

T1228/



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DENEYSEL UVEİT MODELİNDE EBSELEN'İN ETKİSİ

T1228/1-1

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nilüfer H. DEMİRBAŞ

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Güler AKSU

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MÜHÜR

"Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir"

"Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 20.01.0103.08 Proje No İle Desteklenmiştir"

Antalya, 2000

TEŐEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda ihtisasım süresince eğitimime emeği geçen tez hocam Sayın Prof.Dr.Güler AKSU başta olmak üzere, Anabilim Dalı BaŐkanımız Sayın Prof.Dr.İclal YÜCEL'e, Sayın Prof.Dr.Cemil APAYDIN ve Sayın Doç.Dr.YaŐar DURANOđLU'na

Tezimin her aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı ğretim yelerinden Sayın Prof.Dr.T.Aslan AKSU, Sayın Doç.Dr.Saadet GÜMÜŐLÜ, Araştırma Görevlisi Sayın Süreyya BİLMEN ve eŐim Doç.Dr.Alper DEMİRBAŞ'a

İhtisasım boyunca birlikte çalıŐmaktan mutluluk duyduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarım ile anabilim dalımız personeline teŐekkür ederim.

Dr.Nilüfer H. DEMİRBAŞ

Antalya, 2000

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2 - 32
2.1. UVEİT	2
2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ	5
2.2.1. Superoksid Anyon Radikali	6
2.2.2. Hidroperoksil Radikali	7
2.2.3. Hidrojen Peroksit	7
2.2.4. Hipoklorus Asit	7
2.2.5. Hidroksil Radikalleri	8
2.2.6. Singlet Oksijen	8
2.2.7. Ozon	9
2.2.8. Nitrojen Oksitleri	9
2.3. SERBEST RADİKALLER VE UVEİT	11
2.4. GÖZ HASTALIKLARI PATOGENEZİNDE SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSIDANLAR	16
2.5. LİPİD PEROKSİDASYONU	16
2.5.1. Lipid Peroksidasyonunun Önemi	19
2.5.2. Lipid Peroksidasyonu Ürünü Olarak Malondialdehid	20
2.5.3. Lipid Peroksidasyonunun Son Ürünü Olarak Konjüge Dienler	20
2.6. ANTİOKSIDAN SAVUNMA ENZİMLERİ	21
2.6.1. Süperoksit Dismutaz	21
2.6.2. Katalaz	23
2.6.3. Glutatyon Peroksidaz	24
2.6.4. Glutatyon S Transferaz	25
2.6.5. Redükte Glutatyon	25
2.7. EBSELEN	26
2.8. EBSELEN'İN KİMYASAL DÖNÜŞÜMLERİ	26
2.8.1. Hidroperoksidlerle Reaksiyon	27
2.8.2. Tiyoller ile Reaksiyon	27
2.8.3. Ebselen'in Dönüşümleri	27
2.9. EBSELEN'İN DİĞER REAKSİYONLARI	29
2.10. EBSELEN VE LİPİD PEROKSİDASYONU	29
2.10.1. Serbest Radikaller ile Reaksiyon	29
2.10.2. Lipid Peroksidasyonu Üzerine Olan Etkileri	29
2.10.3. Lipoproteinlerin Oksidatif Modifikasyonları Üzerine Etkileri	30

2.11 ENZİM İNHİBİTÖRÜ OLARAK EBSELEN	31
2.12. EBSELEN FARMAKOLOJİSİ	31
3. MATERYAL VE METOD	33 - 40
3.1 DENEY HAYVANLARI	33
3.2. DENEYSEL İŞLEMLER	33
3.3. KLİNİK GÖZLEM	34
3.4 CERRAHİ İŞLEM	34
3.5. Cu/Zn BAĞIMLI SÜPEROKSİD DİSMUTAZ TAYİNİ	35
3.6. Se-GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM TAYİNİ	35
3.7 KATALAZ TAYİNİ	36
3.8 DOKU MDA TAYİNİ	37
3.9. KONJÜGE DİEN TAYİNİ	38
3.10. PROTEİN ÖLÇÜMÜ – LOWRY METODU	39
4. BULGULAR	41 - 46
5. TARTIŞMA	47 - 57
6. SONUÇLAR	58 - 59
7. ÖZET	60 - 61
8. KAYNAKLAR	62 - 68

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Göz, serbest radikal oluşumuna karşı hassas bir organdır. Uveit, akut ve kronik inflamasyon ile ve bunların sonucunda göz içinde serbest oksijen radikal oluşumu ile seyreden oküler bir patolojidir (1,2,3).

Akut oküler inflamasyonun tedavisi üzerindeki çalışmalar prensipte deneysel uveit modelleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlardan insanda görülen ve klinik uveit'e en çok benzerlik gösterenlerden birisi Bovin Serum Albumin ile sensitize edilmiş tavşanlarda oluşturulan Deneysel Alerjik Uveit'tir (DAU). Deneysel uveit modellerinde oksijen metabolitlerinin lipid peroksidasyonunun varlığı ve oluşturdukları retinal hasar birçok kez rapor edilmiştir (2). Oluşan hasarın önlenmesinde faydalı olabileceği düşünülen enzimler ve maddelerin histopatolojik ve kimyasal etkileri araştırılmıştır (1,2).

Ebselen, son dekadda, antiinflamatuvar özelliği ile ilgi gören seleno-organik bir bileşiktir. Başlıca fosfolipid Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) olmak üzere GSH-Px benzeri ektisi ile organik hidroperoksitlerin arındırılmasında etkili bulunmuştur. Kendisi zayıf bir radikal önleyicisi olmasına rağmen düşük toksisitesi, çoğu inflamatuvar reaksiyon zincirlerinde yer alan çok sayıda enzim inhibisyonu ve metabolik stabilite göstermesi umut vaad etmiştir (4).

Uveit'de retina hasarının önemli nedenlerinden olan lipid peroksidasyonundaki önemli rolü ile Ebselen'in uveit modelinde organik hidroperoksitleri arındırmada etkili olarak serbest radikal oluşumunu ve retinal hasarı azaltabileceği düşünüldü (2). Bu düşünceden yola çıkarak, tavşanlarda deneysel alerjik uveit modelinde Ebselen'in serbest oksijen radikallerine bağlı hasarı, dolayısı ile lipid peroksidasyonu ve antioksidatif enzimler üzerine etkilerini araştırmak için bu çalışma planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 UVEİT

Göz içinin enfeksiyonu uveit olarak tarif edilmiştir. Grek dilinde Uva (üzüm) ve itis (inflamasyon) kelimelerinin bileşiminden oluşmuştur (1). Daha sık olarak çocuk ve genç erişkinlerde görülen bu inflamasyon uvea ve komşu dokuların inflamatuvar durumunu kabaca tarif etse de hasara uğramış dokunun daha ayrıntılı teşhisi sonunda terminoloji daha spesifik olur; örneğin iris inflamasyonu "iritis", silier cisimin etkilenmesi "siklitis", her ikisinin etkilenmesi "iridosiklit" veya "ön uveit" olarak adlandırılır. "Intermediate Uveit" terimi minimal ön segment tutulumu ve orta dereceli arka vitre inflamasyonunun görüldüğü posterior silier cisim (pars plana) inflamasyonunu tarifler. Eğer vitre birincil olarak tutuldu ise "vitrit", retina birincil olarak tutuldu ise "retinit", vitreus tabanının posteriorunun tutulumu 'posterior uveit', retina ve koroid'in birlikte tutulumu "korioretinit" veya "retinokoroidit" olarak adlandırılır. "Panuveit" terimi ise tüm uveal traktusun etkilenmesini tarifler (1,2,3).

Hastaların çoğunda yoğun araştırmaya rağmen Uveit'e neden olan kaynak ortaya çıkarılamamaktadır. İnfeksiyöz ajanlar ve travma nedenler arasında sıkça sayılsa da çoğu vakada alta yatan nedenin otoimmün bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Oküler inflamasyonun nedenleri iki genel başlık altında toplanabilir; 1)İnfeksiyöz, 2)Non-infeksiyöz. Non-infeksiyöz nedenler ise kendi aralarında : a) Ekzojen b) Endojen nedenler olarak sınıflanır (Tablo 1).

İnflamasyona neden olan tüm bu etyolojilerin esas etkisi; vasküler dilatasyona neden olarak, ekstrasellüler alana sıvı sızması ve lökositlerle diğer hücrelerin bu alana geçişlerine olanak sağlamasıdır (2)

İNFEKSİYÖZ

Virüsler, Bakteriler, Riketsiyalar, Mantarlar, Protozoa, Parazitler

NON-İNFEKSİYÖZ

Ekzojen

-Fiziksel hasar (cerrahi travma, cerrahi olmayan travma)

-Kimyasal hasar (asid, alkali, ilaçlar)

-Dış antijenlere karşı allerjik reaksiyonlar

Endojen

-Nekrotik tümörlere reaksiyon

-Dejenere dokulara olan reaksiyon

-İmmünolojik reaksiyonlar

Tip 1 (Ig E'ye karşı hipersensitivite)

Tip 2 (Sitotoksik ve komplemana karşı hipersensitivite)

Tip 3 (İmmünkompleks hastalığı)

Tip 4 (Hücreye bağlı hipersensitivite ve lens'e bağlı üveitler)

Tablo 1 : Oküler İnflamatuvar Hastalıklar Etiyolojisi (1)

BİLİNMEYEN NEDENLER

İnflamasyona neden olan çoğu etken inflamasyonu daha da artıracak bazı kimyasal maddelerin salınımına neden olur. İnflamatuvar yanıt aslında gözü infeksiyöz ajanlardan korumak için ortaya çıkıyorsa da inflamatuvar yanıtın kendisi olayı başlatan nedenden daha zarar verici olabilir (1).

İmmün yanıt birçok hücre çeşidi ve bazılarının salgıladığı çözünebilir faktörler tarafından düzenlenmektedir. Hücreler iki kategoride incelenebilir; lökositler ve doku hücreleri. İlk kategoride lenfositler (T ve B), fagositler ve yardımcı hücreler (bazofiller, mast hücreleri ve trombositler) yer alır. Doku

hücreleri arasında ise, antijen sunan hücreler (APC) yer alır. Bu grupta yer alıp gözde saptanan hücre tipleri Langerhans hücreleri (dendritik hücreler), periferel korneadaki makrofajlar, uvea ve retinada yer alan kemik iliği kökenli hücrelerdir (2).

İNFLAMASYON FAZLARI

İnflamasyon akut ve kronik faz olarak iki fazda incelenir. Akut faz bazı kimyasal mediatörlerin salınımı ile tetiklenir; Histamin, Serotonin, Kininler, Plazmin, Kompleman, Lökotrien ve Prostaglandin.

Akut fazın ilk evresinde; histamin ve histamin benzeri maddelerin etkileri gözlenir. Bu maddeler düz kas gevşemesi ve endotelial hücreler arası sıkı bağlantı noktalarının açılması ile vasküler geçirgenliğin artması nedeniyle damar içindeki sıvının ekstrasvazasyonu ve lökosit migrasyonuna neden olurlar.

Akut fazın ikinci evresi; Kininler, Prostaglandinler ve Lökotrienler'ce yürütülür. İris'te bulunan prostaglandinler vazokonstriktör maddeleri antagonize ederler ve Adenil Siklaz'ı inhibe ederek Epinefrin'in bazı etkilerini bloke ederler. Ayrıca kan-aköz bariyerini bozar, oküler kan akımını artırır ve göz içi basıncını artırır. Kininler bozulmuş vasküler geçirgenliği daha da bozarlar. Aktive komplemanlar etkili lökotoksik ajanlardır. Polimorfonükleer lökositler (PMNL) hasarlı bölgeye giderek fagositoz ve lizozomal sindirim yolu ile istenmeyen maddeleri ortadan kaldırırlar. Eozinofiller, Mast hücreleri ve Bazofiller olaya katılabilirler. Kapiller geçirgenlik nedeni ile doku içinde hücre ve protein içeren eksuda birikimi olabilir. Akut inflamatuvar reaksiyon yapısına göre isimlendirilir: Seröz (birincil protein- aköz atak), fibrinöz (fibrin-plastik aköz), pürülan (PMNL ve nekrotik debris-hipopiyon) ve sanginöz (eritrositer-hifema)

İnflamasyonun kronik evresi non granüloamatöz ve granüloamatöz olarak ikiye ayrılır. Non-granüloamatöz inflamasyonlarda lenfositler ve plazma hücreleri içeren hücresel infiltratlar bulunurken granüloamatöz inflamasyonlarda epiteloid ve dev hücreler ile plazma hücreleri ile plazma hücreleri ve lenfosit karışımı hücresel infiltrasyonlar gözlenir (1,2,3).

2.2 SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Dış yörüngesinde çiftlenmemiş bir elektron bulunduran organik veya inorganik moleküllere serbest radikal denir. Bu konfigürasyonlarından dolayı serbest radikallerin kendilerine özgü fiziksel ve kimyasal özellikleri vardır ve son derece reaktiftirler. Süperoksit anyonu inorganik serbest radikallere bir örnektir (4).

Serbest radikallerin hedef hücrede yaratacakları hasarın boyutu radikalın doğası ve nerede oluştuğu ile bağlantılıdır. Ancak genelde etkileri özel savunma sistemleri ile baskılanmadığı takdirde zincirleme reaksiyonlarla doku nekrozuna neden olurlar. Bu zararlı etkilerini lipid peroksidasyonu başta olmak üzere, kapiller permeabiliteyi artırarak, damar duvarına nötrofil ve trombosit agregasyonunu başlatarak ve 'eicosanoid' metabolizmasını etkileyerek gösterirler (5).

Normal havadakinden daha yüksek konsantrasyonlardaki oksijenin bitkilere, hayvanlara ve aerobik mikroorganizmalara toksik etkisi olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. 1954 yılında Gersham ve Gilbert oksijenin bu toksik etkilerinin SOR'lerine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (4). Fridovich 1983 yılında süperoksit radikallerinin oluşumunun oksijenin in vivo toksik etkilerinde önemli bir rol oynadığını bildiren 'oksijen toksisitesinde süperoksit radikalleri' teorisini ileri sürmüştür (5).

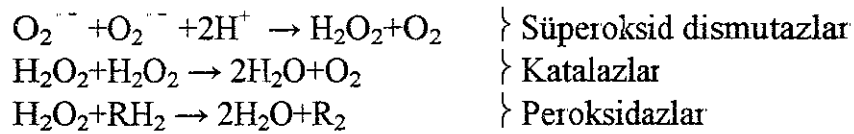
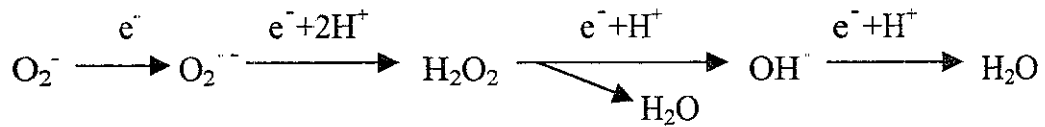
Süperoksit üreten sistemlerin hayvan hücre kültürlerini harap ettiği, DNA ve polisakkaritleri bozduğu, membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlattığı, vasküler geçirgenliği değiştirdiği ve inflamasyonu artırdığı görülmüştür.

Ayrıca SOR'lerinin kemotaktik faktör oluşumunda önemli rol oynadığı ve serumda normalde bulunan antiproteazları inaktive ederek inflamatuvar cevabı artırdığı da gösterilmiştir (5).

2.2.1 SUPEROKSİD ANYON RADİKALI (O₂⁻)

McCord ve Fridovich'in 1969'da Ksantin oksidaz üzerindeki çalışmalarından beri dioksijen'in (O₂) enzimatik reaksiyonlarla bir elektron indirgenerek süperoksit'e dönüşümünün birçok biyokimyasal olayın bir yan etkisi olduğu bilinmektedir. Uyarılmış nötrofiller ve diğer fagositik hücreler solunumsal artış sonucunda, içerdikleri spesifik NADPH oksidaz'ın istemli reaksiyonu sonucu süperoksit oluştururlar. Aktive nötrofillerde süperoksit üretiminin başlıca hücre yüzeyinde gerçekleştiği gösterilmiştir. Mitokondrial Elektron Transport Sistemi ve Sitokrom P450 gibi mikrozomal Elektron Transport Zinciri (ETZ) O₂'nin muhtemel majör biyolojik kaynaklarıdır. Oksijenin Hemoglobin tarafından transportunda bile O₂⁻ ve methemoglobin oluşumuna yol açacak bir miktar elektron transferi olur (6,7,8,9).

Süperoksit anyon radikali: Oksijenin π2p orbitallerinden birine bir elektron girmesi ile oluşur. Kimyasal özellikleri kendisinin çözündüğü ortama bağlı olarak çok değişir. Aköz bir solüsyonda O₂⁻ askorbik asit ve tiol gibi molekülleri okside edebilen zayıf bir oksitleyici ajandır oysa O₂⁻ çok daha kuvvetli oksitleyici bir ajandır ve sitokrom C ve ferrik EDTA gibi çeşitli demir komplekslerini indirgeyebilir (8,9,10).



Şekil 2: Oksijen indirgenmesi yolları ve koruyucu enzimlerin reaksiyonları (29).

Dokuda O₂⁻'nin durağan düzeyini sabit ve çok düşük tutmak için SOD dismutasyon reaksiyonunu katalizler. Dolayısı ile SOD, hücreleri oksidatif hasardan korumadaki birçok enzimatik basamağın ilk komponenti olarak kabul edilir (7).

2.2.2 HİDROPEROKSİL RADİKALİ (HO₂[·])

O₂^{·-}'nin protonlanmış formudur. O₂^{·-} den hem daha güçlü bir oksidan, hem de daha güçlü bir redüktan maddedir, fakat bu radikalın pKa değeri 4,7-4,8 civarında olduğu için, pH:7,4'te çok az bulunur (8,9).

2.2.3 HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂)

Aktive olmuş insan nötrofilleri hidrojen peroksit yaratabilirler ve bu metabolitlerin %80 kadarı süperoksit radikalının dismutasyonu gerisi ise diğer enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşur. Bazı dokularda 50 µm konsantrasyonda normal olarak bulunabilir ancak bunun üstündeki düzeylerde hasar vericidir (7).

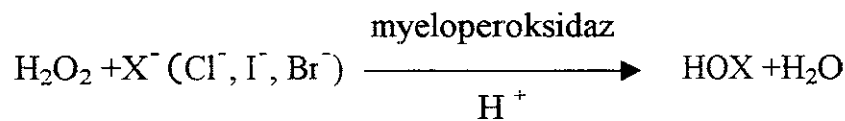
Süperoksit oluşturan herhangi bir sistem dismutasyon reaksiyonunun bir sonucu olarak aynı zamanda H₂O₂'te oluşturur. H₂O₂ geçiş metal iyonları yokluğunda neredeyse stabil olan, zayıf bir oksidan ve zayıf bir redüktan ajandır. Molekül suyla tamamen karışır ve vücut tarafından su molekülü gibi algılanarak hücre membranından hızla difüze edilir. Diğer yandan H₂O₂'nin redoks özellikleri ve geçiş metal iyonları varlığında yüksek reaktif oksijen türleri oluşturma kabiliyeti, kendisine karşı vücut savunma mekanizmalarının geliştirilmesine yol açmıştır.

Aerobik metabolizma ile dokuya sabit giriş yapan H₂O₂, koruyucu antioksidan enzim sisteminin son basamağında CAT, Selenyum bağımlı GSH-Px yolu ile suya indirgenir ve vücuttan uzaklaştırılır (7).

2.2.4 HİPOKLORÖZ ASİT (HOCl)

Aktive olmuş insan fagositleri lizozomal granüllerinden fagositik vakuol'e veya ekstrasellüler aralığa hidrojen peroksit ve myeloperoksidaz salarlar.

Hidrojen peroksit varlığında myeloperoksidaz enzimi aralarında Chloride (Cl⁻), Iodide (I⁻), ve kanda az miktarda bulunan Bromid (Br⁻) olan halidlerin oksidasyonunu katalizler (8)



Bu oksidasyonda ortaya çıkan hipokloröz asit (HOCl), hipoiodus asit (HOI) ve hipobromus asit (HOBr) birçok önemli biyolojik molekül ile reaksiyona girebilecek potent oksidanlardır. Hipokloröz asitler süperoksitten üretilen oksijen metabolitleri ile reaksiyona girip hidroksil radikal oluşturabilirler (9,11).

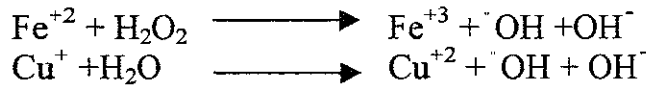
2.2.5 HİDROKSİL RADİKALLERİ ($\cdot\text{OH}$)

Hidroksil radikali, organik veya inorganik bir çok molekül ile reaksiyona girebilen güçlü bir oksidandır. Biraz önce belirtilen kaynaklar dışında, hidroksil radikalının çoklukla süperoksit ve hidrojen peroksit'in reaksiyonundan oluştuğu düşünülmekte idi (Haber-Weiss reaksiyonu)



Bu reaksiyon enerjetik olarak uygun gibi görünse de çok düşük hızda meydana gelir.

Yapılan başka çalışmalarda ise Hidrojen Peroksitlerin ortamdaki demir ve bakır gibi transisyon metalleri tarafından indirgenmesi sonucu hidroksil radikal oluştuğu görülmüştür. Bu reaksiyon ilk kez 1890'da Fenton adlı kimyacı tarafından tanımlanmış ve "Fenton reaksiyonu" olarak anılmıştır;



Hidroksil radikal grubu SOR'leri içinde reperfüzyon zedelenmesinde en çok etkili olan gruptur (6,9).

2.2.6 SİNGLET OKSİJEN (ΔgO_2)

Aslında bir serbest radikal değildir çünkü eşleşmemiş bir elektron içermez. Fakat O_2 oksijenin çok reaktif bir formudur çünkü burada spin kısıtlanması (paralel spinlerde iki eşleşmemiş elektron bulunması) durumu ortadan kalkmış ve bu da kendisinin oksitleme özelliğini artırmıştır (8).

Triplet dioksijenin daha reaktif olan singlet dioksijen molekülüne fotoaktivasyonunun olduğu ve doku içinde derin katlarda (ör. lens ve retina) oksidatif hasar oluşturabildiği tek organ göz'dür. Bu reaksiyon Xenobiotik fotosensitizasyon molekülleri veya muhtemel endojen moleküllerce katalizlenir ve biyolojik bir ortamda singlet oksijenin olduğu tek mekanizma olarak bildirilmiştir. H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ 'nin reaksiyonu ile oluşan oksijen singlet oksijenin bir başka biyolojik kaynağı olabilir. Bu reaksiyonlar arasında $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'nin spontan dismutasyonu, $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'ce oksidasyonu ve myeloperoksidaz enzimi yardımı ile H_2O_2 ve hipoklorit reaksiyonu sayılabilir. Singlet dioksijenin biyolojik oluşumuna direkt kanıt bulunamaması teknik zorluklar nedeniyledir (7,9).

2.2.7 OZON (O_3)

Soluk mavi bir gaz olan ozon solar radyasyona karşı önemli bir stratosferik koruma tabakası oluşturur. Yeryüzünde ise ozon, istenmeyen toksik bir oksidan kirleticidir. Ozon; proteinleri, DNA'yı ve lipidleri okside eder ve akciğerleri hasara uğrattır (8,9).

2.2.8 NİTROJEN OKSİT'LERİ

Nitrik oksit (NO) ve Nitrojendioksit (NO_2) tek sayıda elektron içerdikleri için serbest radikallerdir. Oysa Nitroz oksid (N_2O) böyle değildir. NO_2 zehirli bir gaz ve kuvvetli bir oksitleyici ajan iken, NO zayıf bir redükleyici ajandır. N_2O ise anestezide kullanılan bir gazdır (gülme gazı) (8).

Son zamanlarda başta PMNL olmak üzere inflamatuvar hücrelerin nitrik oksit ve süper oksit'i eşzamanlı olarak ürettikleri gösterilmiştir (11). Tüm bu ürünlerin lipid membranlarının peroksidasyonuna neden olabilecek güçlü ajanlar oldukları gösterilmiştir (12).

SOR'lerinin oluşumunu artıran faktörler üç ana başlık altında incelenebilir:

- 1) İntrasellüler Faktörler
 - a) Hiperbarik Oksijen
 - b) İnkomplet İskemi
 - c) Yaşlanma
 - d) Transplantasyon
- 2) Ekstrasellüler Faktörler
 - a) Yanık
 - b) Vaskülit
 - c) İmmün Yetmezlikler
 - d) Konnektif doku hastalıkları
 - e) İnfeksiyonlar
- 3) Intra-Ekstrasellüler Faktörler
 - a) Radyasyon
 - b) Ultraviyole
 - c) Kimyasal karsinojenler

Oluşan SOR'leri hücre üzerindeki toksik etkilerini hücrenin değişik komponentleri üzerinden gösterirler. Bu komponentler; proteinler, nükleik asitler-DNA ve membran lipidleridir.

Proteinler: Triptofan, Tirozin, Fenil alanin , Histidin, Methionin ve Sistein içeren proteinler SOR'den etkilenirler. Bu aminoasitleri içeren proteinlerde SOR etkileriyle çapraz bağlantılar oluşur ve bunun sonucunda meydana gelen dimerler ve büyük agregatlar sonucu fonksiyon kaybı gelişir (13,14,15).

Nükleik asitler ve DNA: SOR ile etkileşim sonucunda mutasyonlar ve kromozomal değişiklikler oluşur.

Membran Lipidleri: Sellüler ve subsellüler membranlardaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri SOR'leri ile reaksiyona girerek peroksidasyona uğrarlar. Bu reaksiyon zincirleme bir reaksiyondur ve savunma sistemleri ile

durdurulmadığı takdirde membran bütünlüğünün bozulması ve hücre ölümü ile sonuçlanır (13,14,15).

2.3 SERBEST RADİKALLER VE UVEİT

Uveit'te doku hasarı plazma proteinleri veya inflamatuvar fagositik hücreler, PMNL'ler ve makrofajlarla uyarılan çeşitli kimyasal mediatörler tarafından oluşturulur. Bu mediatörler Araşidonik asit metabolitleri, proteolitik enzimler ve muhtemelen oksijen metabolitleri ihtiva ederler (16,17). Araşidonik asit metabolitleri vasküler permeabilitede, kemotaksiste ve inflamasyonun artışında birinci derecede rol oynarlar. Diğer organlardaki inflamatuvar hasarda olduğu gibi, uveit'e bağlı retinal ve uveal hasarda proteolitik enzimlerin rolünün minimal olduğu görülmektedir. Son zamanlarda tüm dikkatler inflamasyonun ilk fazında PMNL'ler ve makrofajlarca salınan SOR'lerine yönelmiştir. Bu moleküller inflamatuvar cevabın artışı ve doku nekrozundan sorumlu tutulmaktadır (18,19,20).

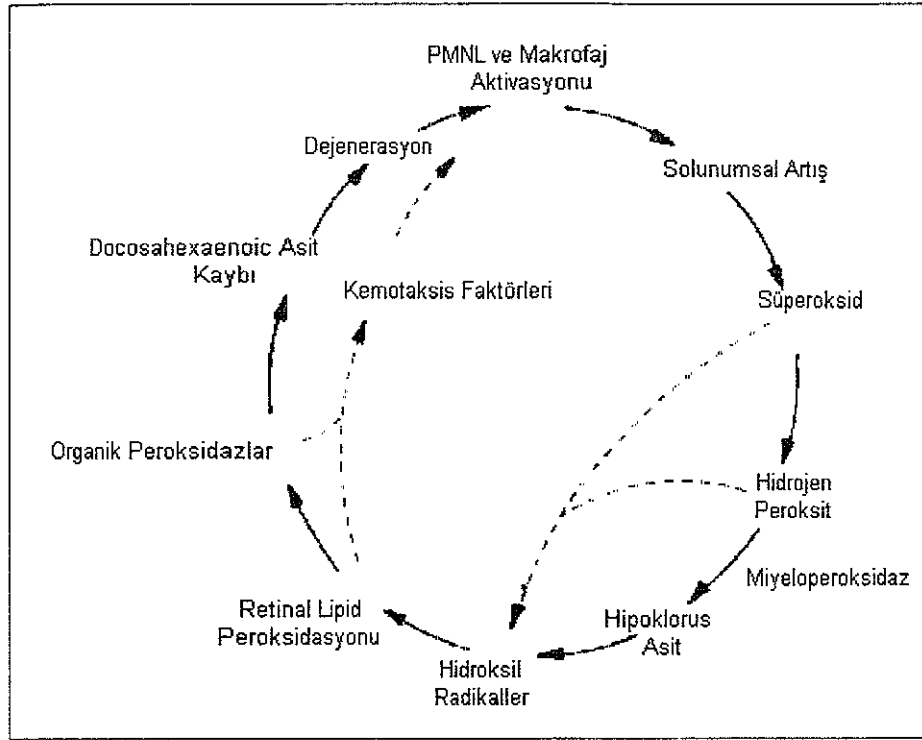
Akut oküler inflamasyonun tedavisi üzerindeki çalışmalar prensipte deneysel uveit modelleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Optik nörit üzerinde de bazı çalışmalar vardır. Uveit çalışmalarındaki iki ana deneysel modelden birincisi Deneysel Allerjik Uveit (DAU)'tir. Bu insan sempatik oftalmisine benzerlik gösterir. İkinci model olan Deneysel Fakoanflaktik Endoftalmi (DFE) modeli ise insanda lens hasarından sonraki duruma veya PECCE ameliyatı sonrasında benzerlik gösteren modeldir.

DAU verilen sensitizan antijen dozunun fazlalığına göre geniş bir spektrum gösterir. DAU tek bir intradermal Retinal S Antijen injeksiyonu sonrasında 9-11 gün sonrası gelişir ve hücreyel immün bir hastalıktır. Bovin Retinal S Antijen ile oluşturulan DAU'in ağır bir formu kompleman bağımlıdır ve birçok akut inflamatuvar hücre olaya katılır. Hastalığın bu ciddi formu SOR oluşumunu baskılamak için denenen bir çok antioksidan madde çalışmasında kullanılmıştır.

DFE'de sensitizasyon, protokole göre değişen derecelerde ağırlık gösterir. DFE bir seri subkütan sensitizan injeksiyon yapılmış hayvanlarda olan lens hasarından sonra ortaya çıkan immünkompleks hastalığıdır. Daha önce Freund's adjuvant içindeki lens proteinleri ile sensitize edilmiş hayvanlarda lens hasarı oluştuktan sonra 24 saat içinde ciddi Arthus reaksiyonu gelişir. Bu uveit modellerinde inflamasyonun ciddiyeti genelde koroidal kalınlığın morfometrik analizi ile ölçülür. Morfometri değerleri çoklukla nötrofil sayısı ve myeloperoksidaz düzeyi ile de bağlantılı bulunmuştur (16).

Bu güne kadar deneysel hayvan modellerinde oluşturulan uveit ile ilgili çalışmalarda tedavi olarak intraperitoneal injeksiyon ile uygulanan antioksidan maddeler veya hidrokisil SOR önleyicileri intraoküler inflamasyonda da belirgin azalmaya neden olmuşlardır. Bu tedavilerde faydalı etkilerin fagositlerce üretilen oksijen metabolitlerinin eliminasyonuna bağlı olduğu düşünölmektedir. Ancak antioksidanlar ve SOR önleyicileri, fagositler ve immün hücrelerin kemotaksis, antikör oluşumu ve T hücre proliferasyonu gibi diğer fonksiyonlarını da değiştirebilirler. Bu nedenle bu tedavi deneyleri oksijen metabolitleri ve SOR'lerinin in vivo jenerasyonu ve bunlara bağlı uveit'te oluşan doku hasarı hakkında sınırlı bilgi vermektedir (21,22)

In vitro yürütölen çalışmalarda fagositoz veya membran aktive edici ajanlara maruz kalma sonucunda PMNL'ler ve makrofajların 'solunumsal artış'a uğradığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda oksijen tüketiminin arttığı, Glukoz'un heksoz monofosfat shunt'ı ile kullanımının arttığı ve başlıca ürünleri süperoksid anyonu ve inorganik serbest radikal olmak üzere reaktif oksijen metabolitlerinin salındığı görölmüştür (23). Süperoksid radikalının kendisinin aköz solösyonlarda zayıf bir reaktif olduğu ve doku hasarının daha çok; hidrojen peroksit (H₂O₂), hipokloröz asit (HOCl) ve hidrojen radikalleri gibi daha reaktif olan ikincil ürünlerinden kaynaklandığı iddia edilmiştir



Şekil 1 Oksijen metabolitlerinin oluşumu ve retina üzerindeki etkileri.

Bu oksijen metabolitleri ve SOR'lerinin in vitro hücre membranlarına lipid peroksidasyonu dahil direkt sitotoksik etkileri gözlenmiştir (24,25,26,27, 28,29).

Göz çok miktarda antioksidan madde ve diğer antioksidan ajanlar ihtiva etmesi yönü ile özel bir organdır. Bu antioksidan ajanlar arasında SOD, CAT, GPx; Glutasyon Transferaz ve diğerleri sayılabilir (26,27,28). Tavşan gözünün değişik dokularındaki antioksidan madde miktarları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Doku	Katalaz [Ünite (mg/protein ⁻¹)]	GSH [Ünite (mg/protein ⁻¹)]	SOD [Ünite (mg/protein ⁻¹)]
İris	84,4	1,0	12,9
Silier cisim	35,0	1,0	12,2
Retina	1,5	0,3	5,0
Kornea epiteli	1,1	0,4	6,2
Kornea endoteli	1,8	0,3	5,1
Lens epiteli	1,0	0,3	1,0
Lens (dekap.)	0,004	0,02	0,15
Tüm lens	-	-	0,2

Tablo 2: Tavşan gözünün değişik dokularındaki antioksidan enzim aktiviteleri (34)

Bu enzimlerin çoğu kornea epiteli ve endotelinde, lens epitelinde retina ve retina pigment epitelinde yer alır. Gözde ayrıca askorbat, vitE, seruloplasmin ve transferrin gibi antioksidanlar da bulunur. Bu ajanların ve maddelerin, oksijen metabolitlerinin hasar verici etkilerini önledikleri varsayılmaktadır (26,27,28). Ancak uveit oluştuğunda oksijen metabolitleri büyük miktarlarda üretilirse, bunların etkilerini baskılayıp baskılayamadıkları bilinmemektedir. Dokuların biyolojik ve yapısal bütünlüklerini korumada hücre ve dokuların oksidanları üretim ve katabolizmaları arasındaki denge çok kritik olduğu için SOR'lerinin retinal veya diğer antioksidan dokuların hasarındaki rolü klinik olarak benzer uveit modellerinde *in vivo* olarak çalışılmalıdır (29).

Uveit için önerilmiş bir çok deneysel hayvan modeli vardır. Bunlar arasında ilk grupta Retinal "S" Antijen, Rhodopsin, Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein (IRPB), lens proteini gibi organ spesifik oküler antijenler ile oluşturulmuş üveitler yer alır. İkinci model grubunda konakçıya yabancı proteinler uygulanmıştır. Ör: intravitreal heterolog albumin veya γ globulinler. Üçüncü grupta IL-1, IL-2 gibi sitokinlerin, Tümör Necrosis Factor veya kompleman ürünlerinin intravitreal injeksiyonu, dördüncü grupta endotoksin gibi

bakterial ürünlerin intravitreal injeksiyonu ve beşinci grupta ise SOR oluşturmak için Ksantin ve Ksantin oksidaz injeksiyonu ile oluşturulan modeller yer alır.

Tüm bu deneysel modeller içinde en çok çalışılanlar ve morfolojik, klinik, immünolojik olarak en iyi tanımlananlar Retinal "S" Antijen, Rhodopsin, IRBP ve lens proteini ile oluşturulmuş uveit modelleridir. Bu modeller klinik ve patolojik özellikleri açısından insanlarda gözlenen bir çok uveit formuna büyük oranlarda benzerlik gösterirler (29).

Doku hasarının bir yönü lipid peroksidasyonu ile tariflenir ve Oksijen veya metabolik ürünleri tarafından başlatılabilir. In vivo olarak O₂, organik peroksitlerin oluşuna uzanan zincir reaksiyonunda yer aldığı için SOR'lerinin sabit bir kaynağıdır. Peroksitlerin birikimi hücresel canlılık üzerinde olumsuz etkiler yaratarak dejenerasyona ve sonuçta nekroza neden olur. Fotoreseptör membranlarda %50'ye varan oranlarda bulunan majör doymamış yağ asitlerinden olan docosohexaeonoic asit (22:6) in vivo peroksidasyona son derece duyarlıdır. Biosentetik yollarda 22:6 zincir elongasyon ve desatürasyon aşamalarının son ürünü olarak tarif edildiği için 22:6'nın retinada yok oluşu peroksidasyona bağlı kayıp olarak değerlendirilmektedir. Bu yağ asidinin eksikliğinin görme fonksiyonlarını etkilediği daha önce gösterilmiştir. İnsanlarda görülen uveit'te görme kaybının retinal doku hasarından kaynaklandığı bilindiğinden bu retinal hasarın retinal hücre membranlarının SOR'lerine bağlı peroksidasyonu ile oluştuğu hipotezi oluşturulmuştur (29)

Bu hipotezleri test etmek için oksijen metabolitlerinin göz içi inflamasyon bölgelerinde (retina ve koroid) varlıkları çeşitli yöntemlerle saptanmaya çalışılmış ve uveit'te oluşan retinal hasarı azaltmak amacıyla SOR önleyici etkiye sahip bir çok terapötik ajan modeli çalışılmıştır (29).

2.4 GÖZ HASTALIKLARI PATOGENEZİNDE SERBEST RADİKALLER VE ANTIOKSİDANLAR

Göz serbest radikallere karşı hassastır ve onların zarar verici etkilerine karşı korunmaktadır. Lens yaş ilerledikçe daha fazla ultraviole ışın absorbe etmeye başlar. Retinadaki indirgeyici ajanların fotosensitizasyonu ve bu maddelerin etkileşimi sonucunda serbest radikallerin fotojenerasyonu gözü etkiler. Omurgalıların retinaları test edilen tüm diğer dokulardan 5-10 daha fazla oksijen tüketir. Fotoreseptörler yüksek konsantrasyonlarda doymamış yağ asidi içerirler(Ör. omurgalıların beyin dokusunda docosohexaenoic asit konsantrasyonu %20 iken, retinal basil fosfolipidleri arasındaki konsantrasyonu %50'dir) (11).

Gözde ayrıca yüksek konsantrasyonlarda antioksidan enzimler, serbest radikal önleyiciler ve süperoksid oluşumunu inhibe eden maddeler vardır. İmmünhistokimyasal çalışmalara göre Süperoksid Dismutaz (SOD), Catalase (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx)'in benzer dağılımları vardır. Bu enzim aktiviteleri kornea epiteli, kornea endoteli, lens ve silier epitel, fotoreseptör iç tabakaları ve retinal pigment epitelinde yoğunlaşmıştır (30,31,32).

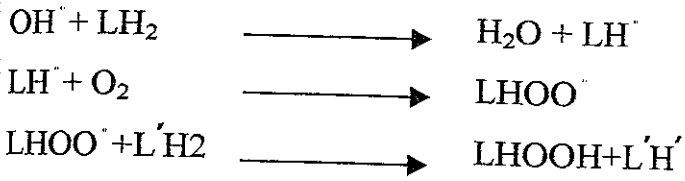
Oküler hastalıkta serbest radikal oluşumunun en çok etkilediği durumlar katarakt, diyabet, fotik hasar, retinal dejenerasyon, senil maküler dejenerasyonlar ve üveitlerdir. Serbest radikal hasarı ayrıca retrolental fibroplazi, vitamin eksiklikleri, reperfüzyon hasarı ve nadir göz hastalıklarında bildirilmiştir (33,34,35,36,37).

2.5 LİPİD PEROKSİDASYONU

Biyolojik ortamlarda bulunan SOR'leri son derece reaktif ve dengesizdirler. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle de son derece kısa bir yarılanma ömrüne sahiptirler. Süperoksit veya hidrojen peroksit'ten köken alan hidroksil radikallerinin, hücre membran lipidleri ve sellüler DNA dahil olmak üzere birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girdikleri bilinmektedir (38).

Membranların en hassas bileşenleri 1,4 pentadien yapısında olan lipidlerdir: $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ve bu yapıda radikallerden hidrojen atomu abstraksiyonuna en hassas bölüm metilen (allylic) karbon atomlarıdır. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif bozulma reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu self-katalitik siklus ile meydana gelir. Hem başlama hem çoğalma basamaklarının zincir reaksiyonu halinde geliştiği düşünülmektedir.

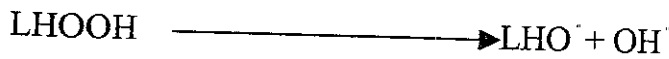
Başlama Basamağı:



Enerji transferi gerektiren bu basamakta serbest radikal oluşur. Koşulların uygun olması durumunda oluşan serbest radikal, bir seri reaksiyonu tetikleyerek çoğalma evresini başlatır.

Yukarıda da görüldüğü gibi başlama aşaması sonunda oluşan hidroksiperoksit ürünü ve lipid radikali ($\text{L}'\text{H}^\cdot$) zincir reaksiyonunu devam ettirerek zinciri kırarak reaksiyon meydana gelene kadar devam ettirirler.

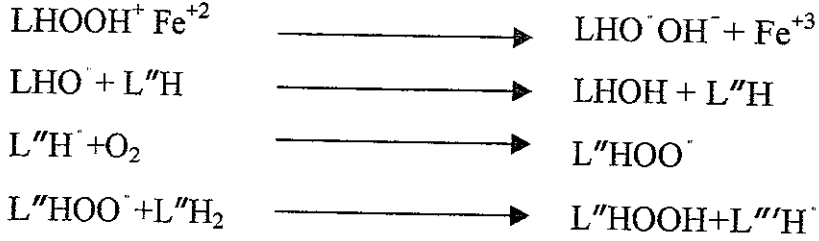
Lipid hidroksiperoksitlerinin hem in vivo hem de in vitro olarak zincir reaksiyonuna neden oldukları gösterilmiştir. Bir alkoksiradikal ve ikinci bir OH^\cdot radikalın oluşumuna neden olan bu fragmantasyon sonucunda her bir ürün ayrı ayrı yeni doymamış yağ asidi moleküllerinde zincir reaksiyonlarını devam ettirirler.



Lipid peroksitlerinin başlattığı oksidasyonların kuvvetle metal iyonlarınca kataliz edildiği gösterilmiştir. Bir elektron transfer eden ajanların varlığında lipid hidroksiperoksitler hem alkoksi (LHO^\cdot) hem de peroksi (LHOO^\cdot) radikal

kaynağı olabilirler. Fragmentasyonun yanı sıra bu reaksiyon lipid peroksidasyonunda propagasyon (çoğalma) ve otokataliz aşamasını başlatabilir.

Propagasyon (Çoğalma) ve Otokataliz:



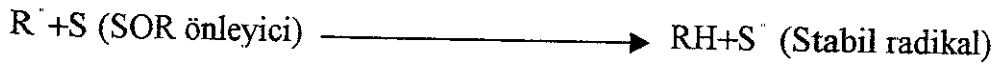
Bu aşamada ilk basamak Fenton benzeri bir reaksiyondur. Dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta bu aşamaların otokatalitik olmasıdır çünkü oluşan non-radikal ürünler bir başka zincir reaksiyonu başlatabilecek alkoksil radikalın prekürsörüdürler (9,39).

Yukarıdakine benzer aşamalarla çok ufak oranlardaki oksiradikalle başlamış başlama basamağı çok süratle büyüyerek yüksek miktarda lipid peroksidasyonuna yol açabilir.

Sonlanma Basamağı:

Bu basamakta iki eşleşmemiş elektron eşleşmiş elektronlar oluşturmak üzere bir araya gelir.

Serbest radikal önleyiciler, serbest radikal reaksiyonlarını sonlandırmanın diğer bir yolunu oluşturmaktadırlar. Bir önleyici serbest radikal ile reaksiyona girdiğinde, serbest radikale bir Hidrojen atomu vererek kendisi serbest radikal haline gelir (9,39).



2.5.1 LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ÖNEMİ :

Biyolojik membranlardaki yoğun lipid peroksidasyonu akışkanlığın kaybına, membran potansiyelinin düşmesine, Hidrojen ve diğer iyonların geçirgenliğinin artmasına ve hücre ile organel içeriklerinin dışarı salınmasına yol açan nihai bir yıkıma neden olur (40).

Lipid peroksidasyonunun bir çok hastalık durumunda arttığını ve dokuların birçok toksin tarafından zehirlendiğini gösteren birçok kanıt mevcuttur. Bu toksisite için sorumlu tutulan artmış lipid peroksidasyonuna, hastalık ya da toksinin neden olduğu düşünülmektedir. Oysa çok yıllar önce hasarlı dokuların sağlam dokulardan daha hızlı peroksidasyona uğradığı gösterilmiştir. Hasara uğramış dokuların hızlı lipid peroksidasyonuna uğramalarının nedenleri, bazı antioksidanların inaktivasyonu, antioksidanların hücrelerden ayrılması ve metal iyonlarının (öz. demir ve bakır) depo bölgelerinden ve hasarlı lizozomlardan salınan enzimlerce hidroliz olan metalloproteinlerden salınmasıdır. Bu durumda olayların sırası şu şekildedir: Hastalık/Toksin → artmış lipid peroksidasyonu → hücre ölümü veya hasarı. Peroksidasyon hücre hasarına eşlik eder ve peroksidasyonun antioksidanlarca önlenmesi hücre hasarını önleyebilir. Bu durumda lipid peroksidasyonunun ölçülmesi doku hasarının iyi bir belirleyicisi olabilir (40).

Retinanın fotoreseptör membranının toplam yağ asitlerinin %50'sini docosohexaenoic asit (22:6, omega3) oluşturur. Yapısı gereği docosohexaenoic asit lipid peroksidasyonuna oldukça duyarlıdır. Düzenli birçok membran çiftkatları ile fotoreseptörlerin de çok özel yapıları vardır. Ör: ratların dış rod segmenti; 1,5-2 μ m çapında ve 20-40 μ m boyunda yaklaşık 600 ile 1000 çiftkatlı disk ihtiva eder. Böyle bir yapı içinde doymamış yağ asidi moleküllerinin (DYA) çok yakın komşuluk içinde olmaları propagasyon reaksiyonlarına kolaylık sağlar (Hidroperoksidik komşu bir doymamış yağ asidi molekülünden allilik bir H⁺ atomu alır ve zincir devam eder). Deneysel uveitlerde yapılan lipid peroksidasyon tayinlerinde retinada belirgin peroksidatif hasar olduğu ve inflame retinadaki majör peroksidatif ürünün hidroperoksidocohexaenoic asit

olduğu görülmüştür. Oluştuktan sonra 22:6 hidroperoksitlerin nötrofillere kemotaktik aktivite gösterdiği ve inflamasyonu artırdığı saptanmıştır (41)

Retinada membrandaki DYA'lerinin peroksidasyonu membran salgılama fonksiyonlarının azalmasına ve transmembranöz iyonik gradientlerin bozulmasına yol açar. Bu tip değişiklikler sellüler ödem, dejenerasyon ve nekroza yol açarak retina hasarına neden olurlar (29).

2.5.2 LİPİD PEROKSİDASYONU ÜRÜNÜ OLARAK MALONDİALDEHİD (MDA)

MDA memeli dokularında hem doymamış lipid peroksidasyonunun bir son ürünü olarak hem de Prostaglandin ve Tromboksan biyosentezinin bir yan ürünü olarak büyük miktarlarda üretilir. Aynı zamanda karbohidratların gamma radyasyonu sırasında da oluşmaktadır. Tiobarbitürik asit testi ile MDA ölçümü besinlerde oksidatif pütrifikasyonun belirlenmesinde ve DYA'lerinin peroksidasyonunun tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. MDA'nın toksik, karsinojenik ve mutajenik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. MDA'nın yaşlanmada da rol aldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. MDA'nın bu dejeneratif etkileri çeşitli biyolojik makromoleküllerle çapraz bağlar oluşturabilmesine ve bunları kovalent olarak bağlama yeteneğine bağlı olabilir. Örneğin, MDA nükleik asitlere karşı reaktiftir ve bunların aktivitelerinin kaybolmasına neden olur. Lipoproteinlerin MDA ile modifikasyonlarının aterosklerozda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. MDA'nın aminoasitlerin alfa amino grupları, Adenin ve Sitozin bazları ile reaksiyona girdiği gösterilmiştir (9,42).

2.5.3 LİPİD PEROKSİDASYONUNUN SON ÜRÜNÜ OLARAK KONJUGE DİENLER:

Lipid peroksidasyonu sırasında hidroksil radikali hücre membranındaki lipidden bir hidrojen atomu ayırıştırır. Oluşan karbon merkezli radikal moleküler bir düzenleme ile konjüge dien'leri oluşturur. Oluşan konjüge dien ise, oksijen

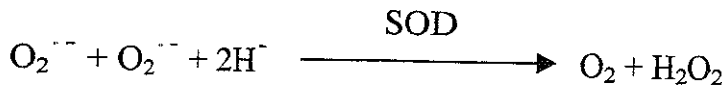
ile birleşerek, peroksil radikalini oluşturur. Oluşan bu radikal diğer bir yağ asidinden hidrojen atomu çıkartarak zincir reaksiyonunu başlatır (8).

2.6 ANTIOKSİDAN SAVUNMA ENZİMLERİ

2.6.1 SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

SOD son derece reaktif olan süperoksit anyonunun ($O_2^{\cdot -}$) Hidrojen peroksit'e dönüştürülmesinde rol oynayan koruyucu enzimdir. SOD her majör aerobik dokuda bulunur.

SOD ilk kez 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır ve aşağıdaki reaksiyon yoluyla $O_2^{\cdot -}$ 'nin dismutasyonunu sağlayarak H_2O_2 ve moleküler O_2 oluşturmaktadır.



SOD %16,53 oranında azot,%1,05 oranında kükürt ve az miktarda karbohidrat içermektedir. Protein kısmında Methionin yoktur. Yapısında az miktarda heksoz, heksozamin ve sialik asit, fazla miktarda ise Aspartik asit, Glutamik asit ve Glisin yer almaktadır (43)

SOD; intrasellüler denge ve SOR'lerinin homeostazında kritik rol oynar, ayrıca nötral veya alkalın pH'da durağan süperoksit konsantrasyonunu düşürerek spontan dismutasyonu daha da azaltır.

Kataliz yoluyla süperoksit iyonları önce Hidrojen peroksit'e dönüştürülür sonra Katalaz enzimince detoksifiye edilirler. Biyokimyasal çalışmalar sonunda SOD enzimi değişik oküler dokularda farklı oranlarda bulunmuştur. SOD aktivitesi en az üç değişik molekül tarafından yürütüldüğü için değişik biyokimyasal çalışmaların sonuçlarını kıyaslamak güçtür; Sitoplazmik Zn/SOD, mitokondrial Mn/SOD ve yüksek moleküler ağırlıkta ekstra sellüler SOD (9,43).

Cu ve Zn içeren SOD:

Primer olarak ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunur. Bunun yanında mitokondride de yer almaktadır. 32000 D (Dalton) molekül ağırlığındadır. Disülfid köprüsü ile bağlanmış, birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşmuştur. Her bir alt ünite birer Cu^{+2} ve Zn^{+2} içermektedir. Bu elementler enzim aktivitesi için mutlaka gereklidir. Fakat Zn^{+2} yerine, Co^{+2} , Hg^{+2} veya Cd^{+2} da geçebilir ve bu durumda enzimde aktivite kaybı olmaz. $\text{O}_2^{\cdot -}$ dismutasyonu Cu^{+2} ile sağlanır. Cu/Zn SOD insan nötrofillerinde (sitoplazmik SOD adıyla) total SOD'un % 85'ini oluşturur ve düşük molekül ağırlıklıdır.

Cu/Zn SOD'lar oldukça kararlı enzimlerdir. Siyanid tarafından tersinir olarak inhibe edilirler. Siyanid'in karbon atomu, enzimin Cu^{+2} 'ını redükleyebilir. Ancak 10 μM 'ün üzerindeki H_2O_2 konsantrasyonlarında enzim irreversibl olarak inhibe olmaktadır. İn vivo koşullarda, süperoksit radikalının kendisi H_2O_2 ile yarışa girerek bu inhibisyonu önlemektedir (9).

Oküler dokularda yapılan immünohistokiyasal çalışmalar Cu/Zn SOD'ın başlıca kornea epitel ve endotelinde, iris posterior epitelinin apikal bölgelerinde non-pigmente silier epitelin iç tabakalarında, lens epitelinde, retinanın fotoreseptör tabakasının iç tabakalarında ve retina pigment epitelinde yer aldığını göstermiştir. Bu bölgeler fizyolojik veya göziçi inflamasyonu gibi patolojik durumlarda Süperoksit'e daha sık maruz kalan oküler dokulardır (26).

Mn içeren SOD:

Prostetik grup olarak Mn^{+2} içerir. Daha çok bakterilerde ve ökaryotik hücrelerin mitokondri matriksinde bulunur. Bakteriel enzim eşit büyüklükte iki alt birimden oluşur. Her alt ünite bir Mn^{+2} atomu içerir. Molekül ağırlığı 40000 Dalton'dur. Mitokondrial enzim ise MA 80000 D olan bir tetramerdir.

Enzim kloroform, etanol ve %2'lik Sodyum dodesilsülfat tarafından inhibe olur. Siyanür'ün bu tip bir etkisi yoktur (9).

2.6.2 KATALAZ (CAT)

Katalaz (CAT) dört alt ünite içeren bir hemoproteindir. Peroksidaz aktivitesi dışında bu enzim bir molekül H_2O_2 'i elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. *In vivo* koşullarda CAT'ın peroksidaz aktivitesi daha baskındır (44).

Enzim yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'i, su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyerek ortamdan uzaklaştırır. H_2O_2 , Ürat oksidaz, Glukoz oksidaz ve D-Aminoasid oksidaz gibi bir çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda oksijene iki elektron transfer edilmesi ile oluşur (44).

CAT eritrositte, kemik iliğinde, müköz membranlarda, böbrek ve karaciğerde yaygın olarak bulunur. Mikro yapılar ve peroksizomlar, karaciğer dahil pek çok dokuda bulunur. Bunlar, oksidazlar ve CAT yönünden zengindir. Bu yapılar, H_2O_2 üreten enzimler ile onu parçalayan enzimleri gruplamada büyük avantaj oluşturmaktadır. En yüksek konsantrasyonlara karaciğer ve eritrositte rastlanmaktadır. Karaciğerin CAT aktivitesinin yüksek olması, oluşan peroksitlerin etkisiz hale getirilmelerine katkıda bulunur (45).

Eritrositlerin metabolik hızlarının daha düşük olmasına rağmen buradaki yüksek CAT aktivitesi, Hemoglobin oksidasyonunun önlenmesi için gerekmektedir. Eritrositler, H_2O_2 'i su ve oksijene çeviren GSH-Px aktivitesine sahiptirler. Bu iki enzim birbirinin eksikliğini kompanse ettiği için eritrositler oksidatif hasara karşı korunmaktadır (46).

Oküler dokularda ise kornea, uvea ve retinada CAT varlığı gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalar sonunda başlıca kornea epitel, silier epitel, retina'nın iç segmentleri ve retina pigment epitelinde yer aldığı gösterilmiştir. Enzimin dağılımının SOD ile benzerlik göstermesi oksidanların detoksifiye edilmesinde bu iki enzimin uyumlu bir işbirliğinde bulunduğunu göstermektedir (26).

Enzim mol başına 4 gm Fe içeren tetramerik bir yapıya sahiptir. Protohem grubu aktif bölgelerin temel komponentidir. Fe^{+3} içeren her alt birimde bir Protopofirin IX bulunmaktadır (46).

Asetat, askorbat, azid, Siyanid, Siyonojenbromid, 2,4diklorofenol, Etanol, Florid, Format, hidroksilamin, Metanol, Monokloramin ve Nitrit CAI inhibitörleridir (47).

2.6.3 GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px)

Glutasyon Peroksidaz 1957 yılında tanımlanmış bir enzimdir. Dokulardaki ve vücut sıvılarındaki H_2O_2 'nin ve lipid hidroksiperoksitlerinin parçalanmasını katalizler. Böylelikle vücut dokularını oksidatif hasara karşı koruyucu bir rol oynar.

Selenyum (Se) bağımlı GSH-Px katalitik aktivitesi için Se'a gereksinim duyar. 23 kD'luk tetramerik bir proteindir. Mol başına 4 atom Se içermekte ve aktif bölgesinde Selenosistein bulunmaktadır. Enzimin Selenolat formu aktiftir. Peroksitleri alkole redüklerken kendisi selenik asit'e oksitlenir. Redükte Glutasyon'un reaksiyona girmesiyle enzim Selenosülfid şekline dönüşür. İkinci Glutasyon'un selenosülfid'e eklenmesiyle Glutasyon okside formuna geçer ve enzim aktif durumuna geri döner.

Lökosit ve makrofaj gibi fagositik hücrelerde GSH-Px yüksek oranda aktiviteye sahiptir. Bu enzim bu hücreleri fagositoz sırasında kendi ürettikleri hidroperoksitlere karşı korur (9,48).

Birçok dokuda GSH-Px aktivitesinin diyet ile alınan Se'a bağlı olduğu gösterilmiştir. Bazı dokuların hem non-Se hem Se-GSH-Px aktivitesine sahip olduğu ancak bu iki enzimin hidroksiperoksit substratlarına farklı spesifitelerinin olduğu gösterilmiştir. Se-GSH-Px'in (Selenyum içerir) organik peroksitleri ve H_2O_2 'i kullanabildiği oysa non-Se-GSH-Px'in (Selenyum içermez) organik peroksitleri kullanabildiği ancak H_2O_2 'i kullanamadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar tavşan ve bovin retina, retina pigment epitel, lens, kornea epiteli ve konjunktiva'da Se-Glutasyon aktivitesinin olduğunu göstermiştir. Selenyum ve Vit E'den fakir diyet ve bu elementlerle desteklenmiş diyet alan ratlarda yapılan çalışmalar sonucu ratlarda retina pigment epiteli ve lenste non Se-GSH-Px enziminin total GSH-Px aktivitesine fazla katkısı olmadığı gösterilmiştir (49).

2.6.4 GLUTATYON S TRANSFERAZ(GST)

GST insan hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan çok gerekli bir enzimdir. Hücresel detoksifikasyon sisteminin majör bir komponentidir. Elektrofilik kimyasal ürünlere karşı koruyucu bir ajan olarak davranır. GST birçok formda bulunur. En çok hücrelerin sitozol kısmından elde edilmiştir. Bu proteinler sitoplazmadan başka subsellüler kompartmanlarda da bulunmasına rağmen genel olarak sitozolik veya çözümlü GST olarak tanımlanmaktadır (9).

2.6.5 REDÜKTE GLUTATYON(GSH)

GSH, -SH grubu içeren non-protein bir tiol'dür. Protein tiyollerinin indirgenmiş şeklinin sağlanmasını destekleyerek doğrudan bir antioksidan etki gösterir. Bu önemli görevinden başka, membranlar boyunca aminoasit transportunda ve çeşitli detoksifikasyon olaylarında rolleri vardır. Elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu ve H_2O_2 ile lipid hidroperoksid (ROOH) lerin indirgenmesini sağlar. GSH eritrositte sürekli sentez edilmektedir. Glutamik asit ve sisteinden γ -glutamil-sistein sentetaz yolu ile bir dipeptid oluşur. Daha sonra glutatyon sentetaz ise bir tripeptid olan γ -glutamil-sisteinil-glisin'i yani GSH'u oluşturur. GSH, hemoglobin ve diğer kritik eritrosit proteinlerinin peroksidatif hasarına engel olarak eritrositi zararlı etkilerden korur. GSH'un metabolik yolunda birçok enzim bulunmaktadır (9,44).

GSH'un hemen hemen tamamı hücre içinde yerleşmiştir. Serumda yok denecek kadar azdır. Normal şartlar altında hücrelerde GSH daha çok serbest formdadır. Sitozoldeki okside Glutatyon (GSSG) miktarı çok azdır ve genellikle GSH miktarının %1-3'ünü oluşturur.

GSH oksidatif strese karşı önemli bir role sahiptir. Organik hidroperoksitler, intrasellüler GSH'un okside forma dönüşmesiyle zararsız hale getirilirler. Yine Glutatyon, fosfolipidlerde lokalize olmuş ROOH'lerin yıkımını da sağlayabilir (9,44).

2.7 EBSELEN

Ebselen [2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)one] son dekadda üzerinde çok çalışılan bir antiinflamatuvar seleno-organik bileşiktir (50). İlaça duyulan ilginin başlıca nedeni 1984 yılında Müller ve Wendel'in, 1998 yılında Maiorino'nun yaptıkları çalışmalarda tespit ettikleri Ebselen'in özellikle fosfolipid hidroperoksid GSH-Px olmak üzere GSH-Px benzeri etki göstermesi olmuştur. Sies'in 1993 ve 1994'teki derleme makalelerinde üzerinde durduğu bir diğer nokta ise Ebselen'in enzim benzeri katalitik aktivitesidir. Aslında düşük moleküler organik bir bileşen olan bir ilacın katalitik aktivitesi olması son derece şaşırtıcıdır ve bu psödoenzimatik aktivitenin Ebselen'in farmakodinamik profiline katkıda bulunduğu da yayımlanmıştır (51).

Ebselen'in farmakolojik profilindeki ilginç noktalardan biri kendine has gösterdiği antioksidan etkidir. Alfa- tokoferol ve probukol gibi birçok diğer antioksidanlar serbest radikallerden arındırma etkileri ile lipid peroksidasyonunu ve bundan sonra tetiklenebilecek ikincil reaksiyonları engellerler. Oysa Ebselen kendisi çok zayıf bir serbest radikal önleyicisidir ancak özellikle hidroperoksilipidler olmak üzere organik hidroperoksitlerin arındırılmasında çok etkilidir. Bu son ürünler lipid peroksidasyonunu devam ettirebilecekleri için ortadan kaldırılmaları ile radikal önleyiciler ile aynı etki elde edilebilir (52).

2.8 EBSELEN'İN KİMYASAL DÖNÜŞÜMLERİ

Ebselen özellikle hidroperoksidler ve tiyollere karşı son derece reaktiftir. Birçok redoks reaksiyonu sonucu Ebselen, oksidasyon durumunu ifade eden bileşiklere dönüştürülebilir; seleninik asit (+4), selenol (-2), diselenid (-1) ve selenenilsülfidler (± 0). İlk bakışta Ebselen'in redoks aktivitesinin (diğer selenyum bileşiklerinin aksine) düşük toksisitesi ve insanlarda, deney hayvanlarındaki uzun yarı ömrü ile çelişebileceği düşünülebilir. Ancak birçok derivativinin arasında Ebselen'in en yüksek termodinamik stabiliteye sahip

olması bu çelişkiyi giderir. Bu stabilitesini enerjetik bakımdan avantajlı beş atomlu halkasına borçludur. Çeşitli redoks reaksiyonlarının kombinasyonundan ve bir çok reaksiyon siklusu sonunda Ebselen tekrar elde edilir (52)

2.8.1 Hidroperoksidlerle Reaksiyon:

Ebselen ve bazı metabolik ürünleri hidroperoksidleri, hidroksi bileşenlerine redükleyebilirler. H_2O_2 'e karşı en reaktif bileşen Ebselen Selenol iken en düşük reaksiyon hızını selenilsülfid gösterir. Organik hidroperoksidler arasında hidroperoksi fosfolipidler, hidroperoksi kolesterol esterleri ve kolesterol hidroperoksid Ebselen tarafından etkili olarak indirgenirler. Hidroperoksidlerin indirgeyici detoksifikasyonları Ebselen'in farmakodinamik aktivitesinin ana bölümünü oluştururlar (53).

2.8.2 Tiyoller ile Reaksiyon:

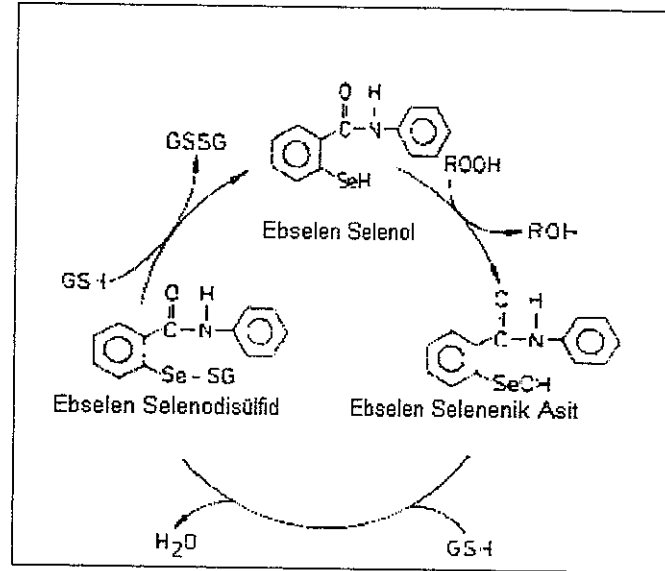
Ebselen birçok tiyoller ile reaksiyona girer. Bunlar arasında yer alan glutasyon, N-asetil L-Sistein ve selenenilsülfid oluşturan dihidrolipoat daha sonra tiyol fazlalığı olması halinde ebselen selenol ve ebselen diselenid'e dönüştürülürler. Tiyoller ayrıca Ebselen'in Selenyum oksidini de indirgeyebilirler.

Ebselen ayrıca proteinlerin tiyol grupları ile de reaksiyona girebilir. Bazı enzimlerin inhibisyonu bu reaksiyon ile meydana gelebilir. Ebselen'in in vitro ve in vivo olarak selenilsülfid bağı ile serum albuminine bağlanması ve bu hali ile GST ve membran proteinleri gibi reaktif tiyol içeren proteinlere transfer edilebilmesi Ebselen'in hücrelerce alınabilmesini mümkün kılmaktadır (52)

2.8.3 Ebselen'in Dönüşümleri:

GSH-Px benzeri etkisi: 1984'te Ebselen'in GSH-Px benzeri aktivitesinin bulunması birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. GSH-Px ve Ebselen'de katalitik olarak aktif Selenyum'un varlığı Ebselen'in GSH-Px'in katalitik mekanizması için model olabileceğini düşündürmüştür. GSH-Px'in aktif

bölgesinde yer alan Selenosistein katalitik siklus sırasında seleninik asit derivatı ve glutasyon selenenil sülfid'e dönüştürülür. Analog katalitik siklus Ebselen için sözkonusu olduğunda Ebselen'in selenol formu kapsanır (51).



Şekil 3. Ebselen'in GSH benzeri etkisi (51).

Dihidrolipoat'ın Ebselen'in GSH-Px benzeri etkisi için Glutatyondan daha iyi bir kofaktör olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle eş zamanlı lipoik asit uygulanımı ile Ebselen'in farmakolojik etkinliğinin artması beklenir. Lipoik asit; karaciğer hastalıkları, nörolojik rahatsızlıklar ve astımda kullanılan bir ilaçtır. İn vivo dihidrolipoat ile bir redoks çift oluşturur ve hem sitozol içinde hem de hidrofob membranlarda peroksil radikal temizleyici görev yaparlar. Bu açıdan lipoik asit, Ebselen'den farklı bir yolla etki eden bir ön ilaçtır. Bu nedenle bu iki ilaç oksidatif stresle bağlantılı rahatsızlıklarda sinerjistik olarak kullanılabilir.

Ebselen'in GSH-Px benzeri etkisi sadece hidrojen peroksit üzerinde değil herhangi bir organik hidroksiperoksid üzerinde mevcuttur. Hidroperoksifosfolipidler ile olan reaksiyon hızı hidrojen peroksit ile olandan 10 kat fazladır. Lipofilik substratlara olan bu tercih Ebselen molekülünün hidrofobik doğasına bağlı olabilir. Bu nedenle, Ebselen'in katalitik aktivitesi Selenoenzim fosfolipid hidroperoksi glutasyon peroksidaz (PHGPx)'in etkisine benzer (52,54)

2.9 EBSELEN'İN DİĞER REAKSİYONLARI:

Ebselen Selenol sadece Ebselenin kendi içindeki dönüşümlerinde yer almayıp hepatik biyotransformasyonlarda da rol alır. İdrarda ve plazma metabolitleri arasında Ebselen selenol'ün Se-metillenmiş ve Se- glukronillenmiş ürünlerinin bulunması araştırmacıları bu sonuca götürmüştür (53).

Ebselen'in rat karaciğer cytocrom P-450'nin bir kısmını zamana bağımlı reaksiyon ile dönüştürdüğü ayrıca, lökotrien B4'ü biyolojik olarak inaktif trans-izomerine dönüştürdüğü gösterilmiştir (52).

2.10 EBSELEN VE LİPİD PEROKSİDASYONU

2.10.1 Serbest Radikaller ile reaksiyon:

Pulse radioliz ile yapılan çalışmalarda Ebselen'in triklorometilperoksil ve diğer halojen radikaller ile hızlı reaksiyona girdiği gösterilmiştir. Ancak non-halojene peroksil radikaller, 2,2-az-bis-amidinopropan, süperoksit, hidroperoksil ve singlet oksijen ile yapılan çalışmalarda Ebselen'in güçlü bir radikal önleyici olmadığı ve farmakolojik etkileri arasında serbest radikaller ile olan reaksiyonunun çok az etkisi olduğu gösterilmiştir (54,55).

2.10.2 Lipid peroksidasyonu üzerine olan etkileri:

Daha önce de belirtildiği gibi Ebselen serbest radikallerce başlatılmış lipid peroksidasyonunu inhibe edemez. Ancak aksine transiyon metallere mikrozomlar ve mitokondride ve metil linoleat ile başlatılan lipid peroksidasyonunun güçlü bir inhibitörüdür. Bu tip lipid peroksidasyonları Fenton tipi reaksiyonlar ile başlatılır. Ebselen bu proses'i hidroperoksitleri ortadan kaldırarak en erken evresinde inhibe eder. Ancak belirtilmesi gereken bir nokta bazı durumlarda Ebselen ve analoglarının hepatositlerde diquat redoks siklusu ile başlatılmış lipid peroksidasyonunda olduğu gibi, peroksidasyonu

tetikleyebileceğidir. Dolayısı ile ebselen lipid peroksidasyonunun üniversal bir inhibitörü olarak kabul edilemez (55).

Ebselen'in bazı tip lipid peroksidasyonlarını inhibe edici etkisi Glutasyonun varlığına bağlı değildir. Bu da Ebselen'in lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkisinde; GPx benzeri etkiden ziyade hidroperoksid indirgeyici etkisinin baskın olduğunu gösterir. Ancak in vivo sistemlerde hidroperoksi lipid düzeyi uygun Ebselen düzeyini aştığında, Glutasyon Ebselen selenoksidden tekrar Ebselen elde etmek için gerekir. Ancak Glutasyon peroksidaz gibi fizyolojik savunma mekanizmalarının varlığı nedeniyle böyle durumlara pek rastlanmaz (56).

2.10.3 Lipoptoteinlerin oksidatif modifikasyonları üzerine etkileri:

LDL'nin lipid bölümünün oksidasyonu büyük oranda kolesteril esterlerine yol açar. Ancak plazmadan lipoprotein yerleşimli kolesterol ve kolesteril ester hidroperoksitlerini arındıracak etkili bir fizyolojik sistem yoktur. Ebselen'in bu hidroperoksitleri uygun alkollere indirgediği ve LDL'nin bakıra bağımlı oksidatif modifikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (56).

Düşündürücü noktalardan biri Ebselen'in plazma ve tam kandaki durumu ve aktivitesidir. Plazmada Glutasyon ve diğer tiyollerin varlığının çok düşük olması nedeniyle Ebselen'in GSH-Px benzeri etkisinin olup olmayacağını şüpheli olmasıdır. Yapılan bir çalışmada ratlara oral yoldan verilen Ebselen'in karaciğer eritrositleri hariç, hidroperoksilipidlerin plazma düzeyini 2-4 saatte düşürdüğü gösterilmiştir. Bu gözlemler plazmada seçici bir hidroperoksit indirgeyici etki varlığını düşündürmektedir. Aydınlatılması gereken nokta kan hücrelerinin Ebselen'in etkisi için kofaktör salgılayıp salgılamadığı (ör:düşük moleküllü tiyoller) veya Ebselen'in plazma formu ile membran içeriği arasında etkileşim olup olmadığıdır (ör:Ectotiyol grubu). Bu tartışmaların dışında eldeki bulgular plazmadaki Ebselen'in in vivo olarak perokside olmuş plazma proteinlerinin etkili bir indirgeyicisi olduğu ayrıca özellikle kan plazmasındaki antioksidatif kapasitesinin olduğudur (56,57).

2.11 ENZİM İNHİBİTÖRÜ OLARAK EBSELEN

Düşük konsantrasyonlarda Ebselen'in birçok enzimi inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu enzimlerin çoğunun inflamatuvar olaylarda rol alması, bunların inhibisyonu ile Ebselen'in in vivo antiinflamatuvar etki edeceğini düşündürmüştür. Ancak inhibe edici etkinin Glutasyon ve diğer tiyollerce geriye döndürüldüğünün görülmesi bu tahmini çürütür. Ebselen aşağıdaki enzim grupları ile reaksiyona girer : a) Lipooksijenazlar, b) NADPH Oksidaz ve Protein Kinaz-C, c) H^+/K^+ ATPaz, d) Nitrik Oksit Sentaz, e) Prostaglandin H Sentaz (56,57,58,59).

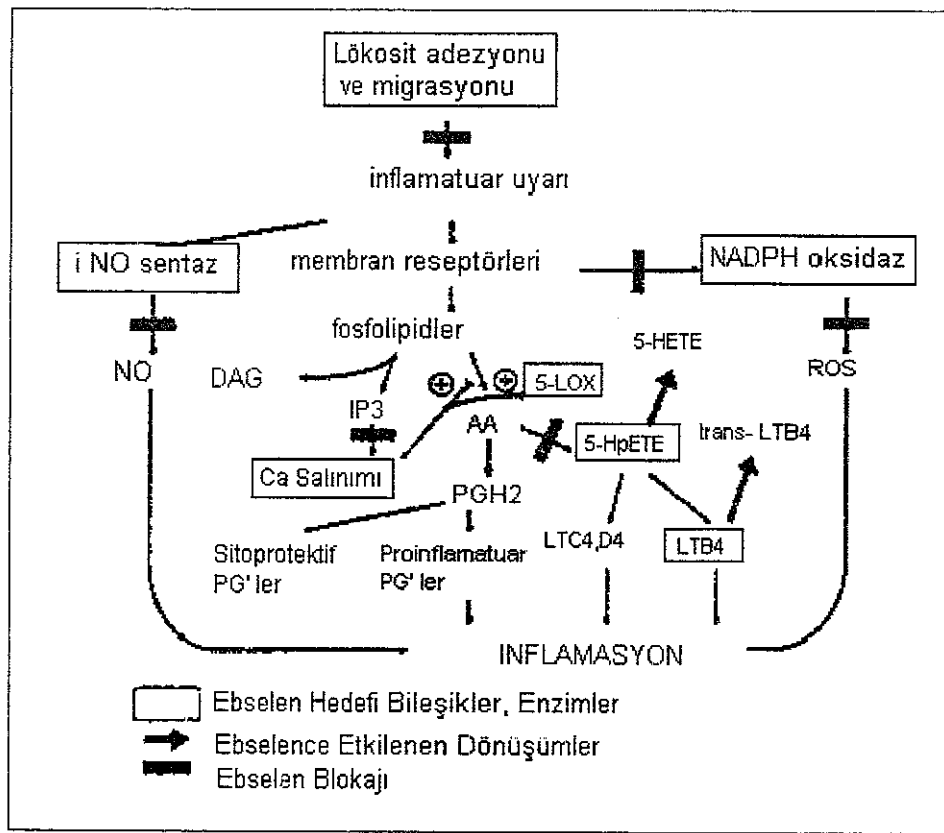
2.12 EBSELEN FARMAKOLOJİSİ

Diğer Selenyum bileşiklerinin aksine Ebselen'in toksisitesi son derece düşüktür çünkü biyotransformasyonu sırasında Selenyum serbest hale gelmez ve organizmanın Selenyum metabolizmasını bozmaz. Plazmada Ebselen'in %90'dan fazlasının serum albuminine bağlanması da hücreler için biyoyararlanıma engel değildir. Albümin selenenil sülfidden plazma membran proteinlerinin tiyol gruplarına efektif transferi Ebselen'in plazmadan hücrenin tüm kompartmanlarına kolay bir geçiş sağlar (56).

Özetle antioksidan ilaçlar arasında Ebselen'in ümit verici olmasını sağlayan karakteristik özellikleri şöyle sıralanabilir:

- Düşük toksisite ve yan etki
- Birçok içdönüşüm sonunda dahi metabolik stabilite
- Sadece Ebselen'e değil bazı metabolik yan ürünlerine özgü biyolojik etkiler

- Moleküler çok yönlü etki; zarar verici hidroperoksitlerin detoksifikasyonu ve enzim inhibisyonlarının yanı sıra sinyal iletim süreci ve hücre-hücre etkileşimlerinin düzenlenmesi
- Birçok yönlü etki ile kendine has antiinflamatuvar etki potansiyelinin diğer antiinflamatuvar ilaçlardan farklı olması
- Özellikle oksidatif strese karşı hücre ve doku koruyucu etki potansiyeli
- İlaç toksisitelerini indirgeme yeteneği
- Prospektif antisklerotik potansiyel.



Şekil 4. Ebselen'in inflamasyon sürecinde etki ettiği maddeler ve dönüşümler (56).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. DENEY HAYVANLARI

Ağırlıkları 2400 gr ile 3800 gr arasında değişen, 34 adet albino erkek tavşan çalışmada kullanılmıştır. Hayvanlar sabit bir karanlık-ışık siklusunda, günde iki kez beslenerek yaşatıldı. Deneysel tüm çalışmalar öncesinde gözler biyomikroskopik muayene ile değerlendirildi.

3.2. DENEYSEL İŞLEMLER

Grup I: 10 tavşana, 0.5 ml steril salin ve 0.5 ml Freund's complete adjuvant (Sigma F 588) içinde 25 mg Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma A 7638) subkutan olarak injekte edilerek immünizasyon uygulandı. Bu injeksiyonlar 7 gün ara ile 3'er kez uygulandı. Son injeksiyondan 1 hafta sonra tavşanlara 2 mg/kg Rompun +25 mg/kg Ketamin ile sedasyon ve analjezi uygulandıktan sonra sağ gözlere 0.05 ml steril salin içinde 2 mg steril BSA intravital olarak injekte edildi. 17 gauge iğne limbus'a 4-5 mm posteriordan superior rektus sakınılarak ve hafif bir açı ile arkaya doğru dönülerek silier cisim ve lens'e zarar verilmemeye çalışılarak injeksiyonlar yapıldı. İntravitreal injeksiyonlar ile eşzamanlı olarak tavşanlara 10 mg/kg Ebselen, Lipovenöz PLR® %10 (Fresenius, Bad Homburg) solüsyonu içinde çözündürüldü. Ebselen intraperitoneal yolla uygulandı (60,61).

Grup II: Yukarıdaki yöntemle 8 tavşan sensitize edildi. İntraperitoneal Ebselen injeksiyonu yerine intraperitoneal yol ile kg'a 1 ml dozunda Lipovenöz PLR® %10 (Fresenius, Bad Homburg) uygulandı.

Grup III : Sensitize olmamış 10 tavşana intravitreal olarak 0.05 ml steril Salin injeksiyonu yapıldı. 1 ml/kg Lipovenöz PLR® %10 intraperitoneal olarak uygulandı (60,61)

Grup IV : Sensitize olmamış 6 tavşana intravitreal Saline injeksiyonu ile eşzamanlı intraperitoneal Ebselen uygulandı (20 mg/kg)

3.3. KLİNİK GÖZLEM

İmmünizasyon öncesi, intravitreal injeksiyonlar öncesi ve enükleasyonlar öncesinde gözler muayene edildi. Klinik Üveit'in bulguları DE Kozak ve ark'nın tarif ettiği sistem ile evrelendirildi (62).

Evre 0: Midriatik damla uygulanımı sonrası normal iris dilatasyonu, aköz hümör ve vitrede hücre yok.

Evre 1/Evre 2 : İnkomplet iris dilatasyonu ve hücre kümeleri izlenir.

Evre 3: Pupil dilate olmuyor, vitre ve ön kamara içinde fibrin ve hücreler gözlenir.

Hayvanlar öldürülmeden hemen önce 27 gauge iğne ile aköz hümör sıvısı alındı ve Lowry tekniğine göre protein miktarı saptandı.

3.4. CERRAHİ İŞLEM

Intravitreal injeksiyonları takiben 24.satte tüm hayvanlar yüksek doz Barbitürat ile sakrifiye edildiler. Gözler enükle edildikten sonra lens ve retina ile beraber koroid ayrıştırıldı. İnflame gözlerde retina ve koroid'i ayrıştırmak zor olacağından ve benzer çalışmalarda retina ve koroid'in homojenizasyonu beraber yapıldığı için retina ve koroid bir bütün olarak alındı ve homojenize edildi (29). Lens ve retina-koroid homojenizatları biyokimyasal çalışmalar yürütülünceye kadar -80°C'de saklandı.

3.5. Cu/Zn BAĞIMLI SÜPEROKSİD DİSMUTAZ TAYİNİ (63)

Prensip: Epinefrinin otooksidasyonu sonucu adrenokrom oluşur. Bu otooksidasyonun, Cu/Zn -SOD ile otoinhibisyon yüzdesine göre enzim miktarı hesaplanır. Adrenokromun maksimum absorbanans verdiği 480 nm'deki absorbanans değişikliği Cu/Zn-SOD inhibisyonuyla ilişkilidir.

Çözeltiler:

- 1) $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$ tamponu (0.3 M, pH:10.2)
- 2) EDTA (0.75 M)
- 3) Epinefrin (1.8 mM, pH:2) : 0.01 M HCl ile günlük hazırlanır. Doku süpernatanı tamponla 500 kat dilüe edilerek ölçüm yapılır.

	Kontrol	Numune
Tampon (μL)	550	550
EDTA (μL)	400	400
Doku homojenatı	750 (Tampon)	750
Distile Su (μL)	50	—
Adrenalin(μL)	500	500

3.6. Se-GLUTATYON PEROKSİDAZ (Se-GSH-Px) ENZİM TAYİNİ (64)

Prensip: Se-GSH-Px aktivitesi Paglia ve Valentina'nın enzimatik yöntemi modifiye edilerek tayin edilir. Birinci aşamada GSH, Se-GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, t-bütil hidroperoksid (t-BuOOH) kullanılarak okside edilir. İkinci aşamada ise ortama eksojen olarak eklenen GR, yine ortama eksojen olarak eklenen NADPH'ı kullanarak okside Glutatyonu yeniden redükler. Bu sırada 340 nm'de NADPH absorbanansındaki azalma ölçülür.

Çözeltiler: 1) Fosfat tamponu (50mM, pH:7.2): K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kullanılarak hazırlanır. Tampon kahverengi şişede, 4°C'de 1 yıl stabildir.

2)Reaksiyon karışımı :15 ml fosfat tamponunda çözülür.

a)EDTA (0.3 mM):0.00221 g

b) NADPH (0.1mM):0.001666 g

c)GR (0.5 U) : 0.014 g

d)NaN₃ (0.5 mM) :0.00065 g

3)Redükte Glutatyon (GSH) : 0.0015 g GSH 2 ml tamponda çözülür.

4)t-BuOOH : 5.478 µL/100 ml olacak şekilde distile suyla hazırlanır.

	GSH (+)	GSH (-)
Reaksiyon karışımı (µL)	750	750
Doku homojenatı	50	50
GSH (µL)	100	—
Distile Su (µL)	—	100
t-BuOOH (µL)	100	100

t-BuOOH eklenmesiyle birlikte her numunede 340 nm'de GSH (+) ve GSH (-) deneylerinin 3'er dakikalık ölçümleri yapılır.

3.7. KATALAZ (CAT) TAYİNİ (46)

Prensip: H₂O₂'nin CAT tarafından O₂ ve H₂O'ya parçalanması sırasında reaksiyon karışımındaki absorbansın azalmasının 240 nm'de ölçümü esasına dayanan bir yöntemdir (ϵ 240:0.00394±0.0002 nmol⁻¹ mm⁻¹)

Çözeltiler :

1)Fosfat tamponu (50 mmol/L, pH:7.0)

a)6.81 g KH₂PO₄, bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

b)8.90 Na₂HPO₄ :H₂O, bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Solüsyonlar a ve b'de sırası ile 1:1.5 oranında karıştırılır

2)H₂O₂ (30 mmol/L) :0.34 ml % 30'luk H₂O₂, fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır. Fosfat tamponu 2°C'de stabildir. H₂O₂ ise taze hazırlanmalıdır.

Prosedür : Süpernatanttan fosfat tamponu ile 1/500 oranında dilüsyon yapılır.

	Kör	Numune
Fosfat Tamponu (μL)	500	-
Doku Homojenatı	1000	1000
H_2O_2 (μL)	-	500

Reaksiyon H_2O_2 eklenmesi ile başlatılır. Başlangıç absorbansının $A=0.500$ civarında olmasına dikkat edilir. 15 saniye boyunca absorbanslar kaydedilir. 15 sn'deki $\Delta_{A_{240}}$ 'ın 0.100'den büyük ve 0.020'den küçük olmamasına dikkat edilir.

Aktivitenin hesaplanması

$$k = 2.3/\Delta t \times \log (A_0/A_{15})$$

$$k = 2.3/ 15 \times \log (A_0/A_{15}) = 0.153 \times \log \rightarrow (A_0/A_{15})\text{s}^{-1} \text{ (ml)}$$

Litredeki değeri hesaplanacağı için çıkan sonuç 1000 ile çarpılır.

$$k = 153 \times \log (A_0/A_{15})\text{s}^{-1} \text{ L}^{-1}$$

Numune 500 defa dilüe edildiği için bulunan değer 500 ile çarpılır, çıkan sonuç doku süpernatan proteindeki %5 gr olduğu için 50'ye bölünerek CAT'ın k/g protein değeri bulunur.

$$k/\text{g prot} = [\log (A_0/A_{15})]/50 \times 382500$$

Anormal kinetiği nedeni ile CAT ünitesi için "birinci derece reaksiyon sabiti (k)" kullanılır ve CAT'ın spesifik aktivitesi doku süpernatan proteini ile ilişkilendirilmiş şekilde k/g prot olarak verilir.

3.8. DOKU MDA TAYİNİ (9,65)

Prensip:

Metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'in TBA ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin bütanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm (eksitasyon) ve 547 nm (emisyon) de florometrik olarak okunması esasına dayanır.

- Çözeltiler: 1) 29 mM TBA: 8.75 M Asetik asit içerisinde hazırlanır.
2) 5 M hidroklorik asid (HCl)
3) n-Bütanol
4) Malondialdehid bis (dimetil asetat) standart solüsyonu, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 ve 1 nmol/ml konsantrasyonlarında hazırlanır.

Prosedür :

	Deney
Doku homojenatı(ml)	0.05
Distile su (ml)	1
TBA(ml)	1

Tüm tüpler 1 saat boyunca 100°C'de kaynatılır. Bir saat sonunda tüpler musluk suyu altında soğutulur.

HCl (ml)	0.025
n-bütanol(ml)	3

Tüm tüpler 10 dakika 3000 x g'de santrifüj edilerek üst faz ayrılır ve fluorometrede yukarıda belirtilen dalga boylarında okunur. Numunelerin MDA içerikleri standart grafiğinden hesaplanır.

3.9. KONJÜGE DİEN TAYİNİ (66)

Prensip: Konjüge dien içeren organik moleküller, << K bantı>> denilen 215 ve 250 nm arasında absorban piki yaparlar. Peroksidize lipidler ise 233-234 nm'deki yoğun K bantı ile karakterizedirler. Peroksidize doymamış yağ asitlerinde konjüge dien oluşumu; bu moleküldeki çift bağları ayıran metilen grubundaki hidrojenler üzerinde serbest radikal atağı sonucundadır.

Çözeltiler: 1)Kloroform

2)Metanol

3)Sikloheksan (spektrofotometrik grade)

4)Nitrojen gazı (HABAŞ)

Prosedür: 0.5 ml numune üzerine 0.5 ml kloroform :metanol (2:1,v:v) solüsyonu eklenir. 5 dakika vortekslelendikten sonra nitrojen gazı altında kloroform : metanol fazının evaporasyonu sağlanır. Kloroformdan arınmış olan ekstrakt, 2 ml sikloheksan içinde çözülür. Numunelerin absorbanansı 234 nm'de sikloheksan körüne karşı okunur.

Sonuçlar $\epsilon_{\max} = 2.52 \times 10^4$ M cm kullanılarak $\mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanır.

3.10. PROTEİN ÖLÇÜMÜ – LOWRY METODU (67)

Prensip: Proteinler alkali ortamda elde edilen bakır iyonları ile kompleks yaparlar. Cu-Protein kompleksi bir elektron donörü olarak hareket edebilir ve ilave edilen Folin-Ciocalteu reaktifini (polifosfomolibdik ve polifosfotungustik asit) yoğun renkli molibdeum ve tungsten mavisine indirger. Oluşan renk şiddetinin optik dansitesi 750 nm'de ölçülür ve standart eğri ile karşılaştırılarak değerlendirilir.

Çözeltiler: 1) 1N NaOH

2)% 5.8'lik $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ veya %2 Na_2CO_3 (anhidrid)

3)%1 CuSO_4

4)%2 Na-K tartarat

5)D reaktifi: 10 ml Na_2CO_3 + 0.1 ml CuSO_4 + 0.1 mL Na-K tartarat. Bu reaktif taze hazırlanır.

6)Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi: Sigmadan hazır olarak temin edilir. Hazır olan reaktif 2N olduğu için aşağıdaki şekilde sulandırılarak kullanılır

Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi 1 kısım

Distile su 1 kısım

7)Protein standartı: Bovin serum albumin (BSA), 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 g/ml'lik konsantrasyonlarda hazırlanır.

Yöntem:

	Kör (mL)	Standart (mL)	Numune (mL)
Distile su	0.1		
Standart		0.1	
Numune			0.1
1 N NaOH	0.1	0.1	0.1
D reaktifi	1	1	1

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 20 dakika oda ısısında inkübe edilir.

Folin-Ciocalteu-Fenol Reaktifi	0.1	0.1	0.1
--------------------------------	-----	-----	-----

Hemen karıştırılıp 30 dakika oda ısısında inkübe edilir.

Distile su	2	2	2
------------	---	---	---

750 nm'de köre karşı okunur. Sonuçlar standart grafiğinden değerlendirilir

4. BULGULAR

Uveit oluşturulan tavşan gözlerinin hepsinde Evre 1 – 2 klinik uveit olduğu gözlemlendi.

Çalışmamıza aldığımız 34 tavşanın lens ve retina-koroid dokularına ait enzim ve lipid peroksidasyon ürünleri değerleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 3-12).

Enzim ve lipid peroksidasyon ürünleri 4 grup arasında, istatistiksel kıyaslama Kruskal-Wallis testi ile, ikili gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar Mann-Whitney testi ile gerçekleştirilmiştir.

Retina-koroid dokusundaki süperoksid dismutaz (SOD) değerleri Tablo 3'de verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 8586.195 ± 1177.114 U/gr protein, sadece Ebselen verilen grupta 9007.070 ± 936.6139 , uveit olan grupta 8361.728 ± 2052.505 , uveit olup Ebselen alan grupta 8249.4950 ± 2103.025 U/gr protein olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlenmiştir ($p < 0.05$).

Tablo 3: 4 grupta retina-koroid dokusundaki SOD değerleri (U/gr protein).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	8586.19	± 1177.11	$p > 0.05$
Ebselen grubu	9007.07	± 936.61	
Uveit grubu	8361.72	± 2052.50	
Uveit + Ebselen grubu	8249.49	± 2103.02	

Retina koroid dokusundaki glutatyon-peroksidaz (GSH-Px) değerleri Tablo 4'de verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 17.21 ± 5.41 U/gr protein, Ebselen grubunda 16.70 ± 1.66 U/gr protein, uveit grubunda 5.69 ± 2.51 U/gr protein, uveit+Ebselen grubunda 14.18 ± 2.07 U/gr protein olarak

bulunmuştur. Gruplar arasında enzim değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0.001$).

Tablo 4: 4 grupta retina-koroid dokusundaki GSH-Px değerleri (U/gr protein).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	17.21	± 5.41	
Ebselen grubu	16.70	± 1.66	$p < 0.001$
Uveit grubu	5.69	± 2.51	
Uveit + Ebselen grubu	14.18	± 2.07	

Gruplar kendi aralarında enzim değeri açısından karşılaştırıldığında, uveit grubu ile kontrol grubu ($p < 0.01$), uveit grubu ile Ebselen grubu ($p < 0.01$), uveit grubu ile uveit+tedavi grubu ($p < 0.05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Kontrol grubu ile Ebselen grubu ($p > 0.05$), kontrol grubu ile uveit+Ebselen grubu ($p > 0.05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Retina-koroid dokusundaki katalaz (CAT) değerleri Tablo 5'de verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 36.11 ± 25.56 U/gr protein, Ebselen grubunda 50.94 ± 26.46 U/gr protein, uveit grubunda 19.78 ± 12.91 U/gr protein, uveit+Ebselen grubunda 52.59 ± 58.66 U/gr protein olarak bulunmuştur. Gruplar arasında katalaz aktiviteler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Tablo 5: 4 grupta retina-koroid dokusunda CAT değerleri (U/gr protein).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	36.11	± 25.56	
Ebselen grubu	50.94	± 26.46	$p < 0.001$
Uveit grubu	19.78	± 12.91	
Uveit + Ebselen grubu	52.59	± 58.66	

Gruplar kendi aralarında katalaz enzimi açısından karşılaştırıldığında; sadece uveit grubu ile Ebselen grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0.01$).

Retina-koroid dokusundaki konjuge dien (cd) değerleri Tablo 6'da verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 218.91 ± 96.23 $\mu\text{mol/L}$, Ebselen grubunda 240.07 ± 111.99 $\mu\text{mol/L}$, uveit grubunda 453.57 ± 79.30 $\mu\text{mol/L}$, uveit+Ebselen grubunda 336.34 ± 20.49 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında konjuge dien düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulunmuştur ($p < 0.001$).

Tablo 6: 4 grupta retina-koroid dokusundaki konjuge dien (cd) değerleri ($\mu\text{mol/L}$).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	218.91	\pm 96.23	
Ebselen grubu	240.07	\pm 111.99	$p < 0.001$
Uveit grubu	453.57	\pm 79.30	
Uveit + Ebselen grubu	336.34	\pm 20.49	

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında uveit grubu ile uveit+Ebselen grubu arasında ($p < 0.001$), uveit grubu ile Ebselen grubu arasında ($p < 0.01$), uveit grubu ile kontrol grubu arasında ($p < 0.01$), uveit+Ebselen grubu ile Ebselen grubu arasında ($p < 0.01$) ve uveit+Ebselen grubu ile kontrol grubu arasında ($p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Sadece Ebselen grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Retina-koroid dokusundaki malondialdehid (MDA) değerleri Tablo 7'de verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 6.54 ± 2.58 nmol/g protein, Ebselen grubunda 6.88 ± 1.94 nmol/g protein, uveit grubunda 14.75 ± 2.60 nmol/g protein, uveit+Ebselen grubunda 8.10 ± 2.39 nmol/g protein olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$).

Tablo 7: 4 grupta retina-koroid dokusundaki malondialdehid (MDA) değerleri (nmol/g protein).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	6.54	\pm 2.58	
Ebselen grubu	6.88	\pm 1.94	$p < 0.001$
Uveit grubu	14.75	\pm 2.60	
Uveit + Ebselen grubu	8.10	\pm 2.39	

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında uveit grubu ile kontrol grubu arasında ($p<0.01$), uveit grubu ile Ebselen grubu arasında ($p<0.001$), uveit grubu ile uveit+Ebselen grubu arasında ($p<0.001$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Lens dokusundaki superoksid dismutaz (SOD) değerleri Tablo 8'de verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 11687.38 ± 1754.29 U/gr protein, Ebselen grubunda 10291.84 ± 1546.15 U/gr protein, uveit grubunda 11762.89 ± 1687.28 U/gr protein, uveit+Ebselen grubunda 10188.88 ± 866.33 U/gr protein olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 8: 4 grupta lens dokusunda superoksit dismutaz (SOD) değerleri ($\mu\text{mol/L}$).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	11687.38	± 1754.29	$p < 0.005$
Ebselen grubu	10291.84	± 1546.15	
Uveit grubu	11762.89	± 1687.28	
Uveit + Ebselen grubu	10188.88	± 866.33	

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında uveit grubu ile Ebselen grubu arasında ($p<0.05$), uveit grubu ile uveit+Ebselen grubu arasında ($p<0.01$), uveit+Ebselen grubu ile kontrol grubu arasında ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Lens dokusundaki glutatyon-peroksidaz (GSH-Px) değerleri Tablo 9'da verilmiştir. Ortalama değerleri; kontrol grubunda 0.218 ± 0.094 U/g protein, Ebselen grubunda 0.617 ± 0.195 U/g protein, uveit grubunda 0.0512 ± 0.023 U/g protein, uveit+Ebselen grubunda 0.161 ± 0.057 U/g protein olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 9: 4 grupta lens dokusunda glutatyon-peroksidaz GSH-Px değerleri (U/g protein).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	0.218	± 0.094	
Ebselen grubu	0.617	± 0.195	p < 0.001
Uveit grubu	0.051	± 0.023	
Uveit + Ebselen grubu	0.161	± 0.057	

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında uveit+Ebselen grubu ile kontrol grubu haricindeki tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Lens dokusundaki katalaz (CAT) değerleri Tablo 10'da verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 4.895±5.099 U/g protein, Ebselen grubunda 4.525±2.033 U/g protein, uveit grubunda 9.146±4.711 U/g protein, uveit+Ebselen grubunda ise 9.541±5.150 U/g protein olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05).

Tablo 10: 4 grupta lens dokusunda katalaz (CAT) değerleri (U/g protein).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	4.895	± 5.099	
Ebselen grubu	4.525	± 2.033	p < 0.005
Uveit grubu	9.146	± 4.711	
Uveit + Ebselen grubu	9.541	± 5.150	

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında sadece uveit grubu ile Ebselen grubu arasında (p<0.05) ve uveit+Ebselen grubu ile Ebselen grubu arasında (p<0.05) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Lens dokusundaki konjuge dien (cd) değerleri Tablo 11'de verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 147.48±9.85 µmol/L, Ebselen grubunda 97.73±26.27 µmol/L, uveit grubunda 429.10±57.72 µmol/L, uveit+Ebselen grubunda 95.73±26.27 µmol/L olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0.001).

Tablo 11: 4 grupta lens dokusunda konjuge dien (cd) değerleri ($\mu\text{mol/L}$).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	147.48	\pm 9.85	
Ebselen grubu	95.73	\pm 26.27	$p < 0.001$
Uveit grubu	429.10	\pm 57.72	
Uveit + Ebselen grubu	382.14	\pm 168.87	

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Lens dokusundaki malondialdehit (MDA) değerleri Tablo 12'de verilmiştir. Ortalama değerler; kontrol grubunda 0.060 ± 0.012 nmol/g protein, Ebselen grubunda 0.076 ± 0.022 nmol/g protein, uveit grubunda 0.161 ± 0.013 nmol/g protein, uveit+Ebselen grubunda 0.187 ± 0.375 nmol/g protein olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$).

Tablo 12: 4 grupta lens dokusunda malondialdehid (MDA) değerleri (nmol/g protein).

Grup	Ortalama	St.Deviasyon	P
Kontrol grubu	0.060	\pm 0.012	
Ebselen grubu	0.076	\pm 0.022	$p < 0.001$
Uveit grubu	0.161	\pm 0.135	
Uveit + Ebselen grubu	0.187	\pm 0.375	

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında uveit grubu ile kontrol grubu arasında ($p < 0.001$), uveit grubu ile Ebselen grubu arasında ($p < 0.001$), uveit grubu ile uveit+Ebselen grubu arasında ($p < 0.01$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş, diğer ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, önerilen uveit modelleri arasında yer alan bovine serum albumini (BSA) ile sensitize edilmiş tavşanlarda, intravitreal BSA ile oluşturulan klinik uveit modeli insan modeline uygun olduğu için tercih edilmiştir. Daha önce Uusitalo'nun çalışmasında, transmission ve scanning elektron mikroskobu ile bu modelin tavşan gözlerinde yarattığı reaksiyon 3 evrede tanımlanmıştır. 24 tavşanın 3 grupta, tedavi edilmeden çalışıldığı bu çalışmada gözler farklı saat ve günlerde enükle edilip incelenmiştir. Çalışmada uveitin ilk bulgularının intravitreal BSA enjeksiyonundan 3 saat sonra gözlendiği belirtilmiştir. Uusitalo'nun çalışmasında akut ön uveit klinik bulguları ilk gün içinde artmaya devam etmiş (ön kamaradaki protein miktarı 21.4 mmHg'a çıkmıştır) ve 2 günden sonra azalmaya başlamıştır. Tavşanlar 2 haftaya kadar izlenmiş ve çok hafif klinik bulgular saptanmıştır (Aköz sıvıda protein 12.7 mg/ml) (60).

Intravitreal enjeksiyonun kendisi de travmatik bir reaksiyona sebep olabilirse de, primer polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonu sadece immünize olmuş ve intravitreal BSA uygulanmış tavşan gözlerinde gözlenmiştir. Her iki kontrol grubunda da sadece enjeksiyon bölgesinde az miktarda PMNL tespit edilmiştir. Bu bulgular enflamasyonun başlama sebebinin antijenik uyarının yanısıra, antijen sunumu olduğu ve deneysel uveit'in akut fazında PMNL'lerin önemli rolü olduğunu göstermiştir (60).

PMNL infiltrasyonunu mononükleer (MN) hücrelerin infiltrasyonu izlemiştir. Dolaşan MN hücreler genelde küçük veya orta boyda lenfositlerdir. Dolayısı ile plazma hücreleri ve lenfoblastların, ön uveada yer alan lokal

lenfositlerden enflamasyon sırasında türediği aşıkardır. Çalışmada tüm lenfositlerin endotelial bağlantılardan geçiş yaptığı görülmüştür (60)

Silier epitelinde morfolojik değişikliklere çok hassas olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada enflamatuvar hücrelerin göçünden önce silier proçeslerin üzerinde fibrin ağlarının oluştuğu gözlenmiştir. Enflamatuvar hücrelerin arka kamaraya geçişinde silier epitel ana geçiş yolunu sağlar. Göç eden hücrelerin içinde çoğunluğu mononükleer (MN) hücreler oluşturmuştur (60).

Bizim çalışmamızda patolojik değerlendirme yapılmamasının sebebi, modeldeki patolojik değişikliklerin daha önceki çalışmalarda çok iyi tarif edilmiş olması ve çalışılan serbest oksijen üretiminin biyokimyasal verileri ile patolojik sonuçların birbiri ile ilişkili bulunmasıdır (29)

Çalışmamızın amacı, uveitin akut fazında yoğun PMNL varlığında başlayan serbest oksijen radikal hasarının, lipid peroksidasyonu aşamasında, Ebselen uygulanımı ile azalıp azalmayacağını gözlemek idi. Ebselen'in PMNL ve makrofajlarca başlatılan inflamatuvar cevabı azaltacağı beklenmediği için patolojik çalışmanın, enzimatik düzeydeki etkileri sorgulayan çalışmamıza çok fayda sağlayacağı düşünülmedi.

Çalışmamızda enükle edilmiş tavşan gözlerinde retina ve koroidde sadece biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır, ancak daha sonraki aşamalarda patolojik inceleme yapıp, sonuçların biyokimyasal değerler ile karşılaştırması yapılabilir.

Rao'nun deneysel uveitte serbest oksijen radikallerinin rolünü ayrıntılı olarak irdeleyen çalışmasında lökosit infiltrasyonunun en yoğun olduğu günde, Luminal Amplified Chemiluminance (LAC) ile ölçülen serbest radikaller ve enflame dokuda lipid peroksidasyon ürünleri olan CD, MDA ve fluorokrom lipidlerin düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Eş zamanlı olarak ışık ve elektron mikroskopunda da retinal hasar saptanmıştır. Uveoretinit bölgesinde saptanan bu bulgular, serbest oksijen radikalleri gelişimi, lipid peroksidasyon oluşumu ve retinal hasar arasındaki direkt ilişkiyi ortaya koymuştur (29)

Rao'nun bu çalışmasında elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, infiltrasyon bölgesinde hücrelerde oluşan hasarın çoğunlukla retinal damarlar ve

fotoreseptörler civarında olduğunu göstermiş ve hasarın, serbest radikallerin olduğu bölgelerin en yakınında meydana geldiği sonucunu doğurmuştur (29).

Daha önce intraperitoneal olarak uveit modellerinde uygulanmış SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz veya hidroksil radikal önleyiciler uveit'in seyrinde hafifleme ve retinal hasarda azalma sağlamışlardır. Bu etkilerini uveada oksijen metabolitlerinin olduğu bölgelerdeki önleyici etkileri ile sağladıkları sonucuna varılmıştır (21,22).

İncelenen bu serbest oksijen radikalleri biyolojik açıdan son derece reaktif ve dengesizdirler. Bu yüksek reaktivite sonucunda ise kısa yarılanma ömrüne sahiptirler. Süperoksid ve hidrojen peroksitten kaynaklanan hidroksil radikallerinin, hücrelerin membranlarındaki lipidler ve hücresel DNA dahil birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girdikleri bilinmektedir. Membran lipidlerinde yer alan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu, membranların sekretuar fonksiyonlarının ve transmembranöz iyonik gradientlerinin bozulmasına sebep olur. Bu tür değişiklikler hücresel ödem, dejenerasyon ve nekroza sebep olabilir. Deneysel uveit modellerinde tespit edilen CD, MDA ürünleri, floresan kromolipid bileşikleri, hidroperoksid'lerin tespiti, lipid peroksidasyonuna kanıt olmuştur (29).

Deneysel uveitlerde bu ürünler enflame retina ve koroidde tespit edilmiş ve böylece korioretinal enflamasyon bölgesinde oluşmuş serbest oksijen radikallerinin doku hasarı oluşturduğu gösterilmiştir (25,29).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda retina ve koroid beraber olarak alınmış ve alınan spesimenlerde lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak CD ve MDA çalışılmıştır.

Başka uzun zincirli doymamış yağ asitleri olmak üzere çok miktarda lipid içeren retina oksidatif hasara karşı çok duyarlıdır. Retinal fotoreseptörlerin yüksek oranda 22:6 dokosaheksanoik asit içerdikleri bilinmektedir. Bu yağ asidinin deneysel uveitlerde azaldığı gösterilmiştir. 22:6 dokosaheksanoik asit'in benzer şekilde kaybı, serbest radikallerce başlatıldığı düşünülen fotik retinal dejenerasyonlarda da saptanmıştır. Fotoreseptörlerin fizyolojik fonksiyonların

idamelerinde önemli rol oynayan bu yağ asitlerinin azalması, fotoreseptör ve diğer retina hücrelerinde dejenerasyona ve dolayısı ile görme kaybına yol açacaktır.

Enflamasyonda ve fotik hasarda ortaya çıkan serbest radikallerin etki mekanizmaları farklı olsa da, oluşan doku hasarından her iki durumda da retinal lipidlerin peroksidasyonunun ve 22:6 dokosaheksanoik asit kaybının sorumlu olduğu görülmektedir (29).

Çalışmamızda retina ve koroid hem uveit, hem kontrol gruplarında enzim ve lipid peroksidasyon ürünlerinin tayini için kullanılmıştır. Ancak her ikisinin özellikle İnflame gözlerde, ayrıştırılması zor olduğu için bir bütün olarak alınmışlardır.

Rao'nun deneysel uveit modelindeki en önemli gözlem PMN hücrelerde bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enziminin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin pik yaptığı zaman ile histolojik bulguların ve klinik uveitin şiddetinin zamanlamasının kıyaslanmış olmasıdır.

Elde edilen bulgulara göre, lipid peroksidasyonunun PMNL'lerdeki "oksijen artışı" ile yakın bağlantısı vardır. Dahası, retinal membran lipidlerinin peroksidasyonu ile oluşan retinal hasar dejeneratif sürecin ilk basamağını oluşturmaktadır. Bunu destekleyen bulgular, retinanın nekroza uğramaya başladığı günlerde yüksek düzeylerde lipid peroksidasyon ürünlerinin bulunması ve uveitte ilk fazda 22:6 dokosaheksanoik asit kaybı gözlemlenmesidir (29).

Serbest oksijen radikallerinden superoksid, hidroksil radikalleri ve singlet dioksijenin göz dokusunda biyolojik jenerasyonun mümkün olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. İntraoküler dokular, birçok dokuda varlığı tespit edilen koruyucu anti-oksidan sistemlerin aynısına sahiptir. Oksidan hasara karşı savunmada üç muhtemel evre tanımlanmıştır. Birincisi; reaktif oksidanların oluşumunu başlatan $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 gibi serbest oksijenlerinin SOD, katalazlar ve peroksidazlarca ortadan kaldırılmalarıdır. İkinci basamak vitamin E ve askorbat gibi endojen koruyucularla reaksiyonlarında radikallerin yok edilmesidir. Üçüncü

basamak ise okside olmuş hücre içeriklerinin tamir mekanizması veya yenilenmeleridir (34).

İntraoküler dokularda yer alan koruyucu enzimler hücre içinde yer alırlar, oysa intraoküler sıvıların hemen hemen hiç enzimatik aktivitesi yoktur. Oküler boşlukları çevreleyen tüm dokular hücre içinde oluşan oksidanlara karşı kendilerini koruyabilirler. Göz içinde deneysel veya reaktif yol ile oluşturulan oksidanlar, oküler boşluğa komşuluğu olan dokuların hücre membranlarına hasar vererek etki ederler. Biyolojik membranlar üzerinde *in vitro* yürütülen deneysel çalışmalar hidroksil radikalleri ve süperoksit radikallerinin, dokularda oluşan oksijen hasarında rol aldıklarını göstermektedir. Gözde, ön kamara ve vitre, aktif oksijen çeşitlerinin *in vivo* jenerasyonunu ve çevre dokulardaki etkilerini araştırmak için uygun bölgelerdir (34).

Tavşan gözlerinde intravitreal ksantin oksidaz ve ksantin ile yaratılan uveal enflamasyonda ön kamarada çok miktarda protein ve selüler birikimin, çok sayıda hücre ile lens kapsülünün ön kısmına yapıştığı izlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca lense yakın vitreusda yoğun inflamatuvar reaksiyon varlığı gösterilmiştir (68).

Ratlarda yürütülen peroksinitrit ve oksidatif hasarın incelendiği deneysel bir uveit modelinde aktive nötrofillerde süperoksit jenerasyonunu hücre yüzeyinde olduğu ve retinal lipid peroksidasyonunun oluşması için bölgede infiltrate olan PMNL'lerin varlığının şart olduğu gösterilmiştir (69). Retinal lipid peroksidasyonunun deneysel uveit modelinde çalışıldığı bir başka çalışmada yine serbest oksijen radikallerince oluşturulan doku hasarının lipid hücre membranının peroksidasyonu yolu ile olduğu ve retinadaki peroksidatif hasarın, komşu uveal dokuda var olan aktive inflamatuvar hücrelerce başlatıldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada ekstraselüler ortamda oluşan hidroksil radikallerin lipid hücre membranından hidrojen atomları alarak konjüge dien oluşumuna ve hücre membranlarında peroksidatif hasara sebep oldukları bildirilmiştir (25).

Bu bilgiler ışığında, uveit oluşumu sırasında PMNL infiltrasyonu ve inflamatuvar reaksiyon oluşumunun gösterildiği aköz hümör, vitre ön yüzü ve

idamelerinde önemli rol oynayan bu yağ asitlerinin azalması, fotoreseptör ve diğer retina hücrelerinde dejenerasyona ve dolayısı ile görme kaybına yol açacaktır.

Enflamasyonda ve fotik hasarda ortaya çıkan serbest radikallerin etki mekanizmaları farklı olsa da, oluşan doku hasarından her iki durumda da retinal lipidlerin peroksidasyonunun ve 22:6 dokosaheksanoik asit kaybının sorumlu olduğu görülmektedir (29)

Çalışmamızda retina ve koroid hem uveit, hem kontrol gruplarında enzim ve lipid peroksidasyon ürünlerinin tayini için kullanılmıştır. Ancak her ikisinin özellikle İnflame gözlerde, ayrıştırılması zor olduğu için bir bütün olarak alınmışlardır.

Rao'nun deneysel uveit modelindeki en önemli gözlem PMN hücrelerde bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enziminin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin pik yaptığı zaman ile histolojik bulguların ve klinik uveitin şiddetinin zamanlamasının kıyaslanmış olmasıdır.

Elde edilen bulgulara göre, lipid peroksidasyonunun PMNL'lerdeki "oksijen artışı" ile yakın bağlantısı vardır. Dahası, retinal membran lipidlerinin peroksidasyonu ile oluşan retinal hasar dejeneratif sürecin ilk basamağını oluşturmaktadır. Bunu destekleyen bulgular, retinanın nekroza uğramaya başladığı günlerde yüksek düzeylerde lipid peroksidasyon ürünlerinin bulunması ve uveitte ilk fazda 22:6 dokosaheksanoik asit kaybı gözlemlenmesidir (29).

Serbest oksijen radikallerinden superoksit, hidroksil radikalleri ve singlet dioksijenin göz dokusunda biyolojik jenerasyonun mümkün olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. İntraoküler dokular, birçok dokuda varlığı tespit edilen koruyucu anti-oksidan sistemlerin aynısına sahiptir. Oksidan hasara karşı savunmada üç muhtemel evre tanımlanmıştır. Birincisi; reaktif oksidanların oluşumunu başlatan $O_2^{\cdot\cdot}$ ve H_2O_2 gibi serbest oksijenlerinin SOD, katalazlar ve peroksidazlarca ortadan kaldırılmalarıdır. İkinci basamak vitamin E ve askorbat gibi endojen koruyucularla reaksiyonlarında radikallerin yok edilmesidir. Üçüncü

özellikle iris ile silier cisim arasında yer alan ve koruyucu enzimatif aktivitesi Tablo 2’de gösterilmiş olup, homojenizasyonu mümkün olabilen lensler enükle edilen gözlerden alınarak enzimatif aktiviteleri ve lipid peroksidasyon ürünlerinin tayini için çalışılmıştır.

Retinada yer alan koruyucu enzimler, retinadaki diğer antioksidanlar ile birlikte serbest oksijen radikallerinin temizlenmesinde etkili olabilirler. Bu etkileri enflamasyon başlangıç safhasında baskın olurken, ileri evrelerde radikallerin temizlenmesinde etkin olamayabilirler. Bu sonuca, kesitlerin histopatolojik incelemesinde PMNL varlığının minimum düzeyde izlendiği günlerde serbest radikal oluşumunun ısrarla yüksek bulunması sonucunda varılmıştır (29). Bu sebeple, biz kontrol ve tedavi grupları arasındaki enzimatif etkileri ve tedavinin dokulardaki akut etkilerini daha iyi kıyaslayabilmek için enflamasyonun bizim modelimizde pik yaptığı dönemde yani 24. saatte (60) enükleasyon yaparak dokularımızı ayırdık.

Serbest radikallerin maksimal düzeyde ölçüldüğü erken dönemde retinal dejenerasyon bulgularının minimal olması, retinal hücre membranlarından serbest radikal hasarı sonucu oluşan lipid peroksidasyon ürünlerinin zincir reaksiyonu ile gittikçe artan retinal hasar oluşturduğunu düşündürür. Bu mekanizmanın yanı sıra, lipid peroksidasyon ürünlerinin kemotaktik özellik göstererek inflamasyonun artmasına sebep oldukları düşünülmektedir. Daha önceki invitro çalışmalarda da 22:6 PUFA’dan kaynaklanan lipid peroksidasyon ürünlerinin PMNL için kemotaktik oldukları gösterilmiştir. Aynı çalışmada prostaglandinler (PG) ile bağlantısı olmayan perokside lipidlerin kemotaktik fonksiyonları olabileceğini göstermiştir. İn vivo şartlarda retinanın lipid peroksidleri ve hidroperoksitlerinin prostoglandinlerle beraber uveoretinit’in ilerlemesinde etken olabileceği önerilmiştir. Antioksidan enzim ve serbest radikal önleyici tedavilerin faydalı etkilerinin lipid peroksidasyonu kemotaktik faktörlerini en aza indirmekle olabileceği öne sürülmüştür (29).

Rao’nun yürüttüğü deneysel uveit modelinde retinal ve koroidal dokularda yürütülen histokimyasal yapısal ve kimyasal çalışmalar oksijen metabolitlerinin

varlığını kanıtlamıştır. İnflame dokularda superoksid, hidrojen peroksit ve bunların ürünleri olan lipid peroksidasyon ürünleri tespit edilebilmiştir (29).

Daha önce birçok deneysel uveit modellerinde tedavi edici ajan olarak deferoksamin, sodium benzoat, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, dimethyl thiourea gibi birçok madde ve enzim kullanılmış ve serbest oksijen radikali hasarını önleyerek intraoküler inflamasyonu özeltmede etkileri gözlenmiştir (18,21,22).

Ebselen literatürdeki birçok çalışmada oral yolla ve 100 mg/kg benzeri dozlarda verilmiştir. Ancak oral yolla kullanımda tavşanlarda büyük miktarlarda Ebselen gerekmektedir. Bir çalışmada Ebselen'in intravenöz yolla 5.5 mg/kg dozunda verildiği tarif edilmiştir. Çalışmamızda hidrofobik ve hidrofilik özellikleri gözönüne alınarak, Ebselen Lipovenöz PLR®%10 (Fresenius, Bad Homburg) solüsyonu içinde (intravenöz kullanım için litrede 25.0 g gliserol, 6 g yumurta fosfolipidleri, 100 g soya fasulyesi yağı içeren lipid solüsyonu), ml'sinde 10 mg Ebselen olacak şekilde çözündürülüp intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Ebselen'in kan retina bariyerini geçebildiği daha önceki bir çalışmada kanıtlanmıştır (70,71).

Çalışmamızda retina-koroid dokusunda yürütülen çalışmalarda konjuge dien değerleri açısından iki kontrol grubu arası hariç, tüm ikili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark uveit grubu ve uveit+Ebselen grubunda her iki kontrol grubuna göre yüksek değerler bulunması sonucu oluşmuştur. MDA değerleri açısından gruplar arasında genel anlamda saptanan istatistiksel olarak anlamlı farklılık, uveit grubunda tüm diğer gruplara oranla tespit edilen yüksek değerlerden kaynaklanmaktadır. Retina MDA değerlerinde, konjuge dien değerlerine kıyasla bulunan değişik sonuç uveit+Ebselen grubunun diğer kontrol grupları ile istatistiksel olarak farklı bulunmamasıdır. Lens dokusunda yapılan çalışmaların istatistiksel sonuçları da retina-koroid dokusundan elde edilenlerin aynısıdır. Bu sonuçlar bize sensitize edilip intravitreal Bovin serum albumini uygulanan hayvanlarda (uveit ve uveit+Ebselen grubu) intraoküler inflamasyon ve lipid peroksidasyonunun

gerçekleştiğini gösterir. Lipid peroksidasyonu ürünlerinin bu gruplarda kontrol gruplarından daha yüksek oranlarda bulunmasının yanı sıra, konjüge dien değerleri tedavi almış uveit grubunda tedavi olmamış uveit grubundan istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuş, malondialdehid değerleri ise tedavi almış uveit grubunda diğer kontrol gruplarından istatistiksel olarak farksız bulunmuştur. Bu sonuçlar bize Ebselen'in özellikle doymamış lipid peroksidasyonunu azalttığı sonucunu düşündürmüştür. Özellikle retinada, konjüge dien ve malondialdehid değerlerinin iki kontrol grubu arasında farklılık göstermemesi ise, lipid peroksidasyonunun olmasını beklemediğimiz hayvanlarda Ebselen'in bir etkisi olamayacağı varsayımını doğrulamaktadır.

Ökaryotik hücre sitoplazmasında yer alan superoksid dismutazlardan "sitoplazmik SOD" adıyla alınan Cu/Zn SOD insan nötrofillerinde bulunur ve total SOD aktivitesinin %85'ini oluşturur. Cu/Zn SOD'un oküler dokularda lens epitelinde, retinanın fotoreseptör tabakasının iç tabakalarında ve retina pigment epitelinde var olduğu gösterilmiştir. SOD'un tavşan gözlerinde retinada, lens epitelinden 5 kat daha fazla oranlarda bulunduğu gösterilmiştir (Tablo 2).

Çalışmamızdan çıkan ilginç bir sonuç, retina-koroid spesimenlerindeki SOD aktivitesinin hiçbir grup arasında farklılık göstermemesi idi. Bunun sebebi akut safhada enükle ettiğimiz (24 saat) gözlerde, daha önce gösterilmiş olan yoğun polimorfonükleer ve özellikle nötrofil birikimine bağlı olabilir. Dokuda olan ve serbest oksijen radikallerinden arınma işlemi sonrasında düşmesi beklenen SOD değerleri, inflamatuvar uyarı sonunda ortamda sayıları çok artan nötrofillerden kaynaklanan SOD artışı ile dengelenmiş olabilir. Bu durumda tek başına SOD değerleri dokuda oluşan reaksiyon ve aktivite için bize çok yardımcı olamamaktadır.

Öte yandan, inflamatuvar cevabın birincil derecede gerçekleşmediği ve dolayısı ile polimorfonükleer yoğunluğunun maksimum derecede beklenmediği lens dokusunda biraz daha farklı sonuçlar elde edilmiştir. SOD değerleri açısından lens dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Bu farklılık uveit grubunda Ebselen grubuna ve uveit+Ebselen grubuna göre

yüksek bulunan değerlerden ve uveit+Ebselen grubunda kontrol grubuna oranla yüksek bulunan değerlerden kaynaklanmıştır. Oküler enflamasyon olduğu, konjuge dien ve MDA sonuçlarına göre kesinlik kazanmış uveit gruplarında SOD değerlerinin istatistiksel olarak daha düşük çıkması oksijen radikallerine karşı bir cevabın olduğu ve bu nedenle enzimin kullanıldığını gösterir. SOD değerlerinin istatistiksel olarak retina-koroid dokusundan farklı çıkması, lensin peroksidatif saldırının uzak bir hedefi olması, dolayısı ile SOD kaynağı olabilen nötrofil saldırısına daha az oranda maruz kalması ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra lensin retinadan çok daha az miktarlarda SOD içermesi de akut fazda çabuk tükenmesi sonucunu doğurabilir.

Lökosit ve makrofajlarda yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilen GSH-Px bu hücreleri kendi ürettikleri hidroperoksitlere karşı korur. Se-GSH-Px'ın oküler dokularda, retinada, retina pigment epitelinde, lensde, kornea epitelinde ve konjunktivada bulunduğu gösterilmiştir. Se-glutasyon total GSH-Px aktivitesinin büyük çoğunluğundan sorumludur (49).

Retinada çalışılan GSH-Px sonucunda gruplar arasında genel anlamda bir istatistiksel fark ortaya çıkmıştır. Uveit grubunun GSH-Px değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı derecede daha düşük çıkarken, uveit+Ebselen grubundaki GSH-Px değerleri de sadece Ebselen uygulanan gruptan daha düşük çıkmıştır. Bu sonuçlara göre lipid peroksidasyonu ve peroksidatif hasara karşı retinada bulunan GSH-Px'ın kullanıldığı görülmektedir. Retina dokularındaki GSH-Px değerlerinin Ebselen ve kontrol grubu arasında farklılık göstermemesi, inflamatuvar cevabın olmadığı bir dokuya Ebselen uygulananının enzim düzeyini değiştirmediyini gösterir. Ebselen ile tedavi edilmiş oküler dokulardaki enzim aktivitesinin kontrol grubundan istatistiksel anlamda farksız çıkması ise önemli bir bulgudur, zira ortamda bulunan GSH-Px'in çok az miktarda kullanıldığı veya hiç kullanılmadığı sonucunu düşündürmektedir.

Tavşanlarda retina ve lens epitelinde benzer oranlarda bulunan GSH-Px'in (Tablo 2) lens değerlerinde de hemen hemen aynı sonuçları vermesi, sonuçlarımızın tutarlılığının bir kanıtı olabilir. Lens dokusunda yürütülen

istatistiklerde gözlenen tek fark Ebselen uygulanan kontrol grubu değerlerinin kontrol grubundan anlamlı ölçüde yüksek çıkması idi. Bu sonuçtan Ebselen veya türevlerinin Se-bağımlı-GPx aktivitesini artırmaları sorumlu olabilir.

Lens ve retina-koroid dokusunda GSH-Px değerleri ile varılan bu sonuçlardan parenteral yolla uygulanmış Ebselen'in kan-aköz ve kan-retina bariyerini aştıktan sonra glutatyon peroksidaz benzeri etkisi ile retinada ve lens epitelinde, inflamatuvar yanıt ile ortaya çıkmış hidroperoksitleri redüklediği gösterilmiştir. Böylelikle dokularda bulunan GSH-Px'in yoğun miktarlarda kullanımına gerek kalmamıştır. Bu sonuç çok önemlidir, zira retinanın fotoreseptör membranının toplam yağ asitlerinin %50'sini oluşturan docosohexanoic asit'in (22:6) lipid peroksidasyonuna çok duyarlı olduğu ve deneysel uveitlerde inflame retinadaki major peroksidatif ürünün hidroperoksidocohexanoic asit olduğu gösterilmiştir. Bu hidroperoksitlerin nötrofillere kemotaktik aktivite gösterdiği, inflamasyonu da artırdığı saptanmıştır (41). Ayrıca membran doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun membran fonksiyonları ve transmembranöz iyonik gradientlerini bozduğu ve sonucunda oluşan selüler ödem, dejenerasyon, nekroz ile retina hasarı oluşturduğu bilinmektedir (29).

Dolayısı ile ortamdaki hidroperoksitlerin, dokudaki enzimlerin tüketimine gerek kalmadan redükte edilmesi retinal hasarın önlenmesi açısından son derece önemlidir.

Özellikle retinada SOD değerlerinin uveit gruplarında kontrol grupları ile benzer oranda bulunmasının akut fazda yoğun PMNL yığılımına bağlandığı bu çalışmada, uveit gruplarında lökosit ve makrofajlarca da GSH-Px salınmış olabileceği düşünülürse, Ebselen'in koruyucu etkisi daha fazla ortaya çıkmaktadır.

Tavşan gözlerinin retina-koroid ve lens dokularında bulunan katalaz değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi kendi aralarında çelişkili bulunmuştur. Lens değerlendirmelerinin çelişkili ve uyumsuz çıkması mantıklı olarak değerlendirilebilir, çünkü katalazın varlığı kornea, uvea ve retinada en yoğun

olarak iris ve silier cisimde bulunurken, lens epitelinde düşük, dekapüle lensde çok daha düşük miktarlarda bulunmuş ve tüm lensin çalışıldığı spesimenlerde enzim aktivitesi almamadığı rapor edilmiştir (Tablo 2).

Retina-koroid dokularında katalaz yönünden yapılan karşılaştırmalarda sadece Ebselen grubunda uveit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik bulunmuştur. Bu sonuçtan uveit oluşan gözlerin retinasında katalazın kullanıldığı sonucuna varılabilir, ancak uveit grubu ile kontrol grubu arasında bir fark bulunmamış olması bu hipotezi çürütmektedir. Öte yandan uveit ve kontrol grubu, uveit+Ebselen grubu ile hem Ebselen hem kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunamamış olması kırmızı kan hücrelerinde bulunan katalazın oluşan vaskülit sonucu açığa çıktığını ve bu nedenle kullanılmış olsa dahi kontrol gruplarından çok farklı düzeylerde bulunmayacağını düşündürmüştür.

Uveit grubu ile tedavi almış uveit grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiş olması, Ebselen'in lipid peroksidasyonunun universal bir inhibitörü olmadığı gerçeği ile bağdaşır (56). Dahası, serbest radikallerce başlatılmış lipid peroksidasyonunu inhibe edemeyeceği, ancak GSH-Px benzeri etkisi ile ortamdaki hidroperoksitleri redükleyebileceği bilinmektedir. Bu noktadan yola çıkarak belki de ortamda hazır bulunacak daha yüksek miktarlardaki Ebselen'in serbest radikallerin oluşmasına fırsat vermeden lipid peroksidasyonunu engelleyebileceği düşünülebilir. Bu sebeple bundan sonra yapılacak çalışmalarda, düşük toksisitesinin olduğu da bilinerek Ebselen'in daha yüksek dozlarda intraperitoneal kullanımının katalaz düzeylerini nasıl etkileyeceği incelenebilir.

6. SONUÇLAR

- 1) Uveit oluşturulan gruplarda MDA ve konjüge dien değerleri hem retina, hem lenste kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş, böylece 24.saatte enükle edilen gözlerde lipid peroksidasyonu olduğu gösterilmiştir.
- 2) Uveit oluşturulup Ebselen ile tedavi edilen grupta lens ve retina, MDA ve konjüge dien değerlerinin uveit grubuna göre anlamlı olarak düştüğü görülmüş ve antijenik uyarı ile eşzamanlı verilmiş Ebselen'in akut fazda lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir.
- 3) Tavşan lens ve retina - koroid dokusundaki GSH-Px değerleri incelendiğinde; uveit grubunun GSH-Px değerleri diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Buna göre lipid peroksidasyonu ve peroksidatif hasara karşı retinada bulunan GSH-Px kullanılmıştır. Ebselen ile tedavi edilmiş oküler dokulardaki (lens ve retina-koroid) GSH-Px aktivitesinin kontrol grubundan istatistiksel olarak farksız çıkması, bu grupta ortamda bulunan doku GSH-Px'inin korunduğu sonucunu doğrumuştur. Ortamda oluşan hidroperoksitleri Ebselen redüklemiştir.
- 4) Tavşanların lens ve retina-koroid dokularında Ebselen'in GSH-Px benzeri etkisi ile GSH-Px enzimini koruması, intraperitoneal yolla verilmiş Ebselen'in kan-retina bariyerini aştığını göstermektedir.

- 5) Retina-koroid dokusunda ölçülen SOD aktivitesinin hiçbir grup arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemesi, uveit oluşmuş gözlerde ortamda yoğun olarak PMNL ve nötrofil birikimine bağlı olabilir. İnflamatuvar uyarı sonunda, nötrofillerin sitoplazmalarında bulunan Cu/SOD aktivitesi bazal düzeyin çok üstüne çıkarak, kullanılması halinde dahi kontrol gruplarına yakın düzeylerde idame edebilir.
- 6) SOD ve katalazın, GSH-Px değerleri kadar anlamlı sonuçlar göstermemesi, Ebselen'in universal bir antioksidan olmaması ve oküler dokularda GSH-Px benzeri aktivitesi ile peroksidasyonu önüyor olmasını düşündürür.

7. ÖZET

Uveitte gelişen retinal hasarı önlemek için deneysel olarak intraperitoneal injeksiyon veya oral yol ile birçok antioksidan madde veya hidroksile serbest radikal önleyicileri denenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar lipid peroksidasyonunu azaltmanın, doymamış yağ asitlerinden zengin retina ve özellikle fosforeseptör membranları korumada etkili olduğunu göstermiştir.

Akut oküler inflamasyonun tedavisi üzerindeki çalışmalar prensipte deneysel uveit modelleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, uveit oluşturmak için Rao'nun Bovin Serum Albumin'ini (BSA) sensitizan olarak kullandığı deneysel model kullanılmıştır.

Çalışmada 34 adet erkek tavşan 4 gruba ayrılmıştır. 2 grup tavşan sensitize edilmiş ve sağ gözlere intravitreal BSA verilerek klinik uveit oluşturulmuştur. Bu gruplardan birincisindeki tavşanlara intravitreal injeksiyon ile eşzamanlı intraperitoneal Ebselen verilmiştir. Diğer iki kontrol grubundaki tavşanlara ise immünizasyon uygulanmamış ve sağ gözlere intravitreal serum fizyolojik uygulanmıştır. Kontrol gruplarından birisindeki tavşanlara intravitreal serum fizyolojik ile beraber intraperitoneal Ebselen uygulanmıştır. Akut inflamasyonun beklendiği 24. saatte tüm tavşanların sağ gözleri enükle edilmiştir. Tavşanların lens ve retina dokularında lipid peroksidasyon ürünleri olan konjüge dien (CD) ve Malondialdehid (MDA) düzeyleri ve antioksidan enzimler olan Katalaz, Süperoksid Dismutaz ve GSH-Px düzeyleri ölçüldü.

Çıkan sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri sonunda, uveit oluşması beklenen gruplarda, beklendiği gibi CD ve MDA düzeylerinin kontrol gruplarına

göre daha yüksek olduğu ve Ebselen uygulanmış uveit grubunda lipid peroksidasyonunun daha az geliştiği görüldü. Antioksidan enzim düzeylerinin incelenmesi sonunda GSH-Px düzeyi uveit oluşturulan grupta diğer gruplardan daha düşük çıkarken, Ebselen uygulanan uveit grubunda kontrol grubundan farksız çıkmıştır. SOD ve Katalaz değerleri GSH-Px değerleri istatistiksel olarak anlamlı çıkmış ancak sonuçları gruplar arasında ve dokular arasında farklılık göstermiştir. Bu verilere dayanarak şu sonuca varabiliriz:

Ebselen BSA ile oluşturulan uveit sonucu oluşan lipid peroksidasyonunu azaltır görünmektedir. Ebselen;GSH-Px benzeri etkisi ile dokuda var olan GSH-Px değerlerini koruyabilmekte ancak diğer antioksidan enzimler üzerinde birebir etki göstermemektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Slanovits TL. Intraocular Inflammation and Uveitis. P:56 Ed: Slanovits TS. Basic and Clinical Science Course 1993, 1994. AOA Publications, California 1993.
2. Forster DJ. General Approach to the uveitis patient and treatment strategies 10 (3.1); Eds: Yanoff M, Duker JS. Ophthalmology, Mosby Pub, London 1999.
3. Kanski JJ. Uveitis. P:264. Clinical Ophthalmology. Ed: JJ Kanski, Butterworth, Heineman pub. Oxford 1999.
4. Freeman B, Crops J. Free radicals α tissue injury. Lab Invest; 47: 5: 412-426, 1982.
5. Roos D. The cell biology and inflammation. New York, Elsevier / North – Holland; 337-385, 1980.
6. Fridovich I. Superoxide radicals An Endogenous Toxicant: Ann Rev Pharmacol Toxicol; 23: 239-257, 1983.
7. Mittag I. Oxygen radicals in ocular inflammation and cellular damage. Eye Res; 39: 759-769, 1984.
8. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation α antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem; 41(12): 1819-1828, 1995.
9. Bilmen S. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Yetmezlikli ve Normal Bireylerin Eritrosit ve Plazmalarında Lipid Peroksidasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya 1998.
10. Long CA, Bielski BHJ. Rate of reaction of superoxide radical with chlorine containing species. J Phys Chem; 84: 555, 1980.

11. Rodenas J, Mitjavila MT, Corbonell T. Simultaneous generation of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in rats. *Free Radic Biol med*; 18: 869-875, 1995.
12. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite – induced membrane lipid peroxidation; The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*; 288: 484-487, 1991.
13. Freeman B, Crops J. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*; 47-5: 412-426, 1982.
14. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals, oxygen toxicity, transition metals and disease. *Biochem J*; 219: 1-14, 1984.
15. Southorn PA. Free radicals in medicine: Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc*; 63: 390-408, 1998.
16. Marak GE, de Kozak Y, Fave JP. Free radicals and antioxidants. Pathogenesis of Eye Disease. *Adv Exp Med Biol* 264: 513-27, 1990.
17. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine: II involvement in human disease. *Mayo Clin Proc*; 63: 3890-408, 1988.
18. Rao NA, Calordra AJ, Sevanian A, et al. Modulation of lens induced uveitis by superoxide dismutase. *Ophthalmic Res*; 18: 41-46, 1986.
19. Rao NA, Sevanian A, Fernandez MAS, et al. Role of oxygen radicals in experimental allergic uveitis. *Invest Ophthalmic Vis Sci*; 28: 886-892, 1987.
20. Rao NA, Romero JL, Fernandez MAS, et al. Role of free radicals in uveitis. *Surv Ophthalmol*; 32: 209-213, 1987.
21. Rao NA, Romero JL, Sevanian A, et al. Antiinflammatory effect of glutathione peroxidase on experimental lens induced uveitis. *Ophthalmic Res*; 20: 213-219, 1988.
22. Rao NA, Fernandez MAS, Sevanian A, et al. Treatment of experimental lens induced uveitis by dimethyl thiourea. *Ophthalmic Res*; 20: 106-111, 1988.
23. Weiss ST, Lobuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest*; 47: 5-18, 1982.

24. Anderson RE, Rapp LM, Wiegand RD. Lipid peroxidation and retinal degeneration. *Curr Eye Res*; 3: 223-227, 1984.
25. Rao NA, Fernandez MA, Cid LL; et al. Retinal lipid peroxidation in experimental uveitis. *Arch Ophthalmol*; 105: 1712-1716, 1987.
26. Rao NA, Thacte LG, Delmage JM, et al. Superoxide dismutase in ocular structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 26: 1778-1781, 1985.
27. Atalla LR, Fernandez MA, Rao NA. Immunohistochemical lokalisation of catalase in ocular tissue. *Curr Eye Res*; 6: 1181-1187, 1987.
28. Atalla LR, Sevanian A, Rao NA: Immunohistochemical localisation of glutathione peroxidase in ocular tissue. *Curr Eye Res*; 7: 1023-1027, 1988.
29. Rao NA. Role of oxygen free radicals in retinal damage associated with experimental uveitis. *Tr Am Ophth Soc*; 38: 797-850, 1990.
30. Bhuyon KC, Bhuyon DC. Regulation of hydrogen peroxide in eye humors : Effect of 3-amino 1-H, 1,2,4 triazole in catalase α glutathione peroxidase of rabbit eye. *Biochem Biophy Acta*; 497: 641-651, 1977.
31. Lustone W, Dratz EA. Selenium and nonselenium glutathione peroxidase activities in selected ocular and monocular rat tissues. *Exp Eye Res*; 35: 405-412, 1982.
32. Rao NA, Thaete LG, Delmage JM, Sevanian A. Superoxide dismutase in ocular structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 26: 1778-1781, 1985.
33. Freeman BA, Crapo VS. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*; 47: 412-426, 1982.
34. Mittag TW. Role of free radicals in ocular inflammation and cellular damage. *Exp Eye Res*; 39: 759-767, 1984.
35. Apaydın C, Oğuz Y, Açar A, Yargıçoğlu P, Demir N, Aksu G. Visual evoked potentials and optic nerve histopathology in normal and diabetic rats and effect of ginkgo biloba extarct. *Acta Ophthalmol*; 71: 623-628, 1993.
36. Apaydın KC, Yücel G, Açar A, Aksu G. Diyabetik sıçanların retina ve lenslerinde lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin etkisi. *T Oft Gaz*; 22: 178-182, 1992.

37. Apaydın KC, Açar A, Yargıçoğlu P, Oğuz Y. The effects of oxygenated free radicals on VEP spectral components in experimental diabetes. *Int J Neurosci*; 73: 129-137, 1993.
38. Southorn PA. Free radicals in medicine; Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc*; 63: 390-408, 1988.
39. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation : A radical chain reaction. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, England, Clarendon Press; 139-189, 1985.
40. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation; its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr*; 57: 715-725, 1993.
41. Goto H, Wu GS, Chen F, et al. Lipid peroxidation in experimental uveitis sequential studies. *Curr Eye Res*; 11: 489-499, 1992.
42. Ohya T. Reactivity of alkonals towards malandialdehyde (MDA) and the effect of alkonals on MDA determination with a thiobarbituric acid test. *Biol Pharm Bull*; 16: 1078-1092, 1993.
43. Sun Y, Oberley LW, Lu Y. A simple method for clinical assay superoxide dismutase. *Clin Chem*; 34(3): 497-500, 1988.
44. Horton AA, Fairbust S. "Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity". *CRC Critical Reviews in Toxicology*; 18(1): 27-73, 1987.
45. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, et al. *Harper's Biochemistry* 24th ed. Appleton&Lange; 119-120, 205-215, 1996.
46. Aebi HE. Catalase of Enzymatic Analysis. Vol.II, Enzymes 1: Oxireductases, Transferases. Ed. Bergmeyer HV, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim; 273-285, 1987.
47. Zollner H. Handbook of enzyme inhibitors. Ed. Zollner H, 2nd, revised and enlarged edition. Part A, VCH, Weinheim; 105, 1993.
48. Strayer LI. *Biochemistry*, Third Ed. WH Freeman and Company, New York; 397-423, 422, 592-593, 1988.

- 49 Stone WL, Dratz EA. Selenium and nonselenium glutathione peroxidase activities in selected ocular and non ocular rat tissues. *Exp Eye Res*; 35: 405-412, 1982.
- 50 Takasago T, Peters EE, et al. Neuroprotective efficiency of ebselen, an antioxidant with antiinflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Br J of Pharmacology*; 122: 1251-1254, 1997.
- 51 Sies H. Review article. Ebselen a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med*; 14(3): 313-323, 1993.
- 52 Schewe T. Review. Molecular actions of Ebselen an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol*; 26(6): 1153-1169, 1995.
- 53 Akerboom TPM, Sies H, Ziegler DM. The oxidation of ebselen metabolites to thiol oxidants catalyzed by liver microsomes and perfused rat liver. *Arch Biochem Biophys*; 316: 220-226, 1995.
- 54 Engman L, Tunek A, Hallberg M, Hallberg A. Catalytic effects of glutathione peroxidase mimetics on the thiol reduction of cytochrome C. *Chem Biol Intersections*; 93: 129-137, 1994.
- 55 Andersson CM, Hallberg A, Linden M, et al. Antioxidant activity of some diarylselenides in biological systems. *Free Radic Biol Med*; 16: 17-28, 1994.
- 56 Schewe T. Review: Molecular actions of ebselen - an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol*; 26(6): 1153-1169, 1995.
- 57 Christison J, Sies H, Stocker R. Human blood cells support the reduction of LDL associated cholesteryl ester hydroperoxides by albumin ebselen. *Biochem J*; 304: 341-345, 1994.
- 58 Cotgreave JA, Duddy SK, Kass GEN, et al. Studies on the antiinflammatory activity of ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADH oxidase and protein kinase? *Biochem Pharmacol*; 38: 649-665, 1989.

59. Kurebayashi Y, Tobuchi Y, Akasaki M. Gastric cytoprotection by ebselen againts the injury induced by necrotizing agents in rats. *Arzneim Forsch / Drug Res*; 39: 250-253, 1989.
60. Uusitalo H. An experimental uveitis induced by bovine serum albumin. A transmission and scanning electron microscopic study. *Acta Ophthalmologica*; 62: 413-424, 1984.
61. Yücel İ, Paksoy N, Yücel G, Aksu G, Aksu TA. Effect of vitamin E in the treatment of bovine albumin induced uveitis in rabbits. *Ophthalmic Res*; 24: 129-133, 1992.
62. De Kozak Y, Mirshahi M, Boucheix C, Faure JP. Inhibition of experimental albumine uveoretinitis in rats by S-antigen specific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*; 15: 1107-1111, 1985.
63. Misra HP, Fridovich I. The role superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*; 247: 3170-3175, 1972.
64. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*; 70: 158-169, 1967.
65. Wasavicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem*; 39(12): 2522-2526, 1993.
66. Recknagel RO, Glende EA. Spectrophotometric detection of lipid conjugated diseases. In *Methods in Enzymology* (Eds, Packer L). Academic Press, New York; 105: 331-337, 1984.
67. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Rondall RT. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193: 265-275, 1951.
68. Sery TW, Petrillo R. Superoxide anion radical as an indirect mediator in ocular inflammatory disease. *Curr Eye Res*; 3(1): 243-252, 1984.

69. Wu GS, Zhang J, Rao NA. Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol and Vis Sci*; 38(7): 1333-1339, June 1997.
70. Gower JD, Lane NJ, Goddard JG, et al. Ebselen. Antioxidant capacity in renal preservation. *Biochem Pharmacol*; 43(11): 2341-2348, 1992.
71. Bosch-Morell F, Roma J, Puertos FJ, et al. Efficacy of the antioxidant ebselen in experimental uveitis. *Free Radic Biol Med*; 27(3-4): 388-391, 1999.

ACCIDENT
DATE