla birbirlerinden ayırlamadığı bilinmelidir (5).

Ön Üveitler

Primer olarak iris ve silier cismin ön kısmının tutulduğu üveittir. Ön üveitin belirti ve bulguları:

Ağrı: Periorbital alanda lokalize olan ağrı, silier cismin spazmına bağlı gelişmektedir. Ağrının şiddeti, silier tutulum ile doğru orantılı olup silier spazmı ve akomodasyonu engelleyen sikloplejiklerle azalmaktadır.

Fotofobi ve Lakrimasyon: Fotofobi, ışığın neden olduğu pupilla hareketine bağlı silier cisim kasılmasıyla ortaya çıkan ağrıdır. Lakrimasyon ise trigeminal irritasyon sonucudur.

Görme Azalması: Orta şiddette bir görme azalması olmaktadır. Ortamdaki enflamatuar hücre ve flare ile ilişkili bulanıklık olabileceği gibi makula ödemeine bağlı görme azalması olabileceği de akılda tutulmalıdır.

Hiperemi: Histamin, serotonin gibi vazoaaktif mediatörler ön silier arterlerin rekürren dallarında dilatasyona neden olmaktadır. Tipik olarak silier enjeksiyon şeklinde tanımlanır.

Pupiller Değişiklikler ve İris: Enflamasyonda rol alan prostaglandinler yaklaşık %20 oranında pupiller konstriksiyona neden olmaktadır. Herpetik

üveitte sektöryel, heterokromik iridosiklitte diffüz iris depigmentasyonu izlenmektedir. Her iki tip üveitte de ortaya çıkan stromal atrofi pupil değişikliklerine neden olabilir. Granülamatöz üveitlerde iris üzerine yapışan enflamatuar hücre kümelerinin oluşturduğu Busacca ve Koeppe nodülleri izlenebilir.

Keratik Presipitatlar (KP): Ön kamarada, enflamatuar hücreler, iris pigmentleri ve fibrin gibi maddelerin kornea endoteline yapışmasıyla ortaya çıkar. Sıcak olan iris yüzeyinde hızla hareket eden humör aköz (HA) akışkanlığının daha soğuk olan kornea endotel yüzeyinde azalması ile ilişkilidir. Eski KP'ler pigmentli ve soluk görünüme sahipken yeni KP'ler daha açık renklidir. Granülomatöz üveitlerde beyaz-gri renkte, daha iri görünümde (mutton-fat) olabilirler.

Ön Kamara: HA son derece düşük seviyede protein ihtiva eder (10mg/100ml). Kan aköz bariyerinin bozulması sonucu damar dışına protein ve enflamatuar hücre ekstrasvazasyonu meydana gelir. Ön kamara bulanıklığının ve hücresinin değerlendirilmesi 0'dan +4'e doğru tasnif edilir. Artmış HA protein konsantrasyonu bulanık bir manzaraya neden olur (Tyndall fenomeni). Kronik üveitlerde kan aköz bariyerindeki kalıcı hasar bu durumun sebat etmesine neden olur; dolayısıyla akut atak için spesifik bir bulgu sayılamaz.

Lens: Üveite sekonder katarakt gelişimi oldukça sık olup bu duruma hastalığın kendisi veya tedavisinde kullanılan steroidler neden olabilmektedir. Sıklıkla arka kapsüler vasıftadır.

Vitreus: Silier cisim ve koroid enflamasyonunda etkilenen bölgeye komşu vitreusta enflamatuar hücreler görülebilir. Akut enflamasyonda hücreler tek tek veya kümelenmiş halde izlenirken, kronik enflamasyonda kümelenme ve kartopu manzarası izlenebilir.

Göziçi Basıncı (IOP): IOP değerlendirilmesi, üveit tedavisi üzerine odaklanıldığı için sıklıkla ihmal edilmektedir. IOP her muayenede mutlaka ölçülmelidir. Genellikle ön üveitlerde erken dönemde silier cisim enflamasyonuna bağlı IOP düşüşü izlenirken, geç dönemde gelişen trabekülit veya enflamatuar hücrelerce oluşturulan trabeküler blok nedeniyle IOP artışı izlenebilir. Diğer IOP artış nedenlerini anterior sineşiler, pupil bloğu ve steroide hassas kişilerde kullanılan steroid tedavisi oluşturmaktadır.

Orta Üveitler

Esas olarak retina ve koroidin uç perifer noktaları ile silier cismin arka kısmını tutan üveit tipidir. Başta vitreus olmak üzere ön segment, retina, optik disk gibi yapılar da mevcut enflamasyondan etkilenebilmektedir.

Hastalar tipik olarak görmede azalma ve uçuşan noktalar görme (floaters) yakınmasıyla başvurur. Nadiren ağrı, kızarıklık ve fotofobiden yakınırırlar. Ön segment muayenede sakin olup hücre sayısı +2'yi geçmez ve sineşi nadiren görülür. Enflamasyonun şiddetiyle korele vitritis tablosu izlenebilir. Bazen vitreustaki enflamatuar hücreler bir araya gelerek vitreus tabanı ve pars plana bölgesine çökebilir (snow banks). Periferik venüllerde

periflebitik değişiklikler ve pars plana üzerinde gevşek fibrovasküler membranlar izlenebilir. Görme azalmasının en ciddi sebebi olan kistoid makula ödemi (KMÖ) arka segment muayenesinde görmek mümkündür.

Çoğu hastada izole göz hastalığı olarak ortaya çıkan orta üveitler bazen bir sistemik hastalığın göz tutulumu şeklinde ortaya çıkmaktadır. Orta üveit tablosunun eşlik ettiği bu sistemik hastalıklar: Sarkoidoz, Lyme hastalığı, Multiple Sklerozis, Bağ dokusu hastalıkları, Sifiliz, Tüberküloz ve Whipple hastalığıdır.

Arka Üveitler

Vitreus tabanının arka sınırının gerisinde lokalize olan üveit tipidir. Hastalar genellikle görme azalması veya floaters yakınmasıyla başvururlar. Santral bir patoloji görmeyi etkilerken daha periferdeki bir lezyon floaters şikayetine neden olur. Hastalığın bulguları:

Vitreus: Vitreusta enflamatuar hücreler, flare, opasiteler ve sıklıkla arka vitreus dekolmanı (AVD) yer alır. Arka hyaloid üzerinde enflamatuar hücre kümeleri izlenebilir.

Koroid: Koroidit nisbeten belirgin sınırları olan, retina kan damarlarının etkilenmeksizin üzerinden geçtiği, sarı-gri renkte, yama tarzında lezyonlar ile karakterizedir. İnaktif lezyonlar, pigment sınırlara sahip koryoretinal atrofi alanları olarak izlenir.

Retina: Retinit keskin sınırları olmayan, üzerinden geçen retinal damar ayrıntısının seçilemediği, beyaz ve bulanık görünümde enflamatuvar odaklar ile karakterizedir.

Damarlar: Vaskülit arterlere göre venlerin daha sık tutulduğu, damar çeperinde bulanık-beyaz, tüysü görünümün olduğu vasküler enflamasyonla karakterizedir. Ağır periflebitlerde, granüloamatöz doku damar etrafında birikebilmektedir ve bu görünüme “balmumu damlaları” denilmektedir.

Üveal İmmünoloji

Göz, hem oküler yüzey vasıtasıyla dış çevre ile direkt teması olduğu için, hem de iç bölümleri kan kaynaklı patojenlere açık olduğu için sürekli enflamatuvar ajanlara maruz kalır fakat bunların birçoğunu anatomik veya fonksiyonel bütünlüğünde değişim olmaksızın savuşturma kabiliyetine sahiptir.

Üvea, alenfatik globun vasküler mimarisini oluşturmakta olup birçok immunolojik reaksiyon tarafından hedef alınmasına neden olan bazı özelliklere sahiptir. Koroidin bruch membranında ve koroidal stromada oldukça yoğun elastik doku bulunmaktadır. Kimyasal yapı ve fiziksel özellikler bakımından oküler dokular, eklem dokuları ile benzeşmektedir. Bu benzerlikler bazı üveitik sendromlarda her iki dokunun da yer almasını açıklayabilir.

Koroidin homojen temel yapısı, özellikle damarlar etrafında ve interkapiller ile subkapiller bölgelerde büyük miktarda elastik ve kollajen materyal içerir. İnterstisyel doku içerisinde mast hücreleri, plazma hücreleri, lenfositler ve fagositler bulunur. Pek çok melanosit ve fibroblast da damarlarla

birlikte koroidal stromada yer alır. Koriokapillaris RPE'nden ayıran Bruch zarı, besin maddelerini geçirecek ve artık maddeleri uzaklaştıracak yapıdadır. Bileşimi dolayısıyla elastik ve kollajen dokuları etkileyen hastalıkların da hedefi durumundadır. Dış koroid daha büyük damarlara sahip olup ayrıca sinir pleksusları, ganglion hücreler, arterioller, küçük arter ve venüller, melanositler, makrofajlar ile mast hücreleri içerir (6). Koroid mast hücreleri bakımından çok zengin olup diğer tüm dokulardan daha fazla mast hücresi içerir. Mast hücreleri ile üveal fonksiyon arasındaki ilişki net olmayıp bu durumun muhtemelen rekürren üveal enflamasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Üveal doku ile yakın komşuluğu olan vitreus, kandan anatomik izolasyonu ve elektrostatik olarak yüklü proteinleri bağlayabilme özelliği nedeniyle bir antijen deposu işlevi görür. Aynı zamanda lökositlerin bağlanması için substrat olarak davranmaktadır. Vitreusta, eklem dokusundakine benzer şekilde tip 2 kollagen bulunmaktadır.

İris ve silier cisimde bol miktarda antijen sunucu hücreler (makrofajlar ve dentritik hücreler) bulunmakta olup antijenik uyarı ile trabeküler ağdan gözü terk ederek ACAID (anterior chamber associated immun deviation) cevabını oluştururlar. Normal şartlarda ön üveada B lenfosit, eozinofil, polimorfonükleer lökosit (PNL) bulunmamakta ve nadir T lenfosit ve mast hücre izlenmektedir.

HA dolaşımı, özellikle sitokinlerin ve bağışıklık hücrelerinin dolaşması, iris- silier cisim- kornea endoteli arasında iletişimin sağlanması açısından önemlidir. HA, kandakinin %1'i kadar protein bulundursa da ön kamaranın

immün imtiyazında rol alan çeşitli immünsupresif sitokinler, nöropeptidler ve kompleman inhibitörleri bulundurmaktadır.

Ön kamarada oluşan bir enflamatuvar yanıt, vücudun diğer bölgelerinde olduğu gibi meydana gelseydi belki enflamatuvar etken hızlı ve şiddetli bir cevap ile etkin bir şekilde gözden uzaklaştırılacaktı ancak oluşan şiddetli enflamatuvar yanıt yerel dokulara çok fazla hasar verecek ve gözde önemli fonksiyonel kayba neden olabilecekti. Bunu önlemek için vücutta, sadece ön kamaraya özgü ve normal bağışık yanıtın by-pass edilerek daha sessiz ama etkin olmasını sağlayan bir yol gelişmiştir. Ön kamaradaki bir antijen, bağışıklık sistemine lenfatik yol yerine Schlemm kanalı yoluyla sunulmaktadır. Bu durumda ise hümmoral immünitenin baskın olduğu ve hücressel immünitenin zayıf kaldığı bir immünolojik sapkın yanıt oluşmaktadır. Sonuç olarak ACAID, yani kompleman fikse edici antikor sentezleyen B hücrelerinin ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonuna aracılık eden T hücrelerinin inhibe edildiği, kompleman fikse etmeyen antikor sentezleyen B hücrelerinin ve sitotoksik T hücrelerinin ise desteklendiği ve ek olarak dalak kaynaklı T regülatuar lenfositler ile karakterize bir immünite hali ortaya çıkar. Böylece seçici immün yanıt oluşurken görme korunur (7).

Üvea, dört tip aşırı duyarlılık reaksiyon tipini de gerçekleştirebilir. Oluşan cevabın histopatolojik tipi pek çok faktöre bağlıdır; antijenin kimyasal yapısı, dozu, verilme şekli.

Üveal aşırı duyarlılık reaksiyonları şu şekilde gelişebilir:

Tip I Anafilaktoid Reaksiyon

Üveada bol miktarda mast hücresi bulunmasına rağmen anafilaktoid reaksiyona nadiren rastlanır. Ön kamara ve siliyer cisimde, saniyeler ve dakikalar içinde başlayan nötrofil infiltrasyonu ile karakterizedir. Deneysel olarak domuz vitresine *Ascaris Suum* larvası enjeksiyonu ile oküler anafilaksi yaratılmıştır.

Tip II Sitotoksik Reaksiyon

Antikorum bağlandığı organ veya hücrelerde etkili olan ve hücre zarı antijenlerine yönelik antikorum kompleman sistemini etkinleştirdiği, sınırlı selektif hasarlandırıcı bir hipersensitivite reaksiyonudur. IgG ve IgM sorumludur. Antikor, antijene Fab bölgesi yolu ile bağlanır ve Fc bölgesi yolu ile komplemana bir köprü görevi yapar ve sonuç olarak kompleman aracılı bir lizis görülür.

Deneysel olarak ACAID veya üveit yaratmak amacıyla çeşitli intraoküler enflamasyon modelleri yaratılmıştır. Laboratuvar hayvanlarının üveal doku veya üveal ya da retinal antijen ile immünizasyonu, bakteriyel lipopolisakkaritin enjeksiyonu veya sempatik oftalmi için deneysel hayvan modeli yaratmak amacıyla uzun yıllardır uygulanmaktadır.

Tip III İmmün Kompleks Reaksiyonu

Üveal enflamasyonların oluşumunda en önemli faktörlerden biri Arthus reaksiyonudur. Antijen-antikor kompleksleri, Behçet hastalığının tıkkayıcı

vaskülit, toksoplazma retinokoroiditinde görülen periarteryel eksudalar ve gözü etkileyen çeşitli romatoid durumlarda yer alırlar. Tipik Arthus reaksiyonu, 24 saat içinde zirveye ulaşan ve sonra aniden yatışan akut fibrinöz hemorajik üveit ile karakterizedir.

Tip IV Hücresel immün Reaksiyon

Vogt-Koyanagi-Harada Sendromu, sarkoidoz ve sempatik oftalmi gibi pek çok üveit tipinde gecikmiş aşırı duyarlılık cevapları rol oynamaktadır. Ek olarak toksoplazmosis, tuberküloz, lepra ve herpes simpleks enfeksiyonları gibi bazı enfeksiyöz üveitlerde de hücresel immünite önemlidir. Mikroskopik olarak üvea mononükleer hücrelerin ve daha az sayıdaki nötrofilin yoğun işgali altındadır. Ayrıca kornea, sklera ve retina da tutulmuş olabilir.

İntraoküler Eflamasyon Mekanizmaları

İntraoküler enflamasyonlar travma, enfeksiyon gibi eksojen nedenlerle veya büyük çoğunluğunu otoimmün mekanizmaların oluşturduğu endojen yolla gelişebilir. Otoimmun mekanizmalarla oluşan üveitlerin patogenezi henüz tam aydınlatılamamıştır. Gözün dış yüzü koruyucu ve immünolojik bir bariyer olan konjonktiva ile iç kısmı ise ön kamara ve retinaya makromoleküllerin girmesini önleyen vasküler yapıya sahip kan göz bariyeriyle sarılmıştır. Kan-aköz bariyeri nonpigmente epitel hücreleri arasındaki zonula occludens ve iris damarlarındaki endotel tarafından oluşturulmaktadır.

İnflamasyon gözde kan-aköz ve kan-retina bariyerinin kırılmasına neden olarak geçirgenlik artışına yol açar. Bu durum, enflamatuar hücrelerin ve makromoleküllerin ön kamaraya geçişine neden olmaktadır. Enflamatuar hücrelerce salınan sitokin ve kemokinler daha fazla hücrenin bölgeye gelmesine ve enflamasyonun şiddetlenmesine yol açar. Kan aköz bariyerinin kırılması intraoküler enflamatuar olaylarda en önde gelen etkilerden biridir. Örneğin endotoksin enjeksiyonunu takiben 1-6 saat içinde kan aköz bariyerinin bozulduğu ve HA protein konsantrasyon artışı olduğu izlenmiştir. Bu olay birkaç gün göz içine hücre akışına neden olur.

Deneysel üveitlerin immunohistolojik incelemelerinde enflamasyonun erken döneminde baskın hücre tipini T hücrelerin oluşturduğu, bununla birlikte makrofaj ve lökosit gibi diğer enflamatuar hücrelerin de göç ettiği izlenmiştir. Enflamatuar hücrelerden, bu hücreler arasındaki iletişimden sorumlu polipeptidler olan sitokinler (IL-1, IL-6, IL12, TNF- α , TGF- β , interferon- γ) salınmaktadır (8). Sitokinlerin etkisi ile kan aköz engeli hızla bozulmakta ve göz içine lökosit göçü ve protein sızıntısı hızla artmaktadır. Bölgeye göç eden lenfositler ve lökositler vasküler endotele 'intercellular adhesion molecule' (ICAM-1) aracılığı ile yapışmaktadır.

Deneysel Üveit Modelleri

İntraokuler enflamasyonda birbiriyle bağlantılı pek çok enflamatuvar olayın iç içe geçmiş olması hastalığın patogenezinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Üveit patogenezindeki bu karmaşık mekanizmaların aydınlatılması ve yeni terapötik ajanların geliştirilmesi için yakın geçmişte hayvanlarda deneyel üveit modelleri geliştirilmiştir.

Endotoksinle indüklenen üveit (EIU)

Endotoksin

Endotoksin terimi, ilk olarak 1904 yılında Pfeiffer tarafından tanımlanmış olup ‘bakteriyal lizis sırasında salınan ve ısıya dayanıklı toksinler’ için kullanılmıştır (9). Endotoksinin saf kimyasal formuna lipopolisakkarit (LPS) denilmektedir.

Gram negatif bakteri duvarı, protein ve fosfolipidden oluşan iç duvar ve özgül bir yapıya sahip dış duvardan oluşmaktadır. Endotoksin, gram negatif bakteri dış duvarının temel komponentini oluşturmakta olup dış duvarın fiziksel bütünlüğü ve fonksiyonu için esansiyeldir (10) LPS, heterejon glukokonjugatlardan oluşan O-antijeni, polisakkarit yapıdaki iç ve dış core ve de lipid A olmak üzere dört komponentten oluşmaktadır. Endotoksinin konak üzerindeki etkileri:

1. Pirojenik özellikte olup kompleman sistemini uyarır.
2. B lenfosit, makrofaj, granülosit aktivasyonuna neden olur.
3. Sitokin (IL-1, -2, -6, -8, TNF, interferon) salınımını sağlar.

EIU Mekanizması

Endotoksin ile konak ilk karşılaştığında serumda bulunan lipopolisakkarit bağlayıcı protein, LPS ile bağlanmakta ve bu kompleks makrofaj üzerindeki CD14 reseptörüne bağlanarak makrofajları uyarmaktadır (11). Makrofajların stimülasyonu ile pek çok sitokin (IL-1, TNF, interferon, endotelin), serbest oksijen radikalleri, protein ve lipidler salınmaktadır. Bu etki dolaşım sisteminde kollapsa ve ölümcül olan multi-organ yetmezliğine neden olabilmektedir.

İlk olarak 1916 yılında A.C Woods, sinüzit veya diş çekimini takiben bazı hastalarda üveit geliştiğini gözlemlemiş ve bazı bakteri kaynaklı ürünlerin üveite neden olabileceğini öne sürmüştür (12).

1980 yılında Rosenbaum ve arkadaşları sıçan ayak tabanına öldürülmüş gram negatif bakteri enjeksiyonu ile reaktif artrit tablosu oluşturmayı başarmışlardır. Bu sıçanlardan bazılarında belirgin ancak geçici ön segment tutulumu olduğunu belirtmişlerdir. Üveit tablosunun bilateral seyrettiğini ve nötrofil hakimiyetinin olduğunu izlemişlerdir (3).

Endotoksin ile indüklenen üveit (EIU) modeli günümüze kadar kedi, köpek, Lewis ve Columbia sıçanları ve farelerde oluşturulmuştur. Enjeksiyon subkutan, intarperitoneal, intravenöz, intravitreal ve ayak tabanı yoluyla yapılabilmektedir.

Deney hayvanına sublethal dozda lipopolisakkarid (LPS) verilmesiyle genelde 24 saat sonra pik yapan göze lokalize enflamatuar cevapla karakterize akut fakat geçici bir olaydır. EIU, lens arkasını etkileyebilse de primer olarak ön segmentte oluşmaktadır. Üveit bilateral seyretmekte olup kan-aköz bariyeri saatler

içinde (1-6 saat) hızla tahrip olmakta ve 24. saatte selüler infiltrasyon en üst seviyeye çıkmaktadır. 48. saatte enflamasyon azalmaya başlamaktadır. 24. saatte nötrofillerin yoğun olduğu ve 5. gün monositlerin yoğun olduğu bifazik üveit tablosu oluşabilmektedir. Endotoksin uygulamasından 24 saat sonra hayvanlarda miyozis, iris hiperemisi, kan aköz bariyerinin kırılmasına bağlı HA'ya protein sızıntısı, ön üveada, ön kamarada ve vitreusta hücre infiltrasyonu ile karakterize oküler hastalık ortaya çıkar. LPS, sitokinlerin (TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8), oksijen metabolitlerinin ve araşidonik asit metabolitlerinin (PGE2, LTB4) sentez ve salıverilmesine neden olur. İntravitreal uygulamalarda enflamasyonun daha şiddetli seyrettiği ve tekrarlayan enjeksiyonlara karşı toleransın geliştiği belirtilmiştir.

EIU modeli, üveitte aktive olan sitokin, adezyon molekülleri, kemotaktik faktörler ve bunların farmakolojik inhibitörlerinin araştırılması için önemli değere sahiptir. İdiopatik nonspesifik üveitlerin etyopatagonezinin aydınlatılmasında önemli bir modeldir.

Melaninle İndüklenen Deneysel Üveit (EMIU)

Pertussis toksini ile emülsifiye edilmiş öküz ve farklı kökenli üveitojenik melanin proteinleri ile immünize edilmiş sıçanlarda ön üveit modeli geliştiği izlenmiştir. Ön segment tutulumu baskın olup immünizasyondan iki hafta sonra hiperemi, miyozis, flare ve HA'da hücreler şeklinde ortaya çıkmaktadır. EMIU'de T hücre aracılı bir mekanizmanın işlediği düşünülmekte olup bu hastalığın siklosporin ile inhibe edildiği izlenmiştir. İdiopatik insan ön

üveitlerinin otoimmün kökenli olduğu düşünülmektedir ve EMIU bu hastalığın mekanizmasının anlaşılmasında yararlı bir modeldir.

Lensin İndüklediği Üveitler (LIU)

Lens kapsülünün penetran yaralanmalarda olduğu gibi hasarlanması sonrası lens proteinlerine karşı gelişen bir otoimmün reaksiyondur. Klinik olarak HA protein konsantrasyonunda artış ve flare şeklinde izlenmektedir. Hayvanlardaki hastalık antijen-antikor kompleksi ve komplemanı içeren bir tip III reaksiyonu tarafından indüklenmektedir. Bu deneysel model hayvanlarda lens kapsülü yapay olarak parçalanarak çalışılmıştır.

Deneysel Otoimmün Üveit (EAU)

Retinal S-Ag, IRBP, rodopsin, recoverin ve fosfodusun major üveitojenik retinal antijenlerin subkutan yolla uygulanmasını takiben retina proteinlerine karşı CD4⁺ T hücre ağırlıklı enflamatuvar cevabın olduğu ve arka üveit tablosunun geliştiği görülmüştür. Otoimmün göz hastalıkları ve insan arka üveitlerine benzerliğinden dolayı EAU önemli bir modeldir.

Klinik olarak, enjeksiyonu takiben 10-21 günde gelişen iris damarlarında dilatasyon, ön kamarada enflamatuvar hücre infiltrasyonu, hifema, fundus muayenesinde perivasküler infiltratlar, disk ödemi ve retinal hemorajiler izlenir.

Histopatolojik olarak; fotoreseptör tabakanın infiltrasyonu, retinal foldlar, granülom formasyonu, perivaskülitis, retina dekolmanı ağır vakalarda

retinal hücrelerin destrüksiyonu izlenir. Akut fazda T lenfositler ve PMNL'ler dominant hücrelerdir fakat infitre olan makrofajlar bulunabilir.

Endotelin Peptidler

1988 yılında Yanagisawa ve arkadaşları tarafından domuz aorta endotelinden izole edilen endotelin-1 (ET-1), endojen vasoaktif nöropeptid olup bilinen en potent vasokonstriktör maddedir (13). Makrofajlar, astrositler ve endotelyal hücrelerce üretilmektedir. Keşfinden hemen sonra yapılan çalışmalarda beyin (14), kalp (15), böbrek (16), akciğer, bağırsak ve göz (17, 18) gibi pek çok dokuda mevcudiyeti gösterilmiştir.

Endotelin (ET), embriyogenez (19) ve hemostaz (20, 21) için esansiyel bir maddedir. Endotelin ve reseptörlerinden sorumlu genlerin yokluğu ölümle sonuçlanmakta olup ET'nin nöral krest hücrelerinin migrasyon ve farklılaşmasında rol aldığı görülmüştür (22, 23). ET-1 ve beraberindeki proenflamatuar sitokinlerin kalp krizi, konjestif kalp yetmezliği, ateroskleroz, hipertansiyon, diabet, inme, glokom ve üveit gibi çeşitli patolojilerden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Pek çok nöropeptid gibi endotelinler kalp dışındaki dokularda çok düşük düzeyde eksprese edilmektedir. Hipotalamus ve retina gibi dokulardaki rolü hala tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır.

Endotelin İzofomları

Endotelin ailesinin üç izoformu mevcuttur, ET-1, -2 ve -3. Tüm izoformlar ayrı genlerde eksprese edilmekte ve sonrasında bir dizi posttranslasyonel işlem ile 21 aminoasitten oluşan matür endotelin izoformu oluşmaktadır (24, 25).

Oküler dokularda baskın olarak ET-1 ve ET-2 izoformlarının bulunduğu görülmüştür. Kan-aköz ve kan-retina bariyeri büyük moleküllerin geçişine engel olmakta aynı zamanda göze immün özellik kazandırmaktadır. Bu nedenle hemostazdan sorumlu makromoleküller lokal olarak sentez edilmelidir (26). İmmunreaktif ET-1 ekspresyonu, iris, koroid, retina, optik disk, silier cisim, lens ve kornea endoteli gibi oküler yapılarca gerçekleştirilebilmektedir. Aköz ve vitreusta da mevcudiyeti çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Endotelin Sentez ve Salınımı

Endotelin sentezi üç basamaklı proteolitik işlem sonucunda gerçekleşmektedir. 212 aminoasitten oluşan preproendotelin, peptidazlar ile proendotelin'e, proendotelin ise dibazik aminoasit konvertaz ile big-enotelin'e çevrilmektedir. Son basamakta big-endotelin, endotelin converting enzim (ECE) ile 21 aminoasitten oluşan matür ve aktif endotelin'e dönüşmektedir (27, 28).

ECE membrana bağlı nöral endopeptidaz-24 ile benzer homolojiye sahiptir. Endopeptidaz-24 çeşitli dokularda bu peptidlerin düzeyini regüle etmektedir. ECE-1, çinko bağımlı-fosforamidon'a sensitif bir matriks metalloproteinazdır. ECE, hücrelerde plazmelemma içinde olup ET üretimini azaltmak için iyi bir terapötik hedeftir.

ET-1, hücre içinde endoplazmik retikulum ve golgi veziküllerinde lokalize olup ekzositoz ile hücre dışına salıverilmektedir. Doku bütünlüğüne bağlı olarak hücrelerin bazolateral veya apikal yüzünden salınmakta ve parakrin etki oluşturmaktadır.

TGF β , TNF α , IL-1, interferon- γ , trombin ve kalsiyum ET-1 sentez ve sekresyonunu artırır (29, 30). Atrial natriüretik peptit ve nitrik oksit donörleri ise ET-1 sekresyonunu azaltır (31). Sekresyondaki azalmadan cGMP bağımlı yol sorumlu görülmektedir. Nitrik oksit aynı zamanda ET-1'in reseptöründen ayrılmasına neden olmaktadır (32). Heparin, trombin üzerinden ET-1 sekresyon ve sentezini inhibe eder (33). Fosforamidon da ECE'yi inhibe ederek ET-1 üretimini azaltır.

Endotelin reseptörleri ve oküler ekspresyonları

ET reseptörleri, G protein reseptörleri olup ET_A ve ET_B alt tipleri mevcuttur (34). ET-1 tarafından ET_A reseptörlerinin uyarılması vazokonstriksiyona, ET_B reseptörlerinin uyarılması ise NO aracılığıyla vazodilatasyona neden olmaktadır (35). ET_B reseptörleri aynı zamanda dolaşımdaki ET-1'in klirensine (klirens reseptör) neden olmaktadır (36). ET_A reseptörleri ET-1 ve ET-2'ye eşit ve yüksek affinite gösterirken, ET-3'e zayıf affinite gösterirler. ET_B ise her üç endotelin izoformuna yüksek affinite gösterir.

ET reseptörleri desme membranı, korneal endotel, iris, silier cisim, retina ve koroidde gösterilmiştir. Retina ve koroid damarlarında ET_A reseptörleri

yoğunluktaiken retinanın nöronal ve glial komponentlerinde ET_B reseptörleri yoğunluktadır (37).

$ET-1$ reseptör antagonistleri ET_A selektif, ET_B selektif veya non-selektif (ET_A ve ET_B) olarak üç grupta incelenebilir.

Peptid yapıdaki selektif ET_A inhibitörleri siklik pentapeptid BQ123 ve modifiye lineer peptid FR139317 [$(N-[(\text{hexahydro-1-azepinyl})\text{carbonyl}]L\text{-Leu}(1\text{-Me})D\text{-Trp-3}(2\text{-pyridyl})\text{-D-Ala}]$ olup oldukça yüksek potens ile ET_A inhibisyonuna neden olurlar. Non-peptid yapıdaki ET_A reseptör antagonistleri ise peptid yapıdaki antagonistlerden yaklaşık 10 kat daha potent olmalarına karşın daha az selektiftirler.

Klinik olarak ihtiyacın daha az olması nedeniyle ET_B reseptör antagonistleri üzerinde daha az çalışılmıştır. Peptid yapıda (BQ788) veya non-peptid yapıda (A192621) çeşitli selektif ET_B reseptör antagonistleri mevcut olup potensleri ve seçicilikleri ET_A reseptör antagonistleri kadar güçlü değildir.

ET_A selektif antagonistler ile non-selektif antagonistler arasında kesin bir ayrım olmamasına karşın, ET_A reseptörüne 100 kattan fazla selektif olanlar ET_A selektif, 100 kattan daha az selektif olanlar non-selektif antagonist olarak sınıflandırılmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda non-selektif inhibitörlerin her iki reseptörü eşit düzeyde inhibe etmediği akılda tutulmalıdır. Non-peptid yapıdaki bazı non-selektif inhibitörler; bosentan (RO470203, Tracleer; Actelion, San Francisco, CA), SB209670, SB217242 (enrasentan) ve RO610612 (tezosentan) olarak sıralanabilir.

ET-1 ve ikincil mesaj yolları

ET-1, hücre içi ikincil mesajcı olarak üç önemli yolu kullanmaktadır. Bunlar; hücre içi kalsiyum düzeyindeki değişiklikler, araşidonik asit metabolizması ve prostaglandin sentezindeki değişiklikler ve nitrik oksit sentezindeki değişikliklerdir. Bu kısımda ikincil mesajcı olarak kalsiyum rol aldığına ortaya çıkan oküler etkilerden kısaca bahsedilecek prostaglandinler ve NO ile ilgili ayrıntılı açıklamaya daha sonra değinilecektir.

ET-1 intraselüler kalsiyum akımını artırır. Bu yolla oküler dokularda oluşturduğu etkiler:

Silier kas: Yüksek dozdaki ET-1, ET_A reseptör aracılığıyla kontraksiyona, düşük dozda ET-1 ise ET_B reseptörü aracılığıyla relaksasyona neden olur (38).

Trabeküler ağ: Trabeküler dokudaki fenestralarda kontraksiyona neden olur (39).

İris: ET_A ve ET_B aracılığıyla dilatatör pupilla kasında kontraksiyona neden olur (40).

Korneal epitelyum ve endotel: ET_A aracılığıyla proliferasyona neden olduğu izlenmiştir (41).

Optik sinir başı: Kan akımında azalma ve glokomatöz hasardakine benzer astrosit proliferasyonuna neden olmaktadır (42).

Retina-koroid: Kan damarlarının vazokonstriksiyonunda ve yara iyileşmesinde rol alır (43).

ET-1 ve Oküler etkileri

ET-1'in göz üzerine olan etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda belli başlı bazı özellikler ön plana çıkmıştır. Bu etkiler; göz içi basıncı, pupil çapı, koryo-retinal dolaşım, korneal epitel ve endotel, aköz protein konsantrasyonu ve intraoküler enflamasyon üzerindeki değişikliklerdir.

Endotelin-1'in glokom üzerine olan etkileri ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olmasına karşın net bir sonuç elde edilmemiştir. ET-1 silier kas kontraksiyonu ile dışa akımı arttırmakta aynı zamanda homeostatik yolla indirekt olarak Na-K ATPase inhibisyonu ile nonpigmente silier epitelde aköz üretimini azaltmaktadır. MacCumber ve arkadaşları, tavşanlarda yaptıkları çalışmada, intravitreal 2.5µgr ET-1 ve ET-3 enjeksiyonu sonrası %45 oranında göz içi basıncı düşüşü olduğunu ve bu düşüşün indometazin ile engellenemediğini göstermişlerdir. Patolojik çalışmalarda, iris ve silier cisimdeki damarlarda vazokonstriksiyon dikkati çekmiştir. Göz içi basınç düşüşünün indometazin ile engelenememesi dışa akım mekanizmasından çok silier cisimdeki vasküler yataktaki vazokonstriksiyona bağlı aköz yapımındaki azalmaya bağlanmıştır. Aynı çalışmada, ET-1 enjeksiyonu ile %20 oranında pupiller konstriksiyon olduğu ve aköz protein konsantrasyonunda artış olduğu izlenmiştir (44).

Chen ve arkadaşları, tavşan gözlerine intravitreal 10^{-5} µl ET-1 enjeksiyonu sonrası kan-aköz bariyeri ve silier epiteldeki değişiklikleri incelemişlerdir. Enjeksiyon yapılan gözlerde kontrol grubuna göre göz içi basıncında azalma ve aközde flare artışı izlenmiştir. Enjeksiyon sonrası, iris ve silier proseslerde pigmente ve non-pigmente epitel hücrelerinde mitokondriyal şişme, interselüler

mesafede ve silier kanallarda dilatasyon görülmüştür. Arka kamaraya makrofaj ve nötrofil akümülayonu olduğunu izlemişlerdir. Non-pigmente silier epitel hücrelerinde nekroz olduğu görülmüştür. Silier kan damarlarında endotelial hasar izlenmemiştir. Göz içi basıncındaki düşüşün non-pigmente silier epiteldeki hasara bağlı olduğu belirtilmiştir. Aköz protein sızıntısından, non-pigmente silier epiteldeki nekrozun sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (45).

ET/NO arasındaki dengenin bozulması, optik sinir kan akımının bozulmasına neden olmakta ve glokomatöz optik sinir hasarı oluşturmaktadır. İntravitreal endotelin-1 enjeksiyonunun, kedilerde retinal kan akımını azalttığı (46) ve tavşanlarda göz içi basıncını düşürdüğü (47) görülmüştür.

Shoji ve arkadaşları, tavşan modelinde intravitreal ET-1 enjeksiyonu (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M) sonrası aköz protein, PGE_2 , LTB_4 konsantrasyonu değişikliklerini zamanlama açısından değerlendirmişlerdir. Aynı zamanda tedavi öncesi ve sonrası topikal diklofenak uygulamanın etkinliğini de incelemişlerdir. 10^{-5} M ET-1 enjeksiyonu sonrası aköz protein konsantrasyonu 4. saatte pik yaptığını ve 48. saatte normal değerlerine döndüğünü görmüşlerdir. 10^{-4} M ET-1 enjeksiyonu sonrası etkinin 4. saatte başlayıp 7. gün bile normal değerlerine dönmediğini izlemişlerdir. 10^{-6} ve 10^{-7} M konsantrasyonda ET-1'in aköz protein konsantrasyonunu artırmadığını izlemişlerdir. Enjeksiyon öncesi topikal diklofenak (2 saat öncesinde 30 dk.'da bir damla) uygulaması ile 10^{-5} M ET-1 uygulanan tavşanlarda aköz protein konsantrasyon artışında inhibisyon sağlanırken 10^{-4} M grubunda yalnızca 24 saatlik bir inhibisyon sağlanabilmiştir. ET-1 enjeksiyonu sonrası 4. saatte en yüksek olmak üzere tüm zaman dilimlerinde

PGE2 düzeyinde artış (doz bağımlı) olduğunu izlerlerken LTB4 düzeyinde değişiklik olmadığını izlemişlerdir (48).

Shoji ve arkadaşları, tavşan modelinde ön kamaraya ET-1 (10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} M) enjeksiyonu sonrası doz bağımlı olarak aköz protein konsantrasyonunun kontrol grubu olan diğer göze göre anlamlı olarak yükseldiğini tespit etmişlerdir. Aköz protein konsantrasyonunun 1-2 saatte pik yaptığını ve 12. saatte normal düzeylerine döndüğünü belirtmişlerdir. Çalışmanın bir diğer ayağında, enjeksiyon öncesi topikal indometazin veya intravenöz diklofenak enjeksiyonu ile ET-1 aracılı aköz protein konsantrasyon artışının engellenebildiğini göstermişlerdir (49). Bir diğer çalışmalarında ise, intravenöz lipopolisakkarit (*Salmonella Thphimurium*) enjeksiyonu yapılan tavşanlarda, normal gruba göre aköz protein ve ET-1, serum ET-1 düzeylerinde anlamlı artış olduğunu tespit etmişlerdir. Aköz ET-1 düzeyinin serumdakinden 1,5-3,9 kat yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Lipopolisakkarit aracılı oluşan üveit modelinde, aköz ve serum ET-1 düzeyi artmakta ve aköz konsantrasyonu serumdaki değerlerden daha fazla yükselmektedir. Bu durum, ET-1'in kan-aköz bariyerindeki bozulma neticesiyle sızıntı yoluyla aköze geçtiğinden ziyade oküler dokularda lokal olarak sentezlendiğini desteklemektedir. Sonuç olarak oküler enflamasyonda ET-1'in önemli bir mediatör olduğu belirtilmektedir (50). Lepple-Wienhues ve arkadaşları insan ve domuz aközünde serumdan 2-3 kat daha yüksek konsantrasyonda endotelin benzeri immünreaktivite tesbit etmişlerdir (51). Shoji ve arkadaşları, tavşan modelinde, intravitreal ET-1 (10^{-4} , 10^{-5} M) enjeksiyonu öncesi selektif ET_A (97-139, 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} M) veya ET_B (BQ-788, 10^{-3} M) reseptör antagonisti

enjeksiyonun aköz protein, PGE₂ ve LTB₄ konsantrasyonu üzerine olan etkilerini değerlendirmişlerdir. ET-1 enjeksiyonundan 1 saat önce uygulanan selektif ET_A reseptör inhibitörlerinin, sadece ET-1 uygulanan kontrol grubuna göre aköz protein konsantrasyonunu ve PGE₂ düzeyini doz bağımlı olarak azalttıkları görülmüştür. Gerek kontrol grubunda gerekse enjeksiyon öncesi ET_A reseptör antagonisti uygulanan grupta, LTB₄ düzeyinde değişiklik saptanmamıştır. Enjeksiyon öncesi selektif ET_B reseptör antagonisti uygulanan grupta ise aköz protein konsantrasyonunun baskılanamadığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak ET-1'in enflamatuar etkisini ET_A reseptörü üzerinden ve PGE₂ düzeyini arttırarak gerçekleştirdiği belirtilmiştir. ET_B reseptörlerinin oküler enflamasyonda rolünün olmadığı ve LTB₄'ün ET-1 tarafından etkilenmediği belirtilmiştir (52).

Evreklioğlu ve arkadaşları, Behçet hastalığı bulunan 43 hastada serum homosistein, endotelin-1 ve nitrik oksit düzeylerini normal kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Her üç maddenin serum düzeyinin, Behçet hastalığı bulunanlarda kontrol grubundan daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Yine her üç parametre, aktif Behçet hastalığı olanlarda aktif olmayanlardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Oküler tutulumu olan olgularda da oküler tutulum olmayanlara göre bu parametrelerin anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Bu üç parametrenin hastalığın aktivitesini ve oküler tutulum riskini belirlemede değerli olabileceği belirtilmiştir (53).

Araşidonik Asit Metabolitleri

Fiziksel, nörokimyasal ve hormonal uyaranlar, fosfolipaz A₂ aracılığıyla hücre membranı fosfolipidlerinden (fosfoinositidler: fosfotidilkolin, fosfotidiletanolamin) araşidonik asit (AA) salınımına neden olur. Araşidonik asitler siklooksijenaz (COX) enzimi ile önce prostaglandin (PG) G₂'ye daha sonra da süratle PGH₂'ye dönüşmektedir. PGH₂'den ise prostanoidler (PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ ve TxA₂) sentezlenir. AA'lar lipooksijenaz enzimi ile lökotrienlere (LT) de dönüştürülebilir.

PG'ler, bölgesel fizyolojik hormon görevi görürler. Depolanmazlar, sentezlenip salgılanırlar. PG'ler, ağrı, ateş, enflamasyon, pıhtılaşma, ovulasyon, doğum eylemi, kemik metabolizması, gastrik mukozanın devamlılığı, damar tonus regülasyonu, immün cevap ve böbrek fonksiyonu gibi olaylarda rol alır. TxA₂ trombositlerde sentezlenir ve PGI₂'nin tersi bir etkiyle trombosit agregasyonunu neden olur. Lökotrienler ise enflamatuvar hücrelerin kemotaksisinden ve anaflaksiden sorumludur.

Siklooksijenaz (COX) Enzimleri

COX enziminin 2 izoformunu bulunmaktadır; COX₁ ve COX₂. COX₁ birçok dokuda yapısal olarak bulunur ve hemoastatik ve sitoprotektif prostanoidlerin sentezinden sorumludur. COX₂ enzimi ise enflamasyondan sorumlu PG sentezini sağlar ve lökositler, damar düz kas hücreleri, romatoid sinoviositleri ve beyin nöronlarında bulunur. COX₂ enzim sentezi mitojenler,

sitokinler ve endotoksinlerce sitümüle edilir. COX enzimi non-steroidal antienflamatuar ilaçlar (diklofenak, indometazin, aspirin) ile inhibe edilebilir.

Endotelin-1 ve Araşidonik Asit Metabolizması

Endotelin-1, iris düz kas ve silier kas hücrelerinde ET_A reseptörü üzerinden proteinkinaz C aktivasyonu ile sitozolik fosfolipaz A_2 enziminin fosforilasyonuna yol açar. Fosforilize olan fosfolipaz A_2 enzimi de araşidonik asit sentezine neden olur (54). ET-1'in iris dokusunda, 3 önemli enzimi aktive ettiği görülmüştür: 1) Fosfolipaz C 2) Fosfolipaz A_2 ve bunun sonucu artmış araşidonik asit yapımı ve prostaglandin aracılı cAMP formasyonu 3) Fosfolipaz D ve buna bağlı artmış fosfatidik asit.

Abdel-Latif ve arkadaşları; domuz, köpek, kedi ve insan silier kaslarını ET-1 ($0,1\mu M$) ile inkübe etmişler ve daha sonra dokudaki cAMP ve PGE_2 düzeylerini değerlendirmişlerdir. 5 dakikalık inkübasyon sonrası PGE_2 düzeyinde % 58-105 ve cAMP düzeyinde %98-393 oranında artış olduğunu belirtmişlerdir. ET-1'in, cAMP salgılatıcı etkisini ET_A reseptörü üzerinden gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Selektif ET_A reseptör inhibitörlerinin (BQ610), fosfolipaz A_2 inhibitörlerinin (quinacrine) ve siklooksijenaz inhibitörlerinin (indometazin) cAMP düzeyinin azalttığını bildirmişlerdir (55).

Araşidonik Asit Metabolitleri ve Oküler Roller

Göz dokularında prostaglandin sentezini ilk olarak 1957 yılında, Ambache göstermiştir. Ambache, tavşan irisinden pupillada konstriksiyon oluşturan bir özüt

(extract) elde etmiş ve 'İrin' adını vermiştir (56). İris-silier cisim, kornea, lens, trabeküler ağ ve retinada PG sentezinin olduğu izlenmiştir.

PGE_2 ve $PGF_{2\alpha}$ uveosklral akımı arttırmak suretiyle GİB düşüşü sağlamaktadır. Topikal PG'ler, ilk anda, GİB'nı yükselttikten sonra uzun süreli hipotansiyon oluşturmuştur. Başlangıçtaki tansiyon artışı, miyozis, kan-aköz bariyer yıkımı ve aköz sıvısına protein geçişi ile birliktedir ve yüksek dozlarda görülmüştür (57).

PGE_2 'nin, kültür edilmiş kornea endotelinde morfoloji ve mitozu düzenlediği ayrıca sitoprotektif etkisinin olabileceği bildirilmektedir. PGE_2 , deneysel kimyasal yanıklarda, goblet hücrelerindeki ve korneal epiteldeki hasarı azaltmıştır (58).

Deneysel çalışmalarda, retinal ve koroidal kan akımı otoregülasyonunda rol aldığı izlenmiştir (59). Retrolental fibroplazi ve diyabetik retinopati gibi pek çok hastalığın patogenezinde PG'lerin üzerinde durulmuştur.

Üveitte Araşidonik Asit Metabolitlerinin Rolü

Tavşanlarda yapılan ilk çalışmalarda, ön kamaraya kanül ile verilen PG' nin, kan-aköz engelini yıktığı, konjonktivada hiperemi, GİB'de ani artış, pupillada miyozis ve iriste hiperemi oluşturduğu gösterilmiştir. Tüm bu etkilerin aspirin ile önlenemediği bildirilmiştir (60).

Csukas ve arkadaşları, tavşanlarda intravitreal endotoksin uygulayarak üveit modeli oluşturmuşlar ve aközde protein, PGE_2 ve LTB_4 düzeylerindeki değişimleri incelemişlerdir. 2-6 saat içinde aköz protein konsantrasyonunda artış

olduğu izlenmiştir. 6-14 saat arasında PGE_2 , LTB_4 konsantrasyonunda ve nötrofil akümülyasyonunda artış olduğunu bildirmişlerdir. PGE_2 artışı ile aköz protein konsantrasyon artışı arasında zamanlama olarak bir korelasyon bulunmadığı belirtilmiştir. PGE_2 düzeyinin, lokal olarak dokularda artıyor olabileceği bildirilmiştir (61).

Shimida ve arkadaşları, fare peritoneal makrofajlarında ET-1 (12 saat) ve lipopolisakkarit (4 saat) inkübasyonu sonrası PGE_2 düzeyini ve COX_2 enzim ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. ET-1 inkübasyonunu takiben doz ve zaman bağımlı olarak PGE_2 düzeyinin ve COX_2 enzim ekspresyonunun arttığı izlenmiştir. İnkübasyondan yarım saat önce uygulanan deksametazonun ve indometazinin bu artışları inhibe ettiği gösterilmiştir. ET-1'in neden olduğu PGE_2 düzeyindeki artışın, ET_B reseptör antagonisti (BQ788) ile %53 oranında, ET_A reseptör antagonisti (BQ123) ile %22 oranında ve kombine (BQ788 ve BQ123) uygulamada %71 oranında azaldığı bildirilmiştir. LPS'nin neden olduğu PGE_2 düzeyindeki artışın ise bu her iki ilaç ile de engellenemediği bildirilmiştir. Benzer şekilde, indometazin ve deksametazon uygulamasının hem ET-1 hem de LPS aracılı artmış COX_2 enzim ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Sonuç olarak ET-1'in ET_B reseptörü üzerinden fosfolipaz A_2 enzimini aktive ettiği belirtilmiştir (62).

Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), L-arginin'in nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) ile oksidasyonu sonucu ortaya çıkan bir serbest radikaldir (63). NO pek çok

fizyolojik ve patolojik olayda rol almaktadır. Vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve nörotransmisyon gibi önemli fizyolojik olaylarda rol alır. Bunun yanı sıra, sitotoksik ve enflamatuvar özelliklere sahip olup artrit, ateroskleroz, otoimmün esnsefelomiyelit, diabetes mellitus ve septik şok gibi hastalıkların patofizyolojisinde rol aldığı gösterilmiştir.

Nitrik oksit sentezi

NO sentezinden sorumlu NOS enziminin çeşitli dokularda eksprese edilen izoformları mevcuttur. Bu izoformlar kalsiyum bağımlılığına, aminoasit sayısına, doku dağılımına ve fonksiyonlarına göre birbirlerinden ayrılmaktadır. Sentez aşamasında NADPH, FAD, kalmodulin, hem ve tetrahidrobiopterin kofaktör olarak görev alır (64). NOS, yapısal (constitutive, cNOS) ve indüklenen (inducible, iNOS) tipte olmak üzere iki grupta incelenir. cNOS da kendi içinde endotelial (eNOS) ve nöronal (nNOS) olmak üzere iki alt grup içerir.

cNOS, kalsiyum-kalmodulin bağımlı bir enzim olup uyarıldığında düşük miktarda NO sentezi gerçekleşmektedir. cNOS temel olarak endotelial ve nöronal hücrelerde bulunur.

eNOS tarafından sentezlenen NO, guanilat siklaz aktivasyonu ile intraselüler cGMP düzeyini artırırken kalsiyum düzeyini azaltır ve neticede vazodilatasyona neden olur (65). nNOS ise nöronal tansmisyonda rol alır (66).

iNOS, normal koşullarda bulunmayan ancak çeşitli sitokinler (IL-1 β , TNF α), bakteriyel ürünler (LPS) ile eksprese edilen izoformdur (67). İmmünolojik ve enflamatuvar hadiselerde rol oynayan NO üretiminden sorumludur (68). iNOS,

kalsiyum-kalmodulin bağımlı olmayıp yüksek konsantrasyonlarda NO üretimine neden olur. Primer olarak makrofaj, polimorfonükleer lökositler ve endotel hücreleri tarafından eksprese edilir. Yüksek orandaki NO, demir içeren enzimlerde destrüksiyon yapmaktadır. Örneğin sitrik asit siklusundaki akontaz, DNA sentezindeki ribonükleotid redüktaz gibi yaşamsal enzimlerin inhibisyonuna neden olarak sitotoksik etkiler yaratmaktadır.

L-arjinin analogları, NO sentezinde kompetitif inhibisyona neden olurlar (69). Bunlar selektif (aminoguanidin, iNOS inhibitörü) veya non-selektif (N^G-nitro-L-arjinin methyl ester [*L-NAME*] , iNOS ve cNOS inhibitörü) inhibitör özellikte olabilirler.

NO ve Oküler Rolü

NO'nun gözdeki fizyolojik ve patolojik durumlardaki rolü ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (70). NADPH-diaforaz boyama tekniği ve anti-NOS antikorları ile gözde çeşitli bölgelerde her üç NOS enzim mevcudiyeti gösterilmiştir.

Konjonktiva, silier kas, trabeküler ağ, retina ve koroid gibi oküler dokularda cNOS aktivitesi izlenmiştir. NO, retina ve koroid kan dolaşımında (kan akımında artış), aköz humör dinamiklerinde ve göz içi basıncı regülasyonunda rol almaktadır. Trabeküler ağ ve silier kasta relaksasyon yoluyla göz içi basınç düşüşü sağladığı izlenmiştir. Behar-Colen ve arkadaşları tavşanlarda intraoküler NO enjeksiyonunun anlamlı göz içi basınç düşüşüne neden olduğunu

göstermişlerdir (71). NO'nun aynı zamanda retinal hücreler arasında NO bağımlı-nörotransmisyonunda görev aldığı da düşünülmektedir.

iNOS, enflamatuvar ve immünolojik hadiselerde bol miktarda NO salınımına neden olmakta ve bunun sonucunda da sitotoksosite gerçekleşmektedir. Retinada (pigment epiteli, perisit ve müller hücreleri) ve üveit esnasında infiltrate olan polimorfonükleer hücrelerde ve makrofajlarda iNOS aktivitesi saptanmıştır. Yüksek konsantrasyondaki NO metabolitleri (nitrit, peroksinitrit ve serbest radikaller) glokom (72, 73, 74), yaşa bağlı maküla dejeneresansı, miyopi (75), katarakt (76) ve üveit gibi patolojik durumlarda rol alır. Tavşanlarda intravitreal NO uygulamasının nörotoksositeye neden olduğu histolojik ve fonksiyonel olarak gösterilmiştir (77). Retinanın iskemik ve dejeneratif hastalıklarının patofizyolojisinde rol alabileceği bildirilmektedir.

ET-1 ve NO Etkileşimi

Endotelial hücrelerde, ET-1, ET_B reseptör aracılığıyla endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivasyonuna neden olmakta bunun sonucunda da NO üretimi gerçekleşmektedir (78). NO, guanilat siklaz aktivasyonu ile cGMP düzeyini arttırmakta ve bunun sonucu olarak ET-1 sekresyonu azalmaktadır. NO aynı zamanda ET-1'in reseptöründen ayrılmasına neden olmaktadır (79). Glokom, diabetik retinopati gibi oküler hastalıklarda ET/NO arasındaki dengenin bozulduğu izlenmiştir.

NO ve Üveit

Endotoksin ile indüklenen üveit (EIU) modeli insanlardaki akut anterior üveit ile klinik ve histopatolojik olarak benzeşmektedir. Bu model üveit mekanizmasında etkili olan mediatörlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Günümüze kadar pek çok sitokin (IL-1 β , TNF α , IL-6) ve prostaglandinlerin rolü ortaya konmuştur. NO'nun üveit üzerindeki etkileri ve buna yönelik teröpatik yaklaşımların üveit gelişimini engellediği pek çok çalışma ile desteklenmiştir. Endotoksin ile indüklenen üveitlerde, gerek enflamatuvar hücrelerce salınan sitokinler (IL-1 β , TNF α) gerekse direkt endotoksin, iNOS üzerinden yüksek miktarda NO salınımına neden olmaktadır. Histamin ve bradikinin endotelial hücrelerden cNOS aracılığıyla NO salınımına neden olduğu belirtilmektedir. Yine NO ve siklooksijenaz aktivitesi arasında da güçlü bir bağ olduğu belirtilmektedir.

Goureau ve arkadaşları, sıçanlarda ayak tabanı altına LPS enjeksiyonu ile EIU modeli oluşturmuşlardır. Sıçanların bir kısmına non-selektif NOS inhibitörü olan L-NAME, işlemiden yarım saat önce ve 2 saat sonra olmak üzere iki kez intraperitoneal olarak uygulanmıştır. 16. saatte, L-NAME uygulanan sıçanlarda aköz ve vitreus nitrit düzeyinde sırasıyla %58 ve %47 oranında azalma sağlamışlardır. Histolojik olarak EIU oluşturulan gözlerde, silier cisim ve retinada hücrel infiltrasyon olduğu ve L-NAME uygulanan sıçanlarda bu infiltrasyonda belirgin azalma olduğu izlenmiştir. Retina, iris-silier cisim örneklerinde yapılan PCR çalışmasında iNOS ekspresyonunun 16. saatte en yüksek düzeye ulaştığı ve bu pikin enflamatuvar hücrelerden kaynaklandığı belirtilmiştir (80).

Parks ve arkadaşları, sıçanlarda ayak tabanı altına LPS enjeksiyonu ile EIU modeli oluşturmuşlar. Sıçanlara işlemden yarım saat önce başlamak üzere 2 saatte bir toplam 6 kez intraperitoneal L-NAME enjeksiyonu uygulamışlar. L-NAME uygulanan sıçanlarda humör aköz protein konsantrasyonunun %73-82 oranında azaldığını izlemişlerdir. Selüler infiltrasyonun neredeyse tamamen yok olduğunu ve histopatolojik olarak enflamasyonun baskılandığını göstermişlerdir (81).

Tilton ve arkadaşları, sıçanlarda EIU modeli oluşturmuşlar. Bir grup sıçana işlem sonrası 3'er saat aralıklarla toplam 8 doz selektif iNOS inhibitörü olan aminoguanidin enjeksiyonu yapmışlardır. 24 saat sonra oküler dokularda kan akımını ve I^{125} -albumin permeasyonunu değerlendirmişlerdir. Ayrıca ön üvea ve ön kamara lökosit infiltrasyonunu histolojik olarak derlendirmişlerdir. HA lökosit sayımı yapmışlardır. LPS enjeksiyonu sonrası retina, ön üvea, koroid-sklera, ve aközde I^{125} -albumin permeasyonunda artış olduğunu izlenmişlerdir ($p<0.0001$). Aminoguanidin ile retinada %74, ön üveada %57, aközde %32 oranında anlamlı permeasyon azalması sağlanmıştır ($p<0.0001$). Aköz hücre sayımı değerlendirildiğinde, kontrol grubunda sadece lenfositler izlenirken EIU modelinde polimorfonükleer hücrelerin predominant olduğu yoğun hücresel infiltrasyon izlenmiştir. Hücre sayısında %60-90 oranında azalma sağlanmıştır ($p<0.05$).

Bu çalışmada;

1. Farelerde LPS enjeksiyonu ile oluşturulan üveit modelinde, aköz ve serum ET-1 düzeyinde ve HA protein konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikleri ve histopatolojik değişiklikleri değerlendirmek,
2. Sistemik yolla uygulanan selektif ET_A reseptör antagonistlerinin (BQ123) ve non-selektif ET-1 reseptör antagonistlerinin (Bosentan) tüm bu parametrelere ve üveit tablosuna olan etkilerini değerlendirmek,
3. Prostaglandin ve nitrik oksit sentezin sistemik yolla inhibisyonunun tüm bu parametrelere ve üveit tablosuna olan etkilerini değerlendirmek,
4. EIU modelinde, ET-1'in rolünü ve etki mekanizmasında muhtemelen etkili olan yolların inhibisyonunun üveit tedavisindeki yerlerini değerlendirmek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 8 haftalık ve ortalama ağırlığı 20-25 gr. olan 48 adet fare kullanılmıştır. Çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu kurallarına uygun olarak Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilimdalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Farelere enjeksiyon öncesi intramüsküler ketamin hidroklorür (25 mg/kg) ve ksilazin hidroklorür (5 mg/kg) uygulanarak genel anestezi ve proparakain hidroklorid ile topikal anestezi sağlanmıştır. Her farenin 2 gözü çalışmaya dahil edilmiştir. Bütün solüsyonlar enjeksiyonlardan hemen önce hazırlanmıştır.

Her bir grupta 6 hayvan olmak üzere hayvanlar 8 gruba ayrılmıştır. 1. gruptaki hayvanlara herhangi bir enjeksiyon yapılmamış olup bu hayvanlar kontrol grubunu oluşturmaktadır. 2. gruptaki hayvanlara intraperitoneal yolla 50µg/0.1ml endotoksin (*Salmonella typhimurium*, Sigma Chemical Co.) enjeksiyonu uygulanmıştır. 3. gruptaki hayvanlara eş zamanlı olarak intraperitoneal 50µg/0.1ml endotoksin ve 25µgr/0.05ml konsantrasyondaki selektif ET_A reseptör antagonisti olan BQ123 enjeksiyonu yapılmıştır. 4. gruptaki hayvanlara eş zamanlı olarak intraperitoneal 50µg/0.1ml endotoksin ve 100µgr/0.2ml konsantrasyondaki non-selektif ET-1 reseptör antagonisti olan bosentan (Tracleer, Actelion) enjeksiyonu yapılmıştır. 5. gruptaki hayvanlara eş zamanlı olarak intraperitoneal 50µg/0.1ml endotoksin ve non-selektif NOS inhibitörü olan L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester, Sigma Chemical Co.) 10mg/kg/0.2ml konsantrasyonda enjekte edilmiştir. 6. gruptaki hayvanlara eş

zamanlı olarak intraperitoneal 50µg/0.1ml endotoksin ve non-selektif COX inhibitörü olan indometazin 10mg/kg/0.2ml konsantrasyonda enjekte edilmiştir.

7. gruptaki hayvanlara eş zamanlı olarak daha önce uygulanan konsantrasyonlarda intraperitoneal endotoksin, bosentan ve L-NAME enjeksiyonu yapılmıştır. 8. gruptaki hayvanlara eş zamanlı olarak daha önce uygulanan konsantrasyonlarda intraperitoneal endotoksin, bosentan ve indometazin enjeksiyonu yapılmıştır.

Enjeksiyonların 24. saatinde, genel ve topikal anestezi altında sulandırılmış povidone iodine ile yüzey temizliğini takiben iris ve lens hasarı oluşturulmayacak şekilde 30 gauge iğne ile tüm hayvanların sağ gözlerine ön kamara parasentezi uygulanmıştır. Her hayvandan 0.01 ml HA örneği alınarak ET-1 düzeyi ve protein konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Ön kamara parasentezini takiben intrakardiyak yolla her hayvandan 0.5 ml kan örneği alınarak serum ET-1 düzeyi değerlendirilmiştir. Takiben yüksek doz (200 mg/kg) ksilazin hidroklorür enjeksiyonu ile hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Tüm hayvanların parasentez uygulanmayan sol gözleri nazikçe öne çekilip optik sinir çok kısa güdük kalmayacak şekilde kesilerek enükleasyon yapılmış ve enükleasyon materyali patolojik değerlendirmeye gönderilmiştir. Tüm örnekler çalışma yapılncaya kadar -80°C’de saklanmıştır.

Sandermann ve Stromiger tarafından tanımlanan modifiye Lowry metodu kullanılarak, HA örneklerinde total protein miktarı değerlendirilmiştir (83). Lowry metodu, alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin

artıklarının bakır ile kompleks oluşturması prensibine dayanır. Deney tüpüne analizi yapılacak örnekten 1 mL alınır.  zerine 3 ml  z lti eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir. Bu s renin sonunda 0.3 ml Folin-fenol kimyasalı eklenip vortekslenir ve 45 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. UV spektrofotometrede  z ltlerin 660 nm'deki absorbans değerleri okunarak protein miktarları saptanır. Standart eğrisi oluşturmak için tüplere örnek yerine konsantrasyonları belli olan standart  z ltiden (BSA) 1'er ml eklenerek yukarıdaki işlem aynen uygulanır. 660 nm'de absorbans okutularak konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilir. Kontrol  z lti için ise yine örnek yerine 1 ml saf su koyularak örnek için uygulanan işlemin aynısı uygulanır. ELISA okuyucusunda da okunabilir hale getirilen modifiye Lowry metodu ile daha az numune ve kimyasal malzeme kullanılarak daha çok ve hızlı analiz yapılması olası hale getirilmiştir. Enzim proteinleri  l   rken mutlak protein miktarına gerek yoktur, önemli olan nispi protein miktarıdır. Modifiye edilen bu metodda okuma kabı olarak ELISA okuyucularının mikrotitre plakaları ve ELISA okuyucusu (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) kullanılmıştır.

Serum ve HA endotelin-1 düzeyi, kantitatif sandviç enzim immünassay tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Tabanında fare ET-1 spesifik antikorlar bulunan ELISA kitinin (Mouse Endothelin 1, ET-1 ELISA Kit, Usnlife) mikrotitre'lerine 37 C 'de iki saat inkübe edilmiş 100 l serum ve HA örneklere eklenerek ET-1 antijen-antikor kompleksleri oluşturulmaktadır. Bu komplekslerin üzerine horseradish peroksidaz enzimine bağlı ET-1 antikor

eklenmektedir. Takiben bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapılmaktadır. Daha sonra mikropate içine hidrojen peroksit (H₂O₂) ve renk indikatörü eklenmektedir. Peroksidaz enzimiyle reaksiyona giren hidrojen peroksit, ortamda pH değişikliğine neden olarak indikatörde renk değişimine neden olmaktadır. Oluşan renk değişimi 450 nm dalgaboyunda ELISA okuyucusu (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) ile değerlendirilerek pg/ml cinsinden ET-1 düzeyi hesaplanmaktadır. Kullanılan ET-1 kiti, doğal ve rekombinant farelere spesifik olup 1pg/ml altındaki ET-1 düzeyini tesbit edebilecek sensitiviteye sahiptir.

Deney süresi sonunda elde edilen sol göz küreleri %10'luk tamponlu formalinde 48 saat süreyle tespit edilmiştir. Her iki yarısında kornea, sklera, üvea ve optik sinirin izlenmesine olanak verecek şekilde longitudinal eksen boyunca kesit yapılmıştır. Dokular %50, %70, %80, %90 ve absolu alkol serilerinden 2 saat süreyle geçirildikten sonra, 4 saat ksilol, 2'şer saat ksilol+parafin ve parafinde bekletildikten sonra parafine gömülmüştür. Rotary mikrotom ile her parafin bloktan 4-5 µm kalınlığında 3'er adet seri kesit alınmıştır. Kesitler rutin olarak hematoksilen eozin ile boyandıktan sonra Olympus BX51 ışık mikroskopunda değerlendirilmiş ve fotomikrografları çekilmiştir.

İris, silier cisim ve koroidde meydana gelen patolojik değişiklikler aşağıdaki kriterlere göre derecelendirilmiştir (82);

0 : Normal doku

1+: Genişlemiş iris damarları ve eksudat-protein ile kalınlaşmış iris stroması ve/veya ön kamarada az sayıda inflamatuvar hücre infiltrasyonu

2+: İris stroması ve/veya silier cisimcikte inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ön kamarada değişen sayıda inflamatuvar hücre infiltrasyonu

3+: İris stroması ve silier cisimde yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ön kamarada çok sayıda inflamatuvar hücre infiltrasyonu.

8 grup bulunmakta olup gruplar kendi içinde serum ET-1 düzeyi, HA ET-1 düzeyi ve HA protein konsantrasyonu değişiklikleri açısından nonparametrik Mann Whitney U Test kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. 0.05'in altındaki p değerleri istatistiksel anlamlılık kriteri olarak alınmıştır. Veri analizi SPSS 13.0 for Windows programı ile yapılmıştır.

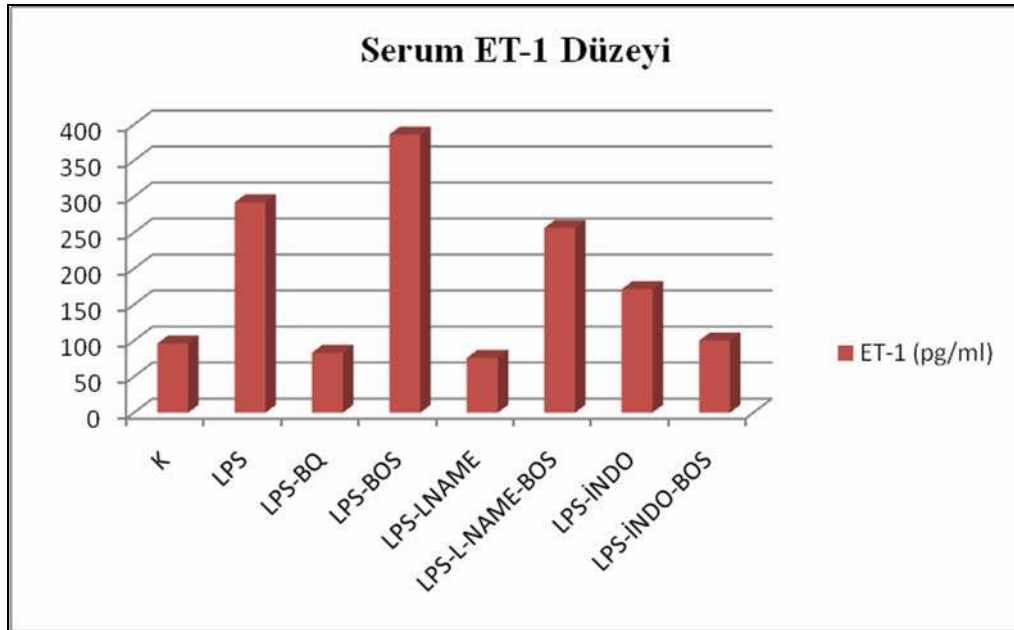
BULGULAR

Serum ET-1 Değişiklikleri

Tüm deneklerden alınan serumlardaki ET-1 düzeyleri, Tablo I ve Grafik I'de sunulmuştur. 1. grupta, ortalama serum ET-1 düzeyi, $95,90 \pm 32,53$ pg/ml olarak saptanmıştır. 2. grupta, ortalama serum ET-1 düzeyi, $291,94 \pm 74,97$ pg/ml olup kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.004$). 3. grupta, ortalama serum ET-1 düzeyi, $83,33 \pm 37,56$ pg/ml olup 2. gruba göre ET-1 düzeyinin anlamlı olarak azaldığı ($p=0.004$) ve bu değerin kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığı izlenmiştir ($p>0.05$). 4. grupta, ortalama serum ET-1 düzeyi, $386,23 \pm 176,78$ pg/ml olup 2. grup ile arasında anlamlı fark olmadığı ve tüm gruplar arasında en yüksek ET-1 düzeyinin bu grupta olduğu izlenmiştir ($p>0.05$). 5. grupta, ortalama serum ET-1 düzeyi, $76,09 \pm 23,32$ pg/ml olup 2. gruba göre anlamlı olarak daha düşük düzeyde ($p=0.004$) saptanmıştır; bu değer kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). 6. grupta, ortalama serum ET-1 düzeyi, $256,30 \pm 109,68$ pg/ml olup 2. grup ile arasında anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) ve bu değerin 5. gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu izlenmiştir ($p=0.004$). 7. grupta, ortalama serum ET-1 düzeyi, $171,31 \pm 121,61$ pg/ml olup bu değer 2. gruptan istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p=0.109$). 8. grupta, ortalama serum ET-1 düzeyi, $99,94 \pm 80,11$ pg/ml olup bu değer 2. gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p=0.004$). Son iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo I. Ortalama Serum ET-1 düzeyi

Grup	İşlem	Serum ET-1 (pg/ml)	Standart Sapma
1	KONTROL	95,90	32,53
2	LPS	291,94	74,97
3	LPS+BQ123	83,33	37,56
4	LPS+BOSENTAN	386,23	176,78
5	LPS+L-NAME	76,09	23,32
6	LPS+ L-NAME+BOSENTAN	256,30	109,68
7	LPS+İNDOMETAZİN	171,31	121,61
8	LPS+ İNDOMETAZİN+BOSENTAN	99,94	80,11

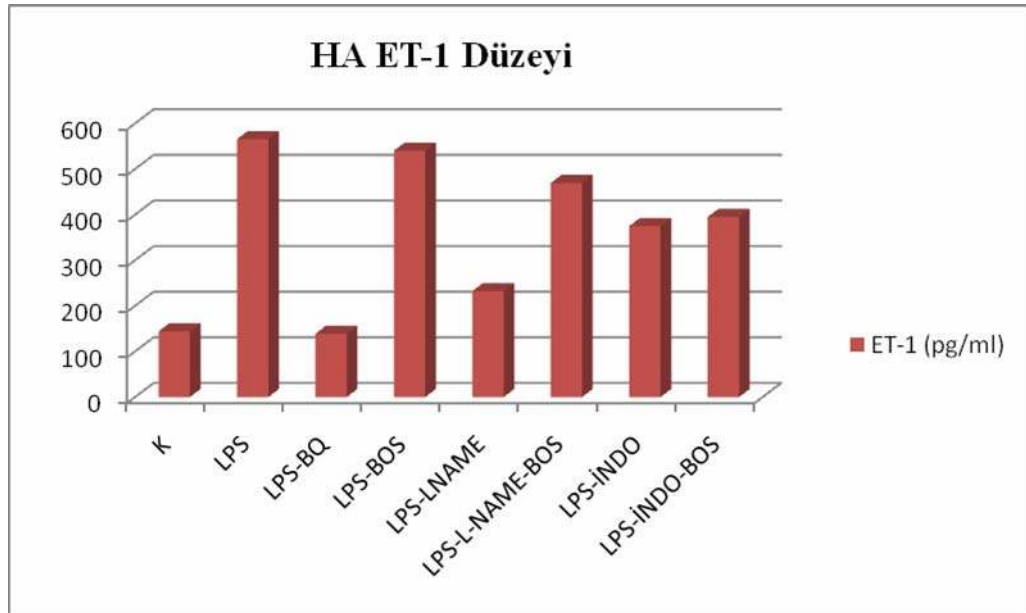
Grafik I. Serum ET-1 düzeyindeki değişiklikler

Humör Aköz ET-1 Değişiklikleri

Tüm deneklerden elde edilen HA ET-1 düzeyleri, Tablo II ve Grafik II 'de sunulmuştur. Birinci grupta ortalama HA ET-1 düzeyi $144,03 \pm 44,71$ pg/ml olarak saptanmıştır. İkinci grupta ortalama HA ET-1 düzeyi $565,67 \pm 376,29$ pg/ml olup bu değer kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,037$). Üçüncü grupta ortalama HA ET-1 düzeyi $138,91 \pm 63,70$ pg/ml olup bu değer 2. gruba göre anlamlı olarak daha düşük düzeyde bulunmuştur ($p=0,004$). Dördüncü grupta ortalama HA ET-1 düzeyi $540,33 \pm 214,18$ pg/ml olup 2. grup ile arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Beşinci grupta ortalama HA ET-1 düzeyi $232,38 \pm 114,53$ pg/ml olup 2. gruba göre ET-1 düzeyi düşük izlense de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.109$). Altıncı grupta ortalama HA ET-1 düzeyi $469,65 \pm 124,80$ pg/ml olup 2. grup ile arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0.05$). Beşinci gruptaki ET-1 düzeyi 6. gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p=0,016$). Yedinci grupta ortalama HA ET-1 düzeyi $375,00 \pm 243,98$ pg/ml olup 2. gruba göre daha düşük düzeyde olmasına karşın iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.15$). Yine 8. grupta ortalama HA ET-1 düzeyi $394,95 \pm 355,72$ pg/ml olup 2. ve 7. gruplarla arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0.05$). Yine 4. ve 8. gruplar arasında da anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tablo II . Ortalama humör aköz ET-1 düzeyi

Grup	İşlem	HA ET-1 (pg/ml)	Standart Sapma
1	KONTROL	144,03	44,71
2	LPS	565,67	376,29
3	LPS+BQ123	138,91	63,70
4	LPS+BOSENTAN	540,33	214,18
5	LPS+L-NAME	232,38	114,53
6	LPS+ L-NAME+BOSENTAN	469,65	124,80
7	LPS+İNDOMETAZİN	375,00	243,98
8	LPS+ İNDOMETAZİN+BOSENTAN	394,95	355,72

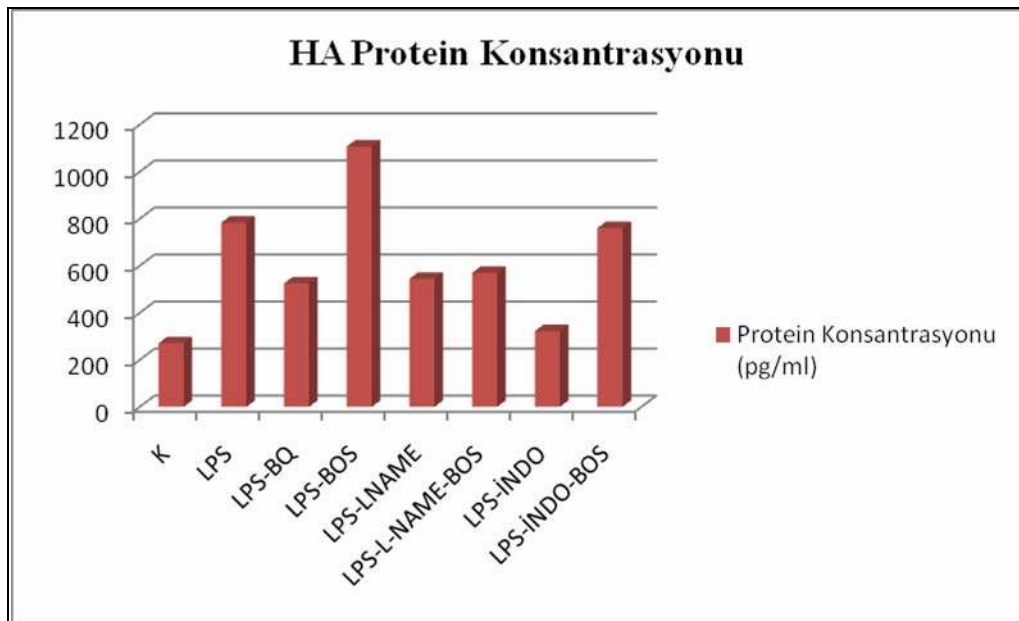
Grafik II. Humör aköz ET-1 düzeyindeki değişiklikler

Humör Aköz Protein Konsantrasyonu Değişiklikleri

Tüm deneklerden elde edilen HA protein konsantrasyonları, Tablo III ve Grafik III'de sunulmuştur. Birinci grupta ortalama HA protein konsantrasyonu $270,87 \pm 149,09$ pg/ml olarak saptanmıştır. İkinci grupta ortalama HA protein konsantrasyonu $783,40 \pm 74,43$ pg/ml olup bu değer kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,004$). Üçüncü grupta ortalama HA protein konsantrasyonu $525,01 \pm 49,23$ pg/ml olup bu değer 2. gruba göre anlamlı olarak daha düşük iken ($p=0,004$) kontrol grubundan ise anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0,016$). Dördüncü grupta ortalama HA protein konsantrasyonu $1107,10 \pm 117,67$ pg/ml olup 2. gruba göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur ($p=0,055$). Beşinci grupta ortalama HA protein konsantrasyonu $544,13 \pm 75,52$ pg/ml olup bu değer 2. gruba göre anlamlı olarak daha düşük ($p=0,004$), kontrol grubuna göre ise daha yüksek bulunmuştur ($p=0,025$). Altıncı grupta ortalama HA protein konsantrasyonu $569,57 \pm 81,11$ pg/ml olup 2. grup ile arasında anlamlı fark izlenmiştir ($p=0,006$). 5. ve 6. grup karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0,05$). Yedinci grupta ortalama HA protein konsantrasyonu $322,08 \pm 13,05$ pg/ml olup 2. gruptan anlamlı olarak daha düşük düzeyde saptanmıştır ($p=0,004$). 8. grupta ortalama HA protein konsantrasyonu $760,41 \pm 86,97$ pg/ml olup 2. grup ile arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0,05$). 8. grup, 7. gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,004$). Yine 4. ve 8. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu izlenmiştir ($p=0,004$).

Tablo III. Ortalama humör aköz protein konsantrasyonları

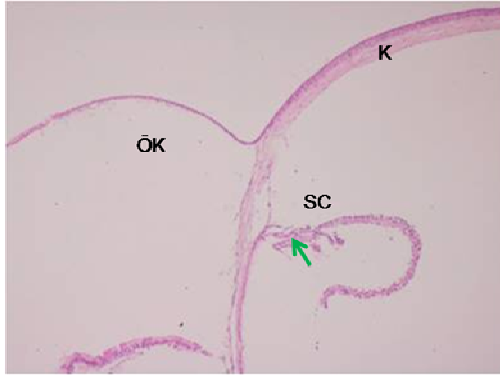
Grup	İşlem	HA protein konsantrasyonu (pg/ml)	Standart Sapma
1	KONTROL	270,87	149,09
2	LPS	783,40	74,43
3	LPS+BQ123	525,01	49,23
4	LPS+BOSENTAN	1107,10	117,67
5	LPS+L-NAME	544,13	75,52
6	LPS+L-NAME+BOSENTAN	569,57	81,11
7	LPS+İNDOMETAZİN	322,08	13,05
8	LPS+İNDOMETAZİN+BOSENTAN	760,41	86,97

Grafik III. Humör aköz protein konsantrasyonundaki değişiklikler

Histopatolojik Değişiklikler

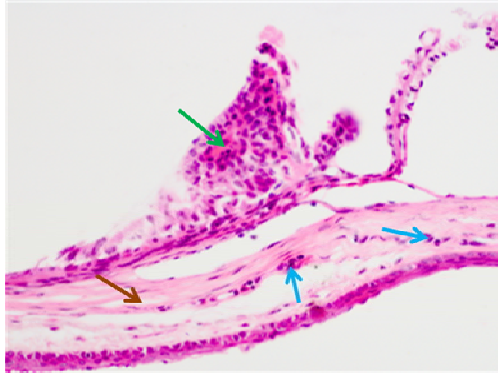
Gruplara ait histopatolojik enflamasyon dereceleri tablo IV’te verilmiştir.

1.grupta silier proseslerde, hafif kapiller hiperemi dışında histopatolojik değişiklik izlenmemiştir. Ön ve arka kamarada hücre izlenmemiştir. (Resim 1)



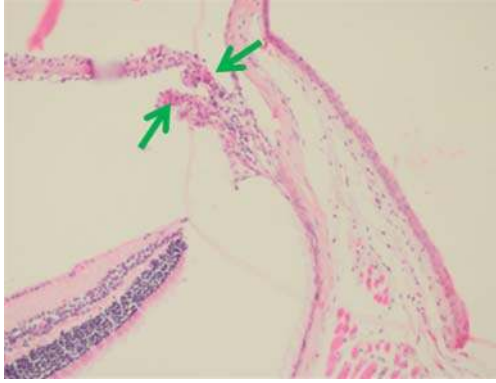
Resim 1. Birinci gruba ait histopatolojik bulgular: Korpus siliarede hafif hiperemi (yeşil ok) dışında patolojik bulgu izlenmemekte. ÖK; ön kamara, SC; silier cisim, K; koroidea. (Hematoksilen-Eozin x 20)

2. grupta koroidea ve silier proseslerde şiddetli vasküler hiperemi, nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu ile interstisyel dokuda ödem dikkati çekmiştir. Özellikle iridokorneal açıda yaygın kanamaların eşlik ettiği şiddetli enflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmiştir. (Resim 2)



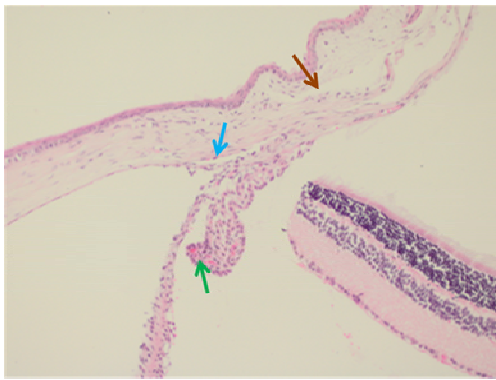
Resim 2. İkinci gruba ait histopatolojik bulgular: Koroidea ve silier proseslerde hiperemi (yeşil ok), ödem (kahverengi ok) ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu (mavi ok). (Hematoksilen-Eozin x 40)

3. grupta silier proseslerde hafif derecede kapiller hiperemi ile sınırlı histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir. (Resim 3)



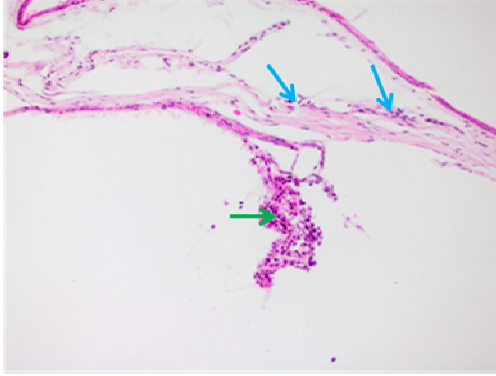
Resim 3. Üçüncü gruba ait histopatolojik bulgular: Silier proseslerde hafif derecede kapiller hiperemi (yeşil ok). (Hematoksilen-Eozin x 20)

4. grupta korpus siliare ve silier proseslerde şiddetli derecede hiperemi ve fokal hemorajilerin yanı sıra, koroidea'da şiddetli interstisyel ödem, vasküler dilatasyon ve hiperemi ile yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu gözlenmiştir. Optik sinir etrafında çoğunluğu nötrofil lökositlerden oluşan yoğun enflamatuvar hücre infiltrasyonudikkati çekmiştir. (Resim 4)



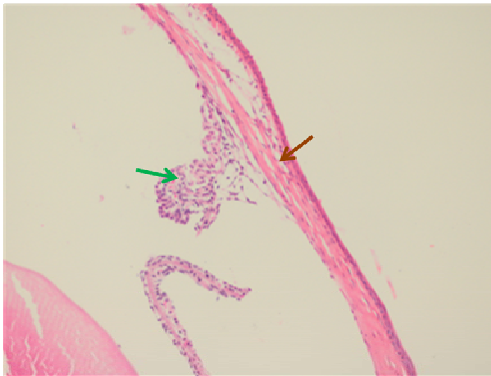
Resim 4. Dördüncü gruba ait histopatolojik bulgular: Korpus siliare ve silier proseslerde hiperemi (yeşil ok), ödem (kahverengi ok) ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu (mavi ok). (Hematoksilen-Eozin x 20)

5. grupta koroidea'da ön ve arka kamara sınırına yakın dokuya infiltre mononükleer hücre infiltrasyonu ile bölgeye yakın kornea epitelinde vakuoler dejenerasyon gözlenmiştir. Silier proseslerde hafif derecede kapiller hiperemi dikkati çekmiştir. (Resim 5)



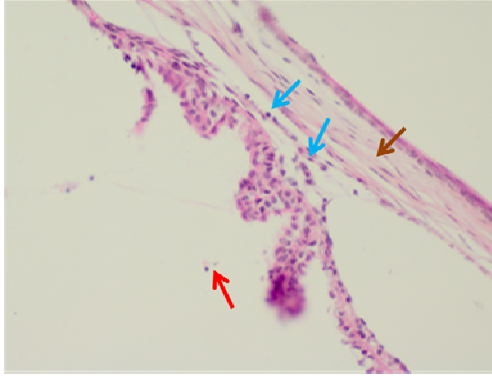
Resim 5. Beşinci gruba ait histopatolojik bulgular: Ön ve arka kamara sınırına komşu koroideada enflamatuvar hücre infiltrasyonu (mavi ok). Silier proseslerde hiperemi (yeşil ok). (Hematoksilen-Eozin x 20)

6. grupta interstisyel dokuda hafif derecede ödem ve hiperemi haricinde herhangi bir bulguya rastlanmamıştır ve gözlenen bulgular kontrol grubunda tanımlananlara oldukça benzerdi. (Resim 6)



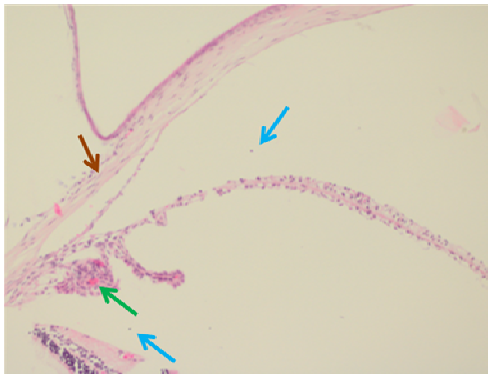
Resim 6. Altıncı gruba ait histopatolojik bulgular: İnterstisyel dokuda hafif derecede ödem (kahverengi ok) ve kapiller hiperemi (yeşil ok). (Hematoksilen-Eozin x 20)

7. grupta ön ve arka kamarada az sayıda da olsa nötrofil lökosit birikimi ile homojen kırmızı renkte proteini materyal tespit edilmiştir. Koroidea, yalnızca iridokorneal açı ile sınırlı olmak üzere stromal ödem, az sayıda makrofaj ve nötrofil lökosit infiltrasyonu içermektedir. (Resim 7)



Resim 7. Yedinci gruba ait histopatolojik bulgular: İridokorneal açı bölgesinde ödem (kahverengi ok) ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu (mavi ok). Arka kamarada enflamatuvar hücre infiltrasyonu (kırmızı ok). (Hematoksilen-Eozin x40)

8. grupta silier prosesler ve korpus siliarede hafif derecede kalınlaşma, ön ve arka kamarada enflamatuvar hücre birikimi gözlenmiştir. Koroideada yalnızca bir alanda fokal mononükleer hücre infiltrasyonu dikkati çekmiştir. (Resim 8)



Resim 8. Sekizinci gruba ait histopatolojik bulgular: Korpus siliare ve silier proseslerde hiperemi (yeşil ok). Ön ve arka kamarada enflamatuvar hücre infiltrasyonu (mavi ok). Koroideada ödem (kahverengi ok). (Hematoksilen-Eozin x 20)

Tablo IV. Gruplara ait histopatolojik derecelendirme

Grup	İşlem	Histopatolojik skor
1	KONTROL	0/+
2	LPS	+++
3	LPS+BQ123	+
4	LPS+BOSENTAN	+++
5	LPS+L-NAME	++
6	LPS+ L-NAME+BOSENTAN	+
7	LPS+İNDOMETAZİN	+ / ++
8	LPS+ İNDOMETAZİN+BOSENTAN	+ / ++

TARTIŞMA VE SONUÇ

Endotelin-1 (ET-1) endojen vasoaktif nöropeptid olup bilinen en potent vasokonstriktör maddedir (13). Makrofajlar, astrositler ve endotelyal hücrelerce üretilmekte olup beyin, kalp, böbrek, akciğer, bağırsak ve göz gibi pek çok dokuda mevcudiyeti gösterilmiştir (14,15,16).

Endotelin-1'in göz üzerine olan etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda göz içi basıncı, pupil çapı, korioretinal dolaşım, korneal epitel ve endotel, aköz protein konsantrasyonu ve intraoküler enflamasyonda rol aldığı gösterilmiştir.

EIU, deney hayvanına sublethal dozda LPS verilmesiyle genelde 24 saat sonra pik yapan göze lokalize enflamatuvar cevapla karakterizedir. Akut fakat geçici bir olaydır ve non-spesifik patojenlerle ortaya çıkan akut ön üveit tablosunun etyopatogenezinin anlaşılmasında önemli bir modeldir (3).

Bizim çalışmamızda, farelerde intraperitoneal LPS (*S. Thphimurium*) enjeksiyonu sonrası serum ve HA ET-1 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği ve histopatolojik olarak üveit tablosunun oluştuğu izlenmiştir. Aköz ET-1 düzeyinin serum ET-1 düzeyinden 1,9 kat daha yüksek olduğu izlenmiştir. Benzer şekilde, Shoji ve arkadaşları, intravenöz lipopolisakkarit (*S. Thphimurium*) enjeksiyonu yaptıkları tavşanlarda, aköz ve serum ET-1 düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir (49). Aköz ET-1 düzeyinin serumdakinden 1,5-3,9 kat yüksek olduğunu belirtmişlerdir (50). EIU modelinde, üveit gelişiminden LPS ile artan ET-1 düzeyinin etkili olabileceği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (45, 48, 49). Çalışmamızda, LPS enjeksiyonu uygulanan hayvanlarda HA protein konsantrasyonu, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu veri literatür ile uyumlu olup Chen ve arkadaşları, tavşan gözlerine intravitreal ET-1 enjeksiyonu uygulandığında, kan-aköz bariyerini oluşturan non-pigmente silier epitelde nekroz oluştuğunu ve bunun sonucu olarak aköze protein sızıntısının gerçekleştiğini belirtmişlerdir (45). Shoji ve arkadaşları, tavşan modelinde intravitreal endotelin-1 enjeksiyonu sonrası aköz protein konsantrasyonunun 4. saatte pik yaptığını ve doz bağımlı olarak bu etkinin 7. güne kadar sürebildiğini belirtmişlerdir (48).

ET-1'in iki farklı reseptör üzerinden etki gösterdiği bilinmektedir (34). Bunlar ET_A ve ET_B reseptörleri olup, ET_A reseptörleri vazokonstriktör etkiden ve fosfolipaz A₂ enzim aktivasyonundan sorumludur. ET_B reseptörleri ise hem NO hem de PGI₂ salıverilmesinden sorumlu olup vazodilatatör etkiden sorumludur. Elde ettiğimiz verilerde, ET_A reseptör antagonisti BQ123, gerek serum gerekse HA'de LPS ile artan ET-1 düzeyinde anlamlı azalma ve histopatolojik incelemelerde üveit tablosunda gerileme sağlamıştır. BQ123 sentez inhibitörü olmamasına karşın ET-1 düzeyinde azalma sağlamıştır. BQ123'ün ET_A reseptörlerinde oluşturduğu inhibisyon ET-1'in ET_B reseptörleri üzerinden etki etmesine neden olmaktadır. Fukuroda ve arkadaşları, ET_B reseptörlerinin mevcut ET-1'in metabolize edilmesinde rol aldığını bildirmişlerdir (36). BQ123 enjeksiyonuna bağlı serum ve HA ET-1 düzeyindeki azalmadan, ET_A reseptör antagonizmasıyla daha etkin hale gelen ve otoregülasyonda rol alan ET_B reseptörünün sorumlu olduğunu düşünmekteyiz. ET-1 düzeyindeki değişimle benzer şekilde, LPS ile artan HA protein konsantrasyonunun BQ123 uyguladığımız farelerde anlamlı olarak azaldığı izlenmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak, Shoji ve arkadaşları, tavşan modelinde intravitreal ET-1 enjeksiyonundan 1 saat önce selektif ET_A reseptör antagonisti (97-139) uygulandığında aköz protein ve PGE₂ konsantrasyonunun doz bağımlı olarak azaldığını belirtmişlerdir (52).

Çalışmamızın bosentan ayağında da bu durumu destekleyen sonuçlar alınmıştır. LPS enjeksiyonu sonrası BQ123 ile sağlanan ET-1 düzeyindeki düşüşün aksine, ET_A ve ET_B reseptör antagonisti olan bosentan enjeksiyonu

yapıldığında LPS ile artmış olan ET-1 düzeyinin düşmediği hatta anlamlı olmayan bir artışın olduğu izlenmiştir. Yine bosentan uyguladığımız farelerde, tek başına LPS uygulanan farelere göre HA protein konsantrasyonunun anlamlı olmasa da daha yüksek olduğu ve histopatolojik örneklerde üveit tablosunun şiddetlendiği görülmüştür. Shoji ve arkadaşları, tavşan modelinde, intravitreal ET-1 enjeksiyonu öncesi selektif ET_B reseptör antagonisti uygulamanın aköz protein konsantrasyonundaki artışı engellemediğini bildirmiştir (52). ET_A reseptör antagonisti ile sağlanan gerek ET-1 düzeyindeki gerek protein konsantrasyonundaki düşüş her iki reseptör birden inhibe edildiğinde sağlanamamıştır. Bu artışların otoregülasyondan sorumlu ET_B reseptörünün inhibisyonundan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

NO, L-arginin'in nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile oksidasyonu sonucu ortaya çıkan bir serbest radikaldir. LPS gerek kendisi gerekse salınan sitokinler aracılığıyla iNOS aktivasyonu ile yüksek düzeyde NO salınımına neden olur (67). Yüksek miktardaki NO salınımı, sitotoksik etkiye sahip olup üveit etyopatogenezinde rol almaktadır. LPS ile artan ET-1 de ET_B reseptörü üzerinden NO sentezini arttırmaktadır (78). LPS ile artan ET-1 düzeyinin, non-selektif NOS inhibitörü olan L-NAME verildiğinde hem serum hemde aközde azaldığı izlenmiştir (80). Literatürde L-NAME'in ET-1 düzeyini etkilediğine dair herhangi bir yayın bulunmamakta olup bu durumun sebebi açıklanamamıştır. Çalışmamızda, LPS ile artan HA protein konsantrasyonunun L-NAME ile anlamlı olarak azaldığı ve üveit tablosunda gerileme olduğu izlenmiştir. Benzer şekilde Parks ve arkadaşları, EIU oluşturulan sıçanlara intraperitoneal L-NAME

enjeksiyonu uygulamışlardır. L-NAME uygulanan sıçanlarda HA protein konsantrasyonunun %73-82 oranında azaldığını izlemişlerdir. Selüler infiltrasyonun neredeyse tamamen yok olduğu ve histopatolojik olarak enflamasyonun baskılandığını göstermişlerdir (81). Tilton ve arkadaşları, EIU modeli oluşturdukları sıçanlara selektif iNOS inhibitörü olan aminoguanidin enjeksiyonu yapmışlardır. Ön üveada %57 oranında anlamlı permeasyon azalması ve aköz hücre sayısında %60-90 oranında azalma sağlanmışlardır (82). Mandai ve arkadaşları EIU oluşturulan sıçanlarda selektif cNOS inhibitörü L-NNA ile %71, selektif iNOS inhibitörü L-NIO ile %31 oranında anlamlı HA protein konsantrasyon azalması sağlamışlardır (83).

Üveit gelişiminde araşidonik asit (AA) metabolitlerinin önemli rolünün olduğu bilinmektedir. Üveitte artan PG düzeyinde, ET-1'in de katkısının olduğu düşünülmektedir. ET-1, fosfolipaz A₂ aktivasyonuna neden olarak araşidonik asit salınımı sağlar (54). Ön kamaraya kanül ile verilen PGE₂'nin, kan-aköz bariyerini yıktığı, konjonktivada hiperemi, GİB'da ani artış, pupillada miyozis ve iriste hiperemi oluşturduğu belirtilmiştir (60). Çalışmamızda LPS ile artan ET-1 düzeyinin, indometazin uygulandığında gerek serum gerekse HA'da azaldığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlenmiştir. Northover ve arkadaşları, yaralı dokularda indometazinin kalsiyum up-take'ini azalttığını ve bu durumun antienflamatuar etkide katkısının olduğunu belirtmişlerdir (85). Dolayısıyla, indometazin hücre içi kalsiyum düzeyini azaltarak ET-1 sentez ve salınımını engellemekte (29, 30) aynı zamanda kan-aköz bariyerinin stabilitesini sağlayarak aközde ET-1 düzeyini arttıran enflamatuar hücrelerin göçünü de

azaltmaktadır. Çalışmamızda, serum ET-1 düzeyinde sağlanan düşüş aközdekinden daha fazladır. Bu durumu, sistemik yolla uygulanan indometazinin oküler penetrasyonunun düşük olmasıyla ilişkilendirmekteyiz. Conquet ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, oral 8mg/kg indometazin uygulamasından 75 dakika sonra indometazinin plazma konsantrasyonunu $1,385 \pm 0,229 \mu\text{g/ml}$, HA konsantrasyonunu ise $0,015 \pm 0,0007 \mu\text{g/ml}$ düzeyinde saptamışlardır (86). Shimida ve arkadaşları, fare peritoneal makrofajlarında ET-1 (12 saat) ve lipopolisakkarit (4 saat) inkübasyonu sonrası doz ve zaman bağımlı olarak PGE_2 ve COX_2 enzim ekspresyonunun arttığını izlemişlerdir. Aynı çalışmada, inkübasyondan yarım saat önce uygulanan deksametazon ve indometazin ile hem endothelin-1 hem de lipopolisakkarit aracılı PGE_2 ve COX_2 enzim ekspresyon artışının inhibe olduğunu izlemişlerdir (62). Çalışmamızda LPS'nin oluşturduğu üveit tablosunun indometazin ile gerilediği ve HA protein konsantrasyonunda anlamlı azalmanın sağlandığı izlenmiştir. Bu bulgular literatür ile örtüşmekte olup Shoji ve arkadaşları, tavşan modelinde ön kamaraya ET-1 enjeksiyonu sonrası ortaya çıkan HA protein konsantrasyonundaki artışın enjeksiyon öncesi topikal indometazin veya intravenöz diklofenak enjeksiyonu ile engellenebildiğini göstermişlerdir (49).

Çalışmamızda, indometazin ve bosentan kombinasyonunun tek başına indometazin uygulamasına göre gerek serum gerekse HA ET-1 seviyesinde anlamlı değişiklik oluşturmadığı izlenmiştir. Bu verilerle uyumlu şekilde bu iki grup arasındaki histopatolojik bulgular da benzer bulunmuştur. Bu durum, indometazin ET-1 sentez ve salınımını engellemektedir dolayısıyla klirens

üzerinde etkili olan bosentanın belirgin etkisi ortaya çıkmamaktadır şeklinde açıklanabilir. İndometazin ve bosentan kombinasyonunun HA protein konsantrasyonunda anlamlı azalma sağlayamamış olması ise açıklanamamıştır.

Sonuç olarak lipopolisakkarit aracılı oluşan üveit modelinde aköz ve serum ET-1 düzeyi artmakta ve aköz konsantrasyonu serumdaki değerlerden daha fazla yükselmektedir. Bu durum ET-1'in kan-aköz bariyerindeki bozulma neticesiyle sızıntı yoluyla aköze geçtiğinden ziyade oküler dokularda lokal olarak sentezlendiğini desteklemektedir.

ET-1'in üveit gelişiminde önemli bir faktör olduğu ve bu etkisini önemli ölçüde ET_A reseptörü üzerinden araşidonik asit metabolitleri aracılığıyla gerçekleştirdiği bilinmekteydi. Bu çalışmada, ET_A reseptör antagonizmasının (BQ123) hem serum hem de HA ET-1 düzeyini azalttığı görülmüştür. Bu yönüyle ET_A reseptör antagonistlerinin üveit gelişimini engellemede bir başka etki mekanizması ortaya çıkmıştır. Çalışmamız, ET_A reseptör antagonistlerinin, ET-1 düzeyine olan etkisini değerlendiren ilk çalışma olması yönüyle değerlidir.

Üveit modelinde ET_A ve ET_B reseptör antagonisti bosentan, BQ123 ile sağlanan serum ve aköz ET-1 düşüşünü engelleyememektedir. ET_B reseptör antagonizması ET-1 metabolizmasını azaltarak üveit tablosunu şiddetlendirmektedir. Çalışmamız bosentanın oftalmoloji alanında ilk kez kullanılıyor olması açısından değerlidir.

Non-selektif NOS inhibitörü olan L-NAME'in aköz NO düzeyini azaltarak üveit tablosunda gerileme sağladığı biliniyordu. Çalışmamızda, açıklanamayan bir mekanizma ile L-NAME, serum ve aköz ET-1 düzeyini azaltmıştır. Bu durum

L-NAME'in enflamasyonu baskılamada hem NO hem de ET-1 üzerinden etki edebileceğini düşündürmektedir.

ET-1, potent araziidonik asit agonisti ve prostanoid sentezleyicisi olup bunu fosfolipaz A₂ üzerinden gerçekleştirmektedir. Bu yolağın blokajının (indometazin) intraoküler enflamasyonu baskılayabileceği bilinmekteydi. Oküler enflamasyonu baskılamada indometazinin sağlamış olduğu serum ve aköz ET-1 düzeyindeki düşüşün de etkili olabileceği düşünölmüşür.

Sonuç olarak, oküler enflamasyonda ET-1 önemli bir mediatördür. ET-1 ile ilişkili enflamasyonun baskılanmasında, ET_A reseptörlerinin inhibisyonu kadar ET_B reseptörlerinin de çalışır durumda olması gerekmektedir. ET-1 sentez ve salınımını engelleyen veya ET_A reseptör antagonizması sağlayan tedavi modaliteleri ile ilgili daha ileri çalışmalar yapıldığı takdirde, bu modalitelerin üveit tedavisinde kullanılabileceği düşöncesindeyiz.

ÖZET

Endotelin 1 (ET-1), endojen vazoaktif peptid olup bilinen en potent vazokonströktör maddedir. Endotelinlerin ve reseptörlerinin oküler dokularda varlığı gösterilmiş olup aköz protein konsantrasyonu (APK) üzerinde etkilerinin olduğu ve üveit etyopatogenezinde rol aldığı belirtilmiştir.

Bu çalışmada, endotoksinle üveit modeli oluşturulan farelerde serum ve humör aköz (HA) ET-1 düzeyindeki ve APK'deki değişiklikler araştırılmışır. Aynı zamanda intraperitoneal olarak uygulanan ET_A reseptör antagonistinin

(BQ123), non-selektif ET-1 atagonistinin (bosentan), non-selektif nitrik oksit sentaz inhibitörünün (L-NAME) ve non-selektif siklooksijenaz enzim inhibitörünün (indometazin) bu parametrelere olan etkileri değerlendirilmiştir. Bunlara ek olarak, üveal enflamasyonun şiddeti histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, 48 farenin (8 haftalık, 25 gr) 96 gözü değerlendirilmiştir. Fareler sekiz grupta incelenmiştir. Herhangi bir işlem yapılmayan birinci grup, kontrol grubunu oluşturmaktadır. İkinci gruba, intraperitoneal lipopolisakkarit (LPS, *S. Typhimurium*, 50µg/0.1ml) enjeksiyonu uygulanarak deneysel üveit modeli oluşturulmuştur. Üçüncü gruba, eş zamanlı olarak intraperitoneal LPS ve BQ123 (25µgr/0.05ml) enjeksiyonu yapılmıştır. Dördüncü gruba, benzer uygulama ile LPS ve Bosentan (100µgr/0.2ml) enjeksiyonu yapılmıştır. Beşinci gruba, benzer uygulama ile LPS ve L-NAME (10mg/kg/0.2ml) enjeksiyonu yapılmıştır. Altıncı gruba, benzer uygulama ve dozda LPS, bosentan ve L-NAME enjeksiyonu yapılmıştır. Yedinci gruba, benzer uygulama ile LPS ve indometazinin (10mg/kg/0.2ml) enjeksiyonu yapılmıştır. Sekizinci gruba, benzer uygulama ve dozda LPS, indometazin ve bosentan enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyonlardan 24 saat sonra, serum ve HA (sağ gözler) örnekleri alınmıştır. Serum ve HA ET-1 düzeyleri kantitatif sandviç enzim immünassay yöntemi ile ölçülmüştür. APK, modifiye Lowry metodu ile ölçülmüştür. Örneklerin toplanmasını takiben hayvanlar sakrifiye edilmiş ve histopatolojik değerlendirme için sol gözleri enükle edilmiştir.

Kontrol grubunda ortalama serum ve HA ET-1 düzeyi sırasıyla $95,90 \pm 32,53$ pg/ml ve $144,03 \pm 44,71$ pg/ml idi. Kontrol grubunda ortalama APK $270,87 \pm 149,09$ pg/ml düzeyindeydi. LPS enjeksiyonu, serum, HA ET-1 düzeyinde ve APK’de belirgin bir artışa neden olmuş olup bu değerler sırasıyla $291,94 \pm 74,97$ pg/ml ($p=0.004$), $565,67 \pm 376,29$ pg/ml ($p=0,037$) ve $783,40 \pm 74,43$ pg/ml idi ($p=0,004$). Aynı zamanda, LPS enjeksiyonu yapılan farelerde histopatolojik olarak şiddetli üveit tablosu izlenmiştir. BQ123 enjeksiyonu, LPS’nin neden olduğu serum ve HA ET-1 düzeyindeki ve APK’deki artışı engellemiştir; bu parametreler sırasıyla, $83,33 \pm 37,56$ pg/ml ($p=0.004$), $138,91 \pm 63,70$ pg/ml ($p=0,037$) and $525,01 \pm 49,23$ pg/ml ($p=0,037$) olarak ölçülmüştür. Benzer şekilde, BQ123, LPS’nin neden oldu üveit tablosunu histopatolojik olarak engellemiştir. Bosentan enjeksiyonu, LPS’nin bu parametrelerde neden olduğu artışı engelleyememekte hatta arttırmaktadır; bu parametreler sırasıyla $386,23 \pm 176,78$ pg/ml ($p>0.05$), $540,33 \pm 214,18$ pg/ml ($p>0.05$) and $1107,10 \pm 117,67$ pg/ml ($p=0,055$) olarak ölçülmüştür. L-NAME enjeksiyonu, tek başına LPS enjeksiyonu ile karşılaştırıldığında serum ET-1 düzeyinde ve APK’de düşüş sağlamıştır, bu değerler sırasıyla $76,09 \pm 23,32$ pg/ml ($p=0.004$) ve $544,13 \pm 75,52$ pg/ml ($p=0,004$) olarak ölçülmüştür. L-NAME enjeksiyonu sonrası, HA ET-1 düzeyi $232,38 \pm 114,53$ pg/ml olup sağlanan düşüş düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.109$). Bu bulgularla uyumlu şekilde histopatolojik olarak L-NAME enjeksiyonu ile LPS ile uyarılan üveiti engellemiştir. L-NAME ve bosentan kombinasyonu, hem serum hem de HA’da LPS’nin neden olduğu ET-1 artışını değiştirmemiş ancak APK’de azalma

sağlamıştır, bu parametreler sırasıyla $256,30 \pm 109,68$ pg/ml ($p > 0.05$), $469,65 \pm 124,80$ ($p > 0.05$) ve $569,57 \pm 81,11$ pg/ml ($p = 0,006$) idi. İndometazin enjeksiyonu, sadece LPS uygulamasına göre serum ve HA ET-1 seviyesinde, sırasıyla $171,31 \pm 121,61$ pg/ml ve $375,00 \pm 243,98$ pg/ml azalma sağlamış; ancak bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). İndometazin enjeksiyonu sonrası, ortalama APK $322,08 \pm 13,05$ pg/ml olup bu değer LPS'nin neden olduğu APK artışından anlamlı olarak daha az bulunmuştur ($p = 0,004$). Benzer şekilde, indometazinin, LPS'nin indüklediği üveit tablosunu histopatolojik olarak gerilettiği izlenmiştir. İndometazin ve bosentan kombinasyonu uygulamasında ortalama serum ve HA ET-1 düzeyleri sırasıyla $99,94 \pm 80,11$ pg/ml ve $394,95 \pm 355,72$ pg/ml olup tek başına indometazin uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bu gruplar arasında histopatolojik bulgular da benzerdir. Sekizinci grupta ortalama APK düzeyi $760,41 \pm 86,97$ pg/ml olup yedinci gruptan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p = 0,004$).

ET-1 üveit etyopatogenezinde önemli bir mediatördür. ET_A reseptörünün blokajı, hem serum hem de HA'da ET-1 düzeyini düşürmektedir. ET_A reseptör antagonistleri aynı zamanda LPS'nin neden olduğu üveitte düzelme sağlamaktadır. ET_B reseptör blokajı hem serum hem de HA'da ET-1 düzeyini arttırmakta ve üveit tablosunu şiddetlendirmektedir. ET-1 sentez ve salınımını engelleyen veya ET_A reseptör antagonizması sağlayan tedavi modaliteleri ile ilgili daha ileri çalışmalar yapıldığı takdirde, bu modalitelerin üveit tedavisinde kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

İNGİLİZCE ÖZET

Endothelin-1 (ET-1) is an endogenous vasoactive peptide that is considered among the most potent vasoconstrictor substances known. Endothelins and their receptors have been shown to be present in the eye and it is reported that they influence aqueous protein concentration (APC) and play role in etiopathogenesis of uveitis.

In this study, we investigated the serum and humor aqueous (HA) ET-1 levels and APC changes in an endotoxin-induced experimental uveitis model in mice. The influence of intraperitoneally injected ET_A receptor antagonist (BQ123), non-selective ET-1 antagonist (Bosentan), non-selective nitric oxide sentase inhibitor (L-NAME) and non-selective cyclooxygenase inhibitor (indomethacin) on those parameters were also assessed. In addition, the severity of uveal inflammation were examined histopathologically.

In this study, 96 eyes of 48 mice (8-week-old, 25 g) were examined. The mice were evaluated in eight groups. The 1st group was the control group and no procedure was done. In the 2nd group, experimental uveitis model was induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, *S. Thphmirium*, 50µg/0.1ml). In the 3rd group, both LPS and BQ123 (25µgr/0.05ml) was injected intraperitoneally in the same time. In the 4th group, both LPS and bosentan (100µgr/0.2ml) were injected in the same manner. In the 5th group, both LPS and L-NAME (10mg/kg/0.2ml) were injected in the same manner. In the 6th group, LPS, Bosentan and L-NAME were injected in the same manner. In the 7th group,

both LPS and indomethacin (10mg/kg/0.2ml) were injected in the same manner. In the 8th group, LPS, indomethacin and bosentan were injected in the same manner. 24 hours after injections, serum and HA samples (right eyes) were drawn. Serum and HA ET-1 levels were measured by quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. APC was measured by modified Lowry method. The animals were sacrificed after the collection of samples and then the left eyes were enucleated and histopathological changes were examined.

The control group, mean levels of serum and HA ET-1 were $95,90 \pm 32,53$ pg/ml and $144,03 \pm 44,71$ pg/ml respectively. Mean levels of APC were $270,87 \pm 149,09$ pg/ml in the control group. LPS injection, increased the levels of serum, HA ET-1 and APC significantly. These levels were, $291,94 \pm 74,97$ pg/ml ($p=0,004$), $565,67 \pm 376,29$ pg/ml ($p=0,037$) and $783,40 \pm 74,43$ pg/ml ($p=0,004$) respectively. Also, severe uveitis was seen histopathologically in the LPS injected mice. Injecting BQ123 inhibited the LPS induced elevation in serum, HA ET-1 levels and APC. Those parameters were, $83,33 \pm 37,56$ pg/ml ($p=0,004$), $138,91 \pm 63,70$ pg/ml ($p=0,037$) and $525,01 \pm 49,23$ pg/ml ($p=0,037$) respectively. Similarly, BQ123 inhibited LPS induced uveitis histopathologically. Bosentan injection could not inhibit, on the contrary, it augmented those parameters, which were, $386,23 \pm 176,78$ pg/ml ($p>0,05$), $540,33 \pm 214,18$ pg/ml ($p>0,05$) and $1107,10 \pm 117,67$ pg/ml ($p=0,055$) respectively. It was also seen that bosentan aggravated the uveitis histopathologically. Injection of L-NAME, decreased the serum ET-1 levels and APC when compared with LPS alone. Those levels were $76,09 \pm 23,32$ pg/ml ($p=0,004$) and $544,13 \pm 75,52$ pg/ml ($p=0,004$) respectively. L-

NAME injection decreased HA ET-1 level which was measured $232,38 \pm 114,53$ pg/ml ($p=0.109$) and had no statistical value. LPS induced uveitis was inhibited histopathologically with L-NAME injection coherent with those findings. The combination of L-NAME and bosentan did not alter the LPS induced ET-1 elevation both serum and HA but decreased APC. Those parameters were $256,30 \pm 109,68$ pg/ml ($p>0.05$), $469,65 \pm 124,80$ ($p>0.05$) and $569,57 \pm 81,11$ pg/ml ($p=0,006$) respectively. Indomethacin injection inhibited serum and HA ET-1 levels, $171,31 \pm 121,61$ pg/ml ($p=0.109$) and $375,00 \pm 243,98$ pg/ml ($p=0.15$) respectively, when compared with those treated LPS alone but those had no statistical value. Mean APC was $322,08 \pm 13,05$ pg/ml ($p=0,004$). This parameter and histopathologically LPS induced uveitis were inhibited in idomethacin injected mice. In indomethacin and bosentan combination, mean serum and HA ET-1 levels were $99,94 \pm 80,11$ pg/ml and $394,95 \pm 355,72$ pg/ml respectively and had no stastistical value when compared with those treated with indomethacin alone ($p>0.05$). Histopathologic findings are similar between those groups. In the 8th group mean APC level was $760,41 \pm 86,97$ pg/ml and higher than 7th ($p=0,004$)

ET-1 is an important mediator in uveitis etiopathogenesis. ET_A receptor blockage decreases both serum and HA ET-1 levels and ameliorate LPS induced uveitis. ET_B receptor blockage increases both serum and HA ET-1 levels and aggravate uveitis. We think that ET-1 synthesis inhibitors or ET_A receptor antagonists may play role in the treatment of uveitis if more studies are done concerning these modalities.

KAYNAKLAR

1. Darrel RW, Wagner HP, Kurland CT. Epidemiology of uveitis: incidence and prevalence in a small urban community. Arch Ophthalmol 1962; 68: 501–514.
2. Rosenbaum JT: Uveitis. An internist's view. Arch Intern Med 1989; 149: 1173–1176.
3. Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR: Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. Nature 1980; 286: 611–613.
4. Bloch-Michel E, Nussenblatt RB: International Uveitis Study Group recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease. Am J Ophthalmol 1987; 103: 234-5.
5. Nussenblatt RB, Whitcup SM, Paetsch AG: Uveitis: Fundamentals and Clinical Practice, ed 2. St Louis, Mosby-Year Book, 1996.
6. Friedlaender MH: Allergy and immunology of the eye, 2. ed. New York: Raven Press, 1993; 1-325.
7. Streilein JW: Immunoregulatory mechanisms of the eye. Prog Retin Eye Res 1999; 18: 357 -70.
8. Hoekzema R, Murray PI, Van Harren MAC, Helle M, Kijlstra A: Analysis of interleukin-6 in endotoxin induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991; 32: 88-95.

9. Westphal O: Endotoxin: general introduction. In: Bacterial Endotoxin: Chemical, Biological and Clinical Aspects, J.Y. Homma, S. Kanegasaki, O. Lu Deritz, T. Shiba and O. Westphal, Eds, Verlag Chemie, Weinheim, Basel, pp.1-8. 1984

10. Poxton IR and Edmond DM: Biological activity of Bacteroides lipopolysaccharide reappraisal. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 20: 149-153.

11. Hamann L, El Samalouti V, Ulmer AJ, Flad HD and Rietschel ET: Components of gut bacteria as immunomodulators. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 41: 141-54.

12. Woods AC: Studies on the actions of toxins and protein degeneration products on the eye. *Arch Ophthalmol* 1916; 45: 451–64.

13. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988; 332: 411–15.

14. Lee ME, de la Monte SM, Ng SC, Bloch KD, Quertermous T: Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest* 1990; 86: 141–147

15. Plumpton C, Ashby MJ, Kuc RE, O'Reilly G, Davenport AP:
Expression of endothelin peptides and mRNA in the human heart. *Clin Sci* 1996; 90: 37–46.
16. Karet FE: Endothelin peptides and receptors in human kidney. *Clin Sci* 1996; 91: 267–273.
17. Sugiyama T, Oku H, Moriya S, Simizu K, Hamada J. and Azuma I:
Effect of endothelin-1 on ocular circulation. *J Jpn Ophthalmol Soc* 1993; 97: 678–682.
18. Wollensak G, Schaefer HE, Ihling C: An immunohistochemical study of
endothelin-1 in the human eye. *Curr Eye Res* 1998; 17: 541–45.
19. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer
RE, Yanagisawa M: Interaction of endothelin-3 with endothelin-B
receptor is essential for development of epidermal melanocytes and
enteric neurons. *Cell* 1994; 79: 1277–85.
20. Wright CE, Fozard JR: Regional vasodilation is a prominent feature of
the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized,
spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1988; 155: 201–3.
21. Takuwa Y, Yanagisawa M, Takuwa N, Masaki T: Endothelin, its
diverse biological activities and mechanisms of action. *Prog Growth
Factor Res* 1989; 1: 195–206.
22. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H,
Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M: Cranial and

cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 1998; 125: 813–24.

23. Clouthier DE, Williams SC, Yanagisawa H, Wieduwilt M, Richardson JA, Yanagisawa M: Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. *Dev Biol* 2002; 17: 10–24.

24. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T: The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2863–7.

25. Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T et al: Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6964–7.

26. Coca-Prados M, Escribano J, Ortego J: Differential gene expression in the human ciliary epithelium. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18: 403–29.

27. Kido T, Sawamura T, Masaki T: The processing pathway of endothelin-1 production. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 13–15.

28. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M: ECE-1: A membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78: 473–85.

29. Woods M, Mitchell JA, Wood EG, Barker S, Walcot NR, Rees GM, Warner TD: Endothelin-1 is induced by cytokines in human vascular smooth muscle cells: Evidence for intracellular endothelin-converting enzyme. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 902–9.
30. Kitazumi K, Tasaka K: Thrombin-stimulated phosphorylation of myosin light chain and its possible involvement in endothelin-1 secretion from porcine aortic endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1701–9.
31. Saijonmaa O, Ristimäki A, Fyhrquist F: Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 514–20.
32. Wiley KE, Davenport AP: Nitric oxide-mediated modulation of the endothelin-1 signalling pathway in the human cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 213–20.
33. Imai T, Hirata Y, Marumo F: Heparin inhibits endothelin-1 and protooncogene-c-fos gene expression in cultured bovine endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 49–52.
34. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T: Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 103–8.

35. Marsault R, Feolde E, Frelin C: Receptor externalization determines sustained contractile responses to endothelin-1 in the rat aorta. *Am J Physiol* 1993; 264: 687-93.
36. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M: Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1461–5.
37. MacCumber MW, D'Anna SA: Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1231-35.
38. Stahl F, Gebauer B, Lepple-Wienhues A, Langenbeck-Groh G, Berweck S, Wiederholt M: Characterization of acetylcholine- and endothelin induced calcium entry in cultured human ciliary muscle cells. *Pflügers Arch* 1992; 422: 105–11.
39. Tao W, Prasanna G, Dimitrijevic S, Yorio T: Endothelin receptor A is expressed and mediates the $[Ca^{2+}]_i$ mobilization of cells in human ciliary smooth muscle, ciliary nonpigmented epithelium, and trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 1998; 17: 31–38.
40. Satoh M, Yamamoto Y, Takayanagi I: Characterization of endothelin receptor subtypes mediating Ca^{2+} mobilization and contractile response in rabbit iris dilator muscle. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 1277–85.

41. Takagi H, Reinach PS, Tachado SD, Yoshimura N: Endothelin-mediated cell signaling and proliferation in cultured rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 134–42.
42. Prasanna G, Krishnamoorthy R, Clark AF, Wordinger RJ, Yorio T: Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2704–13.
43. Ramachandran E, Frank RN, Kennedy A: Effects of endothelin on cultured bovine retinal microvascular pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 586–95.
44. MacCumber MW, Jampel HD, Snyder SH: Ocular effects of the endothelins. Abundant peptides in the eye. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 705-10
45. Chen HB , Yamabayashi S and Tsukuhara S: Morphological Changes in Rabbit Ciliary Epithelium and Blood–Aqueous Barriers after Intravitreal 10^{-5} M Endothelin-1. *Experimental Eye Research* 1996; 62: 605-612.
46. Granstam E, Wang L, Bill A: Ocular effects of endothelin-1 in the cat. *Curr Eye Res* 1992; 11: 325–32.
47. Taniguchi T, Okada K, Haque MS, Sugiyama K, Kitazawa Y: Effects of endothelin-1 on intraocular pressure and aqueous humor Dynamics in the rabbit eye. *Curr Eye Res* 1994; 13: 461–4.

48. Shoji N, Oshika T, Masuda K: Inflammatory reaction via arachidonic acid cascade after intravitreal injection of endothelin-1. *Curr Eye Res* 1998; 17: 205-10.
49. Shoji N, Oshika T, Masuda K: Endothelin-1 and intraocular inflammation in pigmented rabbit eyes. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1995; 99: 631-5.
50. Shoji N, Oshika T, Masuda K: Endothelin-1 and intraocular inflammation in pigmented rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol* 1997; 41; 150-153.
51. Leppel-Wienhues A, Becker M, Stahl F et al: Endothelin-like immunoreactivity in the aqueous humour and in conditioned medium from cultures ciliary epithelial cells. *Curr Eye Res* 1992; 11: 1041-46
52. Shoji N, Oshika T, Amano S, Masuda K: Effects of endothelin receptor antagonists on anterior chamber inflammation induced by intravitreal injection of endothelin-1. *Exp Eye Res* 1999; 69: 437-44.
53. Evereklioglu C, Er H, Cumurcu T, Türköz Y: Serum homocysteine level is increased and correlated with endothelin-1 and nitric oxide in Behçet's disease. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 653-7
54. Abdel-Latif AA, Zhang Y, Yousufzai SY: Endothelin-1 stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandins in rabbit iris sphincter

- smooth muscle: Activation of phospholipase A2. *Curr Eye Res* 1991; 10: 259–265.
55. Abdel-Latif AA, Yousufzai SY, El-Mowafy A: Prostaglandins mediate the stimulatory effects of endothelin-1 on cyclic adenosine monophosphate accumulation in ciliary smooth muscle isolated from bovine, cat, and other mammalian species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 328-38
56. Ambache N: Irin, a smooth-muscle contracting substance present in rabbit iris. *J Physiol* 1955; 129: 65–6.
57. Bito LZ, Baroody RA: The ocular pharmacokinetics of eicosanoids and their derivatives. 1. Comparison of ocular eicosanoid penetration and distribution following the topical application of PGF2 alpha, PGF2 alpha-1-methyl ester, and PGF2 alpha-1-isopropyl ester. *Exp Eye Res* 1987; 44: 217-26.
58. Yüksel N, Altunay H, Elibol O et al: Prostaglandin E2'nin kornea ve konjonktivada sitoprotektif etkisi: Ultrastrüktürel deneysel çalışma. *MN Oftalmoloji* 1997; 4: 1-4.
59. Hardy P, Abran F, Li Y et al: Free radicals in the retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: Interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 580-91.

60. Neufeld AH, Janipol LM, Scars ML: Aspirin prevents the disruption of the blood aqueous barrier in the rabbit eye. *Nature* 1972; 238: 158-9.
61. Csukas S, Paterson AC, Brown K et al: Time course of rabbit ocular inflammatory response and mediator release after intravitreal endotoxin. *Invest Ophthalmol and Vis Sci* 1990; 31: 382-7.
62. Shimida K, Yonetani Y, Kita T et al: Cyclooxygenase 2 expression by endothelin-1-stimulated mouse resident peritoneal macrophages in vitro. *Eur J Pharmacol* 1998; 356: 73-80
63. Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268: 1231-4.
64. Nathan C, Xie QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-8
65. Pollock JS, Forstermann JA, Mitchell TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F: Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1080-4
66. Snyder SH: Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 1992; 257: 494-6
67. Billiar TR, Curran RD, Ferrari FK, Williams DL, Simmons RL: Kupffer cell: hepatocyte cultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J Surg Res* 1990; 48: 349-53.

68. Kilbourn RG, Griffith OW: Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated septic shock. *J Natl Cancer Institute* 1992; 84: 827-31
69. Rees DD, Palmer RMJ, Schultz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-52
70. Becquet F, Courtois Y, Goureau O: Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol* 1997; 42: 71-82.
71. Behar-Cohen F, Goureau O, D'Hermies D, Courtois Y: Decreased intraocular pressure induced by nitric oxide is correlated to nitrite production in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1711-5.
72. Haefliger IO, Flammer J: Nitric Oxide and Endothelin in the Pathogenesis of Glaucoma. *Lippincott – Raven*. 1998; 27-30
73. Quigley H A: Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18: 39-57.
74. Neufeld AH: Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999; 43: 129-35.
75. Chiou GC, Hong SJ: Prevention and reduction of neural damage in ischemic strokes by w-(N,N'-diethylamino)-n-alkyl-3, 4, 5-

- trimethoxybenzoate compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 474-8.
76. Beauregard C, Q Liu and Chiou GC: Effects of nitric oxide donors and nitric oxide synthase substrates on ciliary muscle contracted by carbachol and endothelin for possible use in myopia prevention. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001; 17: 1-9.
77. Oku H, Yamaguchi H, Sugiyama T, Kojima S, Ota M, Azuma I: Retinal toxicity of nitric oxide released by administration of a nitric oxide donor in the albino rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2540-4.
78. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F: Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;91: 1367–73.
79. Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF: Termination of endothelin signaling: Role of nitric oxide. *J Cell Physiol* 1994; 158: 485–94.
80. Goureau O, Bellot J, Thillaye B et al: Increased Nitric Oxide Production in Endotoxin-Induced Uveitis. Reduction of Uveitis by an Inhibitor of Nitric Oxide Synthase. *The J of Immun* 1995; 154: 6518-
- 23

81. Parks DJ, Cheung MK, Chan CC and Roberge FG: The role of nitric oxide in uveitis. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 544-6
82. Tilton RG, Chang K, Corbett JA, Misko TP, M Currie G, Bora NS et al: Endotoxin induced uveitis in the rat is attenuated by inhibition of nitric oxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 3278-88.
83. Mandai M, Mittag TW, Kogishi J, Iwaki M, Hangai M, Yoshimura N: Role of nitric oxide synthase isozymes in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37: 826-32.
84. Sandermann and Stromiger. Purification and properties of C 55 - isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1972; 247: 5123-31.
85. Northover BJ: The effect of indomethacin on calcium, sodium, potassium and magnesium fluxes in various tissues of the guinea-pig. *Br J Pharma* 1972; 45: 651-59.
86. Conquet PH, Plazonnet B, Le Douarec JC: Arachidonic acid-induced elevation of intraocular pressure and anti-inflammatory agents. *Invest Ophthalmol* 1975; 14: 772-5

