

DENEYSEL RETİNAL İSKEMİ VE REPERFÜZYON OLUŞTURULAN KOBAYLARDA VİTAMİN E TÜREVLERİNİN GLUTATYON DÜZEYİNE ETKİSİ

Orhan AYDEMİR

Serdal ÇELEBİ

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.10.2002

The Effects of Vitamin E Derivatives on the Level of Glutathione in Experimentally Ischemia-Reperfusion Induced Guinea Pigs

Summary

The purpose of this study is to determine protective effects of vitamin E derivatives against oxygen radicals in guinea pig retina with ischemic injury. The right eyes of 40 male guinea pigs weighed 500-600 g were used and we divided them into 5 groups with randomly selected 8 guinea pigs. The animals were randomly assigned as group 1 (control), group 2 (I/R), group 3 (I/R + alpha-tocopherol), group 4 (I/R + gamma-tocopherol) and group 5 (I/R + d-alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS). Groups 2, 3, 4 and 5 were applied ischemia-reperfusion (I/R) and received serum physiologic, alpha-tocopherol, gamma-tocopherol and TPGS respectively. Retinal ischemia was induced for 90 minutes then followed by reperfusion for 24 hours. The animals were sacrificed at 24 hours of reperfusion. Then, retinas were isolated and processed for the quantification of glutathione (GSH) levels.

According to retinal GSH levels gamma-tocopherol did not have significant protective effect ($p=0.53$). Alpha-tocopherol and TPGS groups had significant protective effect but in the comparison of these two groups no statistically significant difference was determined ($p=0.60$).

Our results suggest that according to GSH levels in eyes that were induced to ischemia-reperfusion, vitamin E derivatives especially alpha-tocopherol and TPGS can have protective role by decreasing lipid peroxidation.

Key Words: Retina, ischemia-reperfusion, vitamin E

Özet

Bu çalışmada iskemi-reperfüzyon (İ/R) sürecinde oksijen radikallerinin zararlı etkilerini engelleyen vitamin E türevlerinin, kobay retinasında oluşturulan iskemik hasarı önlemedeki etkinlikleri araştırılmıştır. Çalışmada; 400-600 gram ağırlığında, 40 adet, erkek Guinea pig (kobay)' in sağ gözü kullanılmıştır. Kobaylar her bir grupta 8 denek olacak şekilde 5 eşit gruba ayrılmıştır: Grup 1 (kontrol), grup 2 (İ/R), grup 3 (İ/R+alfa-tokoferol), grup 4 (İ/R+gama-tokoferol) ve grup 5 [İ/R+d-alfa-tokoferol polietilen glikol 1000 süksinat (TPGS)]. Grup 2, 3, 4 ve 5'e İ/R işlemi yapılmış ve grup sırasına göre serum fizyolojik, alfa-tokoferol, gama-tokoferol ve TPGS uygulanmıştır. Kobaylara 90 dakika retinal iskemi uygulanmış ve takiben 24 saat reperfüzyon ortamında bekletilmiştir. Reperfüzyonun 24. saatinde denekler öldürülerek retinaları izole edilmiş ve retinal glutatyon (GSH) seviyesi ölçülmüştür.

Retina glutatyon düzeylerinde; gama-tokoferol grubunun iskemi grubuna göre anlamlı koruma sağlamadığı saptanmıştır ($p=0.53$). Alfa-tokoferol ve TPGS gruplarının iskemi grubuna göre anlamlı koruma sağladığı saptanırken kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0.60$).

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde; retina GSH düzeyleri ile, akut iskemi-reperfüzyona maruz kalan gözlerde, özellikle alfa-tokoferol ve TPGS' de daha belirgin olmak üzere vitamin E türevleri lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Retina, iskemi-reperfüzyon, vitamin E

Giriş

İskemi-reperfüzyonun oluşturduğu doku antioksidan ajanların etkinliği son yılların önemli hasarında oksijen serbest radikallerinin rolü ve araştırma konularından birisidir. İskemi hasarı, bir

dokuyu besleyen arteriyel sistemin belli bir zaman dilimi içinde tıkanması sonucunda ortaya çıkan durumdur (1). İskemi hasarının giderilmesi için, bu kritik zaman diliminde dokunun tekrar oksijene olması şarttır. İskemi oluşmuş dokuda kan akımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon denilmektedir. Ancak, reperfüzyon sırasında oksijen serbest radikallerinin rol oynadığı reperfüzyon hasarı oluşur (2).

Retinanın oksijen ile ilişkili hasara karşı birtakım savunma mekanizmaları vardır. Retina reaktif oksijen moleküllerine karşı enzimatik detoksifikasyon yapmakta veya E vitamini ile radikal zincir uzamasını sonlandırmaktadır. Retinada vitamin E ve süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler mevcuttur (3-5).

Glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan önemli bir antioksidan ajandır (6).

Vitamin E, membranlarda düşük konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen lipide çözünen zincir kırıcı başlıca antioksidandır. Vitamin E benzeri etkiye sahip bileşiklerden tokoferoller; alfa, beta, gama ve delta olmak üzere 4 çeşit molekül ve bunların stereoizomerlerinden oluşur (7). Yeni bir vitamin E türevi olan d-alfa-tokoferol polietilen glikol 1000 süksinat (TPGS), hidrofilik polar başı (tokoferol süksinat) ve lipofilik alkil kuyruğa (polietilen glikol) sahip olup suda çözünür özellik göstermektedir (8,9).

Bu çalışmada; deneysel iskemi-reperfüzyon oluşturulan kobay retinalarında serbest radikal giderici etkiye sahip vitamin E türevlerinin (alfa-tokoferol, gama-tokoferol ve TPGS) retinal dokuya etkisi, retina glutatyon düzeyleri ölçülerek araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Denekler, 400-600 gram ağırlığında erkek cins 40 adet sağlıklı pigmentli Guinea pig (kobay)'den oluşmuştur. Kobaylar her bir grupta 8 denek olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır.

Grup 1 (kontrol/noniskemik grup): Bu gruba herhangi bir işlem yapılmamış olup, sadece normal değerlerin saptanması amaçlanmıştır. Grup 2 (iskemi/reperfüzyon grubu): Bu gruba iskemi-reperfüzyon (I/R) işlemi yapılmış ve plasebo olarak serum fizyolojik verilmiştir. Grup 3 (alfa-tokoferol),

grup 4 (gama-tokoferol) ve grup 5 (TPGS grubu): Bu gruplara ise I/R işlemi sonrası sırasıyla alfa-tokoferol, gama-tokoferol ve TPGS uygulanmıştır.

Çalışmada, bütün deneklerin bir gözü kullanıldı. Deneklere intramüsküler 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg/kg Xylazin hydrochloride (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu ile anestezi ve analjezi uygulandı (10). Grup 2,3,4 ve 5' deki deneklerde retinal iskemi oluşturmak amacıyla, distile su şişesine ucunda insülin iğnesi olan serum seti takılmış ve bu insülin iğnesi ile temporal limbustan ön kamaraya girilmiştir. Göz içi basıncı 150 mmHg olacak şekilde serum şişesi 204 cm yüksekliğe çıkartılarak tespit edilmiş ve bu yükseklikte 90 dakika süreyle tutulmuştur (10). İskeminin başlamasıyla birlikte grup 2'ye 1ml serum fizyolojik subkutan olarak verilirken; grup 3'e yağda çözünen %67'lik konsantrasyondaki d-alfa-tokoferolün (Eastman Kodak, ABD) 880 IU/kg/gün toplam dozun ilk ¼'ü, grup 4'e yağda çözünen %99'lük konsantrasyondaki d-gama-tokoferolün (Eastman Kodak, ABD) 1070 IU/kg/gün toplam dozun ilk ¼'ü, grup 5'e ise suda çözünen %20'lik konsantrasyondaki d-alfa-tokoferol polietilen glikol 1000 süksinatın (Eastman Kodak, ABD) 774 IU/kg toplam günlük dozun ilk ¼'ü subkutan olarak uygulanmıştır. Plasebo ve tokoferoller aynı bölünmüş dozda 6, 12 ve 18'inci saatlerde tekrarlanmıştır. Doksan dakikalık iskemiden sonra, denekler 24 saat süreyle reperfüzyon ortamında bekletildi ve takiben intrakardiyak 50 mg/kg tiyopental sodyum (Pentothal Sodium, Abbott) ile öldürülüp gözler enükle edildi. Gözler, enükleasyon sonrası buz kabı üzerine konup, ameliyat mikroskopu yardımıyla retina dokusu koroidden ayrılarak tüplere kondu ve bu tüpler derin dondurucuda -80°C'de muhafaza edildi.

Biyokimyasal incelemede, antioksidan ajan glutatyon ölçümü şu şekilde yapılmıştır: Ayırıcı oluşturan maddeler: Ayıraç I: 0.2 N hidroklorik asit (HCl) İçinde 1.2×10^{-2} M kromojenik ayıraç solüsyonu. Ayıraç II: %30 sodyumhidroksit (NaOH).

Tampon Solüsyonu (S3): 0.2 mM dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA) ve %0.025 (W/v) lubrol içeren 20 mM potasyum fosfat pH 7.8 (25°C), (11,12).

Retina doku örneklerinin hazırlanması: 1) %0.9 NaCl solüsyonu ile yıkandı. 2) Doku foil kağıt üzerine bırakılıp ağırlığı tartılarak belirlendi. 3) Buz ile soğutulmuş metafosforikasit çalışma solüsyonunda doku homojenize edildi. 4) 4°C'de 10 dakika 3000 g'de santrifüj edildi. 5) Üst kısımdaki faz alınarak ve 0-4°C'de analiz zamanına kadar

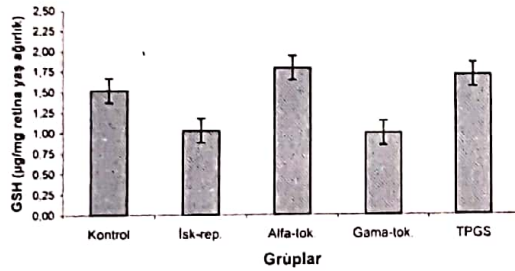
bekletildi. Bulutsu süpernatant 0.2 µm' lik filtreler ile süzülme (11).

Ayrıca, tampon solüsyonu ve retina doku örnekleri hazırlandıktan sonra, glutasyon seviyesinin ölçümü Anderson' un uyguladığı yöntemle yapılmıştır (11,12).

Grup değerleri ortalama ± standart sapma (SS) olarak gösterilirken; gruplar arası karşılaştırmalarda $p < 0.0001$ değeri, gruplar arası ikili karşılaştırmalarda ise $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Retinal dokuda GSH düzeyi değerlendirilirken, gruplar arası karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi, gruplar arası ikili karşılaştırmada ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Bulgular

Kontrol, iskem/reperfüzyon, alfa-tokoferol, gama-tokoferol ve TPGS grubu deneklerinin retina dokularına ait ortalama glutasyon (GSH) değerleri grup sırasına göre 1.5 ± 6.3 , 1.0 ± 0.1 , 1.8 ± 0.4 , 1.0 ± 0.1 , ve 1.7 ± 0.2 (µg GSH/mg retina yaş ağırlık) olarak saptanmış ve Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Kontrol, iskem-reperfüzyon, alfa-tokoferol, gama-tokoferol ve TPGS gruplarının ortalama ± standart sapma GSH değerleri

Çalışmamızdaki beş grubun Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmalarında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p < 0.0001$). Daha sonra grupların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Kontrol grubunun, iskem grubu ve gama-tokoferol grubu ile karşılaştırmalarında kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseklik bulunmuştur ($p < 0.001$). Her bir ilaç grubunun iskem grubu ile karşılaştırmalarında, gama-tokoferolün istatistiksel olarak anlamlı bir koruma sağlamadığı ($p = 0.53$), buna karşılık alfa-tokoferol ve TPGS grubunun anlamlı koruma sağladığı saptanmıştır. İlaç gruplarının birbirleri ile yapılan karşılaştırmalarında, alfa-tokoferol ve TPGS grubunun gama-tokoferole göre anlamlı koruma sağladığı saptanırken ($p < 0.001$), alfa-tokoferol ve TPGS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p = 0.60$).

Tartışma

İskem ve reperfüzyon hasarında dokuda ne gibi değişiklikler olduğu, dokularda oluşan hasarın mekanizmaları ve bu hasarda oksijen serbest radikallerinin rolü ve serbest radikal giderici ajanların etkinliği konusunda son yıllarda bir çok araştırma yapılmıştır (13-16).

İnsan retinasının iskem-reperfüzyon hasarı görsel kayıp ve morbiditeye yol açabilmektedir. İskem, retinanın vazooklusif ve vazoproliferatif hastalıklarında önemli bir rol oynamaktadır (17). Retinanın arter ve ven tıkanıklıkları, diabetik retinopati, prematür retinopati, orak hücre anemisine bağlı retinopati ve inflamatuvar hastalıklarda retina iskem-reperfüzyon hasarına uğrayabilir (18,19). İskemiyi takiben gelişen reperfüzyon sırasında, reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan bir fenomen ortaya çıkmaktadır. Dokuya tekrar oksijen desteğinin sağlanması ile serbest oksijen radikalleri açığa çıkmakta ve hasar daha çok artmaktadır (20). Serbest radikaller; membran lipidlerini peroksidasyona uğratarak, hücrede proteinlerin, karbonhidratların, nükleik asit ve DNA'nın yapısını değiştirerek, kalsiyum dengesini bozarak, aspartat ve glutamat gibi uyarıcı aminoasitlerin salınımını uyararak doku hasarına yol açmaktadır (15,21).

İskem ve reperfüzyonun oluşturduğu hasarları azaltmak ve önlemek amacıyla birçok farmakolojik ajanla değişik çalışmalar yapılmıştır (18,19,22,23). Bu çalışmalarda, iskem oluşturmak amacıyla kullanılan en güncel metod göziçi basıncının (GİB) sistolik basıncın üzerine çıkartılmasıdır (18,24,25). Bu metodun alternatifi ise vasküler yatağın bağlanarak retinal iskem oluşturulmasıdır. Biz de çalışmamızda retinal iskemiyi, kobay göz içi basıncını sistolik basıncın üzerine çıkartarak gerçekleştirdik. Bu metodun tercih nedeni kolay uygulanabilir ve geri çevrilebilir olması, reperfüzyonun kolay başlatılabilir ve kobaylarda rahat uygulanabilir olmasıdır.

Retinanın oksijen ile ilişkili hasara karşı birtakım savunma mekanizmaları vardır. Retina reaktif oksijen moleküllerine karşı enzimatik detoksifikasyon yapmakta veya vitamin E ile radikal zincir uzamasını sonlandırmaktadır (4). Retinada vitamin E, süperoksid dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz mevcuttur. İskem-reperfüzyonun dokuda neden olduğu oksidatif stres ortamında, mevcut savunma mekanizmaları yetersiz kalacağından, oluşabilecek hasarı önlemek için çeşitli antioksidan maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerden vitamin E, membranlarda düşük konsantrasyonlarda

bulunmasına rağmen, lipide çözünen zincir kırıcı başlıca antioksidandır. Lipide çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle kolayca membran fosfolipidlerine difüze olabilmekte ve 20 karbonlu doymamış yağ asitlerini indirgeyerek serbest oksijen radikallerinin biomembranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir (26). Bu madde, kedi yavrularında iskemiye bağlı gelişen vazoproliferatif retinopatinin gelişimini önlemektedir (27). Elektoretinografik çalışmalar sonucunda E vitamini eksikliğin primer etkisinin fotoreseptörler üzerine olduğu saptanmıştır (28). E vitamini eksikliğinde retinada uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinde geri dönüşümsüz kayıp, lipid peroksidasyonunda artma ve membran geçirgenliğinde değişiklik gözlenmiştir (28). Tokoferol, rod dış segment (RDS) membranı fiziksel özelliklerini değiştirerek ve membran lipidlerinin rigiditesini ve düzenini ayarlayarak etki göstermektedir. Ciddi vitamin E eksikliği olan genç çocuklarda sık bir bulgu olarak rod dejenerasyonu ile birlikte gece körlüğü görülmektedir (29).

Yapılan çalışmalarda, farelerde 90 dakika iskemi sonrası uygulanan reperfüzyonda, vitamin E'nin belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır (30). E vitamini glutatyon peroksidaz ve C vitamini ile birlikte hidroperoksidleri azaltmaktadır (5).

Glutatyon (GSH) antioksidan olarak, yabancı biyolojik maddelerin detoksifikasyonunu sağlayan reaksiyonlarda yer alma, izomerasyon reaksiyonlarında kofaktör olarak kullanıma ve sistemin için depo görevi yapma gibi önemli fonksiyonlara sahiptir (31). GSH molekülü, RDS'ye karşı koyan hücrel savunma sistemi için çok önemlidir. GSH, enzimatik olmayan reaksiyonlarda radikallerle direkt reaksiyona girer. Ayrıca GSH,

glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen peroksidazların indirgenmesinde bir elektron vericisidir (31,32).

Glutatyon molekülünün RDS'ye karşı hücrel savunma sisteminin yalnızca bir parçası olduğu kabul edilir. RDS'nin detoksifikasyonunda, askorbat ve alfa-tokoferol gibi antioksidanların yanı sıra, SOD ve katalaz gibi diğer enzimler de görev alır. Çalışmamızda retina dokusunun GSH düzeyleri değerlendirildiğinde; her bir ilaç grubunun iskemi grubu ile karşılaştırmalarında, gama-tokoferolün istatistiksel olarak anlamlı koruma sağlamadığı ($p=0.53$), alfa-tokoferol ve TPGS grubunun anlamlı koruma sağladığı saptanmıştır. İlaç gruplarının birbirleri ile yapılan karşılaştırmalarında, alfa-tokoferol ve TPGS grubunun gama-tokoferole göre anlamlı koruma sağladığı saptanırken ($p<0.001$), alfa-tokoferol ve TPGS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0.60$). Bougle ve arkadaşlarının çalışmasında, yenidoğan tavşanlar 72 saat süreyle %80'lik oksijene maruz bırakıldığında retina SOD seviyesinin azaldığı saptanmıştır (33). Aynı çalışmada, vitamin E ile erken destek tedavisinin retinal SOD azalmasını engellediği gösterilmiştir (33). Bizim çalışmamızda da alfa-tokoferol ve TPGS uygulanması ile retina glutatyon düzeyinde koruma sağlanmıştır.

Sonuç olarak; retina GSH düzeyleri ile, akut iskemi-reperfüzyona maruz kalan gözlerde, özellikle alfa-tokoferol ve TPGS' de daha belirgin olmak üzere vitamin E türevleri lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır. Klinikte retinanın akut iskemik patolojilerinde klasik tedavilere ek olarak vitamin E türevlerinin güvenle kullanılabilir ajanlar olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Barry MC, Grace PA. Ischaemia reperfusion injury. *Surgery* 1997; 3: 68-72.
2. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1989; 9: 1-8.
3. Bensinger RE, Crabb JW, Johnson CM. Purification and properties of superoxide dismutase from bovine retina. *Exp Eye Res* 1982; 34: 623-630.
4. Dilley R, McConnel D. Alpha-tocopherol in the retinal outer segment of bovine eyes. *J Membr Biol* 1970; 2: 317-326.
5. Penn JS, Thum LA, Naash MI. Oxygen-induced retinopathy in the rat: Vitamin C and E as potential therapies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 1836-1845.
6. Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. *Türk Derm* 1996; 30: 116-122.
7. Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 1996; 27: 41-50.
8. Carini R, Poli G, Dianzani MU, Maddix SP, Slater TF, Cheeseman KH. Comparative evaluation of the antioxidant activity of alpha-tocopherol, alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate and alpha-tocopherol succinate in isolated hepatocytes and liver microsomal suspensions. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 1597-1601.
9. Dintaman JM, Silverman JA. Inhibition of P-glycoprotein by D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). *Pharmacol Res* 1999; 16: 1550-1556.

10. Alagöz G. Deneysel retinal iskemî-reperfüzyon hasarının önlenmesinde L-karnitinin rolü. Uzmanlık Tezi. Fırat Üniversitesi, Elazığ 1999.
11. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 1985; 113: 548-555.
12. Anderson ME. Enzymatic and chemical methods for the determination of glutathione. In: Dolphin D, Poulson R, Avramovic A, editors. *Glutathione: Chemical, biochemical and medical aspects*. Memphis: John Wiley and Sons, 1989: 339-365.
13. Bozkurt N, Kazoğlu H, Bavbek T, Kurtel H, Şan T. Tavşan retinasının iskemî-reperfüzyon hasarından süperoksid dismutaz ve katalazla korunması. Bir niceliksel çalışma. *Türk Oftalmoloji Gazetesi* 1998; 28: 227-236.
14. Hayreh SS, Podhajsky P. Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion. *Arch Ophthalmol* 1982; 100: 1585-1589.
15. Nayak MS, Kita M, Marmor MF. Protection of rabbit retina from ischemic injury by superoxide dismutase and catalase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2018-2022.
16. Sverak J, Peregrin J, Kralove H. Electroretinographic intensity-response curves in the central retinal artery occlusion. *Arch Ophthalmol* 1986; 79: 526-530.
17. Faberowski N, Stefannsson E, Davidson RC. Local hypothermia protects the retina from ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 2309-2313.
18. Gupta LY, Marmor MF. Mannitol, dextrometorphan and catalase minimize ischemic damage to retinal pigment epithelium and retina. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 383-388.
19. Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, Averbukh E. Protection of the transiently ischaemic cat retina by zinc-desferrioxamine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 1212-1222.
20. Reiter RJ, Tan DX. Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Acta Pharmacol Sinica* 1998; 19: 575-581.
21. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1998; 16: 947-953.
22. Pulido JS, Fukuda M, Howe CA, Puro DG. Barbiturates protect retinal cells from hypoxia in cell culture. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 409-411.
23. Yoon YH, Marmor MF. Dextrometorphan protects retina against ischemic injury. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 409-411.
24. Kim SY, Nayak MS, Kita M, Marmor MF. Elektoretinogram recovery in the rabbit after repetitive short-term ischemia in the light and dark. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 664-668.
25. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *New Eng J Med* 1985; 312: 159-166.
26. Esterbauer H, Dieber-Rothender M, Striegi G, Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 314-321.
27. Stocker R, Frei B. Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma, oxidative stress. *Clinica Chim Acta* 1991; 42: 213-243.
28. Goss-Sampson MA, Kriss T, Muller DPR. Retinal abnormalities in experimental vitamin E deficiency. *Free Rad Bio & Med* 1998; 25: 457-462.
29. Muller DPR, Lloyd JK, Wolff OH. Vitamin E and neurological function. *Lancet* 1983; 1: 225-228.
30. Terrasa A, Guajardo M, Catala A. Lipoperoxidation of rod outer segments of bovine retina is inhibited by soluble binding proteins for fatty acids. *Mol Cell Biochem* 1998; 178: 181-186.
31. Winterbourn CC, Metodieva D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1994; 314: 284-290.
32. Singh SP, Wishnok JS, Keshive M, Deen WM, Tannenbaum SR. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14428-14433.
33. Bougle D, Vert P, Reichart E, Hartemann D, Heng EL. Retinal superoxide dismutase activity in newborn kittens exposed to normobaric hyperoxia: Effect of vitamin E. *Pediatr Res* 1982; 16: 400-408.