

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA N-METİL D-ASPARTAT İLE İNDÜKLENMİŞ
APOPİTOZİS MODELİNDE TRİGONELLİNE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Sevinç Arzu POSTACI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER**

**ELAZIĞ
2020**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Mehmet YALNIZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Fatma Ülkü ÇELİKER

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER _____ Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

İTHAF

Canım kardeşim Şule Postacı Temiz'e....



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemdeki katkılarından dolayı başta anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Ülkü Çeliker'e ve değerli hocalarım Prof. Dr. Orhan Aydemir, Dr. Öğ. Üyesi Onur Çatak, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Balbaba ve Dr. Öğr. Üyesi Hakan Yıldırım'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu 4 yıllık zorlu süreçte her zaman yanımda olan, dostluğu sayesinde kendimi yanında hep mutlu hissettiğim Tıbbi Patoloji Bölümü asistanı Dr. Burcu Sarıkaya'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Asistanlık sürem boyunca birlikte çalıştığım başta Dr. Ali Dal olmak üzere tüm asistan doktor arkadaşlarıma ve kliniğimiz personeline teşekkür ederim.

Ve her zaman desteği ile yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Trigonelline (TG) antiapoptotik, nöroprotektif ve antioksidan bir maddedir. Amacımız apopitozis modelinde TG'nin nöroprotektif ve antioksidan özelliğini değerlendirmektir. 42 adet Sprague Dawley rat rastgele altı gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna müdahale yapılmamıştır. Sham- kontrol grubuna intravitreal phosphate bufferd saline (PBS) enjeksiyonu yapılmıştır. Diğer gruplardaki ratlara ise intravitreal N-metil-D-aspartat (NMDA) enjeksiyonu yapılarak apoptozis indüklenmiştir. Sham grubuna herhangi bir tedavi verilmemiştir. Dördüncü gruba oral TG, beşinci gruba TG damla, altıncı gruba damla brimonidin tartarat (BT) tedavisi verilmiştir.

Damla TG ve damla BT gruplarında, sham grubuna kıyasla TUNEL ve caspase3 pozitifliği istatistiksel anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). Brn3a boyanmasında sham grubuna kıyasla damla TG ve damla BT gruplarında istatistiksel anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Oral TG ile tedavi edilen grupta TUNEL, caspase 3 ve Brn3a boyamalarında sham grubuna göre istatistiksel anlamlı fark tespit edilememiştir.

Malondialdehit (MDA) düzeylerinde, sham gruba kıyasla tüm tedavi gruplarında istatistiksel anlamlı düzeyde azalma izlenmiştir ($p<0,05$). NOS-2 düzeyleri sham grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0,05$). Damla TG ve damla BT gruplarında sham grubuna kıyasla NOS düzeylerinde istatistiksel anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sham grubuna kıyasla tüm tedavi gruplarında SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve BDNF düzeylerinde istatistiksel anlamlı artış izlenmiştir ($p<0,05$). NF- κ B düzeyleri sham grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı oranda artmıştır ($p<0,05$). Oral ve damla TG ile tedavi edilen gruplarda sham grubuna kıyasla NF- κ B düzeylerinde istatistiksel anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Topikal TG, klinik kullanımda olan topikal BT ile benzer düzeyde NOS düzeylerinde azalma ve antiapoptotik etkinlik göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Apopitozis, glom, trigonelline, nöroproteksiyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF TRIGONELLINE IN RATS WITH N-METHYL D-ASPARTATE INDUCED APOPTOSIS MODEL

Trigonelline (TG)'s antiapoptotic, neuroprotective and antioxidant substance. Our aim's to evaluate neuroprotective and antioxidant properties of TG in apoptosis model. No intervention was made to control group. Sham-control group was injected intravitreal phosphate buffered saline (PBS). Rats in other groups, apoptosis was induced by intravitreal N-methyl-D-aspartate (NMDA) injection. No treatment was given to the sham group. Fourth group received oral TG, fifth group received TG drops, and sixth group received brimonidine tartrate (BT).

Topical TG and topical BT groups, TUNEL and caspase3 positivity decreased statistically significantly compared to sham group ($p < 0.05$). In Brn3a staining, there was statistically significant increase in drop TG and drop BT groups compared to sham group ($p < 0.05$). In TUNEL, caspase3 and Brn3a staining in group treated with oral TG, no statistically significant difference was found compared to sham group.

There was statistically significant decrease in malondialdehyde (MDA) levels in all treatment groups compared to sham group ($p < 0.05$). NOS-2 levels increased statistically significantly in sham group compared to control group ($p < 0.05$). There was statistically significant decrease in NOS levels in groups treated with drop TG and drop BT compared to sham group ($p < 0.05$). There was statistically significant increase in SOD, catalase, glutathione peroxidase and BDNF levels in all treatment groups compared to sham group ($p < 0.05$). NF- κ B levels increased significantly in sham group compared to control group ($p < 0.05$). There was statistically significant decrease in NF- κ B levels in groups treated with oral and drop TG compared to sham group.

Topical TG showed decrease in NOS levels and antiapoptotic efficacy similar to that of topical BT in clinical use.

Keywords: Apoptosis, glaucoma, trigonelline, neuroprotection

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Apoptozis	2
1.1.2. Retinanın Histolojik Tabakaları	4
1.1.3. Glokom Tanımı	5
1.1.4. Glokom Patogenezi	6
1.1.4.1. Mekanik Teori	6
1.1.4.2. Vasküler Teori	6
1.1.4.3. Apoptozis Teorisi	7
1.1.5. NMDA Aracılı Retinal Eksitotoksisite Modeli	7
1.1.6. Nöroproteksiyon	7
1.1.7. Glokom ve Nöroproteksiyon	8
1.1.8. Nöroprotektif Tedavi	8
1.1.8.1. Glutamik Asit, Reseptörleri ve Tedavi Modaliteleri	8
1.1.8.2. Nörotrofik Faktörler ve Tedavi Modaliteleri	9
1.1.8.3. Nitrik Oksit Nörotoksitesitesi ve Tedavi Modaliteleri	10
1.1.8.4. Apoptozis İlişkili Tedavi Modaliteleri	10
1.1.8.5. Oksidatif Stres İlişkili Tedavi Modaliteleri	11
1.1.8.6. İmmünite İlişkili Tedavi Modaliteleri	12
1.1.8.7. Kalsiyum ve Diğer İyon Kanalları ve Renin Anjiyotensin Sistemini Hedefleyen Ajanlar	13

1.1.8.8. Anti-Glokomatöz Ajanlar	13
1.1.8.8.1. Brimonidin Tartarat'ın Nöroprotektif Etkinliği	14
1.1.9. Trigonelline	16
1.1.9.1. Hipoglisemik Etkinlik	16
1.1.9.2. Hipolipidemik Etkinlik	16
1.1.9.3. Antioksidan Etkinliği	17
1.1.9.4. Antiapoptotik ve Nöroprotektif Etkinliği	17
1.1.10. Apoptozis İncelenmesi (TUNEL Analizi)	18
1.1.11. İmmünohistokimyasal Olarak Caspase 3 Değerlendirilmesi	18
1.1.12. İmmünohistokimyasal Olarak Brn3a Değerlendirmesi	19
1.1.13. Oksidatif Sistem Markerları	19
1.1.14. NF-κB	19
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1. Gruplar	21
2.2. Apoptozis İndüksiyonu	22
2.3. Tedavilerin Uygulanması	22
2.4. Histopatolojik İnceleme	22
2.4.1. TUNEL Analizi	22
2.4.2. Caspase 3 ve Brn3a İmmünohistokimyasal Değerlendirme	24
2.5. İstatistiksel Analiz	25
2.6. Doku Örneklerinin Alınması	25
2.7. Biyokimyasal Örneklerin Değerlendirilmesi	25
3.BULGULAR	28
3.1. TUNEL Sonuçları	28
3.2. Caspase 3 Sonuçlar	29
3.3. Brn3a Sonuçlar	30
3.4. Doku MDA Düzeyleri	34
3.5. Doku SOD Düzeyleri	35
3.6. Doku Katalaz Düzeyleri	36
3.7. Doku Glutasyon Peroksidaz Düzeyleri	37
3.8. Doku BDNF Düzeyleri	38
3.9. Doku NF-κB Protein Ekspresyon Düzeyleri	39

3.10. Doku iNOs Protein Ekspresyon Düzeyleri	40
4. TARTIŞMA	42
5. KAYNAKLAR	48
6. ÖZGEÇMİŞ	59



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. TUNEL Boyama Prosedürü.	23
Tablo 2. Kullanılan Antikorların Özellikleri	24
Tablo 3. Western Blot Çalışmasında Kullanılan Malzemelerin Listesi	27



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Apoptozis Şeması	3
Şekil 2.	Retinanın Tabakaları, Histolojik Kesit	5
Şekil 3.	Pozitif Kontroller	24
Şekil 4.	TUNEL Analizi Sonuç Grafiği	28
Şekil 5.	Caspase 3 Sonuç Grafiği	29
Şekil 6.	Brn3a Sonuçları Grafiği	30
Şekil 7.	Grup 1 (Kontrol Grubu)	31
Şekil 8.	Grup 2 (Sham-Kontrol)	32
Şekil 9.	Grup 3 (Sham)	32
Şekil 10.	Grup 4 (Oral TG)	33
Şekil 11.	Grup 5 (Damla TG)	33
Şekil 12.	Grup 6 (Damla BT)	34
Şekil 13.	Doku MDA Düzeyleri Grafiği	35
Şekil 14.	Doku SOD Düzeyleri Grafiği	36
Şekil 15.	Doku Katalaz Düzeyleri Grafiği	37
Şekil 16.	Doku Glutasyon Peroksidaz Düzeyleri Sonuçları	38
Şekil 17.	Doku BDNF Düzeyleri Grafiği	39
Şekil 18.	NF-kB ve β-actin Proteinlerine Ait Bant Görüntüleri	40
Şekil 19.	Doku NF-kB Protein Ekspresyon Düzeyi	40
Şekil 20.	iNOS ve β-aktin Proteinlerine Ait Bant Görüntüleri	41
Şekil 21.	Doku iNOS Protein Ekspresyon Düzeyi	41

KISALTMALAR LİSTESİ

AMPA	: Alfa-Amino 3-Hidroksi 5-Metilisokzasole 4-Propionik Asit
Apaf-1	: Apopitotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
BDNF	: Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
BT	: Brimonidin Tartarat
CoQ10	: Koenzim Q10
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ET-1	: Endotelin-1
GA	: Glutamik Asit
GİB	: Göz İçi Basıncı
GLAST	: Glutamat / Aspartat Taşıyıcı
GS	: Glutamin Sentaz
HSP	: Isı Şok Proteinleri
L-NAME	: Nitro L-Arginin Metil Ester
MDA	: Malondialdehit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NMDA	: N- Metil D-Aspartat
NF- κB	: Nükleer Faktör κB
NO	: Nitrik Oksit
NOS-2	: Nitrik Oksit Sentetaz 2
NT-3	: Nörotrofin-3
NT-4	: Nörotrofin-4
NTF	: Nörotrofik Faktör
OHT	: Oküler Hipertansiyon
PBS	: Phosphate Bufferd Saline
PKC	: Protein Kinaz C
RAS	: Renin Anjiotensin Sistemi
RGH	: Retinal Ganglion Hücre
RPE	: Retina Pigment Epiteli
SOD	: Süperoksit Dismutaz

SOR : Serbest Oksijen Radikalleri
TdT : Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TG : Trigonelline
TNF alfa : Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TUNEL :Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling



1. GİRİŞ

Glokom, retinal ganglion hücre (RGH) kaybı ile giden, ilerleyici görme azlığı yapan önemli bir sağlık problemidir. Glokomda önemli risk faktörlerinden biri olan göz içi basıncını (GİB) düşürmek temel tedavi prensibidir. GİB düşüşüne rağmen glokomda progresyonun devam ettiği durumlar vardır. Özellikle normotansif glokom olarak değerlendirilen bir grupta GİB bilinen normal aralıkta olmasına rağmen RGH kaybı devam etmektedir. Glokomdaki RGH kaybının patofizyolojisi: nörotrofik faktörlerin (NTF) azalması, retrograd aksoplazmik transport blokajı, azalan vasküler perfüzyona bağlı oluşan iskemi, serbest radikallerin oluşumu, nitrik oksit (NO) toksisitesi, glutamat aracılı eksitotoksisite ve genetik faktörlere bağlanmaktadır. Apoptozisi etkileyen birçok durum olması, glokom tedavisinde yeni modalitelerin keşfini gerekli kılmaktadır. Nöroproteksiyon yeni tedavi yöntemlerinin başında gelmektedir (1).

Nöroproteksiyon terim olarak, hasarlanma ihtimali olan veya ölmekte olan nöronların asıl etken ortadan kaldırılmamış olsa bile muhafaza edilmesi anlamında kullanılmaktadır. Birçok farmakolojik ajanın, büyüme faktörlerinin ve diğer bileşenlerin çok sayıda nörolojik ve nörodejeneratif hastalıkta nöroprotektif olduğu rapor edilmiştir. Bazı ajanların optik sinirde de nöroprotektif aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Kalsiyum kanal blokörleri, antiglokomatözler, N-metil D-aspartat (NMDA) antagonistleri, nitrik oksit sentetaz-2 (NOS-2) inhibitörleri, nörotrofinler, antioksidanlar gözde nöroprotektif etkinliğe sahip ilaçlardır. Antiglokomatöz ilaç grubundan brimonidin tartarat (BT) oldukça yüksek selektif α_2 -reseptör agonistidir. α_2 -reseptörlerin uyarılması kompleks ve bağımsız yollarla nöronal hücre ölümünü inhibe eder. Pro-apoptotik yolların inhibisyonu, nörotrofik faktör salınımının artırılması ve glutamat salınım inhibisyonu etkileriyle apoptozisi azalttığı gösterilmiştir. Son zamanlarda α_2 modülasyonunun NMDA reseptör inhibisyonu etkisiyle nöroprotektif etkiye neden olduğu gösterilmiştir (2).

Glutamat retinadaki önemli bir uyarıcı nörotransmitterdir. Presinaptik hücreler tarafından salınır ve NMDA reseptörlerinin de içinde bulunduğu çeşitli postsinaptik reseptörleri uyarır. Glutamat salınımının arttığı veya glutamatın ortamdan temizlenmesinin yetersiz olduğu durumlarda eksitotoksisite olarak bilinen süreç nöron ölümüne sebep olmaktadır (3). NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması hücre içi

kalsiyumun toksik seviyelere ulaşmasına sebep olur ve NOS-2 yi aktive eder. NOS-2 aktivasyonu ile yüksek dozlarda oksidan bir molekül olduğu bilinen NO sentezlenir. Mitokondrial disfonksiyona yol açtığı bilinen “glutamat aracılı eksitotoksik hasar”ın glokomatöz dejenerasyonun patogeneğinde anlamlı rol oynadığı düşünülmektedir (4). Çalışmamızda glokomatoz optik nöropati modeli oluşturmak ve apoptozisi uyarmak için intravitreal NMDA enjeksiyonu uygulanması planlanmıştır.

Trigonelline (TG), kafein gibi kahvenin önemli bir komponenti olan alkaloidtir. TG'nin, anti-hiperglisemik ve anti-hiperlipidemik, nöroprotektif, anti-migren ve hafıza iyileştirme potansiyelleri gösterilmiştir (5). Literatürde TG'e ait göz alanında yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

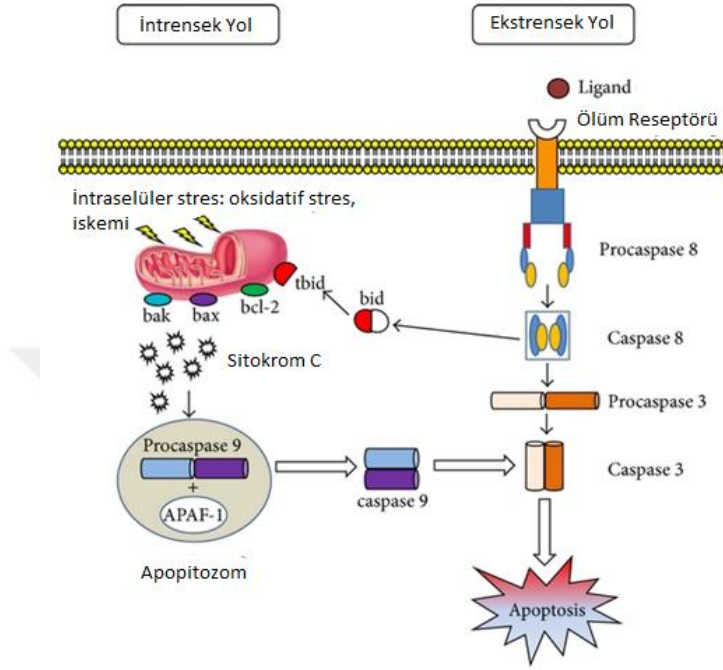
Apoptozisin tanımlayıcı özelliği olan DNA fragmentasyonunu TUNEL boyama metodu ile göstererek, RGH de apoptozis miktarını tayin etmek hedeflenmiştir. Aynı zamanda intrinsek ve ekstrinsek apoptotik yolların ortak kısmında görevli olan caspase-3 düzeyine bakılarak apoptozis süreci başlamış olan hücrelerin de tespit edilmesi amaçlanmıştır. Brn3 ailesinin, RGH'lerinin gelişimi sırasında farklılaşma, hayatta kalma ve aksonal uzamada önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Brn3a'nın RGH'lere spesifik boyama yaptığı bilinmektedir (6). Çalışmamızda RGH'lerin spesifik değerlendirmesi için Brn3a'nın immünohistokimyasal olarak gösterilmesi planlanmıştır. Apoptozis sürecini etkilediği bilinen oksidan ve antioksidan parametrelerle birlikte, glokomda nöron koruyucu etkinliği olan beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) düzeylerinin de değerlendirilmesi planlanmıştır. Glokom hastalarının tedavisinde genellikle topikal tedaviler kullanılmaktadır. Topikal tedavilerde ilaçların sistemik yan etkilerinden kaçınılabilmektedir. Çalışmamızda yeni bir tedavi ajanı olarak TG'nin hem topikal hem oral uygulama ile glokomdaki nöroprotektif etkinliğinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Apoptozis

Apoptozis yaşamsal fonksiyonunu yitiren hücrelerin programlı bir şekilde yok edilmesini sağlayan fizyolojik bir mekanizmadır Apoptozis; normal hücre döngüsünün devamlılığında, immün sistemin düzgün çalışmasında ve embriyonik

gelişimde rol almaktadır. Apoptozis temel olarak iki farklı yoldan uyarılır. Bunlar; intrinsek veya mitokondrial yol ve ekstrinsek veya ölüm reseptör yoludur. Bu apoptotik yollar şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Apoptozis şeması (7)

İntrinsek yolda birçok farklı uyarın mitokondrial membran potansiyelinde değişikliklere sebep olabilir. Bu uyarılardan en önemlisi serbest oksijen radikalleri (SOR) dir. İntrinsek yolda apoptozisi uyarın en önemli faktör SOR olmakla beraber apoptozis süreci boyunca SOR üretiminde artış izlenmektedir. Bu yüzden SOR’nin azaltılması apoptozisi engelleme ve geciktirmede çok önemlidir. Bu yolda mitokondrial membranda değişiklik olduktan sonra Bcl-2 ailesi uyarılır. Bu uyarım sonucu sitokrom C salınımı gerçekleşir. Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1), sitokrom C salımına cevap olarak, apoptozom olarak bilinen büyük bir kompleks oluşturur. Apoptozom mitokondrial yoldaki temel mekanizmadır. Apoptozom sırasıyla caspase 9 ve caspase 3’ün aktivasyonunu sağlayarak apoptozisin gerçekleşmesini sağlar.

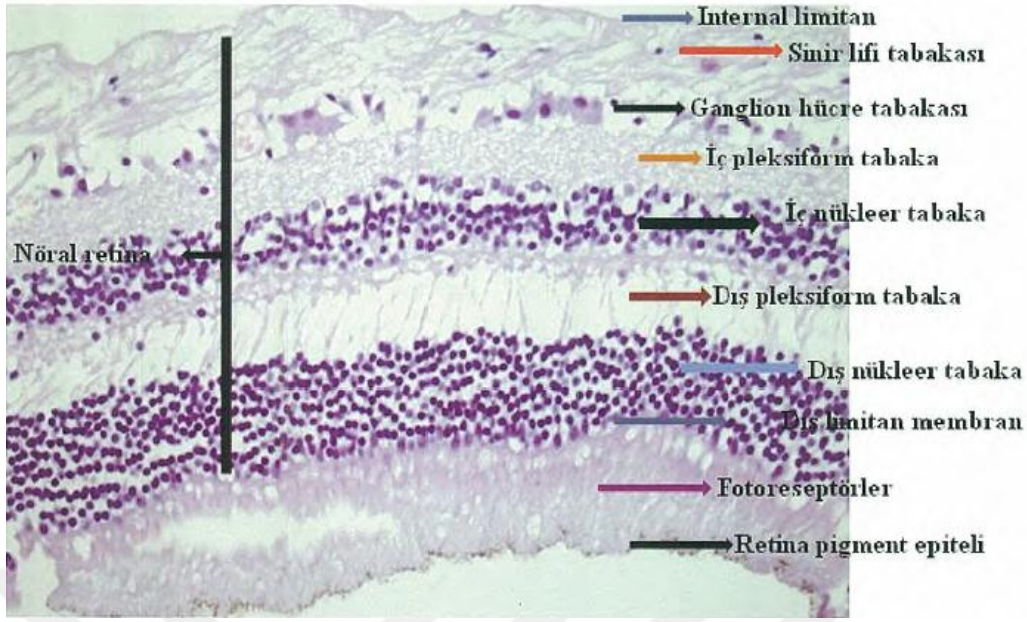
Ekstrinsek yolda, tümör nekrozis faktör alfa (TNF-alfa) reseptörü, FasL reseptörü, Toll like reseptörü gibi ölüm reseptörleri üzerinden apoptozis uyarısı başlatılır. Caspase 8 aktivasyonu gerçekleştirilir. Caspase 8 aktivasyonu caspase 3

aktivasyonu ile ekstrinsek yoldan apoptozisi uyarmakla birlikte intrinsek apoptozis yolunu da aktive eder. Apoptozisin iki yolağı olan intrinsek ve ekstrinsek yol birlikte çalışmaktadır. Caspase 3, intrinsek ve ekstrinsek yolun sonunda aktiflenmekte olup her iki yola da katılmaktadır (8).

1.1.2. Retinanın Histolojik Tabakaları

Retina histolojik olarak birbirinden farklı özellikleri ve görevleri olan tabakalardan oluşmaktadır. Retinanın tabakaları şekil 2’de gösterilmiştir. Dıştan içe doğru bu tabakalar (9, 10):

- 1. Retina Pigment Epiteli (RPE):** RPE de melanoprotein ve lipofusin pigmentleri bulunur. RPE’nin görevleri arasında ışığın fazlasını absorbe etmek, metabolit transportunu sağlamak ve fagositoz yer alır. Kan retina bariyerinin oluşumunda önemlidir.
- 2. Fotoreseptör Hücre Tabakası:** Fotoreseptörler ışığın nöronal sinyallere dönüşmesini sağlarlar. Rodlar ve koniler olarak iki çeşit fotoreseptör mevcuttur. Rodlar foveada bulunmazken, koniler foveada yoğun miktarda bulunurlar.
- 3. Dış Limitan Tabaka:** Müller ve fotoreseptör hücrelerinin bağlantı komplekslerinin bulunduğu tabakadır.
- 4. Dış Nükleer Tabaka:** Fotoreseptör hücrelerin nükleuslarının bulunduğu tabakadır.
- 5. Dış Pleksiform Tabaka:** Rod ve koni hücrelerinin uç uzantıları ve horizontal hücreler ile bipolar hücrelerin arasındaki sinapslarının bulunduğu tabakadır.
- 6. İç Nükleer Tabaka:** Müller, bipolar, amakrin ve horizontal hücrelerin nükleuslarının bulunduğu tabakadır.
- 7. İç pleksiform Tabaka:** Bipolar ve ganglion hücreler arasındaki sinaptik bağlantılardan oluşur. Ayrıca müller hücre dalları, amakrin hücreler, interpleksiform hücreler ve retinal kan damarları bulunur. Nöronal sinyalin ganglion hücre tabakasına iletilmesine yardımcı olur.



Şekil 2. Retinanın tabakaları, histolojik kesit (11)

8. Ganglion Hücre Tabakası (RGH): Ganglion hücrelerinin hücre gövdelerinin bulunduğu tabakadır. Dentritleri bipolar hücreler ve amakrin hücreleriyle sinaps yapar. RGH'ler görme ile ilgili nöronal bilgileri santral sinir sistemine taşıyan nöronlardır. RGH'ler merkezi sinir sistemindeki diğer nöronlar gibi ölünce sonsuza dek kaybolurlar. Glokomda birçok sinyal yolağının RGH apoptozisini tetiklediği görülmüştür. Bu yolaklar; aksonal transport yetersizliği, nörotrofik faktör yoksunluğu, intrinsek ve ekstrinsek apoptotik yolların aktivasyonu, mitokondrial disfonksiyon, eksitotoksik hasar, oksidatif stres, reaktif glia ve sinaptik bağlantı kaybı şeklinde sıralanabilir (12).

9. Retina Sinir Lifi Tabakası: Ganglion hücre aksonları tarafından oluşturulan tabakadır.

10. İnternal Limitan Membran: Müller hücrelerinin hiyaloid membranına olan bağlantılarıyla oluşan membrandır.

1.1.3. Glokom Tanımı

Glokom, tipik optik sinir hasarı ile birlikte görme alanı değişiklikleriyle seyreden ilerleyici çok faktörlü bir optik nöropatidir. Glokom patogenezi açıklamak üzere üç temel teori ortaya konmuştur. Bu teoriler mekanik teori, vasküler teori ve

apoptozis teorisidir. Glokom da asıl hasar gören tabakanın RGH tabakası olduğu tespit edildikten sonra apoptozis teorisi üzerinde daha fazla durulmaya başlanmıştır (13).

1.1.4. Glokom Patogenezi

Göz içi basıncını oluşturan temel unsur aköz hümördür. Aköz hümörün salınımı ve dışa akımı arasındaki denge GİB’i oluşturur. Silyer cisimin pigmente olmayan epitelinden arka kamaraya sekrete edilen hümör aköz, lens ile iris arasından geçerek ön kamaraya ulaşır. Temel dışa akım yolu iris-kornea arasındaki trabeküler ağıdır. Hümör aközün yaklaşık %90’ı bu yol ile gözü terk eder. Uveoskleral yol hümör aközün yaklaşık %10’unun gözü terk ettiği diğer yoldur (14). Glokom etiopatogenezi halen tam aydınlatılamamış olmakla birlikte çeşitli teoriler öne sürülmüştür.

1.1.4.1. Mekanik Teori

Göz içi basıncının; optik diskte lamina kribrosa’ya direkt olarak bası yapması sonucu, optik sinir başında aksonal hasar oluşmasıdır. Zamanla disk üzerinde aksonların bulunmadığı çukurluk alanı genişlemektedir. Optik sinirin alt ve üst temporal bölgeleri daha incedir ve mekanik basıdan daha erken dönemde etkilenir (15).

1.1.4.2. Vasküler Teori

Oftalmik arterin ortalama basıncı ile GİB arasındaki fark perfüzyon basıncı olarak isimlendirilir. Optik diske gelen kan akımı perfüzyon basıncına ve vasküler dirence göre belirlenir (16). Vasküler disregülasyon ile giden sistemik hipotansiyon, migren gibi hastalıklarda, GİB’in yükselmesiyle birlikte oküler kan akımı azalmaktadır.

Vasküler teori, özellikle GİB yüksekliği görülmeyen glokom tiplerinin etiopatogenezi’ni açıklamakta önemlidir (17).

1.1.4.3. Apoptozis Teorisi

Apoptozis teorisi, glokomda gangliyon hücre ölümünün apoptozis ile olduğu temeline dayandırılmıştır (18). SOR; apoptozisin hem intrensek hem ekstrensek yollarını birlikte uyarmaktadır. SOR ile oluşan hasarın; RGH'lerinde apoptozisi uyarmasının yanı sıra trabeküler ağ hücrelerinin de değişikliğe ve hümeör aköz dışı akımına direnç gelişmesine sebep olabileceği düşünülmektedir (19). SOR'a karşı vücudun savunma sistemleri olarak bilinen birçok antioksidan sistem mevcuttur.

Askorbik asit ve glutatyon türevleri vücuttaki önemli antioksidan sistemlerdir. Glokom hastalarında hem askorbik asit düzeyleri hem glutatyon düzeyleri azalmış bulunmuştur (20).

1.1.5. NMDA Aracılı Retinal Eksitotoksisite Modeli

Eksitator aminoasit reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu nöronal hasar oluşumu eksitotoksisite olarak bilinir. Eksitotoksisite ilk kez retinada tanımlanmış olmasına rağmen birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir yere sahiptir. Glutamat başta olmak üzere bazı aminoasitler, N-metil D aspartat (NMDA) ve alfa-amino 3-hidroksi 5-metilisokzasole 4-propionik asit (AMPA) kainat reseptörlerini uyarır. Presinaptik sinir ucundan salınan glutamat NMDA reseptörlerine bağlandıktan sonra, hücre içi kalsiyum miktarı artar. Protein kinaz C (PKC) ve NOS aktivasyonu gerçekleşir. NOS tarafından oluşturulan NO, serbest oksijen radikalidir ve mitokondrial membran potansiyelinde değişikliğe sebep olur.

Bununla birlikte NO, glutamat salınımını arttırır. Glutamatın etkinliği presinaptik glialar tarafından geri alım ile sonlandırılır. Glutamat geri alımı anoksi ve hipoksi durumlarında bozulur. Na⁺/K⁺ gradienti ile glutamatın geri alımı doğrudan ilişkilidir (21). Glokom patogeneğinde RGH tabakasındaki apoptozis temel mekanizmadır.

1.1.6. Nöroproteksiyon

Nöroembriyolojik dönemde santral sinir sistemi maturasyonunun tamamlanması için gerçekleşmesi gereken iki olay vardır. Bunlardan ilki aksonların gelişmesi ile beynin farklı bölgeleri arasında iletişim sağlanması, ikincisi ise nöron çiftleri arasında sinapsların oluşmasıdır. Bu maturasyon sürecinde bazı sinyal

molekülleri, bunların reseptörleri ve ikincil haberci moleküller işlev görür. Nöron korumadaki amaç, çeşitli ajanlarla, zarar verici etkileri en kısa sürede engelleyerek nöronların en az hasara uğramasını sağlamaktır. Nöroprotektif ilaçlar daha çok nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Örnek olarak multiple skleroz, Alzheimer hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz ve Parkinson gibi bazı nörodejeneratif hastalıklar sayılabilir (22).

1.1.7. Glokom ve Nöroproteksiyon

Glokom tedavisinde temel yaklaşım GİB düşürülmesi olmasına rağmen, GİB kontrolü sağlanan olgularda da progresyon olabileceği görülmüştür (23). Bunun sonucu olarak glokom takibinde yeni tedavi modaliteleri gündeme gelmiştir. Nöron koruyucu tedavi en güncel tedavi seçenekleri arasında sayılmaktadır (24).

Glokom, aksonal nörodejeneratif hastalığın patofizyolojik özelliklerine sahip olduğundan; glokom tedavisinde nöroproteksiyonun etkili olabileceği düşünülmektedir. Nöroproteksiyon, RGH tabakasını canlı ve fonksiyonel kılmayı amaçlayan bir tedavi yöntemidir. Nöron koruyucu tedavilerin, klinik kullanımı uzun süreden beri mevcut olmakla birlikte standart bir uygulama şekli yoktur. Serbest radikal süpürücüler, antioksidant ajanlar, apoptozis inhibitörleri, anti inflammatuar ajanlar, metal iyon şelatörleri, iyon kanalı modülatörleri ve gen tedavisini içeren ve çeşitli hastalıklarda kullanılan 500'den fazla ürün nöroprotektif etkinliklerinden dolayı araştırılmaktadır (25).

1.1.8. Nöroprotektif Tedavi

1.1.8.1. Glutamik Asit, Reseptörleri ve Tedavi Modaliteleri

Glutamik asit (GA), retina ve merkezi sinir sisteminde heyecan, stres gibi durumlarda hücreler arası iletişimi sağlayan önemli bir nörotransmitterdir. GA fizyolojik dozu aşarsa nörotoksik etki oluşturmaktadır. Glokom ile yüksek GA düzeyi ilişkisi daha önceki çalışmada gösterilmiştir (26). GA'nın primer reseptörleri NMDA reseptörleridir. Bu reseptörlerin uyarılmasıyla hücre dışı kalsiyum iyonu hücre içine girer. Eksitotoksikite ve apoptozis meydana gelir. Ayrıca metabolizmaları bozulmuş olan hücreler, fazla GA'yı sinaptik ortamdan uzaklaştırmazlar. Bu durum nörotoksik etkinin artmasına sebep olur (4). Dopaminerjik amantadin derivativesi olan memantin,

NMDA reseptörlerinin orta affinitede non-kompetatif antagonistidir. Normal nöronal fonksiyonları etkilemezken, ancak GA' nın fizyolojik dozu aştığı durumlarda kalsiyumun hücre içine girişine engel olmaktadır (27). Deneysel glokom modelinde memantinın nöron koruyucu etkinliği gösterilmiştir (28). Ayrıca topikal memantin formülasyonunun oküler hipertansiyon modelinde RGH kaybını anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir (29).

1.1.8.2. Nörotrofik Faktörler ve Tedavi Modaliteleri

Nöronlar yaşamlarını sürdürebilmek için, nörotrofik büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu faktörler nöral hücrenin yaşam sinyallerini artırırken, apoptozis oluşmasını engellemektedir. Bu büyüme faktörlerinden başlıcaları; Beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-3 (NT-3), ve nörotrofin-4 (NT-4)' tür. Bu faktörleri elde edemeyen RGH' de bir süre sonra apoptozis gerçekleşmektedir. BDNF ve NGF'nin yüzey reseptörleri TrkA ve TrkB, ayrıca tüm nörotrofinlerin ortak reseptörü p75NTR retinada gösterilmiştir (30). BDNF, süperior kolikülüstün ve lateral genikülat çekirdeğinde sentezlenir ve RGH gövdelerine retrograd olarak taşınır. Ayrıca, bu nörotrofik faktör RGH'lerde lokal olarak üretilir (31). Glokom hastalarının serumundaki ve gözyaşlarındaki BDNF seviyelerinin kontrol deneklerinden önemli ölçüde düşük olduğunu belirtmek önemlidir. Bu durum nörotrofinlerdeki eksikliklerin, glokomdaki RGH ölümüne etkisi olduğunu düşündürmektedir (32). BDNF salınım artışının, aksonal yaralanma geçiren RGH'lerde erken bir cevap olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (33). Ayrıca BDNF, Müller hücrelerinin ve bipolar hücrelerin ozmotik şişmesini inhibe eder ve fare retinasında Müller hücrelerinde glutamat/aspartat taşıyıcı (GLAST) ve Glutamin Sentaz (GS) ekspresyonunu düzenler (34). Farklı nöroprotektif ajanların RGH sağkalımını teşvik etmedeki terapötik etkilerinin, retinal BDNF ekspresyonunun indüklenmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Deneysel optik sinir yaralanmaları ve glokom hayvan modellerinde nörotrofik faktörlerin intravitreal enjeksiyonunun nöron koruyucu etkisi gösterilmiştir (35). NGF, RGH'ler, bipolar hücreler ve glial hücreler tarafından üretilir ve kullanılır (36). NGF'nin optik sinir iskemisinde, oküler hipertansiyon ve glokomda RGH'leri koruduğu düşünülmektedir (37). Rat glokom modelinde NGF'nin oküler uygulaması ile retina ve optik sinirdeki NGF ve NGF-

reseptör ekspresyonunun azalmasının engellendiği ve hayvanların nörodejenerasyondan korunduğu görülmüştür (38).

1.1.8.3. Nitrik Oksit Nörotoksitesi ve Tedavi Modaliteleri

Nitrik Oksit, arjinden NOS ile üretilen bir serbest radikal olup, pek çok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde etkilidir. Fizyolojik bir vazodilatatör görevi görerek, optik sinir kanlanmasını artırıcı yani nöron koruyucu etkiye sahip olmakla birlikte yüksek dozlarda ise nörotoksik etki oluşturmaktadır. Yüksek NO düzeyi, serbest radikal oluşumu, NMDA reseptör aracılı hücre içine kalsiyum alımı ve apoptozisin indüklenmesini sağlar (39).

Nitrik oksit sentetazın 3 tipi mevcuttur.

Tip 1 (NOS-1) nöronal tip olup, glokomlu gözlerde varlığı tespit edilmiştir.

Tip 2 (NOS-2) indüklenen tip olup, GİB yüksekliği ve eksitotoksiste gibi stres durumlarında aktive olmaktadır.

Tip 3 (NOS-3) endotelial tiptir.

Glokomda, en çok NOS-2 olmak üzere tüm NOS tiplerinin aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir. Yüksek NO düzeyi, serbest radikal oluşumu, NMDA reseptör aracılı apoptozis indüklemesi ile nöral hasara sebep olmaktadır (40). Genel bir glikolizasyon inhibitörü olan aminoguanidinin, NOS-2 ve kısmen NOS-1 inhibisyon etkisi olduğu bilinmektedir. Aminoguanidinin glokom üzerindeki etkinliğinin plasebodan farksız olduğu izlenmiştir (8). Tavşanlarda glokom modelinde seçici olmayan nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü, nitro-L-arginin metil esterin (L-NAME) topikal bir formülasyonunun farmakolojik etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada topikal L-NAME'in bir oküler hipertansiyon modelinde GİB'i önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (41).

1.1.8.4. Apoptozis İlişkili Tedavi Modaliteleri

Apoptozis, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Apoptozisi intrinsek ve ekstrinsek bazı faktörler tetiklemektedir. NMDA aracılı eksitotoksiste intrinsek faktörler arasında sayılmaktadır. Ekstrinsek faktörler ise TNF-alfa ve FasL gibi ölüm reseptörlerinin uyarılmasını tetikler. Bcl-2 protein ailesi, hücre içi apoptoziste etkilidir. Bu protein ailesinden Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozisi inhibe ederken, Bad, Bax ve Bid ise apoptozisi indüklemektedir (24). Bir çalışmada NMDA ile

indüklenen apopitozis modelinde taurinin anti apopitotik etkinliği değerlendirilmiştir. Taurinin Bcl-2 seviyesini arttırdığı buna karşılık Bax seviyesini azalttığı gösterilmiştir (42). Koenzim Q10 (CoQ10), bilinen nöroprotektif aktiviteye sahip mitokondriyal hedefli bir antioksidandır. İn vitro çalışmalarda, CoQ10'un farklı RGH modellerinde önemli ölçüde koruyucu etkinliği olduğu gösterilmiştir. Oküler hipertansiyonlu (OHT) yetişkin sıçanlara üç hafta boyunca günde iki kez CoQ10 tedavisi verilmiştir. Retina hücre sağlığı, post mortem apopitotik retinal hücrelerin saptanması ve Brn3a histolojik değerlendirilmesi yapılarak incelenmiştir. Topikal CoQ10, glokomla ilişkili modellerde RGH apopitozunu ve kaybını önleyen etkili bir antioksidan ve nöroprotektif terapi olarak görülmektedir (43). NMDA ile indüklenen rat eksitotoksiste modelinde Mg acetyltaurate tedavisinin nöroprotektif ve antioksidan etkinliği değerlendirilmiştir. Apopitozisi göstermek için TUNEL boyama ve immünohistokimyasal olarak Brn3a bakılmıştır. Ayrıca nörotrofik faktörler, oksidatif stres, pro/anti-apoptotik faktörler ve retinadaki caspase 3 aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile intravitreal Mg acetyltaurate 'ın NMDA'nın neden olduğu retina ve optik sinir hasarını önlediği gösterilmiştir. Mg acetyltaurate 'ın NMDA kaynaklı retina hücresi apopitozuna karşı bu koruyucu etkisi, retinal oksidatif stresin azaltılmasına ve BDNF ile ilişkili nöroprotektif mekanizmaların aktivasyonuna bağlanmıştır (44).

1.1.8.5. Oksidatif Stres İlişkili Tedavi Modaliteleri

Oksidatif stresle kuvvetli reaktanlar olan serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikaller, elektron kaybetmiş oksijen kaynaklı ürünlerdir. Elektronlarını kaybetmiş olan serbest radikaller aktifleşerek birçok hücresel yapıyla etkileşime girerler. Lipid peroksidasyonu, protein yıkımı ve nükleik asit dejenerasyonu aracılığıyla hücre ölümüne sebep olurlar. Serbest radikallerin elektron açığını kapatacak olan antioksidan maddeler birçok hastalığın tedavisinde olduğu gibi glokom tedavisinde de çok önemlidir. Katalaz, süperoksit dismutaz, askorbik asit ve redükte glutatyon vücuttaki doğal antioksidan sistemlerdir (45). Ginkgo biloba ekstraktının glokomlu hastalarda oküler kan akışını arttırdığı görülmüştür. Ginkgo biloba ekstraktının antioksidan ve vasküler etkilere sahip olduğu ve glokom tedavisinde potansiyel olarak etkili olduğu gösterilmiştir (46). Topikal α -tokoferolün, sıçanların optik sinir ezilme modelinde önemli bir nöroprotektif etkiye sahip olduğu ve gelecekte

glokom gibi optik nöropatilerin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (47). Aynı zamanda vitamin E tedavisi alan glokom hastalarında oküler kan akımlarının daha fazla olduğu gösterilmiştir (48). Glokom modelinde antioksidan bir madde olan alfa-lipoik asit takviyesi yapılan gruplarda kontrole kıyasla artmış antioksidan gen ve protein ekspresyonu izlenmiştir. Retinada lipid peroksidasyonu, protein nitrosilasyonu ve DNA oksidasyonu ölçümleri ile oksidatif stresin azaldığı gösterilmiştir (49). Rho kinaz inhibitörleri, GİB düşürme yetenekleri ve nöroprotektif etkileriyle glokom tedavisinde önemli rol oynar. Rho kinaz inhibitörlerinin, hücre çekirdeğinde ve mitokondride oksidatif stresi azaltarak RGH üzerinde nöroprotektif etki oluşturduğu düşünülmektedir. GİB düşürücü etkisi trabeküler ağ yapısında oluşturduğu değişikliklere bağlanmaktadır (50). Hidrojen sülfür yeni bir üçüncü sinyal molekülü ve gaz halindeki nörotransmitter olarak tanınır. Son zamanlarda, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem içinde hücre koruyucu özellikleri olduğu gösterilmiştir. Glokomun deneysel modellerinde hidrojen sülfürün ekspresyonu ve nöroprotektif etkinliği analiz edilmiştir. Hidrojen sülfürün, reaktif oksijen ürünlerini azaltarak ve retina damarlarını genişleterek oksidatif stres kaynaklı RGH kaybına engel olabileceği gösterilmiştir (51).

1.1.8.6. İmmünite İlişkili Tedavi Modaliteleri

Glokomun otoimmün bir hastalık olabileceği düşünülmektedir. Isı şok proteinleri (HSP) ve miyelinizasyon ile ilgili proteinlerin antijen olabileceği ileri sürülmüştür (24). HSP birçok hücre tarafından sentezlenen bir stres proteindir. Isı değişimi, anoksi, beslenme bozukluğu gibi durumlarda HSP sentezi artmaktadır. Bu proteinler vücudun savunma mekanizmasında rol oynar. Glokomlu olgularda ve deneysel glokom modellerinde bu proteinlerin sentezinin arttığı gösterilmiştir. Bu proteinlerin glokomda artarak antijenik etki oluşturduğu düşünülmektedir (52). Optik sinirde özellikle T lenfositlerin etkin olduğu lokalize bir immün sistem aktivasyonu mevcuttur. Bu durum, glokom tedavisinde aşılama ve immünomodülasyon tedavilerini gündeme getirmiştir (24).

Aktif immünizasyonda, glatiramer asetat proteini kullanılabilir. Otoimmünite kazanmış T lenfositler etkisiz hale getirilerek RGH harabiyetine engel olduğu

düşünülmektedir. Multiple sklerozda bu aktif immünizasyon yöntemi FDA onayı almıştır (53).

1.1.8.7. Kalsiyum ve Diğer İyon Kanalları ve Renin Anjiyotensin Sistemini Hedefleyen Ajanlar

Kalsiyum kanalları, reseptör aracılı (ör: NMDA reseptörü), voltaj bağımlı ve depo kontrollü olmak üzere üç çeşittir. Reseptör aracılı kalsiyum kanalları, glokom patogenezinin açıklanmasında önemlidir. Kalsiyum kanal blokörlerinin kan dolaşımını arttırıcı etkisi bilinmektedir. Normotansif glokomlu olgularda kalsiyum kanal blokörlerinin dolaşımı arttırdığı gösterilmiştir (54). Bu ilaçlar, endotelin-1 (ET-1) salınımını azaltarak, ET-1'in kan dolaşımını ve aksoplazmik akımı azaltıcı etkilerine de engel olmaktadır. Glokomda kalsiyum kanal blokerleri, kan dolaşımını arttırmaya yönelik kullanılmıştır. Kalsiyum kanal blokerlerinin deneysel çalışmalarda eksitotoksisteye engel olarak nöron koruyucu etkilerinin de olduğu bulunmuştur (55). Nöron koruyucu tedavide gündemde olan diğer bir iyon kanalı da voltaj bağımlı sodyum (Na) kanalıdır. Na kanal inhibisyonu yapan fenitoinin, deneysel çalışmalarda RGH üzerinde nöron koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (56). Sistemik kan basıncı kontrolünde ve elektrolit dengesinin sağlanmasında Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) etkin göreve sahiptir. Anjiyotensinojen konverting enzim inhibitörlerinin kan dolaşımını, bradikinin düzeyini ve prostaglandin sentezini arttırıcı, glutamik asit sentezini ise azaltıcı fonksiyonları bulunmaktadır (57). Bradikinin'in, retinal nöral hücre kültürlerinde ve deneysel çalışmalarda, eksitotoksisteye engel olarak nöron koruyucu etkinliği olduğu gösterilmiştir (58).

1.1.8.8. Anti-Glokomatöz Ajanlar

Medikal tedavi glokomda en çok tercih edilen tedavidir. İlaçların etki mekanizmaları hümeör aközün yapımını azaltmak veya dışı akımına karşı olan direnci zayıflatmak şeklindedir. Etki mekanizmalarına göre sınıflandırma:

1) Parasempatomimetikler: Kolinerjik agonistler ya da miyotikler olarak da bilinirler.

Direkt etkililer: Muskarinik reseptörleri direkt uyarırlar (Pilocarpin, karbakol, asetilkolin).

İndirekt etkililer: Kolinesteraz inhibisyonu yaparak asetilkolin yıkımını engellerler (Fizostigmin ve ekotiofat).

2) Sempatomimetikler: Alfa agonist etkileri ile hümör aközün hem trabeküler, hem de uveasklral yoldan dışa akımını arttıırırlar. Reseptörleri alfa 1 ve alfa 2'dir.

Klonidin ve onun deriveleri olan apraklonidin ve brimonidin kısmi selektif alfa 2 agonistlerdir. Apraklonidin hidroklorid, hümör aközün yapımını sinir uçlarından norepinefrin salınmasını engelleyerek sağlar. Bu grup ilaçlar trabeküler dışa akımı episklral venöz basıncı düşürerek arttırır. Brimonidin, GİB'nı aköz yapımını azaltıp üveasklral akımı arttırarak düşürür.

1.1.8.8.1. Brimonidin Tartarat'ın Nöroprotektif Etkinliğı

Bir ilacın gokomda nöroprotektif etki oluşturabilmesi için oküler bariyerler boyunca kornea epitelinden, lens iris kapsul kompleksinden ve vitreustan geçerek hedef dokular olan RGH tabakası ve optik sinir başına ulaşması gerekir. Alfa adrenerjik reseptörlerin insan, sığır, sıçan ve domuz retinalarındaki varlığı immünohistokimyasal yöntemler ile gösterilmiştir (59, 60). Başka bir çalışmada, kültür retina hücrelerinde BT'nin büyümeyi teşvik ettiğı histolojik yöntemlerle gösterilmiştir (61).

Ratlar üzerinde yapılan optik sinir zedelenmesi modelinde intraperitoneal olarak uygulanan BT'nin nöroprotektif etki oluşturduğı görülmüştür. Aynı şekilde iskemi modelinde de BT'nin nöron koruyucu etkinliğı tespit edilmiştir. Hayvan modellerinde aköz humordaki BT konsantrasyonu 6 saatlik periyot boyunca 0.03 ile 2.2 mg/ml arasında değişmekteydi. BT melanine bağlanır, tek dozluk uygulamadan sonra 6 saat süresince siliyer cisimde maksimum konsantrasyonda bulunur. 10 ile 14 saat arasında vitreusta maksimum konsantrasyonuna ulaşır (62). Bir çalışmada elektif pars plana vitrektomi uygulanacak hastalara operasyon öncesi 4 ile 14 gün arasında BT damla şeklinde uygulanmıştır. Topikal olarak uygulanan brimonidinin, vitreus örneklerinde 2nM veya üzerindeki konsantrasyon seviyelerine ulaştığı görülmüştür. Bu konsantrasyonda RGH tabakasındaki alfa-2 reseptörlerin aktive olduğu izlenmiştir (63).

Brimonidin Tartaratinin nöroprotektif etkinliği nasıl oluşturduğuyla ilgili çeşitli varsayımlar öne atılmıştır. Brimonidin nörön koruyucu etkisini GİB'i dışurmesinden bağımsız olarak gerçekteştirdiği dışünülmektedir. BT tarafından alfa2 reseptörlerinin uyarılması ile antiapoptotik etkili bcl-2 ve bcl-xl gibi genlerin aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (64). Nöroproteksiyon için alfa 2 adrenerjik reseptörlerin diğer etkileri, mitojenle aktiveşen retinal protein kinazların fosforilasyonu ve nörönlardan glutamat salınımının azalması olabilir (65). Aynı zamanda BT hücre dışı glutamat birikimini bloke eder ve NMDA reseptör blokajı sağlar, böylelikle alfa-2 adrenerjik reseptörlerle doğrudan etkileşim göstererek nörön koruyucu etkinlik oluşturabilir (66).

Brimonidin Tartaratinin nöroprotektif etkinlik göstermesinde antioksidan belirteçleri arttırırken, oksidan belirteçleri azaltmasının etkili olabileceği dışünülmüştür. Topikal olarak iki hafta boyunca sabah akşam birer damla olmak üzere kullanılan BT'nin antioksidan enzimler olan glutatyon peroksidazı ve katalazı arttırırken, MDA düzeylerini azalttığı görölmüştür (67). BT'nin GİB dışürücü etkisine bağlı olarak antioksidan özellik gösterdiği dışünülebilir ancak sistemik olarak verilen BT'nde nöroprotektif etkinlik gösterdiği görölmüştür (68).

3) Prostaglandin Analogları: Siliyer kasların ekstrasellüler ağlarının açılmasını sağlayarak üveaskleral direnci azaltarak etki gösterirler. Günümüzde prostoglandin F2 α türevi olan bimatoprost, latanoprost, travoprost ve unoprostone isopropil kullanılmaktadır. Latanoprost ve travoprost ön ilaçtır. Maksimum etkisine 10-14 saatte ulaşmaktadır. Bu yüzden tek doz gece kullanımı önerilmektedir. Bu kullanım şekliyle aynı zamanda vazodilatasyona bağlı semptomlarda da azalma sağlanmaktadır. İris rengine ve göz çevresi cilt rengine koyulaşma, ön üveit, herpetik keratit, hipertrikozis, distikiyazis gibi yan etkileri bilinmektedir.

4) Sempatolitikler (Beta Blokerler): Hem tek başlarına hem diğer ilaçlarla kombinasyon halinde günlük glokom pratiklerinde sıklıkla tercih edilmektedir. β blokerler, cAMP' nin katekolaminlere bağlı sentezinin inhibisyonu ile siliyer cisimden hümör aköz yapımını azaltırlar. Günde iki kez uygulanması önerilir. Etkinlik topikal uygulama sonrası birinci saatte başlayıp dört haftaya kadar devam eder. Miyotikler, karbonik anhidraz inhibitörleri ve prostoglandin analogları ile birlikte kullanıldığında aditif etki oluşturur. Uzun süreli kullanımda taşıflaksi gelişir. Betaksolol, selektif beta1

adrenerjik antagonisttir. Betaksololün iskemi reperfüzyon hasarı ile oluşturulan bir modelde nöroprotektif etkinliği olduğu izlenmiştir (69). Karteolol, levobunolol, metipranolol, timolol maleat ve timolol hemihidrat non-selektif etkilidir. Beta1 adrenerjik reseptörler kardiyak etkili iken, beta2 adrenerjik reseptörler pulmoner etkilidir.

5) Karbonik Anhidraz İnhibitörleri: Sulfonamid derivesi olan karbonik anhidraz inhibitörleri direkt olarak siliyer cisimdeki karbonik anhidraz enzimini inhibe ederek ve hümör aköz salgısını azaltarak etki gösterirler. Asetazolamide, diklorfenamide, metazolamide sistemik; dorzolamide ve brinzolamide topikal etkili olanlarıdır. Tek ilaç olarak kullanılabildikleri gibi β blokerlerle kombine kullanımları da mevcuttur (70).

1.1.9. Trigonelline

Trigonelline (TG), ilk kez çemenotu tohumundan elde edilmiş bir bitki alkaloididir. TG'nin kahve tohumlarında da bulunduğu tespit edilmiştir. Kimyasal olarak N-metilnikotikasit ($C_7H_7NO_2$) olarak bilinir. Trigonelline B6 vitamin türevidir. Suda çözünürlüğü %100 dür (71).

1.1.9.1. Hipoglisemik Etkinlik

Deneyisel bir diyabet modelinde beslenmeye TG eklendikten 23 gün sonra oral glukoz tolerans testi yapılan hayvanlarda glukoz düzeylerinde düşüş olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada açlık serum insülin düzeyi kontrol grubuna göre TG grubunda düşük izlenmiştir. Karaciğer enzimleri olan glukokinaz ve glukoz 6 fosfotaz enzim düzeyleri TG grubunda kontrol grubuna göre yüksek izlenirken tumor nekrosis faktör alfa (TNF alfa) düzeyleri düşük bulunmuştur. TNF alfa'nın TG tarafından azaltılması, TG'nin antiinflamatuvar etkinliğini göstermiştir (72). TG'nin bağırsak mukozasından sodyum bağımlı glukoz emilimini inhibe ettiği görülmüştür (73).

1.1.9.2. Hipolipidemik Etkinlik

Deneyisel modellerde TG'nin, serbest ve total plazma kolesterol düzeylerini düşürdüğü görülmüştür. Ayrıca TG ile tedavi edilen ratlarda karaciğer ve serum trigliserit seviyelerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Karaciğerde yağ asidi sentetaz aktivitesini azaltırken, karnitin palmitoil transferaz ve

glukokinaz aktivitelerini arttırmıştır. Bu enzimlerin TG tarafından düzenlenmesi, hem trigliserit birikiminin baskılanmasını hem de diyabetin ilerlemesinin engellenmesini sağlar (74).

1.1.9.3. Antioksidan Etkinliği

Diyabetik ratlarda yapılan çalışmada, TG'nin MDA ve NO düzeylerini azalttığı; SOD, katalaz, glutatyon düzeylerini ise arttırdığı tespit edilmiştir (75). Bir başka çalışmada TG'nin lipozom peroksidasyonu üzerinden antioksidan etkisi olduğu gösterilmiştir (76).

1.1.9.4. Antiapoptotik ve Nöroprotektif Etkinliği

İskemik inme modelinde hipoksi indüksiyonunu takiben verilen 25, 50 ve 100 μ M TG'nin doz bağımlı olarak hücre canlılığını arttırıcı etkisi olduğu görülmüştür. Doz 200 μ M çıkarıldığında hücre canlılığın 100 μ M doza göre farklılık olmadığı tespit edilmiştir. 50 ve 100 μ M TG'nin, glutatyon seviyelerini doz bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür. 25, 50 ve 100 μ M dozunda uygulanan TG'nin, doz bağımlı olarak MDA seviyelerini azalttığı bulunmuştur (77). Nöroinflamasyon, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisindeki temel problemdir. Lipopolisakkaritle indüklenmiş kognitif bozulma deneyinde, TG'nin, BDNF düzeylerini arttırdığı tespit edilmiştir. 50mg/kg veya 100mg/kg oral dozda uygulanan TG tedavisinin asetilkolinesteraz düzeylerinde anlamlı azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Her iki dozda uygulanan TG tedavisinin korteks ve hipokampusta, SOD ve glutatyon düzeylerini arttırdığı görülmüştür. Bununla birlikte proinflamatuvar sitokinler olan TNF alfa ve interlökin 6 (IL 6) düzeylerinin azaldığı görülmüştür (78). İnflamatuvar sitokinler, NO üretimini arttırarak apoptozisi tetikler. Başka bir çalışmada TG'nin IL 6 ve TNF alfa düzeylerini azaltırken, antiinflamatuvar etkinliği olan interlökin 10 (IL 10) u arttırdığı, NF- κ B seviyesini azalttığı görülmüştür (79).

Trigonellinenin akson ve dentritlerde uzama ve hafıza geliştirici etkinliği tespit edilmiştir (80). Ratlarda oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde TG'nin antiapoptotik ve nöroprotektif etkinliği araştırılmıştır. Deneyde SOD, glutatyon, katalaz gibi antioksidan sistem enzimlerinin arttığı, MDA'nın azaldığı izlenmiştir. DNA fragmantasyonu ile apoptozisin azaltıldığı gözlemlenmiştir (81). Alzheimer modeli oluşturulan bir deneyde TG'nin bilişsel iyileşme sağlayabileceği, oksidatif

stresi ve enflamasyonu azaltabileceği görülmüştür. Ayrıca mitokondrial membran bütünlüğünü koruyarak nöron koruyucu etkinlik gösterebileceği belirtilmiştir (82). Bilişsel bozulma modeli oluşturulan ratlarda TG'nin hipokampal MDA ve asetilkolinesteraz düzeylerini azalttığı aynı zamanda SOD, glutasyon ve katalaz düzeylerini arttırdığı görülmüştür. Aynı deneyde TG tedavisi ile sıçanlarda hipokampal NF-KB, toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ve TNF alfa düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir (83). Kardiyositlerde hidrojen peroksitle indüklenen apoptoziste TG'nin etkinliğine bakılmıştır. TG kardiyositlerdeki hücre morfolojisini önemli düzeyde korumuştur. Apoptotik genler olan caspase 3 ile caspase 9 ve antiapoptotik genler olan Bcl-2 ve Bcl-XL düzenleyerek antiapoptotik etkinlik göstermiştir (84). Diyabetik nefropatide, oksidatif stres artışı ve apoptoza bağlı hücre kaybı hastalığın spesifik özelliğidir. TG'nin diyabetik nefropatiye karşı antioksidan ve antiapoptotik etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada Na⁺K⁺ ATPase aktivitesini; hidroksiprolin ve TNF alfa aktivitesini azalttığı bununla birlikte antioksidan enzim düzeylerini arttırdığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada apoptotik hücrelerin flowsitometrik yöntemle ölçülmesiyle erken ve geç apoptotik hücrelerin TG tedavisi ile azaltıldığı görülmüştür (85).

1.1.10. Apoptozis İncelenmesi (TUNEL Analizi)

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Terminal deoksinükleotidil transferazın (TdT) kullanımına dayanan yöntemdir (86).

1.1.11. İmmünohistokimyasal Olarak Caspase 3 Değerlendirilmesi

Hücre içi Ca ve Mg bağımlı endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanması apoptozisin en belirgin özelliğidir. Caspase 3; DNA parçalanmasından sorumlu endojen endonükleaz enziminin aktivasyonunu sağlar. Apoptozisin hem intrensek hem de ekstresek yolunda görev alır. Apoptozisin gösterilmesinde caspase3 immünohistokimyasal olarak retinal dokuda çalışmak için daha önce farklı deneysel çalışmalarda kullanılmıştır (87, 88).

1.1.12. İmmünohistokimyasal Olarak Brn3a Değerlendirmesi

Optik sinir yaralanması olan gözlerde RGH tanımak için Brn3a güvenilir bir belirteçtir. Aslında immünokimyasal olarak Brn3a ile işaretlenen hücrelere bakarak apoptozisi değil, apoptozisten kurtulabilen canlı RGH'leri tespit etmek mümkündür (6).

1.1.13. Oksidatif Sistem Markerları

Oksidatif stres, apoptozisi uyaran en önemli mekanizmadır. Apoptozisi azaltmayı planlayan tedavi modalitelerinin göreceli olarak oksidatif stres markerlarını azaltması ya da antioksidan sistemlerin etkinliğini artırması beklenir. Antioksidan savunma sistemleri olarak SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz sayılabilir.

Serbest radikaller, hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu meydana getirir. Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA oksidatif sistem belirteci olarak kullanılabilir (89).

1.1.14. NF-κB

Çeşitli dokulardaki normal gelişimde ve homeostazda önemli rol oynar. NF-κB; sitokinler, TNF, serbest radikaller, virüsler, çift sarmallı RNA, endotoksinler ve stres gibi birçok faktör tarafından aktive olur. Aktif NF-κB; immüno-inflamatuar yanıtlar, apoptozis, hücre adezyonu, anjiyogenez gibi olaylarda rol oynayan birçok genin transkripsiyonunu düzenler. TNF-α, IL-1, IL-2, IL-12, IL-16, IL-18 ve interferon-gama (IFN-γ) gibi sitokinlerin transkripsiyonunu artırır. Proinflamatuvar sitokinlerin artışı, NF-κB'nin tekrar uyarılmasına sebep olur. Bu durum oluşan inflamasyonun kronikleşmesini sağlar. NF-κB, tümör hücrelerinin oluşumunu ve yaşam süresini arttırabilir. Tümörün progresyonunu hızlandırır. Apoptozisi başlatan birçok sinyal, apoptozisi baskılayan NF-κB aktivasyonunu artırır. NF-κB hem antiapoptotik hem apoptotik etkinlik gösterebilir (90).

Çalışmamızda; TG etken maddesinin glokom modelindeki nöron koruyucu ve antioksidan etkinliğinin araştırılması planlanmıştır. Birçok hastalığın patogenezinde yer alan nöron hasarı ve oksidatif stres glokom hastalığının prognozunda çok önemlidir. İlerleyici bir nöropati olarak sınıflandırılan glokom hastalığı seyir itibariyle

nörolojik hastalıklara benzemektedir. TG daha önce çeşitli nörolojik hastalık modellerinde nöroprotektif ve antioksidan etkinliği gösterilmiş bir maddedir. Yaptığımız literatür araştırmasında, bu maddenin oftalmoloji alanında yapılan çalışmasına rastlanmamıştır. Glokom tedavisinde yeni bir ajan olabileceğini düşündüğümüz TG'nin etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gruplar

Bu çalışmada ağırlıkları 225-300 gr arasında değişen 8-10 haftalık 42 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanılacaktır. Denekler 7'şerli 6 gruba ayrılacak ve gruplar şu şekilde olacaktır;

Grup I (Kontrol Grubu) (n=7); Deney süresi olan 3 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmayacaktır.

Grup II (Sham-Kontrol Grubu) (n=7); Apoptozis modeli oluşturulmayacaktır. Apoptozis modeli oluşturulmuş olarak kullanılan PBS solüsyonundan deneyin birinci gününde intravitreal 0.1M 2 µl enjekte edilecektir.

Grup III (Sham Grubu) (n=7); Deneyin birinci gününde 160 nmol/µl NMDA çözeltisinden 2 µl intravitreal enjeksiyon ile apoptozis indüksiyonu oluşturulacak ve bu gruba deney boyunca herhangi bir tedavi verilmeyecektir.

Grup IV (Oral Trigonelline) (n=7); Deneyin birinci gününde 160 nmol/µl NMDA çözeltisinden 2 µl intravitreal enjeksiyon ile apoptozis indüksiyonu oluşturulacak ve 21 gün boyunca 100mg/kg gün dozunda trigonelline oral gavaj yöntemiyle tek seferde verilecektir.

Grup V (Topikal Trigonelline grubu) (n=7); Deneyin birinci gününde 160 nmol/µl NMDA çözeltisinden 2 µl intravitreal enjeksiyon ile apoptozis indüksiyonu oluşturulacak ve 21 gün boyunca 20mg/ml (her 1 damlada 1mg olacak şekilde) göz damlası sabah akşam bir damla uygulanacaktır.

Grup VI (Topikal Brimonidin Tartarat grubu) (n=7); Deneyin birinci gününde 160 nmol/µl NMDA çözeltisinden 2 µl intravitreal enjeksiyon ile apoptozis indüksiyonu oluşturulacak, 21 gün boyunca BT (%0.15) göz damlası sabah akşam bir damla uygulanacaktır.

Denekler; Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM) tarafından temin edilmiştir. Deney süreci, hayvanların bakımı ve barınma koşulları 'Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu' tarafından onaylanmıştır. Çalışmamızda kullanılacak sıçanlar 22-25°C oda ısısında 12 saat ışık (7:00–19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00–7:00) tutulacak özel olarak yaptırılan ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslenecektir. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda

(normal eme suyu) verilecektir. Tüm gruba aynı standart sıçan yemi verilerek add-libitum su, yiyecek alımları sağlanacaktır.

2.2. Apoptozis İndüksiyonu

Anestezi ve analjezi uygulamasında intramüsküler 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. Kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda anestezi uygulaması yapıldı. İnteramskler enjeksiyon sonrası tüm hayvanların sağ ve sol gözlerine topikal %1'lik proparacain hidroklorid damlatıldı. Hayvanların her iki gözüne 3 dakika %5 lik povidone iodide uygulandı. Uygulama sonrası 2. gruptaki deneklerin her iki gözüne limbusun 1mm gerisinden 30-gauge Hamilton enjektörü yardımıyla 2 l PBS enjeksiyonu yapıldı. Sham, oral TG, damla TG ve damla BT gruplarındaki deneklerin her iki gözüne limbusun yaklaşık 1mm gerisinden 30-gauge Hamilton enjektörü kullanılarak intravitreal 160 nmol/l NMDA çözeltisinden 2 l uygulandı. Operasyon sonrasında gözler serum fizyolojik ile yıkanıp, antibiyotikli damla tatbik edildi.

2.3. Tedavilerin Uygulanması

Kontrol, sham-kontrol ve sham gruplarına tedavi uygulanmadı. Dördüncü gruba oral gavaj yöntemiyle 100mg/kg dozunda TG tek seferde verildi. Beşinci gruba damla şeklinde hazırlamış TG sabah akşam olacak şekilde günde iki defa bir damla şeklinde uygulandı. Altıncı gruba BT damla sabah akşam olacak şekilde günde iki defa bir damla şeklinde verildi.

2.4. Histopatolojik İnceleme

2.4.1. TUNEL Analizi

Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan 3-4 m kalınlığında elde edilen kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize ve rehidrate edildikten sonra PBS ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular tekrar yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37°C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 l Reaction

Buffer+%30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. AB. P Biosciences TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection kit kullanıldı. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile kaplandı. Mayer hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar Olympus BX50 ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirildi. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Mayer hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 40'lık büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik 100 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam hücrelere oranlanması ile (Apoptotik İndeks = Toplam apoptotik hücresi sayısı / 100) Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı.

Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. TUNEL Boyama Prosedürü.

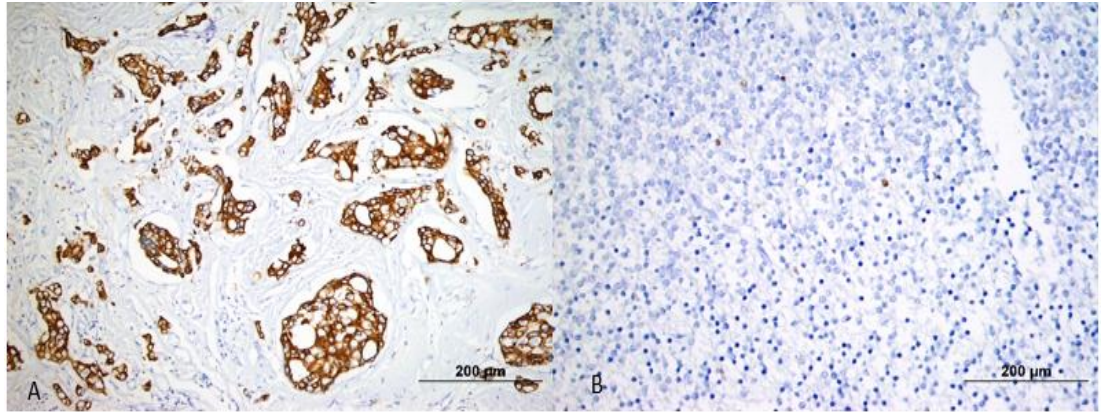
İşlem	Süre
60°C etüv	Bir gece
Xylol	3X15 dakika
%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
PBS	5 dakika
Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
1:500 d ilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
PBS	3X5 dakika
Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
PBS	3X5 dakika
Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
PBS	3X5 dakika
DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
PBS	3X5 dakika
Distile su	5 dakika
Harris hematoksilen	1-5 dakika
Distile su	5 dakika
%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
Xylol	2X5 dakika
Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

2.4.2. Caspase 3 ve Brn3a İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan 3-4 µm kalınlığında elde edilen kesitler polilizinli lamlara alındı. Bu lamlara Ventana BenchMark Ultra model otomatik immünohistokimya cihazında Ventana marka Ultraview Universal DAB Detection Kit ile Ultra DAB kromojen protokolü ile caspase 3 ve Brn3a antikorları uygulandı. Antikorların özellikleri tablo 2’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Şekil 3’te caspase 3’ün meme karsinomundaki, Brn3a’nın beyin dokusundaki boyanması gösterilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan antikorların özellikleri

Antikor adı	Antikor türü	Marka	Dilüsyon oranı	Pozitif kontrol
Caspase 3	Mouse IgG1	Fine test	1/50	Meme mukozası Kolorektal karsinom
Brn3a	Tavşan oliklonal	Bioss	1/50	Beyin dokusu Appendiks



Şekil 3. Pozitif Kontroller A: Meme Karsinomunda caspase 3 boyanması B: Beyin Dokusunda Brn3a Boyanması (x200)

Elde edilen preparatlar Olympus BX50 ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Kesitlerde 40'lık büyütmede rastgele seçilen 10 alanda Caspase 3 ve Brn3a ile boyama yaygınlığı şu şekilde skorlandı:

İmmün pozitif hücre yoksa 0.

İmmün pozitif hücre 1% ve 10% arasındaysa 1.

İmmün pozitif hücre 11% ve 30% arasındaysa 2.

İmmün pozitif hücre 31% ve 50% arasındaysa 3.

İmmün pozitif hücre 51% den fazlaysa 4 (91).

2.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve Posthoc Tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

2.6. Doku Örneklerinin Alınması

Hayvanlara dekapitasyon işlemi uygulandı. RGH'de caspase 3, Brn3a antikorlarına bakılması ve TUNEL boyama tekniği ile apoptozis düzeylerinin değerlendirilmesi için ratların sağ gözleri tıbbi patoloji laboratuvarına gönderildi. Ratların sol gözleri NOS 2, NF κ B, MDA, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve BDNF düzeylerine bakılması için tıbbi biyokimya laboratuvarına gönderildi.

2.7. Biyokimyasal Örneklerin Değerlendirilmesi

Göz doku örnekleri % 0,9'luk soğuk ($+4^{\circ}\text{C}$) sodyum klorür (NaCl) ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra homojenizatörle 0,01M'luk PBS (1/10) çözeltisi içerisinde, 16000 rpm'de 4 dakika uygun şartlarda homojenize edildi. Homojenat 5000 xg'de 1 saat ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de) santrifüj yapılarak süpernatantları ayrıldı ve analiz yapılincaya kadar -80°C 'de saklandı. Süpernatantlardaki protein miktarları Qubit protein ölçüm kiti kullanılarak Qubit Fluorometer cihazında (Invitrogen, USA) tespit edildi ve serum ve süpernatant örneklerinden SOD, glutatyon peroksidaz, katalaz ve BDNF düzeyleri Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemiyle tayin edildi. Süpernatantlardaki protein düzeyleri Lowry metoduna göre tayin edildi. Bu yöntemin prensibi; alkali ortamda proteinlerin Folin-Fenol ayırıcı ile mavi bir renk oluşturmasına dayanmaktadır (92).

Süpernatant SOD Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Süpernatant SOD düzeyleri, rat SOD ELISA kiti (AndyGene Biotechnology Co., Ltd., katalog no; AD2871Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutuldu. Sonuçlar ng/L olarak ifade edildi. Kitin

ölçüm aralığı 10-200 ng/L ve sensitivitesi 1,0 ng/L idi. Intra-Assay'ı CV<8%; Inter Assay'ı CV<10 idi.

Süpernatant Glutasyon Peroksidaz Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Süpernatant glutasyon peroksidaz düzeyleri, rat glutasyon peroksidaz ELISA kiti (AndyGene Biotechnology Co., Ltd., katalog no; AD2434Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutuldu. Sonuçlar ng/L olarak ifade edildi. Kitin ölçüm aralığı 0,4-9 ng/L ve sensitivitesi 0,05 ng/L idi. Intra-Assay'ı CV<8%; Inter Assay'ı CV<10 idi.

Süpernatant CAT Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Süpernatant katalaz düzeyleri, rat katalaz ELISA kiti (AndyGene Biotechnology Co., Ltd., katalog no; AD2444Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutuldu. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi. Kitin ölçüm aralığı 15-450 pg/ml ve sensitivitesi 1,0 pg/ml idi. Intra-Assay'ı CV<8%; Inter Assay'ı CV<10 idi.

Süpernatant BDNF Düzeylerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Süpernatant BDNF düzeyleri, rat BDNF ELISA kiti (AndyGene Biotechnology Co., Ltd., katalog no; AD2597Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikro plate okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutuldu. Sonuçlar ng/L olarak ifade edildi. Kitin ölçüm aralığı 50-1000 ng/L ve sensitivitesi 5,0 ng/L idi. Intra-Assay'ı CV<8%; Inter Assay'ı CV<10 idi.

Doku MDA Ölçümü

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA'nın ölçümü Ohkawa ve arkadaşları tarafından belirlenen yöntem kullanılarak yapıldı. Bu yöntemin prensibi; asidik ortamda (pH: 3,5) ve aerobik şartlar altında dokudan elde edilen süpernatantlar ve serum örnekleri belli sıcaklık etkisinde lipid peroksidasyonu sonucu, açığa çıkan MDA'nın, Tiyoobarbitürik asit ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçme esasına dayanmaktadır. Sonuçlar toplam protein konsantrasyonlarına bölünerek nmol/mg protein cinsinden verilmiştir (93).

Qubit Fluorometre ile Protein Miktarlarının Tayini

Hazırlanan doku homejenizatlarından elde edilen süpernatantlarda protein ölçümleri Qubit protein ölçüm kiti (Qubit™ Protein Assay Kit, Cat No: Q33211) kullanılarak Qubit Fluorometer cihazında (Invitrogen, USA) yapılmıştır.

Western Blot Yöntemiyle Doku NF-κB ve iNOs Protein Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Western blot; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immunolojik metodlarla gösterilmesidir. Bu yöntemde çalışılan numunedeki SDS-polipeptit kompleksleri, poliakrilamid jele yüklenip, elektrik akımına tabi tutuldukları zaman, proteinin molekül ağırlıklarıyla orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç etmekte ve jelde bulundukları yerde bantlar halinde yığılım göstermektedirler. Yapılan bu işlem elektroforez olarak tanımlanmaktadır. Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden dört adımda gerçekleştirilir ki bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselülöz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselülöz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamalarıdır. Western blot yönteminde kullandığımız malzemeler Tablo 3.'de sunulmuştur.

Tablo 3. Western Blot çalışmasında kullanılan malzemelerin listesi

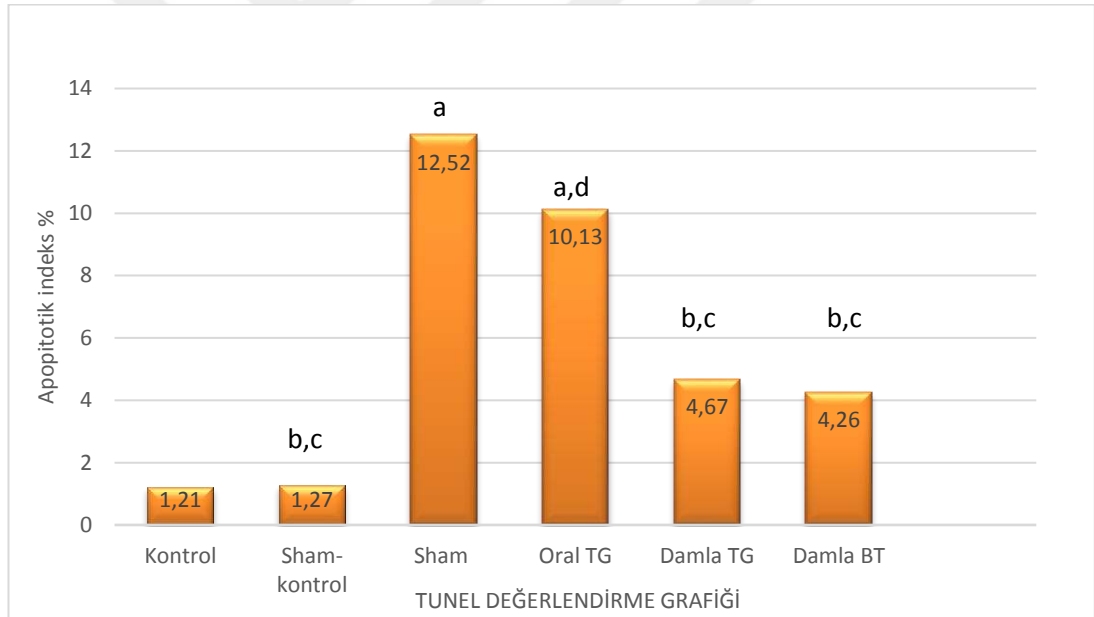
Mouse Monoclonal Anti-β-Aktin primer antikoru Finetest (Cat No:FNab00871)
Mouse Monoclonal Anti- NF-κB primer antikoru (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)
Mouse Monoclonal Anti-iNOs primer antikoru (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)
RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)
NuPAGE MES SDS Buffer Kit (Bis-Tris Jel için) (Invitrogen, USA)
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Jel 15 kuyucuklu (Invitrogen, USA)
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, USA)
iBlot Transfer Stack, nitrocellulose, regular-size (Invitrogen, USA)
WesternBreeze Chromogenic Kit–Anti-Mouse (Invitrogen, USA)

3.BULGULAR

3.1. TUNEL Sonuçları

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyama sonuçları şekil 4'te görüldüğü gibidir. TUNEL pozitifliği kontrol grubu ile sham-kontrol arasında benzerdi ($p>0.05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında sham grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulunmuştur ($p<0.05$).

Kontrol ve sham-kontrol grupları ile kıyaslandığında oral TG grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, $p<0.05$). Kontrol ve sham-kontrol gruplarına göre damla TG ve damla BT gruplarında TUNEL pozitifliği artmış bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).



a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p>0,05$ c: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ d: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p>0,05$

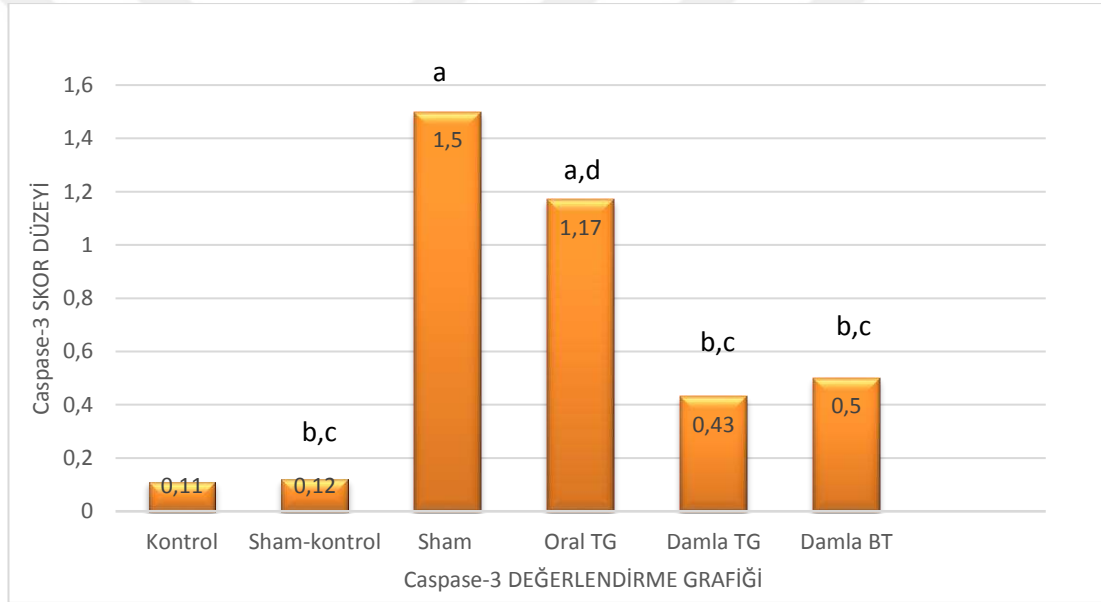
Şekil 4. TUNEL Analizi Sonuç Grafiği

Sham grubu ile kıyaslandığında TUNEL pozitifliği oral TG grubunda azalmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi ($p>0,05$). Damla TG ve damla BT gruplarında sham grubuna kıyasla TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak

anlamli şekilde azalmiŒ olarak izlendi ($p<0.05$). Damla TG ve damla BT grupları arasında istatistiksel olarak anlamli fark tespit edilemedi ($p>0,05$).

3.2. Caspase 3 Sonuçlar

Apoptotizis sürecine girmiŒ olan hücreleri tespit etmek için, apoptozisin ortak yolunda görevli olan caspase 3 iŒık mikroskobu altında deęerlendirilmiŒtir. Caspase 3 boyanma düzeyleri Œekil 5'te görüldüğü gibidir. Caspase 3 pozitifliği kontrol ve sham-kontrol grupları arasında benzerdi ($p>0,05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında sham grubunda caspase 3 pozitifliği istatistiksel olarak anlamli bir Œekilde artmıŒ bulundu ($p<0,05$).



a: Kontrol grubu ile karŒılaŒtırıldığında $p<0,05$ b: Kontrol grubu ile karŒılaŒtırıldığında $p>0,05$ c: Sham grubu ile karŒılaŒtırıldığında $p<0,05$ d: Sham grubu ile karŒılaŒtırıldığında $p>0,05$

Œekil 5. Caspase 3 Sonuç Grafiği

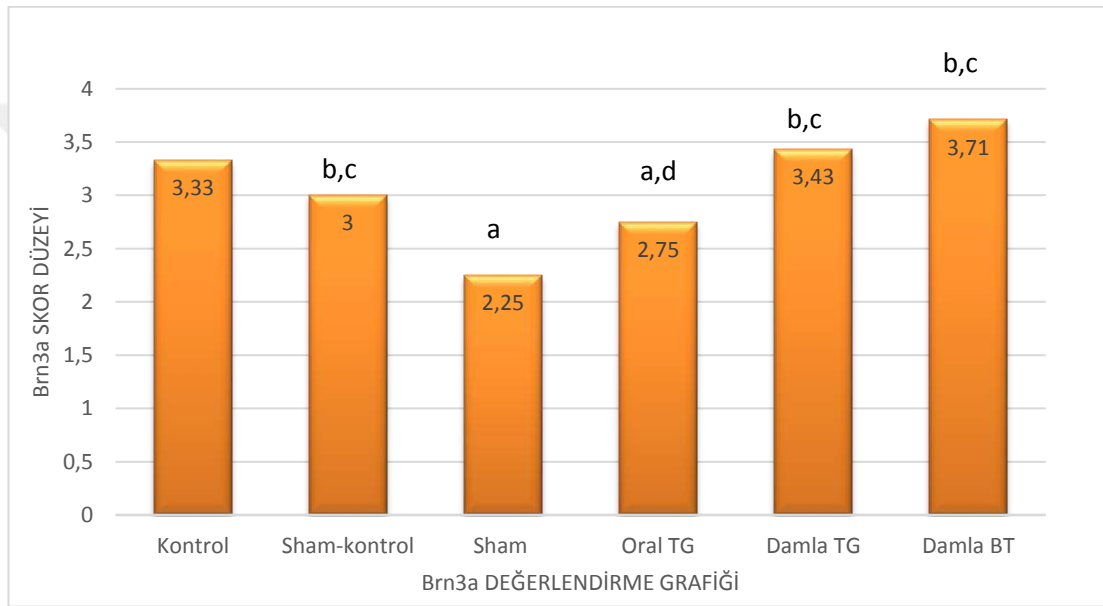
Kontrol ve sham-kontrol gruplarına göre kıyaslandığında oral TG grubunda caspase 3 pozitifliği istatistiksel olarak anlamli düzeyde artmıŒ bulundu ($p<0.05$). Kontrol ve sham-kontrol gruplarına göre kıyaslandığında damla TG ve damla BT grupları arasında istatistiksel olarak anlamli fark izlenmedi ($p>0.05$).

Sham grubu ile kıyaslandığında oral TG grubunda caspase 3 boyanması azalmıŒ olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamli fark tespit edilemedi ($p>0,05$).

Damla TG ve damla BT gruplarında sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde caspase3 boyanmasında azalma tespit edilmiştir ($p<0.05$). Damla TG ve damla BT grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$).

3.3. Brn3a Sonuçlar

RGH markerı olarak değerlendirilen Brn3a'nın boyanma düzeyleri Şekil 6'da gösterildiği gibidir.



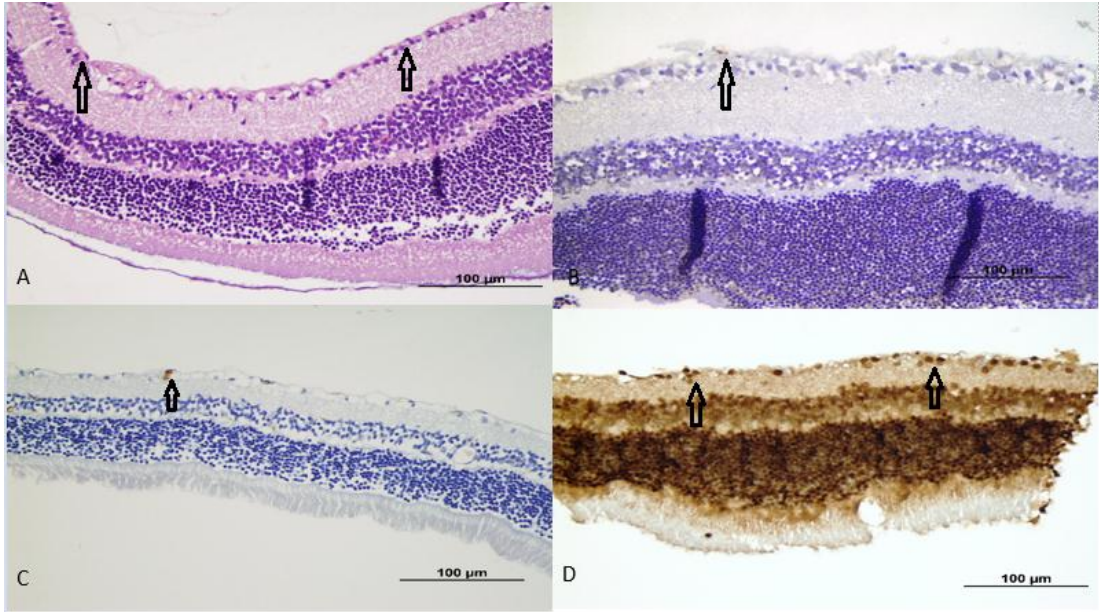
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p>0,05$; c: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ d: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p>0,05$

Şekil 6. Brn3a Sonuçları Grafiği

Kontrol grubu ile sham-kontrol grubu arasında istatistiki fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Sham grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiki anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kontrol ve sham-kontrol grubu ile kıyaslandığında oral TG grubunda brn3a boyanmasının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Kontrol ve sham-kontrol grupları ile kıyaslandığında damla TG ve damla BT grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$). Sham grubuna kıyasla oral TG grubunda Brn3a boyanma miktarında artış izlenmekle beraber istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0,05$). Sham grubuna göre karşılaştırıldığında damla TG ve damla

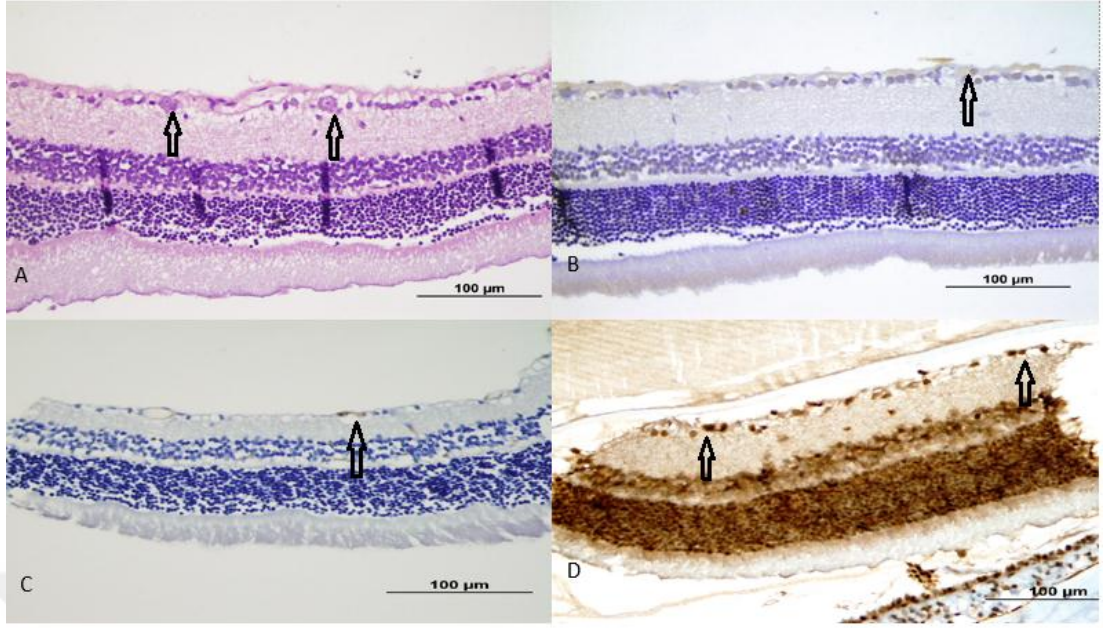
BT gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde Brn3a miktarında artış olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Damla TG ve damla BT grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Şekil 7’de kontrol grubunun, şekil 8’de sham kontrol grubunun, şekil 9’da sham grubunun, şekil 10’da oral TG grubunun, şekil 11’de damla TG grubunun, şekil 12’de damla BT grubunun hematoksil-eozin, TUNEL boyama, caspase 3 ve Brn3a boyanması gösterilmiştir.



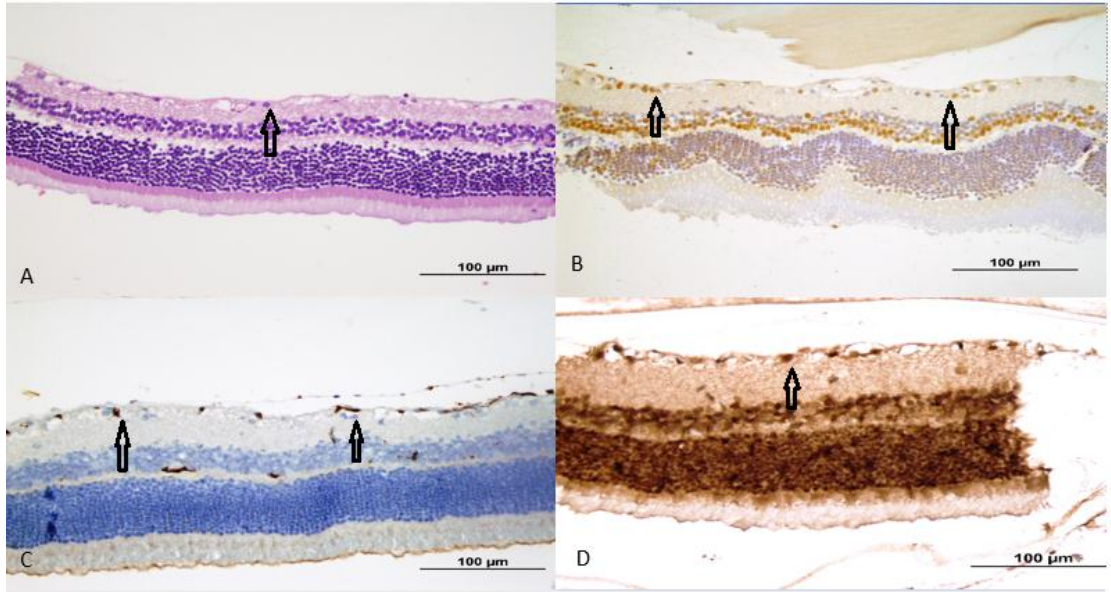
A:Hematoxilen-Eozin Boyama, ganglion hücreleri (ok) B: TUNEL boyama, apoptozis (ok)
C:Caspase-3 İmmünohistokimyasal Boyama D: Brn3a İmmünohistokimyasal Boyama, ganglion hücresi (ok) (x400)

Şekil 7. Grup 1 (Kontrol Grubu)



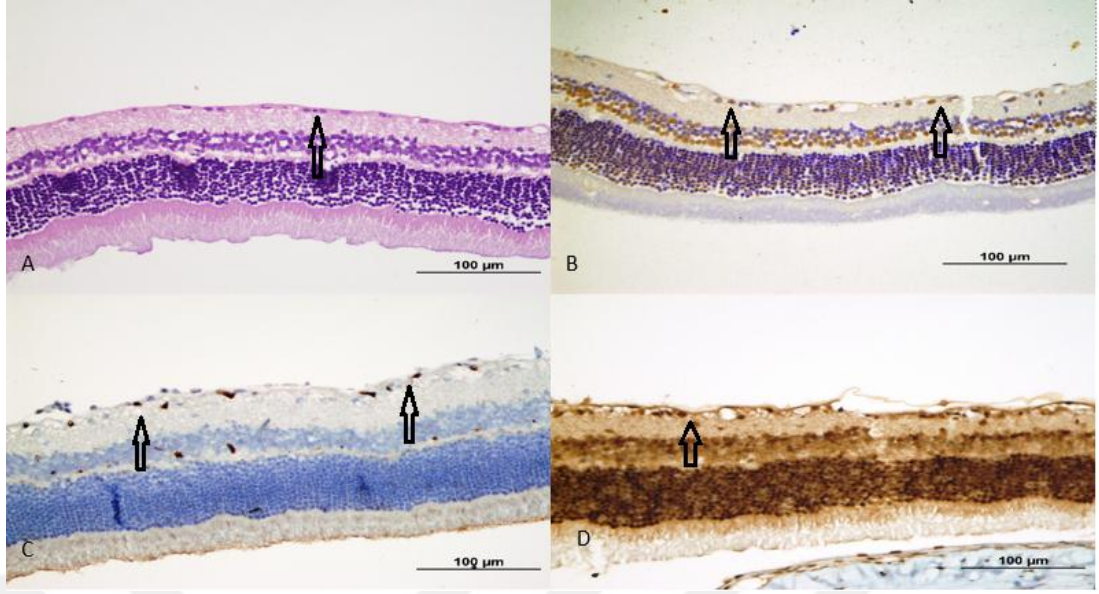
A:Hematoksilen-Eozin Boyama, ganglion hücreleri (ok) B: TUNEL boyama, apoptozis (ok) C: Caspase-3İmmünohistokimyasal Boyama D: Brn3a İmmünohistokimyasal Boyama, ganglion hücreleri (ok) (x400)

Şekil 8. Grup 2 (Sham-Kontrol)



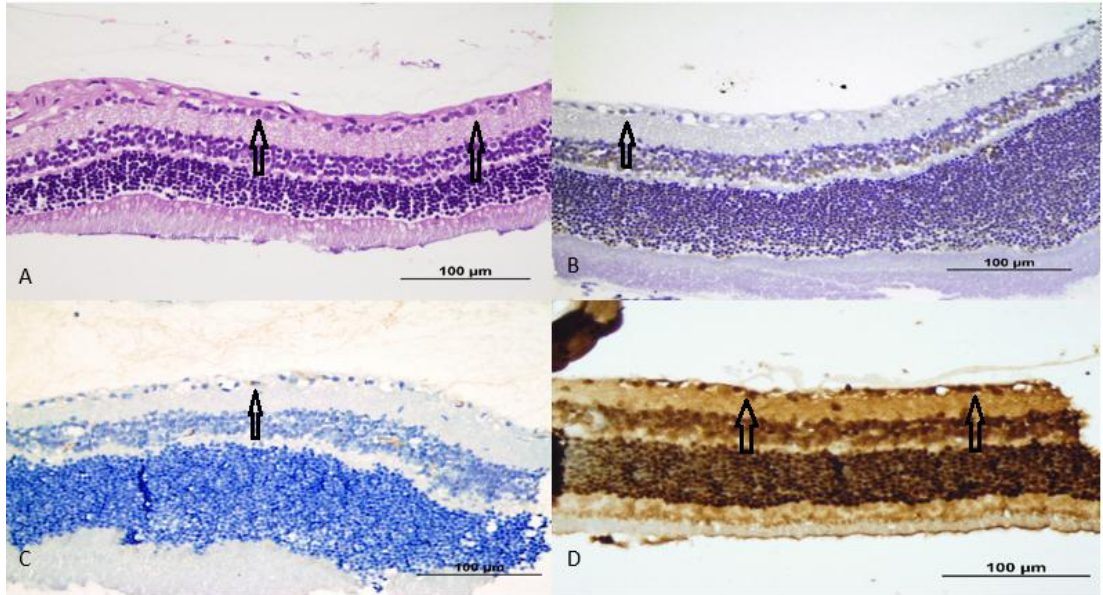
A:Hematoksilen-Eozin Boyama, azalmış ganglion hücreleri (ok); B: TUNEL boyama, apoptotik hücrelerde artış (ok) C: Caspase-3İmmünohistokimyasal Boyama D: Brn3a İmmünohistokimyasal Boyama, ganglion hücrelerinde azalma (ok) (x400)

Şekil 9. Grup3 (Sham)



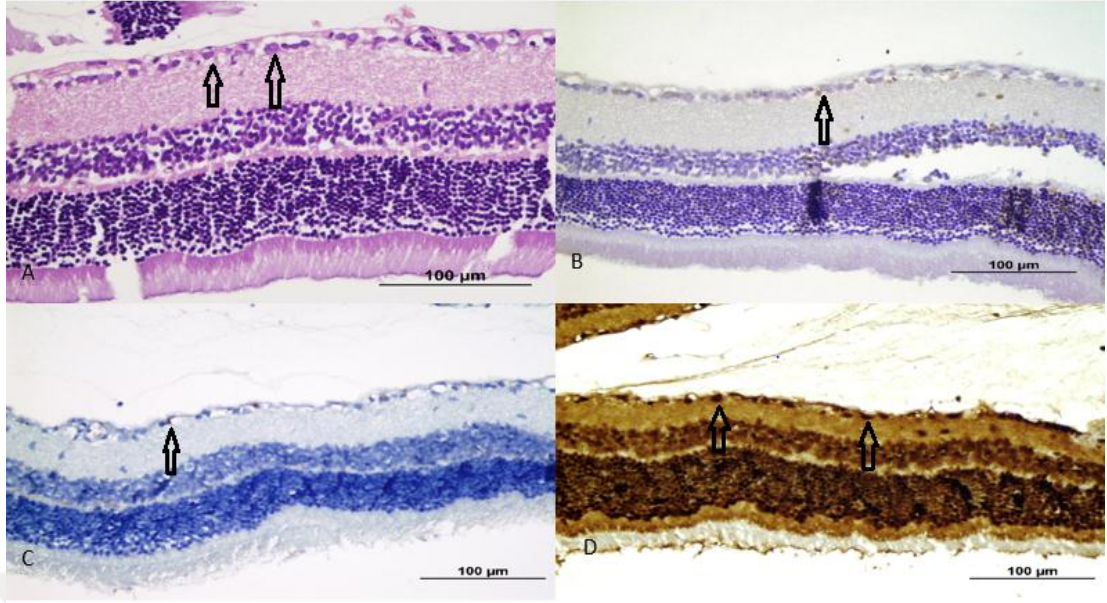
A:Hematoksilen-Eozin Boyama, azalmış ganglion hücreleri (ok); B: TUNEL boyama, apoptotik hücreler (ok) C:Caspase-3İmmünohistokimyasal Boyama; D: Brn3a İmmünohistokimyasal Boyama, ganglion hücreler (ok) (x400)

Şekil 10. Grup 4 (Oral TG)



A:Hematoksilen-Eozin Boyama, ganglion hücreleri (ok); B: TUNEL boyama, apoptotik hücre (ok) C:Caspase-3İmmünohistokimyasal Boyama; D: Brn3a İmmünohistokimyasal Boyama, ganglion hücre (ok) (x400)

Şekil 11. Grup 5 (Damla TG)

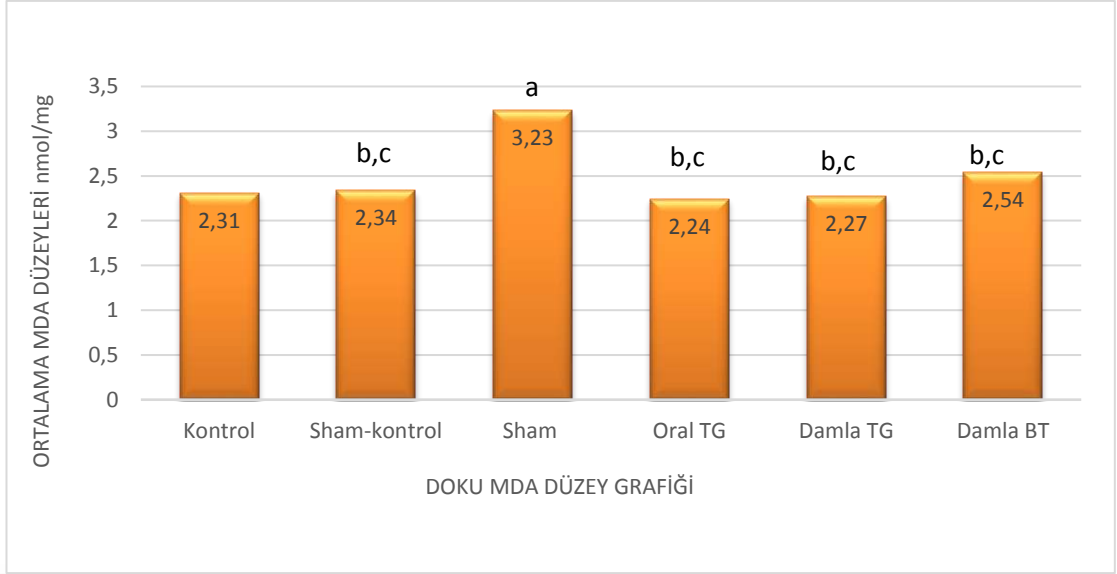


A:Hematoksilen-Eozin Boyama, ganglion hücreleri (ok); B: TUNEL boyama, apoptotik hücre (ok)
C:Caspase-3İmmünohistokimyasal Boyama; D: Brn3a İmmünohistokimyasal Boyama, ganglion hücreler (ok) (x400)

Şekil 12. Grup 6 (Damla BT)

3.4. Doku MDA Düzeyleri

Gruplardan alınan ratların gözlerine ait örneklerde MDA düzeyi Şekil 13'te görüldüğü gibidir. Kontrol ve sham-kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0,05$). Sham grubunda kontrol grubuna göre MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p<0,05$).



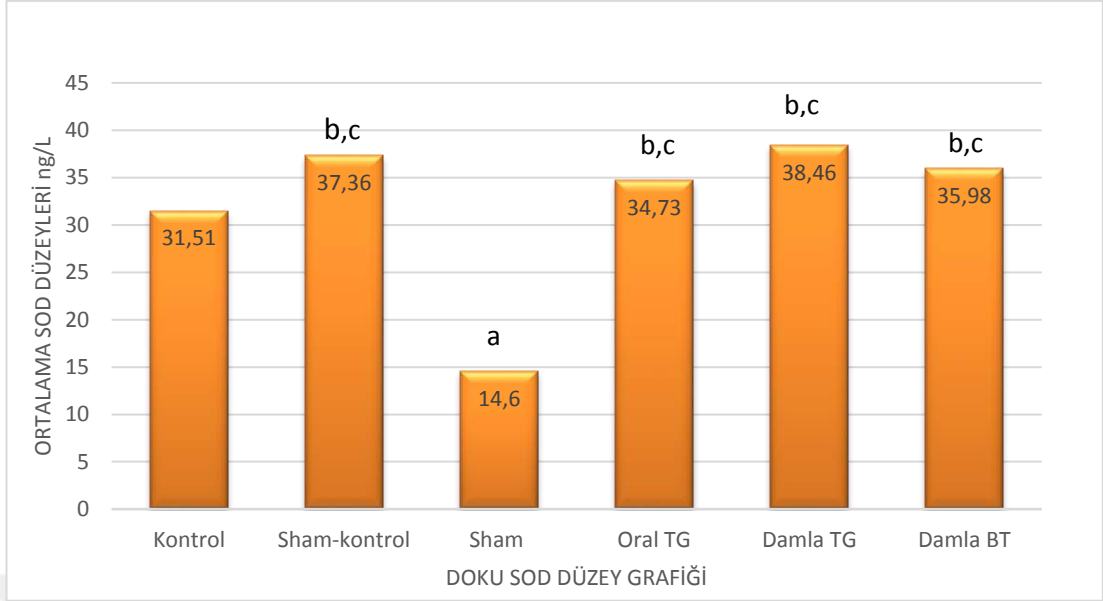
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$ c: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ d: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$

Şekil 13. Doku MDA Düzeyleri Grafiği

Malondialdehit düzeyleri tüm tedavi gruplarında kontrol ve sham-kontrol gruplarına benzer bulunmuştur ($p > 0,05$). Sham grubuna göre kıyaslandığında tüm tedavi gruplarında MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük izlenmiştir ($p < 0,05$).

3.5. Doku SOD Düzeyleri

Gruplardan alınan ratların gözlerine ait örneklerde SOD düzeyi Şekil 14'te görüldüğü gibidir. Kontrol ile sham- kontrol arasında istatistiki anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$). Sham grubunda doku SOD düzeyleri kontrole göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).



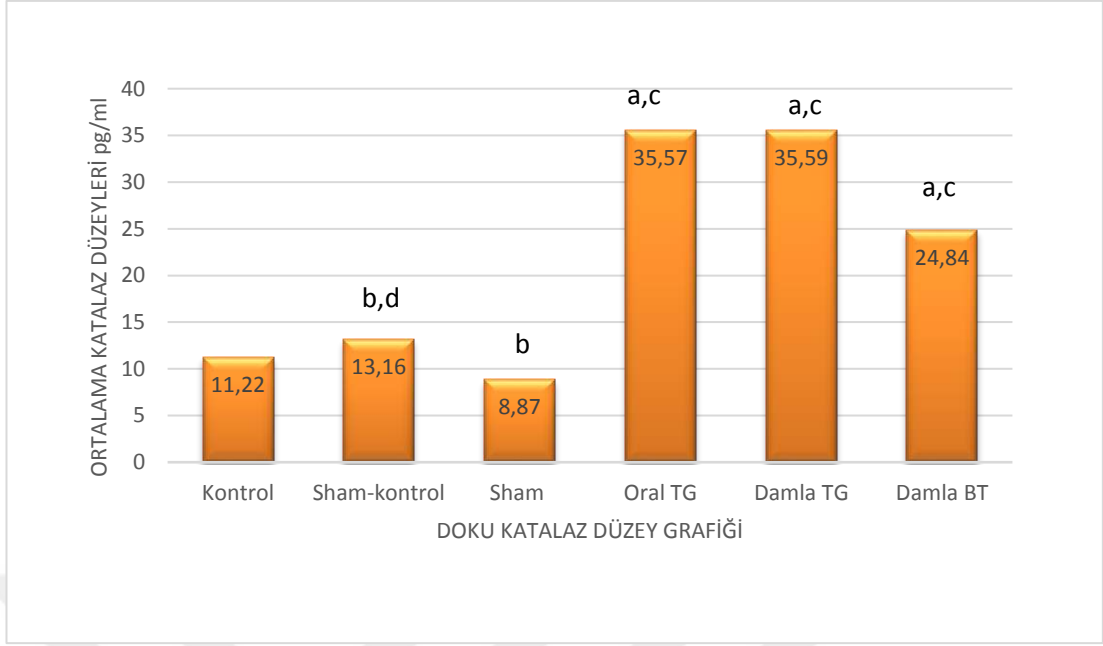
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$ c: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$.

Şekil 14. Doku SOD Düzeyleri Grafiği

Oral TG, damla TG ve damla BT grupları ile kontrol ve sham-kontrol grupları arasında istatistiki anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Oral TG, topikal TG ve topikal BT ile tedavi edilen gruplarda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda SOD miktarında artış izlenmiştir ($p > 0.05$). Topikal TG ve topikal BT grupları arasında SOD düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$).

3.6. Doku Katalaz Düzeyleri

Gruplardan alınan ratların gözlerine ait örneklerde katalaz düzeyi Şekil 15'te görüldüğü gibidir. Kontrol, sham-kontrol ve sham arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir ($p > 0.05$).



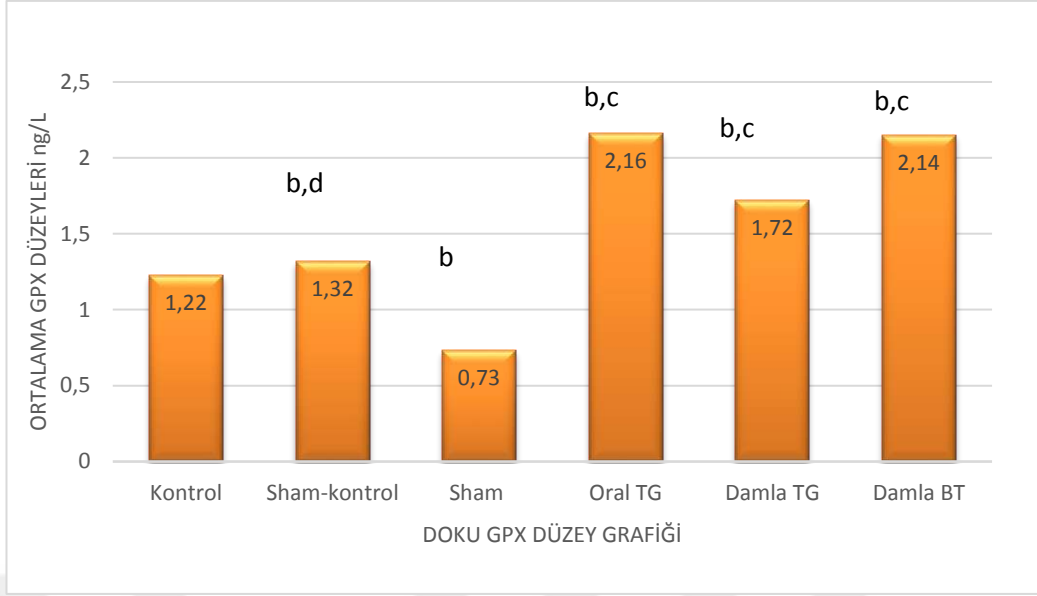
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$ c: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ d: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$

Şekil 15. Doku Katalaz Düzeyleri Grafiği

Kontrol ve sham-kontrol gruplarına kıyasla tüm tedavi gruplarında doku katalaz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Sham grubuna kıyasla oral TG, topikal TG ve topikal BT gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde katalaz artışı olmuştur ($p > 0.05$). Topikal TG ile topikal BT grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p > 0,05$).

3.7. Doku Glutasyon Peroksidaz Düzeyleri

Gruplardan alınan ratların gözlerine ait örneklerde glutasyon peroksidaz düzeyi Şekil 16'da görüldüğü gibidir. Kontrol, sham-kontrol ve sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Sham grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen kontrol grubundan düşük düzeyde glutasyon peroksidaz izlenmiştir.



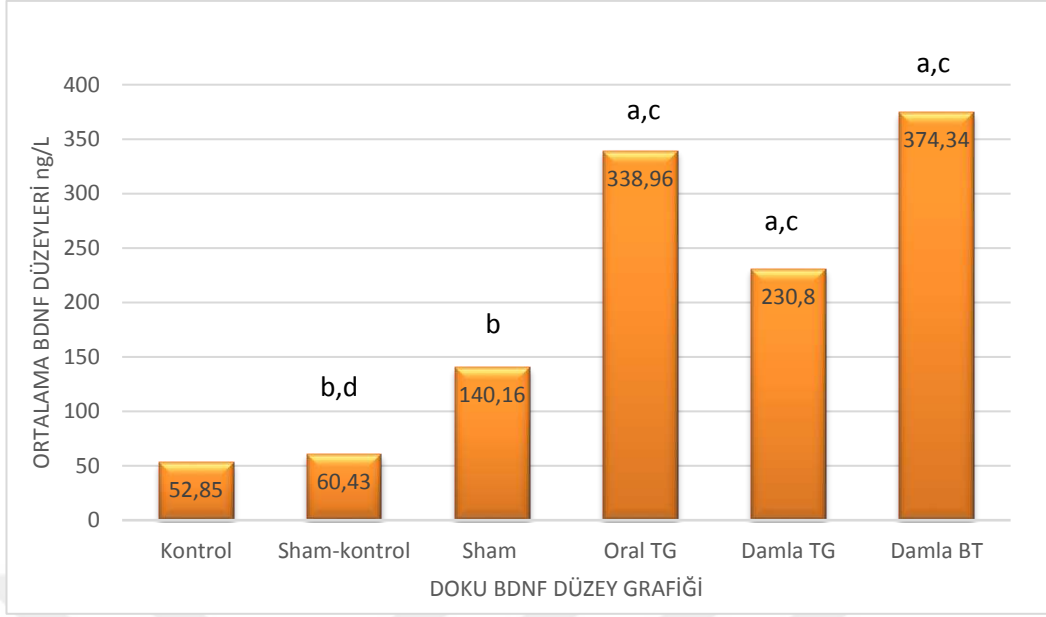
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$ c: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ d: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$

Şekil 16. Doku Glutasyon Peroksidaz Düzeyleri Sonuçları

Kontrol ve sham-kontrol grupları ile kıyaslandığında tüm tedavi gruplarında artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Oral TG, topikal TG ve topikal BT gruplarında sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış izlenmiştir ($p > 0,05$). Topikal TG ve topikal BT grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0,05$).

3.8. Doku BDNF Düzeyleri

Gruplardan alınan ratların gözlerine ait örneklerde BDNF düzeyi Şekil 17’de görüldüğü gibidir. Kontrol, sham-kontrol ve sham grupları arasında BDNF düzeyi ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p > 0,05$).



a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$; c: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ d: Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0,05$

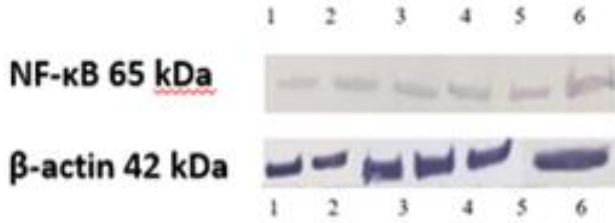
Şekil 17. Doku BDNF Düzeyleri Grafiği

Kontrol ve sham-kontrol gruplarıyla kıyaslandığında her üç tedavi grubunda BDNF düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Sham grubuna kıyasla oral TG, topikal TG ve topikal BT gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde BDNF artışı izlenmiştir ($p > 0,05$). Topikal BT ile topikal TG'nin, BDNF üzerindeki etkinliği benzer bulunmuş olup, istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p > 0,05$).

3.9. Doku NF- κ B Protein Ekspresyon Düzeyleri

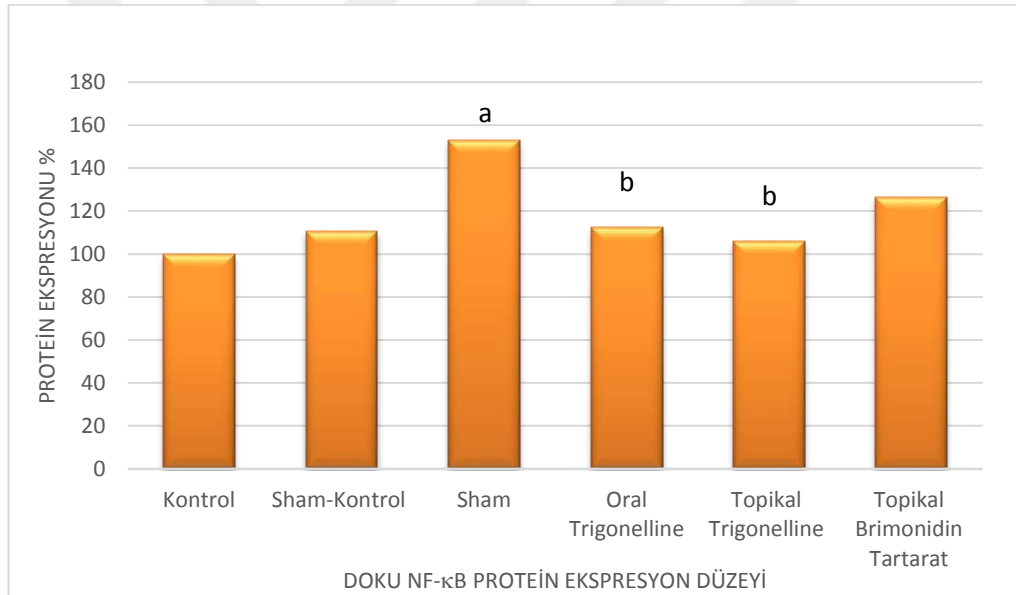
Doku NF- κ B protein ekspresyon düzeyleri kontrol grubunda (%100) kabul edilerek hesaplandığında; sham grubunda NF- κ B ekspresyon düzeyininin ~%53 oranında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Sham grubuna göre oral trigonelline (~%27), topikal trigonelline (~%30) ve topikal brimonidin tartarat (~%17) ajanlarının uygulandığı gruplarında ise NF- κ B protein ekspresyon düzeylerinde azalmalar kaydedildi, bu azalışlar oral trigonelline ve topikal trigonelline gruplarında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,05$).

NF- κ B ve β -actin proteinlerine ait bant görüntüleri şekil 18’de ve doku NF- κ B protein ekspresyon düzeyi şekil 19’da sunulmuştur.



1: Kontrol; 2: Sham-Kontrol; 3: Sham; 4: Oral Trigonelline; 5: Topikal Trigonelline 6: Topikal Brimonidin Tartarat grubunu temsil etmektedir.

Şekil 18. NF- κ B ve β -Actin Proteinlerine Ait Bant Görüntüleri



^ap<0,001, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ^bp<0,05 sham ile karşılaştırma

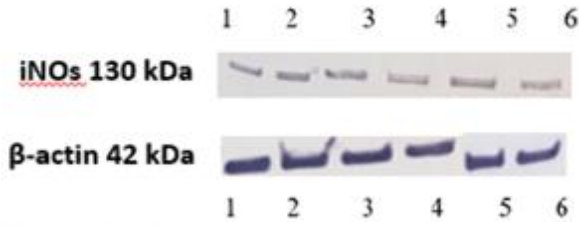
Şekil 19. Doku NF- κ B Protein Ekspresyon Düzeyi

3.10. Doku iNOs Protein Ekspresyon Düzeyleri

Doku iNOs protein ekspresyon düzeyleri kontrol grubunda (%100) kabul edilerek hesaplandığında; sham grubunda iNOs ekspresyon düzeyininin ~%32 oranında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (p<0,005). Sham grubuna göre oral trigonelline (~%15), topikal trigonelline (~%21) ve topikal brimonidin tartarat (~%20) ajanlarının uygulandığı gruplarında ise

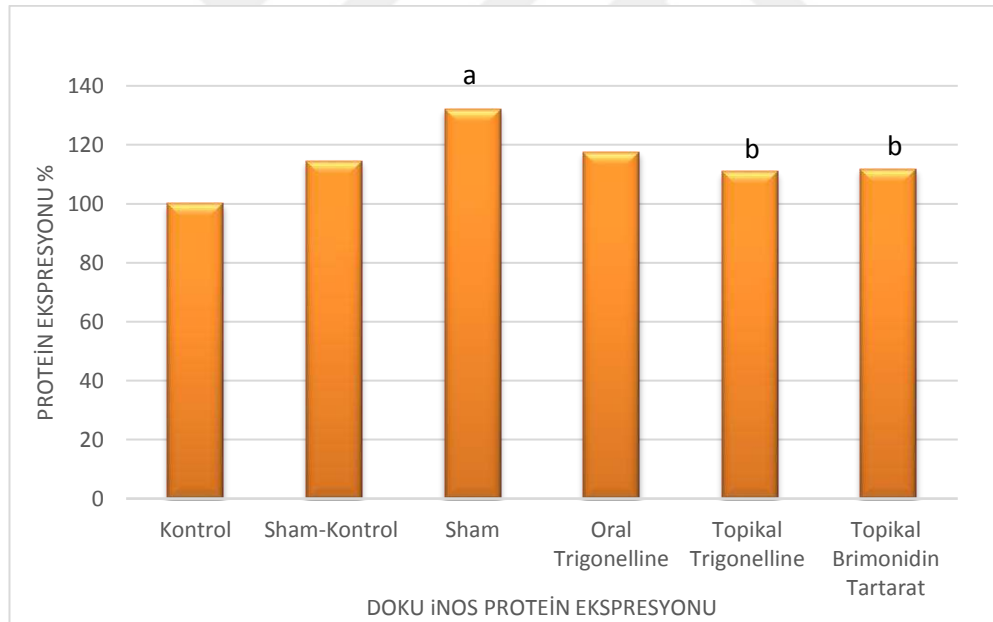
iNOs protein ekspresyon düzeylerinde azalmalar kaydedildi, bu azalışlar topikal trigonelline ve topikal brimonidin tartarat gruplarında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$).

iNOs ve β -aktin proteinlerine ait bant görüntüleri şekil 20’de ve doku iNOS protein ekspresyon düzeyi şekil 21’de sunulmuştur.



1: Kontrol; 2: Sham-Kontrol; 3: Sham; 4: Oral Trigonelline; 5: Topikal Trigonelline 6: Topikal Brimonidin Tartarat grubunu temsil etmektedir.

Şekil 20. iNOs ve β -Aktin Proteinlerine Ait Bant Görüntüleri



^a $p<0,005$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ^b $p<0,05$ Sham grubu ile karşılaştırıldığında

Şekil 21. Doku iNOS Protein Ekspresyon Düzeyi

4. TARTIŞMA

Glokom, RGH'lerinde apopitozisle giden yaygın bir optik nöropatidir (94). Glutamat, santral sinir sisteminde ve retinada bulunan eksitatör bir nörotransmitterdir. NMDA glutamat reseptörleri retinada yaygın olarak bulunmaktadır. Çalışmamızda RGH'lerde apopitozisi indüklemek için NMDA kullanıldı. NMDA aracılığıyla glutamat reseptörlerinin uyarılması hücre içine yüksek oranda kalsiyum girmesine ve mitokondrial fonksiyon bozukluğuna sebep olarak apopitozis gelişimini tetikler. Çalışmamızda glokomun patofizyolojisini açıklamakta kullanılan apopitozis teorisi üzerinden bir glokom modeli oluşturulması planlanmıştır. Bu modelde GİB'de herhangi bir değişiklik oluşmamakla birlikte, glokomun ilk başta hasar verdiği RGH'lerinde apopitozis indüklenmektedir. Glokom patogeneğinde, mekanik ve vasküler teoriler uzun zamandan beri tartışılan teorilerdir. Son yıllarda, özellikle RGH tabakasındaki apopitotik hasarın tespitinden sonra apopitozis, patofizyolojik temelde önemli görülmeye başlanmıştır. Daha önce yapılan birçok çalışmada ve deneysel glokom modelinde NMDA ilişkili apopitozis modeli kullanılmıştır (12, 44, 95).

Deneysel modelimizde retinal apopitotik hasarın gösterilmesinde TUNEL metodu kullanıldı. Deney modeli oluşturulurken intravitreal enjeksiyon yapılmasının, deneklerde oksidatif stres düzeylerini ve apopitozisi etkileyebileceği düşünülerek, sham-kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca apopitozis indüksiyonu sağlamak için kullanılan NMDA, PBS solüsyonu içinde çözüldüğünden kullanılan PBS'nin retinal doku üzerinde herhangi bir etkinliği olup olmadığını göstermek için sham-kontrol grubu değerlendirilmiştir. Oral TG ile tedavi edilen grupta apopitozisin azaldığı izlenmiş fakat sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir. Çalışmamızda oral TG doz ve süresi, Alzheimer ve Parkinson deney modellerini referans alarak üç hafta boyunca 100mg/kg gün olacak şekilde uygulandı (81, 82). Yapılan bir başka deneysel çalışmada hafıza geliştirici etkinlik için iki hafta boyunca 500mg/kg dozunda TG, farelere uygulanmıştır (5). Oral TG tedavisi daha uzun süre veya daha yüksek dozda uygulansaydı, apopitoziste sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilebileceği düşünülmüştür. Göz hastalıklarında kullanılan ilaçların çoğunun topikal formda uygulanması nedeniyle, çalışmamıza asıl olarak topikal TG grubu eklenmiştir. Topikal bir ilacın retinada etkinlik gösterebilmesi için ya konjonktival damarlar yoluyla emilerek sistemik dolaşıma katılması veya ön

segment dokularından geçerek vitreusa ulaşması gerekir. Topikal yolla kullanılan TG'nin deneyin başında vitreusa ne miktarda geçeceği bilinmemekle birlikte, suda çözünürlüğü %100 olduğu bildirilen hidrofilik yapıdaki TG'nin korneadan emiliminin olabileceği düşünülmüştür (71). Nöroprotektif etkinliği bilinen, klinik kullanımda olan topikal BT ile benzer düzeyde TUNEL pozitifliğinde azalma topikal TG grubunda da sağlanabilmiştir (64, 66).

Ganglion hücre katmanında RGH'ler yer değiştirmiş amakrin hücrelerle birlikte bulunur. Bu iki hücre grubunun ganglion hücre katındaki yoğunluğu birbirine benzer miktardadır. Amakrin hücrelerle RGH'leri birbirinden ayırmak zordur. RGH'lerin Brn3a ekspresyon düzeylerini karakterize etmek için yapılan bir çalışmada, Brn3a'nın amakrin hücrelerden RGH'leri ayırmada etkin olduğu ve florogold boyama ile kıyaslandığında Brn3a'nın RGH kaybını daha hızlı ve şiddetli bir şekilde gösterdiği tespit edilmiştir. Florogold boyama RGH tespiti için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir (6). Glokom modelinde hidrojen sülfid RGH üzerindeki koruyuculuğunu değerlendiren bir çalışmada, glokom modeli oluşturulmuş grupta Brn3a'nın azaldığı gösterilmiştir (51). Caffeic acid phenethyl ester etken maddesinin glokom modeli oluşturulmuş hayvanlardaki nöron koruyuculuğunun araştırıldığı bir çalışmada TUNEL boyama ve Brn3a ekspresyonlarına birlikte bakılarak veriler desteklenmiştir (96). Çalışmamızda TUNEL metoduna ek olarak RGH'leri daha spesifik gösterebileceğimiz Brn3a ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. Brn3a boyama ile yapmış olduğumuz değerlendirme, TUNEL sonuçlarını desteklemiş olup, apoptozis izlenen hücreleri TUNEL metodu ile saymanın yanı sıra sağ kalan ganglion hücreleri de Brn3a ile değerlendirilmiştir.

Caspase-3 apoptozis göstergesi olan önemli bir parametredir. RGH sağkalımını arttırmak için yeni bir tedavi seçeneği olarak caspase-3 inhibitörleri denenmektedir (97). Yapılan bir çalışmada TG'nin, apoptotik genler olan caspase 3 ile caspase 9 ve antiapoptotik genler olan Bcl-2 ve Bcl-XL'i düzenleyerek antiapoptotik etkinlik gösterdiği görülmüştür (84). Çalışmamız, literatürle uyumlu olarak TG'nin caspase 3 düzeyini azaltarak antiapoptotik etkinlik gösterdiğini desteklemektedir.

Malondialdehit, non-enzimatik özellikteki oksidatif lipidperoksitlerin parçalanmasıyla meydana gelen toksik etkili bir son üründür. MDA'nın hücre

membranlarının geçirgenliğini arttırarak hücre içi iyon dengesini bozabileceği ve DNA yapısında bozulmalara sebep olabileceği bilinmektedir (98). MDA'nın lipit peroksidasyonunu başlatması ve yürütmesi, membranlara zarar vermesi, DNA'yı denatüre etmesi; glokomda devam eden hasarın kısmen de MDA ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (99). Yapılan bir çalışmada glokom hastalarının aköz hümör örneklerindeki MDA seviyesine bakılmıştır ve ciddi görme alanı kaybı ile MDA enzim düzeyi arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir (100). Glokom patogeneğinde oksidatif stres ve lipit peroksidasyonunun rolünü araştırmak için yapılan bir başka çalışmada kontrol grubu ile glokom hastaları arasında, plazma MDA düzeyleri glokomlu grupta istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, plazma MDA düzeylerindeki olası değişikliklerin, glokom patogenezi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (101). Deneklerde Parkinson hastalık modeli oluşturularak oral TG tedavisi verilen bir grupta MDA ve nitrit seviyelerinin azaldığı ve apoptozisin engellenebildiği gösterilmiştir (81). Çalışmamızda da doku homojenatında MDA düzeyleri değerlendirilmiştir. Hem topikal hem oral TG, MDA düzeyinde etkin düşüş sağlayabilmiş olup, bu düşüş referans ilaç olan topikal BT ile sağlanan düzeydedir. TG'nin MDA düzeylerinde oluşturduğu bu değişim, TG'nin glokom hastalarının tedavisi için umut verici bir ajan olduğunu düşündürmektedir.

N-metil D-aspartat aracılı apoptoziste NOS indüklenir. Glokom patogeneğinde, RGH apoptozisini uyarmada NOS'un önemli işlevi olduğu bilinmektedir (21). Glokom hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada, NOS düzeylerinin aköz hümörde kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür (102). Biz de çalışmamızda apoptozisi uyarmak için NMDA kullanarak, iNOS indüksiyonunu tetiklediğimizi düşünmekteyiz. Topikal TG'nin iNOS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş sağlayabilmesi, topikal TG'nin göz dokusunda yüksek konsantrasyona ulaşabildiğini düşündürmektedir. Oral TG'nin iNOS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmaması, oral TG'nin göz dokusunda iNOS düzeyini etkileyecek konsantrasyona ulaşamadığını düşündürmektedir. Glokom hastalarında iNOS düzeylerini azaltmak için TG'nin topikal kullanımı yeterli etkinlik sağlamaktadır.

Oksidanların arttığı durumda vücutta antioksidan sistemler devreye girerek oluşacak hasarı azaltmaya çalışır. Patolojik koşullarda, antioksidan sistemler hasar görmüş olabilir. Oksidatif stres; kanser, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz, hipertansiyon, diyabet, akut solunum yetmezliği sendromu, idiyopatik pulmoner fibroz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım gibi birçok patolojik duruma ve hastalığa katkıda bulunur (103). Antioksidan sistemleri aktifleştirmek birçok hastalığın tedavisinde umut verici olduğu gibi glokom hastalarında da çok önemlidir. Glokom hastalarının değerlendirildiği bir çalışmada SOD ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aköz hümeördeki düzeylerinin kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiştir (102). Glokomlu hastalarda oksidatif stresin etkinliğini araştıran bir başka çalışmada serum SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz düzeylerinin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir (104). Bizim çalışmamızda da antioksidan sistem belirteçleri olarak SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerinin değerlendirilmesi planlandı.

Doku SOD düzeyi değerlendirmesinde, sham-kontrol grubunda apoptozis indüksiyonu yapılmamış olmasına rağmen intravitreal bir girişim yapılarak oksidatif stres artırılmış olabilir. Buna bağlı olarak vücut savunma mekanizmalarının aktive olmasıyla SOD düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış izlenmiş olabilir. Bizim ölçümlerimiz doku homojenatında değerlendirilmiş olmakla birlikte, SOD göz dokuları içerisinde en çok retinada üretilmektedir ve retinadaki önemli bir antioksidan belirteçtir (105). Hem oral hem damla olarak uygulanan TG, damla BT ile benzer düzeyde, retinanın önemli antioksidan enzimi olan SOD’u istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır.

NMDA enjeksiyonunun etkinliğini değerlendiren bir çalışmada, enjeksiyon sonrası retinal patolojik kesitler incelenmiştir. Birinci gün RGH’lerinde kayıp izlenmiştir ve bu dönem akut faz olarak değerlendirilmiştir. İkinci günde tüm retinal nöronlarda kayıp izlenmeye başlanmıştır ve bu faz intermediate faz olarak değerlendirilmiştir. Yedinci günde tüm retinal tabakalarda apoptozis izlenmiştir ve bu faz kronik faz olarak değerlendirilmiştir (106). Metabolizma stresle karşılaştığı zaman akut cevap olarak antioksidan parametreleri arttırmaya çalışmaktadır (103). Apoptozis indüksiyonu sonrasında sham grubundaki deneklerde muhtemelen çalışmanın başlangıcında antioksidan parametrelerde artış izlenmiştir. Çalışmamızın

sonunda, doku örneklerini değerlendirdiğimiz 21. günde, vücut savunma mekanizmalarının artık antioksidan miktarını arttıracak kapasiteye sahip olmadığını düşünmekteyiz. Katalaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerinin kontrol ve sham grubunda benzer bulunması, sham grubunun hastalığın kronik fazında antioksidan sistemleri arttıramadığını ancak oksidatif stresin hiç uyarılmadığı kontrol grubuna benzer düzeyde tutabildiğini göstermektedir. Oral TG ve topikal TG gruplarında topikal BT grubuna benzer şekilde katalaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerinin yüksek tespit edilmesi, TG'nin antioksidan olarak glokom hastalarında kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Nöronlar yaşamlarını sürdürebilmek için nörotrofik faktörlere ihtiyaç duyarlar. Glokom hastalarının serum ve gözyaşında kontrol grubuna göre BDNF düzeylerinin düşük olduğu bilinmektedir (32). İndüklenmiş kognitif bozukluk modelinde TG oral tedavisi ile BDNF düzeyinde artış olduğu görülmüştür (78). NMDA ile apoptozis ve SOR oluşumu indüklenmektedir. NMDA enjeksiyonundan sonra metabolizmanın, apoptozisi ve SOR oluşumunu azaltmak için savunma mekanizması olarak BDNF düzeylerini arttırabileceği düşünülmektedir (107). Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna göre sham grubunda BDNF düzeylerinde artış izlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. İntravitreal olarak uygulanan tek doz BT ile BDNF artışı olduğu gösterilmiştir (108). Klinik kullanımda olan damla BT ile aynı düzeyde BDNF artışı oral ve damla TG ile sağlanabilmiştir.

Nükleer faktör κ B tüm hücrelerin sitoplazmasında inaktif şekilde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Aktive olduğu zaman çekirdeğe taşınır. NF- κ B, SOR ve proinflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilmektedir. Aktifleşen NF- κ B inflamatuvar sitokinlerin artışını sağlarken apoptozisi hızlandırmaktadır (90).

Transkripsiyon faktörü NF- κ B, artan GİB, artan yaş, vasküler hastalık ve oksidatif stres ile aktive edilebilir (109). Optik sinir hasarının olduğu durumlarda NF- κ B yolağının aktiflendiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (110, 111). TG'nin, hipokampal NF- κ B, TLR4 ve TNF-alfa düzeyini azalttığı lipopolisakkaritle indüklenmiş öğrenme ve hafıza bozukluğu modelinde gösterilmiştir (83). Bizim çalışmamızda da oral TG ve topikal TG ile tedavi edilen gruplarda sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum

TG'nin apopitozis üzerindeki etkinliğinin, NF-κB düzeyini azaltmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir

Çalışmamızda oral TG, damla TG ve damla BT ile tedavi edilen gruplarda antioksidan enzimler, MDA seviyeleri ve BDNF için benzer etkinlik tespit edilmiştir. Retinal histolojik değerdendirmelerde apopitozisi azaltma açısından damla TG ve damla BT etkili bulunurken, oral TG etkisiz bulunmuştur. Oral TG birçok biyokimyasal parametrede etkin değışikliğe sebep olurken, iNOS düzeylerinde düzelme sağlayamamıştır. iNOS düzeylerini damla BT ile eşit şekilde azaltan damla TG'nin apopitozis üzerine azaltıcı etkinliğinin iNOS ile de ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Klinik kullanımda nöroprotektif etkinliği bilinen damla BT ile benzer nöron koruyucu etkinlik gösteren damla TG glokom tedavisinde etkili olabilecek yeni bir tedavi olarak görölmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Levin LA, Crowe ME, Quigley HA, Cordeiro MF, Donoso LA, Liao YJ, et al. Neuroprotection for glaucoma: Requirements for clinical translation. *Exp Eye Res* 2017; 157: 34–37.
2. Lindsley K, Lindsley K. Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults (Review) Summary of Findings For The Main Comparison. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; (1): 111-117.
3. Caprioli J, Kitano S, Morgan JE. Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37(12): 2376-2381.
4. Dong C, Guo Y, Agey P, Wheeler L, Hare WA. Alpha 2 Adrenergic Modulation of NMDA Receptor Function as a Major Mechanism of RGC Protection in Experimental Glaucoma and Retinal Excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 4515–4522.
5. Zhou J, Chan L, Zhou S. Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. *Curr Med Chem* 2012; 19(21): 3523–3531.
6. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martinez I, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: Qualitative and quantitative time course studies in naïve and optic nerve-injured retinas. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(8): 3860–3868.
7. Loreto C, La Rocca G, Anzalone R, Caltabiano R, Vespasiani G, Castorina S, et al. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 616149.
8. Chidlow G, Wood JPM, Casson RJ. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs* 2007; 67(5): 725-759.
9. Germain F, Pérez-Rico C, Vicente J, de la Villa P. Functional histology of the retina. *Microsc Sci Technol Appl Educ* 2010; 24: 914-925.
10. Faruk RÖ. Göz Anatomisi. Dünya Tıp Kitapları, 2016.

11. Retina T. Türk Oftalmoloji Dergisi Eğitim Yayınları. Türk Oftalmoloji Derg Eğitim Yayınları 2009: 3.
12. Niwa M, Aoki H, Hirata A, Tomita H, Green PG, Hara A. Retinal cell degeneration in animal models. *Int J Mol Sci* 2016; 17(1): 1–16.
13. Jonas JB, Aung T, Bourne RR, Bron AM, Ritch R, Panda-Jonas S. Glaucoma. *The Lancet* 2017; 390(10108): 2183-2193.
14. Gabelt BT, Kaufman PL. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research* 2005; 24(5): 612-637.
15. Dongqi H, Zeqin R. A biomathematical model for pressure-dependent lamina cribrosa behavior. *J Biomech* 1999; 32(6): 579-584.
16. Ahmad SS. Controversies in the vascular theory of glaucomatous optic nerve degeneration. *Taiwan J Ophthalmol* 2016; 6(4): 182-186.
17. Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, Serra LM, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2002; 21(4): 359-393.
18. Guerin MB, McKernan DP, O'Brien CJ, Cotter TG. Retinal ganglion cells: Dying to survive. *Int J Dev Biol* 2006; 50(8): 665-674.
19. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res* 2006; 612(2): 105-114.
20. Gherghel D, Griffiths HR, Hilton EJ, Cunliffe IA, Hosking SL. Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open-angle glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(3): 877-883.
21. Schuettauf F, Naskar R, Vorwerk CK, Zurakowski D, Dreyer EB. Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(13): 4313-4316.
22. Vajda FJE. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci* 2002; 9: 4-8.

23. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: Results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(10):1268-1279.
24. Baltmr A, Duggan J, Nizari S, Salt TE, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role? *Exp Eye Res* 2010; 91(5): 554-566.
25. Levin LA, Peeples P. History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. *Am J Manag Care* 2008; 14: 11-14.
26. Bunting H, Still R, Williams DR, Gravenor M, Austin MW. Evaluation of plasma glutamate levels in normal tension glaucoma. *Ophthalmic Res* 2010; 43(4): 197-200.
27. Ju WK, Lindsey JD, Angert M, Patel A, Weinreb RN. Glutamate receptor activation triggers OPA1 release and induces apoptotic cell death in ischemic rat retina. *Mol Vis* 2008; 14: 2629-2638.
28. Yücel YH, Gupta N, Zhang Q, Mizisin AP, Kalichman MW, Weinreb RN. Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(2): 217-225.
29. Sánchez-López E, Egea MA, Davis BM, Guo L, Espina M, Silva AM, et al. Memantine-Loaded PEGylated biodegradable nanoparticles for the treatment of glaucoma. *Small* 2018; 14(2): 12-18.
30. Bessero AC, Clarke PGH. Neuroprotection for optic nerve disorders. *Curr Opin Neurol* 2010; 23(1): 10-15.
31. Herzog KH, Von Bartheld CS. Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain- derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J Neurosci* 1998;18(8): 2891-2906.
32. Oddone F, Roberti G, Micera A, Busanello A, Bonini S, Quaranta L, et al. Exploring serum levels of Brain Derived Neurotrophic Factor and Nerve Growth Factor across glaucoma stages. *PLoS One* 2017; 12(1): e0168565.
33. Kimura A, Namekata K, Guo X, Harada C, Harada T. Neuroprotection, growth factors and BDNF-TRKB signalling in retinal degeneration. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9): 1584.

34. Berk BA, Vogler S, Pannicke T, Kuhrt H, Garcia TB, Wiedemann P, et al. Brain-derived neurotrophic factor inhibits osmotic swelling of rat retinal glial (Müller) and bipolar cells by activation of basic fibroblast growth factor signaling. *Neuroscience* 2015; 295: 175-186.
35. Bai Y, Xu J, Brahimi F, Zhuo Y, Sarunic MV, Uri Saragovi H. An agonistic TrkB mAb causes sustained TrkB activation, delays RGC death, and protects the retinal structure in optic nerve axotomy and in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(9): 4722-4731.
36. Roberti G, Mantelli F, Macchi I, Massaro-Giordano M, Centofanti M. Nerve growth factor modulation of retinal ganglion cell physiology. *J Cell Physiol* 2014; 229(9): 1130-1133.
37. Aloe L, Rocco M, Balzamino B, Micera A. Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. *Curr Neuroparmacol* 2015; 13(3): 294-303.
38. Colafrancesco V, Parisi V, Sposato V, Rossi S, Russo MA, Coassin M, et al. Ocular application of nerve growth factor protects degenerating retinal ganglion cells in a rat model of glaucoma. *J Glaucoma* 2011; 20(2): 100-108.
39. Cavet ME, Vittitow JL, Impagnatiello F, Ongini E, Bastia E. Nitric Oxide (NO): An emerging target for the treatment of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(8): 5005-5015.
40. Pang IH, Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Shepard AR, Hellberg MR, et al. Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(4): 1313-1321.
41. Giuffrida S, Bucolo C, Drago F. Topical Application of a Nitric Oxide Synthase Inhibitor Reduces Intraocular Pressure in Rabbits with Experimental Glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003; 19(6): 527-534.
42. Lambuk L, Iezhitsa I, Agarwal R, Bakar NS, Agarwal P, Ismail NM. Antiapoptotic effect of taurine against nmda-induced retinal excitotoxicity in rats. *Neurotoxicology* 2019; 70: 62-71.

43. Davis BM, Tian K, Pahlitzsch M, Brenton J, Ravindran N, Butt G, et al. Topical Coenzyme Q10 demonstrates mitochondrial-mediated neuroprotection in a rodent model of ocular hypertension. *Mitochondrion* 2017; 36: 114–123.
44. Lambuk L, Jafri AJA, Arfuzir NNN, Iezhitsa I, Agarwal R, Rozali KN Bin, et al. Neuroprotective effect of magnesium acetyltaurate against NMDA-induced excitotoxicity in rat retina. *Neurotox Res* 2017; 31(1): 31–45.
45. Tezel G, Yang X, Luo C, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH, et al. Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(10): 5071-5082.
46. Kang JM, Lin S. Ginkgo biloba and its potential role in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2018; 29(2): 116-120.
47. Aktaş Z, Özmen C, Göçün P, Değim Z, Özkan Y, Onol M. Rat optik sinir ezme modelinde topikal ve sistemik alfa tokoferol uygulaması yoluyla retina gangliyon hücre korunması. *Türk Oftalmoloji Derg* 2013; 43(3): 161-166.
48. Lesk MR, Wajszilber M, Deschenes MC. The effects of systemic medications on ocular blood flow. *Can J Ophthalmol* 2008; 43(3): 351-355.
49. Inman DM, Lambert WS, Calkins DJ, Horner PJ. α -Lipoic Acid Antioxidant Treatment Limits Glaucoma-Related Retinal Ganglion Cell Death and Dysfunction. *PLoS One* 2013; 8(6): e65389.
50. Yamamoto K, Maruyama K, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Shiga Y, et al. The novel Rho kinase (ROCK) inhibitor K-115: a new candidate drug for neuroprotective treatment in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(11): 7126-7136.
51. Liu H, Anders F, Thanos S, Mann C, Liu A, Grus FH, et al. Hydrogen sulfide protects retinal ganglion cells against glaucomatous injury in vitro and in vivo. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58(12): 5129–5141.
52. Joachim SC, Wax MB, Seidel P, Pfeiffer N, Grus FH. Enhanced characterization of serum autoantibody reactivity following HSP 60 immunization in a rat model of experimental autoimmune glaucoma. *Curr Eye Res* 2010; 35(10): 900-908.

53. Schwartz M. Modulating the immune system: A vaccine for glaucoma? *Can J Ophthalmol* 2007; 42(3): 439-441.
54. Luksch A, Rainer G, Koyuncu D, Ehrlich P, Maca T, Gschwandtner ME, et al. Effect of nimodipine on ocular blood flow and colour contrast sensitivity in patients with normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2005; 89(1): 21-25.
55. Fitzgerald M, Payne SC, Bartlett CA, Evill L, Harvey AR, Dunlop SA. Secondary retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of the calcium channel blocker lomerizine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(11): 5456-5462.
56. Hains BC, Waxman SG. Neuroprotection by sodium channel blockade with phenytoin in an experimental model of glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(11): 4164-4169.
57. Hirooka K, Shiraga F. Potential role for angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of glaucoma. *Clin Ophthalmol* 2007; 1(3): 217-223.
58. Yang H, Hirooka K, Fukuda K, Shiraga F. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor blocker in a rat model of chronic glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50 (12): 5800-5804.
59. Bylund DB, Chacko DM. Characterization of α_2 adrenergic receptor subtypes in human ocular tissue homogenates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(10): 2299-2306.
60. Wheeler L, WoldeMussie E, Lai R. Role of alpha-2 agonists in neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 2003; 48: 47-51.
61. Prokosch V, Panagis L, Volk GF, Dermon C, Thanos S. α_2 -adrenergic receptors and their core involvement in the process of axonal growth in retinal explants. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2010; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(12): 6688-6699.
62. Acheampong AA, Shackleton M T-LD. Comparative ocular pharmacokinetics of brimonidine after a single dose application to the eyes of albino and pigmented rabbits. *Drug Metab Dispos* 1995; 23(7): 708-712.
63. Kent AR, Nussdorf JD, David R, Tyson F, Small D, Fellows D. Brimonidine Tartrate 0.2 %. *Ophthalmology* 2001; 6420: 1999-2002.

64. Wheeler LA, Lai R, Woldemussie E. From the lab to the clinic: activation of an α_2 agonist pathway is neuroprotective in models of retinal and optic nerve injury. *Eur J Ophthalmol* 1999; 9: 17-21.
65. Peng L. Activation of cell survival signaling pathway in the retina by selective α_2 -adrenoceptor agonist-brimonidine. *IOVS* 1999; 40: 763-766.
66. Kalapesi FB, Coroneo MT, Hill MA. Human ganglion cells express the α_2 -adrenergic receptor: Relevance to neuroprotection. *Br J Ophthalmol* 2005; 89(6): 758-763.
67. Ozdemir G, Tolun FI, Gul M, Imrek S. Retinal oxidative stress induced by intraocular hypertension in rats may be ameliorated by brimonidine treatment and n-acetyl cysteine supplementation. *J Glaucoma* 2009; 18(9): 662–665.
68. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(12): 2849-2855.
69. Osborne NN, Cazevieuille C, Carvalho AL, Larsen AK, Desantis L. In vivo and in vitro experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. *Brain Res* 1997 14; 751(1): 113-123.
70. American Academy of Ophthalmology, Medical Management of Glaucoma. Chapter-7. Basic and Clinical Course, 2012-2013. Section-10, Glaucoma. 2014: 159-177.
71. Panda S, Biswas S, Kar A. Trigonelline isolated from fenugreek seed protects against isoproterenol-induced myocardial injury through down-regulation of Hsp27 and α B-crystallin. *Nutrition* 2013; 29(11–12): 1395–1403.
72. Yoshinari O, Igarashi K. Anti-Diabetic Effect of Trigonelline and Nicotinic Acid, on KK-Ay Mice. *Curr Med Chem* 2010; 17(20): 2196-2202.
73. Gilmartin B, Castrigno J, Rovnack G, Bala J, Faas P, Einzenga K. In vitro effect of fenugreek extracts on intestinal sodium-dependent glucose uptake and hepatic glycogen phosphorylase A. *Int J Exp Diabetes Res* 2001; 2(2): 91-99.

74. Yoshinari O, Sato H, Igarashi K. Anti-diabetic effects of pumpkin and its components, trigonelline and nicotinic acid, on goto-kakizaki rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73(5): 1033-1041.
75. Zhou J, Zhou S, Zeng S. Experimental diabetes treated with trigonelline: Effect on β cell and pancreatic oxidative parameters. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27(3): 279-287.
76. Yen WJ, Wang B Sen, Chang LW, Duh P Der. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J Agric Food Chem* 2005; 53(7): 2658-2663.
77. Pravalika K, Sarmah D, Kaur H, Vats K, Saraf J, Wanve M, et al. Trigonelline therapy confers neuroprotection by reduced glutathione mediated myeloperoxidase expression in animal model of ischemic stroke. *Life Sci* 2019; 216: 49–58.
78. Chowdhury AA, Gawali NB, Munshi R, Juvekar AR. Trigonelline insulates against oxidative stress, proinflammatory cytokines and restores BDNF levels in lipopolysaccharide induced cognitive impairment in adult mice. *Metab Brain Dis* 2018; 33(3): 681–691.
79. Paulrayer A, Mariadhas VA, Muniappan D, Ki CC, Adithan A, Nam SK, et al. Protective effects of trigonelline against indomethacin-induced gastric ulcer in rats and potential underlying mechanisms. *Food Funct* 2016; 7(1): 398-408.
80. Tohda C, Kuboyama T, Komatsu K. Trigonelline also had dendritic and axonal regeneration activity, and improved memory retention. These compounds, sourced from natural products, and used with treatments preventing pathogenesis and neuronal death, are expected to play an important role. *NeuroSignals* 2005; 14 (1–2): 34–45.
81. Mirzaie M, Khalili M, Kiasalari Z, Roghani M. Neuroprotective and antiapoptotic potential of trigonelline in a striatal 6-hydroxydopamine rat model of parkinson's disease. *Neurophysiology* 2016; 48 (3): 176–183.
82. Fahanik-Babaei J, Baluchnejadmojarad T, Nikbakht F, Roghani M. Trigonelline protects hippocampus against intracerebral A β (1–40) as a model of Alzheimer's disease in the rat: insights into underlying mechanisms. *Metab Brain Dis* 2019; 34(1): 191–201.

83. Khalili M, Alavi M, Esmaeil-Jamaat E, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Trigonelline mitigates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment in the rat due to its anti-oxidative and anti-inflammatory effect. *Int Immunopharmacol* 2018; 61: 355–362.
84. Ilavenil S, Kim DH, Jeong Y, Arasu MV, Prabhu PN, Srigopalram S, et al. Trigonelline protects the cardiocyte from hydrogen peroxide induced apoptosis in H9c2 cells. *Asian Pac J Trop Med* 2015; 8(4): 263–268.
85. Ghule AE, Jadhav SS, Bodhankar SL. International Immunopharmacology Trigonelline ameliorates diabetic hypertensive nephropathy by suppression of oxidative stress in kidney and reduction in renal cell apoptosis and fibrosis in streptozotocin induced neonatal diabetic (nSTZ) rats. *Int Immunopharmacol* 2012; 14 (4): 740–748.
86. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35(4): 495-516.
87. Kowluru RA, Koppolu P. Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: Effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res* 2002; 36(9): 993-999.
88. Saenz-De-Viteri M, Heras-Mulero H, Fernández-Robredo P, Recalde S, Hernández M, Reiter N, et al. Oxidative stress and histological changes in a model of retinal phototoxicity in rabbits. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 637137
89. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Bot* 2003; 91: 179-194.
90. Yang X, Hondur G, Tezel G. Antioxidant treatment limits neuroinflammation in experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57(4) :2344-2354
91. Erisgin Z, Ozer MA, Tosun M, Ozen S, Takir S. The effects of intravitreal H₂S application on apoptosis in the retina and cornea in experimental glaucoma model. *Int J Exp Pathol* 2019; 100: 330-336.
92. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL RR. Protein Measurements with the Folin Fenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-275.

93. Ohkawa H, Ohishi NYK. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358.
94. Quigley H, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(3): 262-267.
95. Lambuk L, Iezhitsa I, Agarwal R, Bakar NS, Agarwal P, Ismail NM. Antiapoptotic Effect of Taurine Against Nmda-Induced Retinal Excitotoxicity in Rats. *Neurotoxicology* 2019; 70: 62–71.
96. Jia Y, Jiang S, Chen C, Lu G, Xie Y, Sun X, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates nuclear factor-KB-mediated inflammatory responses in Müller cells and protects against retinal ganglion cell death. *Mol Med Rep* 2019; 19(6): 4863-4871.
97. Liu Y, Yan H, Chen S, Sabel BA. Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK enhances retinal ganglion cell survival and vision restoration after rabbit traumatic optic nerve injury. *Restor Neurol Neurosci* 2015; 33(2): 205–220.
98. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-431.
99. Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. *Prog Retinal Eye Res* 2006; 25(5): 490-513.
100. Ghanem AA, Arafa LF, El-Baz A. Oxidative stress markers in patients with primary open-angle glaucoma. *Curr Eye Res* 2010; 35(4) :295-301.
101. Yildirim Ö, Ateş NA, Ercan B, Muşlu N, Ünlü A, Tamer L, et al. Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma. *Eye* 2005; 19(5) :580-583.
102. Bagnis A, Izzotti A, Centofanti M, Saccà SC. Aqueous humor oxidative stress proteomic levels in primary open angle glaucoma. *Exp Eye Res* 2012;103: 55-62.
103. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5(1): 9-19.
104. Majsterek I, Malinowska K, Stanczyk M, Kowalski M, Błaszczyk J, Kurowska AK, et al. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Exp Mol Pathol* 2011; 90(2): 231-237.

- 105.** Behndig A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(3): 471-475.
- 106.** Zhang C, Xu YS, Wang W, Tso MOM. Pathological study of retinal excitotoxicity following subretinal injection of NMDA. *Chinese J Ophthalmol* 2007; 43(10): 922-927.
- 107.** Vecino E, Ugarte M, Nash MS, Osborne NN. NMDA induces BDNF expression in the albino rat retina in vivo. 1999; 10(5): 1103-1106.
- 108.** Gao H, Qiao X, Cantor LB, WuDunn D. Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(6): 797-803.
- 109.** Srivastava SK, Ramana K V. Focus on Molecules: Nuclear factor-kappaB. *Exp Eye Res* 2009; 88(1): 2-3.
- 110.** Lin S, Liang Y, Zhang J, Bian C, Zhou H, Guo Q, et al. Microglial TIR-domain-containing adapter-i interferon- β (TRIF) deficiency promotes retinal ganglion cell survival and axon regeneration via nuclear factor- κ B. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 39.
- 111.** Halder SK, Matsunaga H, Ishii KJ, Ueda H. Prothymosin-alpha preconditioning activates TLR4-TRIF signaling to induce protection of ischemic retina. *J Neurochem* 2015; 135(6): 1161-1177.

6. ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Kayseri’de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Kayseri’de tamamladım. 2009-2015 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde tıp eğitimimi tamamladım. 2016 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Anabilim Dalı’nda ihtisas eğitime başladım, aynı kurumda araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.

