

**T.C.
S.B. ANKARA NUMUNE
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
GÖZ HASTALIKLARI KLİNİĞİ**

**İKİ FARKLI DENEYSEL GLOKOM MODELİNDE
TOPIKAL BRİMONİDİN VE
KOENZİM Q10+VİTAMİN E'NİN NÖRON KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Selcan EKİCİER ACAR

UZMANLIK TEZİ

**ANKARA
2017**

**T.C.
S.B. ANKARA NUMUNE
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
GÖZ HASTALIKLARI KLİNİĞİ**

**İKİ FARKLI DENEYSEL GLOKOM MODELİNDE
TOPIKAL BRİMONİDİN VE
KOENZİM Q10+VİTAMİN E‘NİN NÖRON KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Selcan EKİCİER ACAR

UZMANLIK TEZİ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. M. Sinan SARICAOĞLU**

**ANKARA
2017**

TEŞEKKÜR

Tezimin gerçekleştirilmesinde büyük emeği geçen, uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim, meslek sevgisi ve azmiyle örnek aldığım bana her türlü desteği hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak sunan değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Murat Sinan Sarıcaoğlu'na, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, iyi bir göz hekimi olarak yetişmem için gayret gösteren Op. Dr. Ahmet Karakurt ve Prof. Dr. Defne Kalaycı'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bize olan desteğini her zaman yanımda hissettiğimiz idari sorumlumuz Prof. Dr. Özlem Evren Kemer' e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık sürem boyunca her zaman eğitimime katkıda bulunan kliniğimiz uzman doktorlarına, birlikte çalışmaktan sonsuz mutluluk duyduğum asistan dostlarıma teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanmasında bana her zaman yardımcı olan Gazi Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Zeynep Aktaş'a ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniğinden Uzm. Dr. Aysel Çolak'a teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında maddi destek sağlayan Türk Oftalmoloji Derneği Ankara Şubesi'ne ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Bilimsel Araştırmalar Destekleme Fonu'na teşekkür ederim.

Beni büyük özveri, titizlik ve özen ile yetiştiren, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen canım anneme sonsuz teşekkür ederim.

Sevgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, sınav ve tez çalışma sürecimde elinden gelen her türlü yardımı gösteren sevgili eşim Fahri Acar'a gönülden teşekkür ederim.

Dr. Selcan Ekicier Acar
Ankara, 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. GÖRME SİSTEMİ.....	3
2.1.1. Gözün yapısı.....	3
2.1.2. Sıçan Görme Sistemi.....	11
2.2. GLOKOM	12
2.3. GLOKOM VE NÖRON KORUMA.....	17
2.3.1. Glokomatöz Hasarın Patogenezi	19
2.3.2. Retina Ganglion Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	21
2.3.3. Glokomatöz Hasarda Glutamatın Rolü ve Eksitotoksisite.....	22
2.3.4. Glutamat Nörotoksisitesinin Oluşum Mekanizmaları.....	26
2.3.5. Brimonidin ve Nöroproteksiyon.....	27
2.3.6. Antioksidanlar ve Nöroproteksiyon	28
2.4. DENEYSEL GLOKOM MODELLERİ	29
2.4.1. Geçici İskemi Modeli	29
2.4.2. Mekanik Optik Sinir Hasarı Modeli.....	29
2.5. İMMUNOHİSTOKİMYASAL MARKERLAR.....	30

3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. DENEKLER.....	31
3.2. DENEYSEL GLOKOM MODELİ	32
3.2.1. Mekanik Optik Sinir Hasarı Modeli	32
3.2.2. Geçici Retinal İskemi Modeli	34
3.3. DOKULARIN HAZIRLANMASI- İMMUNOHİSTOKİMYA.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Retina ganglion hücre sayımı.....	36
4.2. Brimonidin – Mekanik Sinir Hasarı.....	37
4.3. Brimonidin- Geçici İskemi.....	40
4.4. Koenzim Q10+Vit.E- Mekanik Sinir Hasarı Modeli	43
4.5. Koenzim Q10+Vit.E- Geçici Retinal İskemi Modeli.....	46
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ	59
ÖZET.....	60
ABSTRACT.....	61
7. KAYNAKLAR	62

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 4.1. Normal retinalar ile deneysel glokom modellerindeki (1. grup ve 4. grup) RGH sayılarının karşılaştırılması	36
--	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1. Retinanın histolojik kesiti.	4
Şekil 2.2. Koni ve Basillerin bölümleri	6
Şekil 2.3. Işık uyarımı ile rodopsinde meydana gelen değişimler.....	7
Şekil 2.4. Fotoreseptör dış segmentinde cGMP-kapılı kanallarda ışığın neden olduğu değişimler.	8
Şekil 2.5. Glutamat salınımı ve geri alınımı.....	23

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 3.1.	Mekanik optik sinir hasarı modeli	33
Resim 3.2.	Geçici retinal iskemi modeli	34
Resim 4.1.	Normal retina (A) ile mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol grubu (1. grup) (B) karşılaştırılması	36
Resim 4.2.	Normal retina (A) ile Geçici retinal iskemi modeli kontrol grubu (4. grup) (B) karşılaştırılması.....	37
Resim 4.3.	Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (2. grup) (B) karşılaştırılması.....	38
Resim 4.4.	Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (2. grup) (B) karşılaştırılması.....	39
Resim 4.5.	Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (2. grup) (B) karşılaştırılması.....	39
Resim 4.6.	Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (2. grup) (B) karşılaştırılması.....	40
Resim 4.7.	Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (5. grup) (B) karşılaştırılması.....	41
Resim 4.8.	Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (5. grup) (B) karşılaştırılması.....	41
Resim 4.9.	Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (5. grup) (B) karşılaştırılması.....	42

Resim 4.10. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (5. grup) (B) karşılaştırılması.....	42
Resim 4.11. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (3. grup) (B) karşılaştırılması.....	44
Resim 4.12. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (3. grup) (B) karşılaştırılması.....	45
Resim 4.13. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (3. grup) (B) karşılaştırılması.....	45
Resim 4.14. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (6. grup) (B) karşılaştırılması.....	46
Resim 4.15. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (6. grup) (B) karşılaştırılması.....	47
Resim 4.16. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (6. grup) (B) karşılaştırılması.....	47
Resim 4.17. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (6. grup) (B) karşılaştırılması.....	48

1. GİRİŞ

Glokom sinsi seyirli, tanı gecikmesi durumunda görme kaybı ile sonuçlanan ilerleyici bir optik nöropatidir. Hastalıkta göz içi basınç yüksekliği önemli ve kontrol edilebilir bir faktör olmakla birlikte, diğer faktörler de patogeneze büyük önem taşır. Nitekim göz içi basıncı (GİB)'ndan bağımsız ya da düşük GİB'ye rağmen gelişen ve/veya ilerleme gösteren olgular söz konusudur. Özellikle nörotrofin desteğinin azalması ve oksidatif stres ile RGHlerinde gelişebilecek mitokondriyal hasar, konunun son zamanlarda dikkat çeken ve üzerinde çalışmaların yoğunlaştığı önemli bir parçasıdır. Bu noktadan hareketle glokomda nöron koruyucu ve antioksidan tedavilerin yeri ve değeri tartışılmaya başlanmıştır.

Nöron koruyucu ilaçlar, multiple skleroz (MS), Alzheimer, amiotrofik lateral skleroz (ALS) ve Parkinson gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda kullanılmaktadır. Nöron koruyucu ilaçların glokom hastalığında kullanımı ise, son yıllarda yoğun bir biçimde çalışılmaktadır. Bu ajanlar glokomatöz nöropati patogenezinde rol oynayan pek çok faktöre etki edebilmekle birlikte, çoğunun etkisi deneysel çalışmalarda gösterilmiş olup, bir kısmına ait faz çalışmaları devam etmektedir.

Bir alfa-2 mimetik adrenerjik ajan olan brimonidinin, GİB düşürme yanında nöron koruyucu etkisi de, deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Nöron koruyucu etkinliği, esas olarak hücre dışı sinyaller ile düzenlenen özel kinazların (ERK ve Akt) aktivasyonu sonucunda, anti-apoptotik protein olan Bcl-2'yi arttırmak yoluyla gerçekleşmektedir. Bunun yanında özel protein kinazları uyararak apoptotik yolları inhibisyon, nörotrofik faktör salınımı, glutamat salınım inhibisyonu ve doğrudan NMDA reseptör inhibisyonu gibi etkileri de bulunmaktadır. Düşük basınçlı glokom grubunu yayınladıkları son çalışmada, brimonidin kullanan olgularda timolol maleata oranla, görme alanında daha az progresyon bildirmişlerdir.

Glokomda, mitokondriyel fonksiyonların bozularak hücre için gerekli enerjinin yeterince üretilmediği ve bunun da RGH yaşamı üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Biyoenerjik tedavi yaklaşımları, mitokondriyel fonksiyonlara etki ederek ATP üretimini arttırmaya yönelik yöntemlerdir. Koenzim Q10 (CoQ10)

ve vitamin E (vit.E) antioksidan özelliği olan iki moleküldür. CoQ10 mitokondriyal membran potansiyelinin devamlılığını sağlayarak, ATP üretimini destekleyerek, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini inhibe ederek nörodejeneratif hastalıklarda nöron koruyucu etki oluşturan temel kofaktördür.

Çalışmamızda ratlarda deneysel glokom modeli oluşturularak, brimonidin ve CoQ10+Vit.E'nin nöron koruyucu etkinliklerinin araştırılması planlanmıştır. Glokom hastalarında GİB'nin düşürölmesini hedefleyen hipotansif tedavi stratejileri yanında, bu iki molekülden hareketle nöron destekleyici tedavi yaklaşımının etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

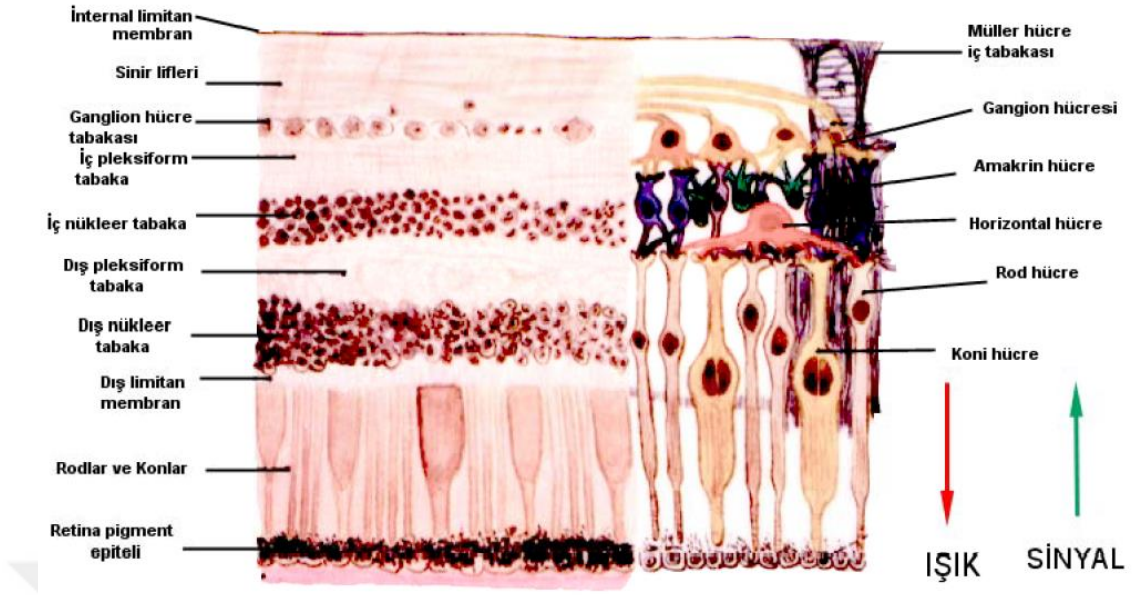
2.1. GÖRME SİSTEMİ

2.1.1. Gözün yapısı

Görme duyusunun görme merkezine ulaştırılmasında görevli olan göz, dıştan içe doğru sklera, koroid ve retina olmak üzere üç tabakadan oluşur. Gözün ön tarafında sklera tabakası yerini ışığa karşı geçirgen ve saydam kornea tabakasına bırakır. Göz merceği ve kornea gelen ışığı kırarak retinanın üzerine düşmesini sağlarlar. Koroid kan damarlarını ve ışığı absorbe ederek göz içinde yansımaları engelleyen melanin pigmentini içerir ve gözün renkli görünen kısmını, irisi oluşturur. İriste bulunan düz kaslar gelen ışığın şiddeti doğrultusunda pupil açıklığını düzenler [1]. Pupilin arkasında saydam, bikonveks ve esnek özellikte lens bulunur. En iç tabaka olan retina ışığa duyarlı fotoreseptörler hücrelerini içerir. Retina histolojik olarak incelendiğinde 10 tabakadan oluştuğu görülür

Bu tabakalar içten dışa doğru:

- 1-İç limitan membran
- 2-Sinir lifleri tabakası
- 3-Ganglion hücreleri tabakası
- 4-İç pleksiform tabaka
- 5-İç nükleer tabaka
- 6-Dış pleksiform tabaka
- 7-Dış nükleer tabaka
- 8-Dış limitan membran
- 9-Koni ve basiller
- 10-Retina pigment epiteli'dir.



Şekil 2.1. Retinanın histolojik kesiti.

Bruch Membranı: Bruch membranı RPE ile koryokapiller dokuyu birbirinden ayırmaktadır.

Retina Pigment Epiteli: Tek katlı heksagonal hücrelerden oluşur. Hücreler arası zonula adherens ve zonula ocludens denilen sıkı bağlantılar sayesinde dış kan-retina bariyerini oluşturur. Retina yüzeyindeki mikrovilluslar sayesinde, fotoreseptör hücrelerin pigment içeren ışığa duyarlı dış segmentlerini sarar ve atılan dış segment parçalarını fagositoz yoluyla temizler. İçerdikleri melanin granülleri sayesinde ışık saçılmalarını absorbe etmek, fotoreseptör dış segmentindeki vitamin A metabolizmasına katılmak, interfotoreseptör matriks içeriğini muhafaza etmek, konların dış segmentini saran kılıflarla metabolik alışveriş ve koryokapillardan gelecek olan maddelerin retinaya aktif transport yoluyla seçici olarak iletilmesini sağlamak diğer görevleridir [2].

Fotoreseptör hücreler: Rod ve konlar iç ve dış segmentlerden oluşmuştur, rod ve konların iç segmentlerinde sentez organelleri ve nukleusları bulunur. İç segmentler silium adında dar ve ince bir parçayla ışığa duyarlı pigmentler içeren dış segmentlerle bağlantılıdır. Rod hücrelerinde 500 nm dalga boyuna duyarlı rodopsin denilen bir pigment bulunmaktadır, rodopsin aracılığıyla rodlar karanlıkta görmeden

sorumludur. Konlar ise fotopigmentlerinde birbirinden farklı 3 opsin türevi içerirler ve buna göre de 3 farklı alt gruba ayrılırlar:

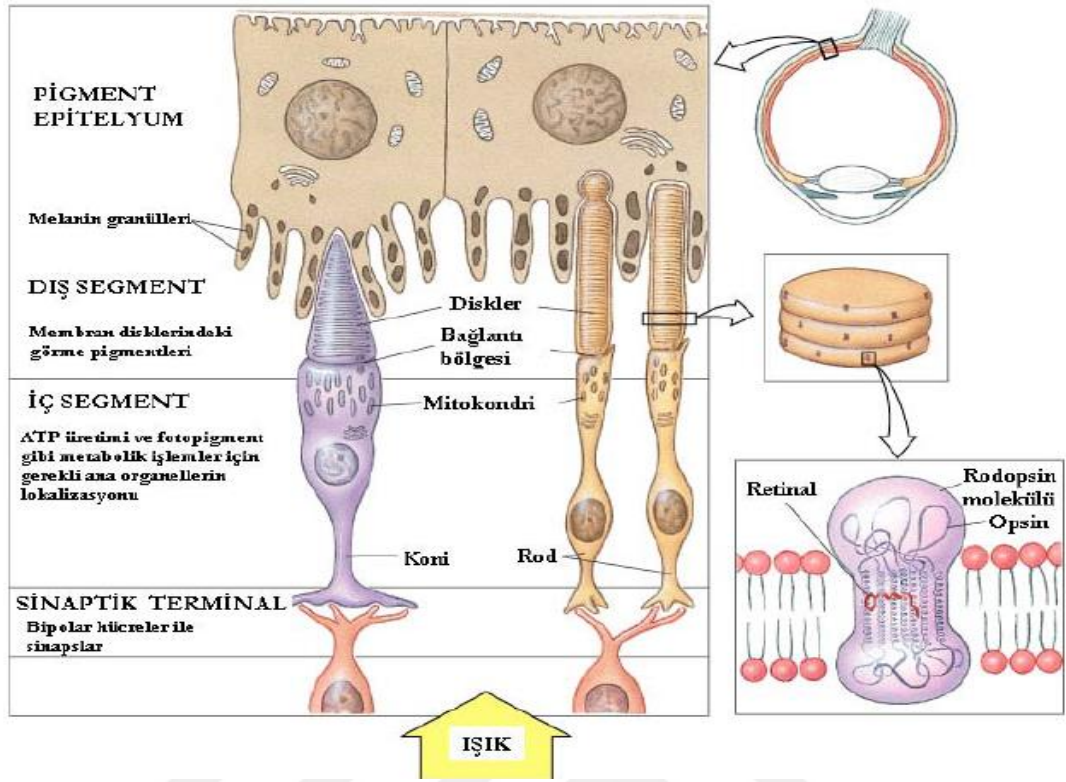
564 nm (kırmızı) ışığa duyarlı pigment içeren L konlar,

533 nm (yeşil) dalga boyuna duyarlı M konlar ve

437 nm (mavi) dalga boyuna duyarlı S konlar.

Santral foveada sadece kırmızı ve yeşil konlar bulunurken; rodlar ve mavi konlar hiç bulunmaz. Rodlar perifoveal alanda yoğunlaşırken kon yoğunluğu en fazla foveal bölgede bulunur (yaklaşık 160.000/ mm²). Retinada toplam 4.6 milyon kon mevcutken 92 milyon rod olduğu düşünülmektedir.

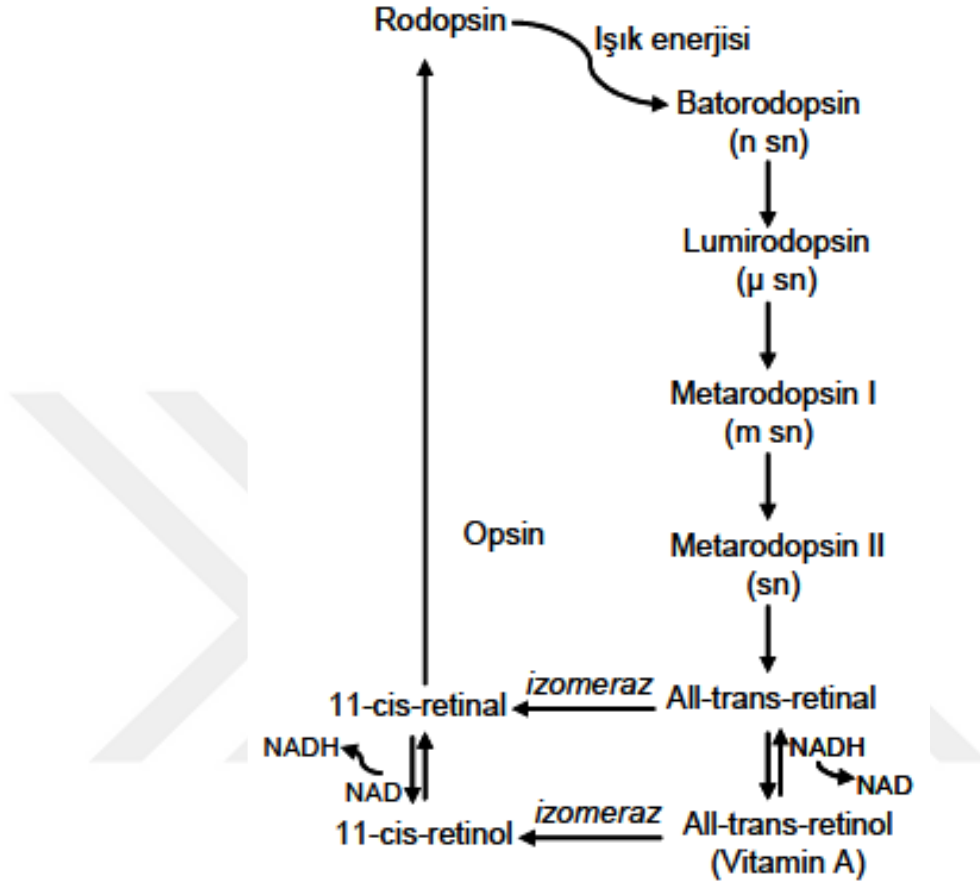
Rodlar ve koniler dış segment, iç segment, sinaptik terminal olmak üzere üç bölge içerirler [3]. Dış segmentte fototransdüksiyon gerçekleşir. Bu bölümde ışığı emen görüntü pigmentleri vardır. Rodlarda tek tip konilerde ise üç tip (mavi, yeşil ve kırmızı) görme pigmenti bulunur. Rodlar ve koniler, ışığı absorbe eden çok sayıda molekül içerir (her hücrede 108 tane) ve hücrelerde zarın yüzey alanını ciddi biçimde genişleten, zarımsı disklere dönüşmüşlerdir. Konilerde, diskler plazma zarının devamındayken, rodlarda plazma zarından ayrılmış ve hücre içi bir organel haline gelmiştir. İç segment, retinanın içinde daha proksimal olarak yerleşmiştir, hücrenin çekirdeğini ve pek çok biosentetik parçasını içerir. İç segmentte sitoplazma ve sitoplazmik organeller bulunur. Bu segmentteki mitokondriler fotoreseptör işlevi için enerji sağlamada önemli rol oynarlar. Sinaptik terminal, koni ya da rodun horizontal ve bipolar hücreler ile bağlantısını sağlayan bölümdür [2, 4]. Fotoreseptörler de diğer nöronlar gibi, bölünmez ancak dış bölümlerini sürekli olarak yenilerler. Yeni diskler hızla oluşur, eski diskler ise pigment epitel hücrelerinin fagositik hareketleri ile atılır [4].



Şekil 2.2. Koni ve Basillerin bölümleri

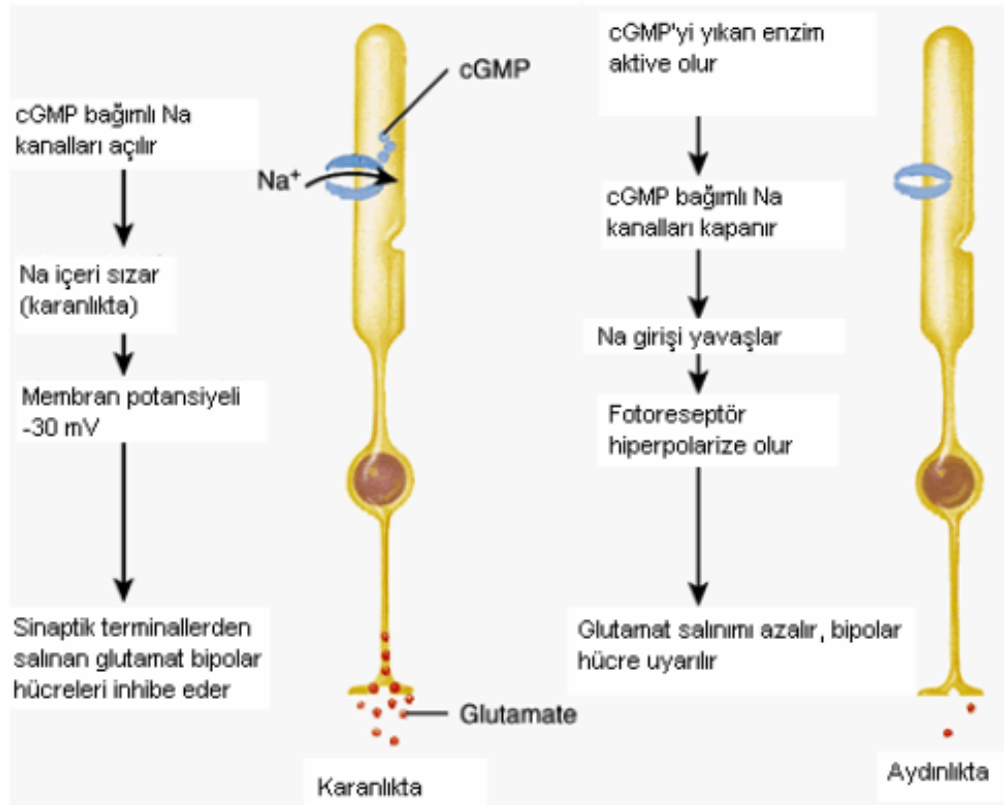
Işık elektriksel değişikliklerin oluşması ile sonuçlanan biyokimyasal reaksiyon basamaklarını tetikler ve fotokimyasal değişikliklere neden olur. Bu fotokimyasal değişiklikler rodlarda ve konilerde meydana gelir. Rodlarda bulunan ışığa duyarlı maksimum absorpsiyon spektrumu 500 nm olan rodopsin pigmenti vardır. Konilerde bulunan ışığa duyarlı kimyasal madde ise iodopsindir [2]. Rodopsin opsin proteini ve karotenoid pigmenti olan retinalin (Vitamin A aldehiti ya da 11-cis-retinal) birleşiminden oluşur. Işık, retina tarafından absorbe edilince rodlarda bulunan 11-cis-retinali all-trans-retinale dönüştürür. All trans-retinal opsinden ayrılır. Bu işleme fotodekompozisyon adı verilir. Bu parçalanma sonucunda ortaya çıkan batorodopsin nanosaniyeler içinde lümirodopsine dönüşür. Lümirodopsin mikrosaniyeler içinde metarodopsin I i, sonra yaklaşık bir milisaniye içinde metarodopsin II yi ve sonuçta çok daha yavaş bir şekilde tamamen parçalanmış ürünler olan opsin ve all-trans retinali oluşturur [2]. All-trans retinal, A vitaminin bir şekli olan all-trans retinole dönüşür. Sonra all-trans retinol, izomeraz enziminin

etkisiyle 11-cis retinole dönüştürülür. 11 cis retinal rod dış segmentinde opsin ile birleşerek rodopsini meydana getirir [5].



Şekil 2.3. Işık uyarımı ile rodopsinde meydana gelen değişimler

Işık 11-cis retinali aktive eder ve fosfodiesteraz enziminin aktivasyonunu sağlar. Bu enzim cGMPyi hidrolize ederek cGMPnin sitoplazmik yoğunluğunu düşürür. cGMP bağımlı kanallar (Na^+ ve Ca^{2+}) kapanır ve fotoreseptör hiperpolarize olur. Hiperpolarizasyon fotoreseptörün ucuna pasif olarak iletilir ve hücreden nörotransmitter salınımı azalır. Daha sonra Ca kanallarının kapanması nedeniyle Ca konsantrasyonundaki düşüş, kalsiyuma duyarlı proteini aktifleştirerek, Guanilat Siklaza bağlanmasına ve daha fazla cGMP üretilmesine neden olur. Bu da Na^+ ve Ca^{2+} kanallarının açılmasını ve hücrelerin tekrar dinlenim durumuna dönmesini sağlar [2].



Şekil 2.4. Fotoreseptör dış segmentinde cGMP-kapılı kanallarda ışığın neden olduğu değişimler.

Dış Nükleer Tabaka: Bu tabakada rod ve kon hücrelerinin gövde ve nukleusları bulunmaktadır.

Dış Pleksiform Tabaka: Burada rod ve konların terminal uçları horizontal ve bipolar hücrelerin dendritleriyle sinapslar yaparlar. Fotoreseptörlerin invajinasyon yoluyla şekillenmiş sinapslarına, her sinapsta bir bipolar ve iki horizontal hücre ile bağlantı kurulduğundan 'triad' adı verilir. Rod hücrelerinin tek triadı olurken, konların birden fazla triadı bulunmaktadır.

İç Nükleer Tabaka: Bu katmanda çeşitli hücrelerin çekirdekleri ve hücre gövdeleri bulunmaktadır. Dıştan içe sırasıyla horizontal hücreler, bipolar hücreler, interpleksiform hücreler ve en içte amakrin hücreler bulunmaktadır. Horizontal hücrelerin görevi fotoreseptör – bipolar hücre sinaptik bağlantılarında elektriksel iletiyi işlemektir. Bipolar hücreler iki kutuplu yapılarıyla rod ve konlardan aldıkları iletiyi iç pleksiform tabakada (İPT) RGH'ye iletirler. Rodlar için özel ve tek tip bir

bipolar hücre tipi mevcuttur ve her rod bipolar hücresi santral retinada 40-50; periferde ise 15-20 rod sferülü ile bağlantılıdır. Tüm bu rod bipolar hücreleri 'on (açık)' ileti hücresidir. Kon bipolar hücreleri ise 'on' ve 'off' ileti tipiyle 2 ana gruba ayrılır.

'On' ileti taşıyan kon bipolar hücreleri İPT'nin iç katmanlarında, 'off' ileti taşıyanlar ise İPT'nin dış katmanlarında gangliyon hücreleriyle sinaps yaparlar. Kon bipolar hücreleri yapısal olarak da diffüz bipolar ve midget bipolar hücreler olarak iki gruba ayrılmışlardır. Diffüz olanlar birden fazla konla ilişkili iken midget tipi bipolar hücreler yalnızca birer konla bağlantılıdır. Dev müller hücrelerinin çekirdekleri de iç nükleer tabaka (İNT) da olup yapı olarak glial kökenli hücreler olduklarından ileride nöroglia başlığı altında ele alınacaklardır. Amakrin hücreler İNT'nin en iç bölgesinde bulunan hücre grubudur. Bu hücreler lateral bağlantılarıyla diğer amakrin hücreler, bipolar ve RGH ile iletişim halindedirler ve sinaptik bileşkelere etkileriyle horizontal hücreler gibi elektriksel iletinin modifikasyonunda rol alırlar.

İç Pleksiform Tabaka: İNT'de bulunan farklı hücre gruplarıyla RGH bu tabakada sinaptik bağlantılar yaparlar.

Gangliyon Hücre Tabakası: RGH'nin hücre gövdesinin bulunduğu bu tabakada tüm retinal yüzeyde yaklaşık 1.5 milyon hücre bulunduğu düşünülmektedir. RGH'nin İPT'ye uzanan dendritik uzantıları ve SLT'ye katılan birer aksonları bulunmaktadır.

Retinal ganaglion hücreleri iki fonksiyonel sınıfa ayrılır: M (magno, büyük) ve P (parvo, küçük). M hücrelerinin büyük alıcı alanları vardır ve devamlı aydınlanmaya geçici olarak tepki verirler. Optimum olarak büyük nesnelere tepki verirler ve uyarıcılardaki ani değişiklikleri fark edebilirler. Daha küçük olan P hücreleri ise görüntüdeki detaylardan sorumlu olarak kabul edilir.

Optik siniri gangliyon hücrelerinin aksonları oluştururlar. Retinanın nazal yarımından gelen lifler optik kiazmada çaprazlaşarak, temporal yarımından gelenler ise çapraz yapmadan dorsal genikülat nükleusa girerler ve sinaps yaparlar. Dorsal

genikülat nükleus; görsel bilgi sinyallerinin ne kadarının kortekse geçeceğinin bilgisini, optik radyasyon (genikülokalkarin traktus) yolu ile görme korteksine iletme ve kontrol etmede işlev görür. Dorsal genikülat nükleusta M hücrelerinden sinyalleri alan magnoselüler tabaka (1. ve 2. tabakalar), P hücrelerinden sinyalleri alan parvoselüler (3, 4, 5 ve 6. tabakalar), olmak üzere iki alt tabaka bulunmaktadır. Bu tabakada bulunan nöronlar morfolojik ve fizyolojik olarak farklılık gösterirler. Parvoselüler ve magnoselüler tabakada bulunan nöronlar görsel korteksin farklı tabakalarına parvoselüler ve magnoselüler sistem olarak isimlendirilen ayrı kortikal yollarla ulaşırlar [4]. Diğer yandan, hem parvoselüler hem de magnoselüler yoldan primer görme korteksine (17. alan) giriş yapan üçüncü bir sistem de bulunmuştur. Diğer iki yoldan tamamen farklı olan bu sistem renkli görmeden sorumlu olup, mitokondriyal bir enzim olan sitokrom oksidazı bol miktarda içeren ve renk damlaları (blob) adı verilen bölgelerde (17. bölge) sonlanır. Magno sistem hareket ve derinlik algılanmasından, parvosistem şekillerin ayırt edilmesinden ve hızlı yersel değişikliklerin algılanmasından, blob sistem ise renkli görmeden sorumludur. Dorsal genikülat nükleustan çıkan görsel bilgi sinyalleri primer görme korteksine ulaşır. Görme korteksi primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Sekonder görme korteksine görsel asosiyasyon alanları da denir. Görsel uyaranların analizi için primer görme korteksinden gelen sinyallerin iletildiği alanlardır [4].

Sinir Lifi Tabakası: Optik disk kenarında en kalın halinde 20-30 µm olan SNT periferde doğru incelererek devam eder. Bu katman RGH'nin aksonlarının MH ve astroglial hücrelerce birbirlerinden ayrılmış şekilde demetler halinde organize olmasıyla oluşmuştur. Retina genelinden OD'ye uzanan aksonlar en kısa mesafeyi katedecek şekilde dizilmişken foveanın temporalinden gelen aksonal demetler foveanın etrafını dolaşacak şekilde arkuat fibrilleri oluşturarak OD'ye ulaşırlar. RGH aksonları 0,6-2 µm kalınlıkta olup, intraretinal seyirleri boyunca myelinsizdirler, ancak OD'in lamina kribrozastan geçtikten sonra myelin kılıfı ile sarılırlar ve bu nedenle optik sinir lamina kribroza'dan sonra çap olarak genişler. Maküladan çıkıp OD'ye uzanan liflerin toplamına ise "papillomaküler band" adı verilir [2].

İnternal limitan membran: İLM retina iç yüzeyinde gerçek bir bazal membrandır. Retinal yüzey ise retinanın ana glial hücresi olan müller hücrelerin

ayaksı çıkıntılarında oluşmaktadır. OD kenarında astroglial hücrelerin bazal laminası olarak devam eder ve Elschnig membranı olarak adlandırılır. ILM; inceldiği vitre bazı ya da fovea gibi bölgelerde vitreal kortekse sıkı bağlantılar içerir.

Nöroglia: Genel olarak retinanın destek hücreleridir ve bariyer oluşturma, yapısal organizasyon, sinir hücre ve uzantılarının izolasyonu, herhangi bir zedelenmede retinal tamir (gliosis) ve rejenerasyondan sorumludurlar. Retinada bulunan glial hücreler yapı ve fonksiyon açısından merkezi sinir sistemindeki glial hücrelerle birçok açıdan benzerler. Embriyolojik köken ve morfolojik açıdan makroglia ve mikroglia olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Makroglial hücreler embriyolojik olarak nöral katlantıdan köken alırlar ve retinanın en büyük hücresi olan müller hücreleri ve astroglialardan oluşurlar. Mikroglial hücreler vasküler endotel hücreleri ve perisitler gibi mesodermal kökenlidir, morfolojik olarak çok daha ufak boyutlardadır [2].

2.1.2. Sıçan Görme Sistemi

Rat retinasını oluşturan elementler alıcı hücreler ve onların arasındaki etkileşimi sağlayan tabakalar şeklindedir. Retina rat gözünün 175 derecelik kısmını kaplar. Optik sinir %6,5 luk alanı oluşturur. Kan damarları optik diskten eşit olarak çıkar ve foveal depresyonun herhangi bir göstergesi yoktur.

Retinada üç farklı nöral element ve bir tek yapısal eleman olan müller hücresi bulunur. Nöronal unsurlar şunlardır: (1) reseptörler, (2) iç nöronlar ve (3) efferent nöronlar. Reseptörler tipik memeli rod hücreleridir. İç nöronlar horizontal hücreler, bipolar hücreler ve amakrin hücrelerdir. Efferent nöronlar gangliyon hücreleridir.

Rat retinası tabakaları şu şekildedir [6]:

- a) Pigmente hücre tabakası
- b) Reseptör tabakası
 - Reseptör hücrelerin dış segmentleri
 - Reseptör hücrelerin iç bölümleri

c) Dış nükleer tabaka

- Reseptör hücre somaları

d) Dış pleksiform tabaka

e) İç nükleer tabaka

- Horizontal hücre somaları

- Bipolar hücre somaları

- Amakrin hücre somaları

f) İç pleksiform tabaka

g) İç nükleer tabaka

- Ganglion hücre somaları

Sıçanlar, insanlara göre, retinada, lateral geniculate nukleusta ve görme korteksinde çok az özelleşme gösterirler. Sıçanlar renkli görmeden ve tahminen blob sisteme karşılık gelen bir sistemden yoksundurlar. Sıçanların temporal (zamansal) frekansları ayırt etme yetenekleri vardır [7]. Magno sisteme karşılık gelen bir sistem varken, parvo sistemine karşılık bir sistemlerinin olduğu şüphelidir. Çünkü uzaysal rezolüsyonları insanlarınkinden daha küçüktür. Türler arası topografik özelleşme ve algı yeteneklerindeki farklılıklara rağmen, iki tür arasında nitelik olarak parvoselüler ve magnoselüler sistemlerinde benzerlik bulunmaktadır. Primatlara benzer olmakla birlikte, sıçanların görsel yolları retinal ganglion hücrelerinin morfolojisi, optik traktustaki sinir liflerinin hızı, retinal ganglion hücrelerinin, lateral geniculate nukleusta tabakalarındaki dağılımı, talamokortikal projeksiyonların kortikal dağılımı ve ileti hızları, dLGN'deki nöronların reseptif alan özellikleri ve görsel korteks bakımından fonksiyonel ve yapısal olarak farklılıklar gösterirler [7].

2.2. GLOKOM

Glokom genellikle GİB'nin artışı ile seyreden, optik sinir başında çanaklaşma; RGH dejenerasyonu ve görme alanı kaybı oluşturan, kronik optik nöropatidir. Glokom dünya çapında geriye dönüşsüz ve önlenabilir körlüğün en önde

gelen nedenidir [8]. Glokomun görülme insidansı çeşitli yazarlara göre %0.47 ile %8 arasında değişmektedir. Aynı zamanda bu insidans yaşla birlikte artmaktadır [8].

2.2.1. Glokomun Sınıflandırması

2.2.1.1. Edinsel Glokomlar

Açık Açılı Glokom

1. Trabekülum Öncesi Engel (membran oluşumu)

- a) Neovasküler Glokom
- b) Travma
- c) Ön Kamaraya Doku İlerlemesi
- d) İltihabi Membranlar (Fuchs Heterokromik Sikliti, İnterstisyel Keratit)

2. Trabekülum Engeli

- a) Süzme Yeteneğinde Azalma
 - Primer Açık Açılı Glokom
 - Steroid Glokomu
- b) Trabekülum Ağında Birikim
 - Alyuvar Birikimi
 - *Hemorajik Glokom
 - *Hayalet Hücreli Glokom
 - Makrofaj Birikimi
 - *Hemolitik Glokom
 - *Fakolitik Glokom
 - *Melanolitik Glokom
 - Neoplastik Hücre Birikimi

*Malign Tümörlere Bağlı Glokom

*Jüvenil Ksantogranüloma Bağlı Glokom

-Pigment Partikülleri Birikimi

*Pigmenter Glokom

*Pseudoeksfolyasyon Glokomu

*Üveite Bağlı Glokom

*Malign Melanoma Bağlı Glokom

-Protein Birikimi

*Lense Bağlı Glokom (Fakolitik ve Fakoanaflaktik Glokom)

-Viskoelastik Maddeye Bağlı Glokom

-Vitreusa Bağlı Glokom

-Alfa Kimotripsin Glokomu

c) Trabekülumda Değişiklik

-Ödem

*Trabekülitis

*Episklerit ve Sklerit

*Alkali Yanığı

-Travmatik Açı Resesyonu

-Göz içi Yabancı Cisim

*Şalkosis

*Siderosis

3.Trabekülum Sonrası Engel

a) Schlemm Kanalı Tıkanması

-Schlemm Kanalı Kollapsı

-Orak Hücre ile Tıkanma

b) Yüksek Episkleral Venöz Basınç

- Karotiko-Kavernöz Fistül
- Kavernöz Sinüs Trombozu
- Retrobulber Tümör
- Troid Oftalmopati
- Vena Kava Süperior Tıkanması
- Mediastinal Tümörler

Açı Kapanması Glokomu

1. İrisin Öne Çekilmesi

- a) Membran Kontraktürü
 - Neovasküler Glokom
 - Travma
- b) İnflamatuvar Membran Kontraktürü

2. İrisin Öne İtilmesi

- a) Pupilla Bloklü
 - Pupilla Bloğu Glokomu
 - Lense Bağlı Glokom
 - Şişkin Lens
 - *Sublukse Lens
 - *Hareketli Lens
 - Çevresel Ön Yapışıklıklar
 - *İris-Vitreus Bloğu
 - *Pseudofakik Glokom
 - *Üveit

b) Pupilla Bloksuz

- Plato İris
- Malgn Glokom (Silyer Blok Glokomu)
- LenseBağlı Glokom
- LensEkstraksiyonu
- Sklerl ökertme
- Panetinal Fotokoagölasyon
- Santal Retinal Ven Tıkanması
- Gözİçi Tümörler
- Ön vea Kistleri

2.2.1.2. Doğumsal ve Gelişimsel Glokomlar

Açık Açılı Glokom:

1. Trabekülüm Öncesi Nedenler

- a) İrido-Korneal Endotelyal Sendrom
- b) Posterior Polimorf Distrofisi

2 Trabeküler Nedenler

- a) Ön Kamara Açısının Tıkanması
 - Tümr Hücreleri
 - Açıd Anomali
 - *Primer Konjenital Glokom
 - *Juvenil Glokom
 - *Axenfeld-Rieger Sendromu
 - *Peter's Anomalisi
 - *Aniridi

3. Trabekülum Sonrası Nedenler

- a) Episkleral Venöz Basıncın Artması
 - Sturge-Weber Sendromu
 - Ailevi Yüksek Episkleral Venöz Basıncı

Açı Kapanması Glokomu:

1. Açıda Membran Kontraktürü

- a) İrido-Korneal Endotelyal Sendrom
- b) Posterior Polimorf Distrofi

2. Pupiller Bloklü

- a) Lens Subluksasyonu
 - Marfan Sendromu
 - Weill-Marchesani Sendromu
 - Homosistinüri

3. Pupiller Bloksuz

- a) Retinoblastom

4. Lens Arkası Membran Kontraktürü

- a) Prematür Retinopati
- b) Persistan Hiperplastik Primer Vitreus

2.3. GLOKOM VE NÖRON KORUMA

Optik sinir hasarının gelişiminde GİB artışı halen en önemli risk faktörü olarak bilinmekle beraber son yıllarda glokomun etyopatogenezinde farklı mekanizmalarında rol oynadığı düşünülmektedir [9, 10]. GİB kontrol edilen bazı hastaların görme alanında görülen ilerleyici hasar ya da GİB normal olan kişilerde izlenen glokom, GİB'nin bu hastalığın tek nedeni olmadığı bilinmektedir [11].

Randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; başarılı GİB kontrolüne rağmen görme alanı kaybının ya da GİB'nin normal olduğu hastalardaki RGH hasarının önüne geçilememektedir [12, 13]. Bu sonuçlar çok sayıda araştırmacıyı GİB'yi düşürmeye yönelik klasik glokom tedavisine ek olarak, yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir.

Nöroproteksiyon RGH'ları canlı ve fonksiyonel kılmayı hedefleyen bir terapötik stratejidir.

Nöroproteksiyonun, glokom ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde geleneksel methodlarla ilişkisi yoktur. Çünkü GİB'den, oküler kan akımından ve diğer mekanizmalardan bağımsızdır. Bunun yerine, nöronun daha uzun yaşamasını hedefleyen bir stratejidir [14].

Glokomda nöroproteksiyonun hedefi RGHlerinin gövdesi, aksonu ve dendritik ağacıdır. Çünkü RGHsi glokomatöz optik nöropati sonucu ölmektedir ve bu kaybın geri dönüşümü olmamaktadır. Retina ganglion hücreleri retinadan çıkış nöronlarıdır ve bu sebeple görsel sinyallerin gözden beyindeki hedef bölgelere ulaştırılmasından sorumludurlar. Bu demek değildir ki, diğer hücre tipleri (örneğin astrositler ya da glia) nöroproteksiyon için önemsizdirler. Ancak optik nöropatinin sonucu RGH kaybı olup, nöroprotektif çabaların amacı bu hücreleri yaşatmaktır [14].

RGH hem normal gelişim sırasında hem de çeşitli optik sinir hastalıklarında apoptoz denen bir tür hücre ölümü ile ölmektedir. Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü; kalıtsal olarak kodlanmış, hücrelere artık ihtiyaç kalmadığında veya bu hücreler ciddi olarak hasarlandığında aktive olan bir tür hücresel intihardır. Henüz tam olarak anlaşılamamış mekanizmalarla hücre ölüm sinyalini alır. İlk olarak gerçekleşen olay hücresel hasarlanmadır. Bu proteinlerin yapılarının bozulması ve DNA'nın ayrışmasıyla olur. Daha sonra mitokondrilerden serbest oksijen radikalleri (SOR) açığa çıkar. Bu ilk hasarlanma bilinmeyen bir proteince düzenlenir, bu protein hücre ölümüne katkısı olan p53 proteinini aktifler. p53 de daha sonra apoptozu devam ettiren Bax genini indüklerken antiapoptotik Bcl-xl'i baskılar. Böylece bir tür proteaz enzim grubu olan kaspazlar harekete geçirilerek hücre apoptotik cisimciklere ayrılıp, makrofaj etkinliği gösteren komşu hücrelerce yok edilir.

Nekrozdan farklı olarak apoptozda; belirli bir hücre grubu değil hücreler ayrı ayrı olaydan etkilenir ve bu durum kalıtsal olarakta kodlanmıştır. Yine apoptozda belirgin bir DNA ayrışması vardır. Apoptotik cisimcikler fagosite edilirken herhangi bir inflamasyon bulgusu izlenmez [15].

2.3.1. Glokomatöz Hasarın Patogenezi

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

Mekanik teori, yüksek basıncın RGH'larda direkt ve indirekt hasara neden olduğunu vurgulamaktadır. Bu mekanizmaya göre, lamina kribrozaya olan baskı nedeniyle akson hasarı olmakta ve sonuçta akson taşıma sistemi engellenerek RGH hasarı oluşmaktadır. Aksoplazmik akımın obstruksiyonu RGH gövdesine nörotrofik faktörlerin retrograd transportunu engeller ve bu faktörlerin lamina cribrosada birikimine neden olur [16, 17, 18, 19].

Deneyisel modellerde, devamlı yüksek basınç RGH mitokondrisini de direkt olarak hasarlamaktadır [20].

Growth faktör açlığı ve mitokondriyal hasar, RGH gen ekspresyon dengesini hücre idamesinden pro-apoptotik yollara saptırabilir

Vasküler hipoteze göre optik sinir başını besleyen damarlardaki perfüzyon basıncının düşüklüğü doku beslenmesini etkiler ve akson atrofisine neden olur.

Aksonal kayıp öncelikle bir iskeminin sonucudur. Çeşitli vasküler bozukluklarda buna hiperlipidemi, arteriyoskleroz, hipertansiyon ve vazospastik hastalıklar da dahil olmak üzere endotel disfonksiyonu olduğunu biliyoruz.

Glokomlu hastalarda, plazma endotelin-1 (ET-1) düzeyi kontrol gurubu ve NTG grubunda daha yüksek bulunmuştur [21].

Bazı glokom formlarında, optik sinir başı (OSB) kan akımında kronik bozulmalara yola açabilecek vasküler disregülasyon olduğuna dair kanıtlar mevcuttur [22].

OSB perfüzyonundaki primer veya sekonder vasküler disregülasyonun sebep olduğu dalgalanmalar iskemi-reperfüzyon sinir hasarını uyarabilir. Primer vasküler disregülasyon vazospastik hastalık tablosu olarak bilinmekte ve Rayno fenomenini ve migreni kapsamaktadır. Sekonder vasküler disregülasyon sistemik ET-1 seviyelerinin arttığı, romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi hastalıklarda görülür [23]. Bazı glokom formlarında bir risk faktörü olan primer vasküler disregülasyon, RGH'larda oksidatif strese neden olan oküler kan akımındaki otoregülasyon bozukluklarından kaynaklanır. Diğer taraftan sekonder disregülasyon glokom için bir risk faktörü olarak görünmemektedir. Olası açıklamalar; bu durumlarda kan akımı global olarak azalır ya da göze patojenik olmayan sistemik seviyesi yükselmiş ET-1 gibi vazokonstriktif peptidlerin parakrin faktörler oluşu gerçeğini içermektedir. Birçok çalışma glokom hastalarında OSB kan akımının azaldığını göstermesine ve hayvan çalışmalarında bu hipotez desteklenmesine rağmen, RGH hasarı ile gerçek ilişkisi henüz açıklanamamıştır [24, 25]. Son zamanlarda, iskemi veya iyonotropik glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması yani eksitotoksisite sonucu olduğu düşünülen glutamata bağlı toksisitenin de glokomda ganglion hücre ölümüne yol açabileceği bildirilmektedir [26]. Glutamata bağlı eksitotoksisite inme, travma, epilepsi, Huntington hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz ve AIDS demansında da gözlenmiştir [27, 28]. Glokomda hasarlanan nöronların santral sinir sistemi ile ilişkili olduğu düşünülürse, eksitatuvar aminoasitlerin glokomdaki ganglion hücre hasarında da rol oynayabileceği olası görünmektedir. Ganglion hücreleri lateral genikulata dek uzanmaları nedeniyle retinada özellikli durumdadır. Buda ganglion hücrelerinde eksitotoksik hasarlanmaya karşı yatkınlık oluşturmaktadır.

2.3.2. Retina Ganglion Hücre Ölüm Mekanizmaları

İlk travmanın tipine bakmaksızın, aksonal hasar RGH'nin ölümünü apoptozis ile indüklemektedir [17, 29]. RGH hasarının ilk belirtileri, dendritik ağacın incilmesi, sonrasında hücre gövde ve aksonlarında boyutlarında küçülmedir [30].

Glokomlu gözlerde GİB yükselmesi sonucu ortaya çıkan akson hasarı eksitatuvar bir aminoasit olan glutamat artışına neden olur. Nöron kaybı ile ekstraselüler ortama glutamat salınır. Glokomda taşıyıcı düzeyinin azalması ile de glutamat düzeyi yükselir. Bu artış NMDA reseptörlerini aktive eder.

Nitrik oksit (NO) etkisi: NMDA reseptörlerinin uyarılması ile NO sentaz enzimi aktive olur. NO bir mesaj mediyatörüdür ve retinal kan akımının düzenlenmesinde, hümeör aköz yapımında görev almaktadır. NO serbest oksijen ile birleşir ve çok güçlü bir toksin olan peroksinitrit anyonlarını oluşturur. Bu da apoptozise yol açar. NO glokomda RGH ölümünde önemli bir mediyatördür.

Nörotrofik Faktörlerin Etkisi: Beyin kökenli nörotrofik faktör (Brain derived neurotrophic faktör, BDNF) reseptörü olan Trk B retinada NO sentaz ile aynı lokalizasyondadır. BDNF ile Trk B uyarımı aynı zamanda NO sentaz enzimini de aktive etmektedir. NTF aksonal geri taşıma ile beyinden RGH ne gelen yaşam sinyalleridir. Nöron hasarında aksonal nörotrofik faktör taşıması artar. Ancak akson basısı devam ettiği sürece beyinden RGH ne ulaşan NTF'de azalma olur. Bu durumda RGH ne yaşam sinyalleri ulaşamaz ve hücre ölümü hızlanarak devam eder. Memeli sinir sisteminde bu türden pek çok faktör vardır, ama ganglion hücreleriyle en yakından ilişkili olanı beyin kökenli nörotrofik faktördür (BDNF). Bu faktör beyindeki hedef nöronlar tarafından salınır. Ganglion hücreleri de bu nöronlarla sinaps yapar ve nörotrofini alıp retinaya ulaştırır. Gelişim dönemi süresince BDNF bu yolla gelir, kullanılır ve tüm RGHleri de bu desteğe bağımlı kalır. Deneysel olarak eğer BDNF taşınımı bir şekilde engellenecek olursa, ganglion hücrelerinin hasara uğradığı görülmüştür [31].

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

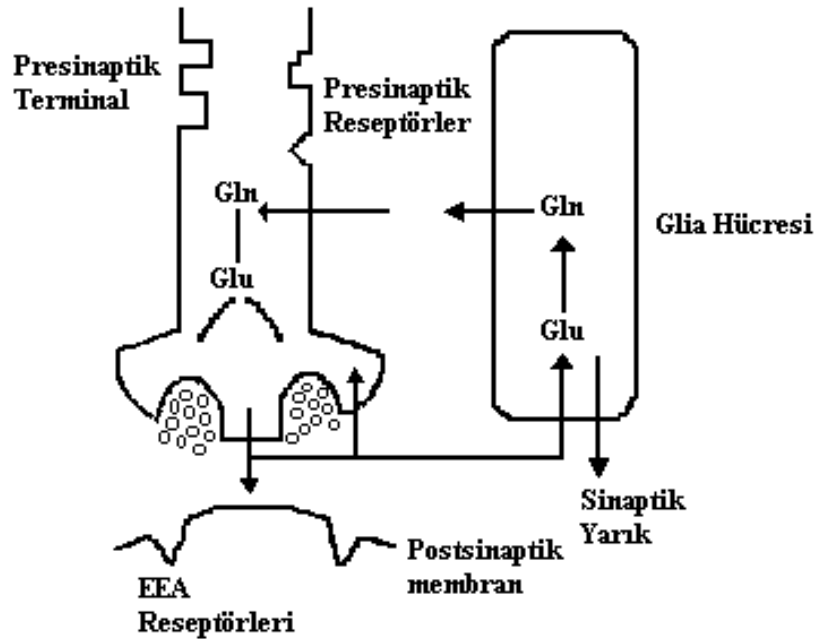
Glokomda erken dönemde sinir lifi harabiyeti ve ileri dönemde RGH ölümü tek bir mekanizma ile açıklanamayacak birçok faktörün rol oynadığı karmaşık olaylar dizisidir. Apopitozisin önlenmesi ve nöroprotektif yanıt için ilk unsur akson basısının azaltılması yani GİB'nin düşürülmesidir. Glokomda retrograd nörotrofik faktör akımının (BDNF) olmaması RGH ölümü için önemli bir nedendir. Bunun dışında NO sentaz enzim inhibitörleri, ilave NTF, kaspaz sistem inhibitörleri, NMDA reseptör antagonistleri gibi potansiyel nöroprotektif ajanlar araştırma safhasındadır [32, 33, 34].

Glokomda tedavinin primer amacı RGH harabiyetini azaltmaktır. RGH kaybı yıllık 10 bin civarında olup 80 yaşında yaklaşık %30'u kaybolmaktadır. GİB yüksekliği ve diğer faktörlerle kayıp daha da artar [35]. Asıl nöron koruma, GİB düşürücü etkiden bağımsız glokomatöz optik nöropatinin potansiyel tedavisidir. Amaç, RGHlerinin devamının sağlanmasıdır, bunun için nöron koruyucunun hedef dokuya yeterli oranda geçmesi gerekir. Şu anda müdahale edebildiğimiz tek risk faktörü GİB'dir. Bu da indirekt bir nöron koruma olarak değerlendirilebilir [36].

2.3.3. Glokomatöz Hasarda Glutamatın Rolü ve Eksitotoksisite

İlk olarak 1957 yılında Lucas ve Newton isimli araştırmacıların retinal distrofiyi iyileştirmek için fare retinası üzerinde çeşitli maddeleri dener iken glutamatın subkutan enjeksiyonunun retinanın iç sinir katmanlarında ağır hasara yol

açtığı gözlemlenmesiyle glutamatın toksik potansiyeli olduğu anlaşılmıştır [37, 38]. Sonrasında Olney ve Sharpe sonradan eksitotoksikite olarak adlandırılacak bu nörotoksik etkinin yalnızca glutamat ve retinal nöronlar ile sınırlı olmadığını, eksitotoksik amino asitlerin (EAA) santral nöronlar üzerinde genel bir etki oluşturduklarını bildirmişlerdir [39]. Son yıllarda bu hipotez glutamat reseptör fonksiyonlarının ortaya konulması ve etkili glutamat antagonistlerinin gelişimi ile desteklenmiştir. Günümüzde kafa travması, spinal travma, serebral iskemi, epilepsi ve kronik dejeneratif hastalıkların fizyopatogenezinde eksitotoksikitenin önemi kabul edilmektedir [40, 41]. Glutamat ve aspartat gibi EAA'lar memeli santral sinir sisteminin ana nörotransmitterleridir. Beyinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar (glutamat 10 mmol/l ve aspartat 4 mmol/L), sinir terminallerindeki sinaptik geçişi yönlendirir ve nöron içine iyon geçişini kontrol ederler. Nöronal yaşam, sinaptogenesis, nöronal plastisite, öğrenme ve hafıza üzerinde etkili bulunmuşlardır [42]. EAA'lar normalde sinir iletiminden sorumlu oldukları halde, nörotoksikitenin de potansiyel kaynağıdır. Glutamatın anormal düşüklüğü normal eksitasyonun bozulmasına, aşırı yükselmesi ise kalsiyum homeostazisini bozarak eksitotoksikiteye ve hücre ölümüne neden olabilir. Glutamat ve benzeri aminoasitlerin nöronun gövdesinde, dendridlerde, glialarda akut şişmeye ve daha yavaş olarak nöronal dejenerasyona yol açtıkları gösterilmiştir [41, 43].



Şekil 2.5. Glutamat salınımı ve geri alınımı

Bu nedenle normal şartlarda sinaptik aralıktaki glutamat seviyelerini düzenleyen hassas bir mekanizma mevcuttur. Bu mekanizma, sinir terminalinin presinaptik ucundaki reseptörler ve glia hücreleri aracılığıyla hücre dışı fazla glutamatın sinaptik aralıktan hücre içine geri alımına dayanır (Şekil) [38]. Bu mekanizma sayesinde fizyolojik koşullarda glutamat kuvvetli ve hızlı etki gösteren bir toksin olduğu halde glutamatın beyne direkt uygulanması bile hasar yaratmayacaktır [44]. Bununla beraber sistemin yetersizliğine yol açabilen veya çok yüksek glutamat salınımına neden olan patolojik durumlar ise nöron kaybına yol açacaktır.

Eksitotoksisite terimi ilk olarak ekzojen uygulanan glutamat veya glutamat agonistlerinin neden olduğu nöronal ölümü ifade etmek için kullanılmıştır. Daha sonra bu terim endojen olarak ortaya çıkan glutamat aracılı nörotoksisite için de kullanılmaya başlanmıştır [45]. Eksitotoksisitenin akut travmalardan (inme, hipoglisemi, travma, ve epilepsi) kronik nörodejeneratif hastalıklara (ör: Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, ALS, ve insan bağışıklık yetmezlik virusüne bağlı demans) kadar değişen çeşitli bozuklukların etiyolojisinde rol alabileceği düşünülmektedir; glokomda muhtemelen bunların arasında yer almaktadır [46, 47, 48, 49]. Deneysel glokom modellerinde, vitreus içerisinde yüksek glutamat konsantrasyonları, retina ganglion hücresine (RGH) toksik olacak kadar yüksek düzeylerde bulunmuştur. Glokomlu insanlarda postmortem yapılan çalışmalarda da vitreus içerisinde yaklaşık iki katı glutamat yüksekliği tespit edilmiştir [50, 51, 52, 53]. Eksitotoksisitenin glokoma katkısı bundan başka, glokom ve retinal hasar oluşturulmuş deneysel glokom modellerinde NMDA reseptör blokeri ajanların nöroprotektif etkisinin gösterildiği çalışmalar ile de desteklenmiştir [54, 55].

Eksitator aminoasit, glutamat (glutamik asit), postsinaptik hücre yüzeyindeki etkilerini glutamat reseptörlerine bağlanıp nöronal sinyali tetikleyerek oluştururlar. Glutamat reseptörleri iki majör kategoriye ayrılmıştır; iyonotropik (iletken iyonlar) ve metabotropik (biyokimyasal sinyali tetikleyen). İyonotropik reseptörler uyarıldıklarında hücre membranından hücre içine iyon geçişini doğrudan etkileyen reseptörlerdir. Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} 'a olan farklı geçirgenlikleri nedeniyle N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) ve kâinat olmak üzere 3'e ayrılırlar. Eksitotoksisite çoğunlukla bu iyonotropik

reseptörler aracılığıyla yönetilir. Bütün bu ligand-kapılı iyon kanalları normalde ligand bağlandığında hücre içine katyon girişine olanak sağlar. NMDA, kâinat ve AMPA reseptörleri eksitatör etkiler oluşturlar. Metabotropik glutamat reseptörlerinin ise hem eksitatör hem de inhibitör etkileri bildirilmiştir [56].

NMDA reseptörleri üzerinde en çok çalışılan ve bilgi sahibi olunan reseptör kompleksidir. Monovalan katyonlara ek olarak, Ca^{+2} iyonunun da hücre membranından geçişini sağlar. Diğer iyonotropik reseptörlere kıyasla Ca^{+2} 'a karşı en az 5 kez daha fazla geçirgen olduğu gösterilmiştir [57]. NMDA reseptörünün işlevini kolaylaştırmak için önce glisin (kofaktör olarak rol oynar) bu reseptöre bağlanmalıdır. Sonrasında ise glutamat bu bölgeye bağlanır. Ancak normal membran potansiyeli halinde bu kanal Mg ile bloke edilmiş haldedir ve blok; ancak reseptörü içeren nöron kısmen depolarize olduğu zaman ortadan kalkar. Nörotransmitter aracılı ligand kapılı iyon kanalları arasında hem kimyasal hem de voltaja bağlı açılabilen tek kanal NMDA reseptörüdür. Santral sinir sistemine yaygın olarak dağılmıştır. Duysal ileti ve iletinin integrasyonu ile motor fonksiyon ve aktivitenin koordinasyonu ve programlamasında yer alır [44]. Bu reseptör başlıca 6 bölge içerir. NMDA reseptörleri üzerindeki yoğun çalışmalar yakın zamanda birçok subünitinin de ortaya konulmasını sağlamıştır. Bu subünitler değişik beyin bölgelerinde daha yoğun konsantrasyonlarda yer almakta ve canlının gelişim evresine göre de farklılıklar gösterebilmektedir. Bunlar; bağlayıcı NR1 alt ünitesi ile birlikte modülatör 4 farklı tipte NR2A NR2D alt üniteleridir [58, 59, 60]. NMDA reseptörlerinin alt üniteleri, özellikle RGH, amakrin hücre gövdeleri ve iç pleksiform tabakada olmak üzere; immünohistokimyasal olarak kemirgenlerin iç retina katlarında ve NR1 alt ünitesi, sıçan optik sinirinin intraorbital bölgesinde gösterilmiştir [58, 61]. Agonist olarak glutamat, kofaktör olarak glisin ve antagonist olarak çinkonun bağlanabileceği farklı bağlanma yerleri içeren NMDA reseptörleri, eksitotoksisite nedeniyle klinik olarak ayrı bir önem taşır. SSS de glutamat geri alımında astrositlerin çok önemli rolü olmasına rağmen, Müller hücreleri de bu mekanizmada oldukça aktiftir. Müller hücresi, retinal ekstraselüler alanın homeostazisinin sağlanması, retinal kan akımının regülasyonu ve patolojik koşullarda da reaktif yanıtların oluşturulması gibi fonksiyonları olan, vertebral retinasının en önemli glial hücresidir [62]. Ayrıca Müller hücrelerinin RGH'lerin kültür çalışmalarında eksitotoksik hasarın önlenmesinde primer etkili olduğu; eksitatör

glutamatın retinal ekstraselüler alandan alınması ve bir antioksidan olan glutatyonun ortama verilmesi gibi görevleri olduğu bildirilmiştir [62, 63].

Glutamatın glial hücreler ile geri alımından sonra, glutamat glutamine dönüştürülür, ekstraselüler alana salınır, nöronlar tarafından alınır, tekrar glutamata dönüştürülür. Böylelikle, bu nöronal-glial metabolik geçiş formu, eksitator nörotransmitter metabolizmasının önemli bir komponentidir. Bu nöroglial sistemin disfonksiyonunun, artan ekstraselüler glutamat düzeyleri ile eksitotoksik hasara ilerlediği bilinmektedir. Memeli RGH'si 3 iyonotropik reseptörde içerir ve NMDA reseptörleri RGH'lerinde ve amakrin hücre alt gruplarında eksprese edilmektedir [58, 64].

Alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazole propionic acid (AMPA) reseptörleri monovalan katyonlar (Na^+ , K^+ , H^+) için daha seçicidirler. AMPA ve kâinat reseptörleri Na^+ iyonlarının hücre içine ve K^+ iyonlarının hücre dışına akışına izin verir. Oligodendrositlerde ve spinal kordda bulunduklarına dair kanıtlar mevcuttur ve bu reseptörlerin aşırı aktivasyonunun ak madde hasarı ile sonuçlanabileceği bilinmektedir [65, 66, 67]. Bir çalışmada, optik sinir hasarı sonrasında AMPA/kâinat reseptörlerinin inhibisyonunun NMDA reseptörlerinin inhibisyonuna göre hasarı daha fazla azalttığı gösterilmiştir de AMPA/kainat reseptörleri myelinize olmayan RGH aksonlarında gösterilememiştir [67].

2.3.4. Glutamat Nörotoksisitesinin Oluşum Mekanizmaları

İki ayrı yolak glutamatın oluşturduğu nörotoksisite için bildirilmiştir. Bunlar eksitotoksik yolak ve oksidatif yolaktır. Eksitotoksik yolak, NMDA ve diğer benzeri glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna ve sonuçta hızlı ve yavaş sitotoksik olayların her ikisinin de tetiklenmesine yol açar. Eksitotoksik yolaktaki hızlı etkiler, NMDA reseptörünün aktivasyonuna bağlı olarak, Ca^{+2} iyonunun zararlı olan yüksek konsantrasyonda hücre içine girişine yol açar. Yavaş etkiler ise daha çok metabotropik glutamat reseptör aktivasyonu sonrası gelişir. Oksidatif yolak, glutamat-sistin antiport sistemini bozar, glutatyon seviyelerini azaltır ve nörotoksik olan aşırı reaktif oksijen oluşumuna yol açar. Birçok nörodejeneratif hastalıkta ortaya

ıkan hasardan reaktif oksijen radikallerinin (ROR) sorumlu olduğu gösterilmiştir [68]. Glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması hücre içi Ca²⁺ artışı ve serbest radikal oluşumuyla nöron hasarına yol amaktadırdır [69, 70]. Dağınık bulunan glutamat reseptörlerinin yaygın aktivasyonu ve hücre içi serbest radikallerin oluşumu bu nöronal hasarda önemli rol oynar. Nöronlar gibi replikasyonu olmayan hücrelerde oksidatif stres birikmiş olabilmektedir. Beyin dokusunda yapılan postmortem çalışmalar esas olarak protein ve DNA yapılarındaki biyokimyasal değişikliklerin varlığını göstermektedir. SOR; süperoksid dismutaz enzimlerinin, katalazın ve glutatyon peroksidazın sıkı kontrolü altındadır. Serbest radikallerin ana üreticisi mitokondridir. Oksijen radikalleri hücre, doku ve organ hasarı oluşumuna katkı yaparlar. Salisilik Asit (SA), OH⁻ radikali yakalayıcı olarak glutamat (10⁻⁷M) ve kainik asit toksisitesini önlemede çok etkili bulunmuştur. Bu durum NMDA ve kainik asitin serbest radikal oluşturarak hücre ölümü yaptığını düşündürmektedir. SOR glutamat alım inhibisyonu yapabilir. Ayrıca NMDA reseptör aktivasyonu yaparak, süperoksid salınımına, hücre içi Ca²⁺ artışına ve NO oluşumuna yol açabilir. ROR'un, iskemi veya aksotomi nedeniyle hatta gelişim sırasında doğal olarak ortaya çıkan, birçok türde nöron ölümünde yeraldığı açıktır [71].

2.3.5. Brimonidin ve Nöroproteksiyon

İnsan, sığır ve domuz retinalarında alfa-adrenerjik reseptörlerin varlığı ve sıçan retinasının içi nükleer tabakalarındaki mevcudiyeti immünohistokimyasal çalışmalar ile gösterilmiştir [72, 73]. Histolojik bir çalışmada, brimonidinin (selektif alfa-2 reseptörü adrenerjik agonisti) retina metabolizmasını arttırdığı ve kültür retina hücrelerinde nöronal büyümeyi teşvik ettiği ortaya konmuştur [74].

Brimonidin hücre dışı glutamat birikimini bloke eder ve NMDA reseptör blokajı sağlar böylelikle alfa-2 adrenerjik reseptörlerle doğrudan etkileşim göstererek RGH ölümünü önler. Bu etkinin, GİB azaltan mekanizmalardan bağımsız olduğu düşünülmektedir [75, 76, 77]. Bir alfa 2-antagonistinin birlikte uygulanmasıyla brimonidinin koruyucu etkisinin ortadan kaldırılması, bahsedilen etkinin alfa-2 reseptör aktivasyonuna ikincil olduğunu teyit eder [78].

Oküler kan akımı değişiminin glokomatöz optik nöropatinin patogeneğinde yer aldığı giderek daha fazla kabul edilmektedir [79, 80]. Oküler ve sistemik kan damarlarının vazokonstriksiyonuna neden olan alfa-1 reseptör aktivasyonunun aksine, alfa-2 agonistlerinin optik sinir, retina, koroid veya retrobulber kan akımını değiştirdiğine yönelik bir kanıt yoktur [81, 82].

Yapılan randomize bir klinik araştırmada brimonidin ve timololün glokomatöz görme alanı defekti insidansı ve akut GİB yükselişinden sonra görme alanı bozulması oranı üzerine olan etkisi karşılaştırılmıştır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre 16 haftalık takip periyodunda görme alanı testleri değerlendirildiğinde brimonidin herhangi bir koruyucu etkisi saptanmamıştır [83]. Bununla birlikte, başka bir çalışmada oküler hipertansiyon hastalarında 12 aylık tedaviden sonra yapılan tarama lazer polarimetresiyle (GDx) RNFL kalınlığının ölçümünde %0.5 timolol ile karşılaştırıldığında brimonidin ile daha az RNFL kaybı gösterilmiştir [84].

“Düşük Basıncılı Glokom Tedavi Çalışması (LoGTS)” dört yıllık izleme boyunca hastalarda timolol karşı brimonidin nörönkoruyucu etkisi değerlendirildi. Bu çalışma ile, göz alerjisi gelişmeyen brimonidin ile tedavi edilen düşük basıncılı glokom hastalarında, timolol ile tedavi edilen hastalara göre görme alanı progresyonunun daha az olduğu gösterilmiştir [85].

2.3.6. Antioksidanlar ve Nöroproteksiyon

Yapılan araştırmalar, glokom patogeneğinde oksidatif stresin rolünü desteklemektedir [86]. Çalışmalar esas olarak glokomlu gözlerin aköz hümöründe düşük antioksidan düzeylerini ve yükselmiş oksidatif stres belirteçlerini, glutatyon-S-transferaza karşı antikorları, düşük glutatyon plazma seviyelerini ve glokom hastalarının plazmalarındaki artmış lipid peroksidasyon ürünlerini göstermiştir [87, 88, 89, 90].

Teorik olarak, ROS inhibisyonu ve hücre savunma sistemlerinin upregülasyonu RGH sağkalımını artırabilir [91, 92, 93]. Oksidatif strese karşı hücre savunma mekanizmaları süperoksit dismutaz, glutatyon (GSH) ve tioredoksin

sistemlerini içerir [92]. Tioredoksin sistemi hücre içi ROS'u süpürerek oksidatif hasarı hafifletir. Reaksiyon tioredoksin oksidasyonuna yol açar, bu da NADPH varlığında tioredoksin redüktaz ile indirgenmiş haline döndürülür.

Deneysel bir glokom modelinde E vitamininden eksik diyet verilen sıçanlarda diyet ile artmış RGH ölümü arasında bir ilişki bulundu. E vitamini eksikliği olan grup, normal diyetli sıçanlara kıyasla daha fazla lipid peroksidasyonu gösterdi. Bu çalışma, E vitamini eksikliği grubunda hızlandırılmış RGH ölümünün artmış lipid peroksidasyonu ile ilişkili olabileceğini öngörmektedir [94].

2.4. DENEYSEL GLOKOM MODELLERİ

2.4.1. Geçici İskemi Modeli

Yüksek GİB ile indüklenen iskemi, santral retinal arter veya oftalmik arter oklüzyonundan sonra hastalarda görülen patolojik özelliklere hemen hemen benzer olan retina iskemi araştırması için sıkça kullanılan bir hayvan modelidir. Ancak aynı zamanda akut açılı kapanması glokomunun bir modelidir. Bir diğer hipotez, artmış GİB'den kaynaklanan iskekiye maruz kalan hayvanlarda, görülen retinal hasarın insanlardaki glokoma benzer olduğu gözlemine dayanmaktadır, retinal kan damarlarının oklüzyonu (örneğin, karotid veya vertebral arterleri tıkamak suretiyle) farklı bir hasar paterni oluşturur. Özellikle, karotidlerin sıkıştırılması, opsin mRNA düzeylerinin çarpıcı bir şekilde düştüğünü ve fotoreseptörlerin tercihan etkilenmiş olduğunu göstermektedir. Aksine, artmış GİB ile indüklenen iskemi, RGH yüzey ilişkili antijen Thy-1'de büyük bir düşüşe neden olur ve opsin seviyeleri etkilenmez, bu ganglion hücrelerinin öncelikle etkilenmiş olduğunu göstermektedir [95].

2.4.2. Mekanik Optik Sinir Hasarı Modeli

Mekanik optik sinir hasarı modelinde esas mekanizma, oluşturulan aksonal hasarın retrograd olarak nöron gövdesinde dejeneratif bir cevaba sebep olmasıdır. Bu modelde glutamat düzeyi artar. Superior colliculustan kaynaklanan nörotrofin

yokluğu ve diğer eksitotoksinlerin varlığı, apoptozise sebep olarak ganglion hücrelerine spesifik bir dejenerasyon süreci başlatmaktadır.

Mekanik optik sinir hasarı modeli GİB yüksek olmadığı için birebir glokomu taklit etmese de bazı özellikleri glokom ile benzerlik göstermektedir. Aksonal ganglion hücre hasarı ve beyinden retrograd olarak nöron gövdelerine gönderilen büyüme faktörlerinin artışı gibi bazı özellikleri glokomla olan benzerlikleridir [96]. İlk hasarlanma sonrası zarar görmemiş bazı nöronlarda da zaman içerisinde sekonder dejenerasyon izlenmektedir. Bu durum GİB düşüşü sağlanan başlangıcında sinir lifi hasarı olan glokom hastasının GİB zaman içerisinde düşse bile neden kötüleşmeye meyilli olduğunu açıklamaktadır.

2.5. İMMUNOHİSTOKİMYASAL MARKERLAR

Brn-3a: Class-4 POU domain transkripsiyon faktörlerinin beyine özgü homeobox / POU domain proteini (Brn) ailesi birbirine yakın üç geni içerir: Brn3a, Brn3b ve Brn3c. Brn3 genleri, gelişmekte olan ve olgun memeli sinir sisteminde yer almaktadır. Brn-3a RGH için spesifik markerdir. RGH hasarını değerlendirmek için kullanılır.

Bax: Bax, apoptozinin birçok yolunda gerekli olan Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik bir üyesidir; ayrıca mitokondrilerden sitoplazmaya çıkarak apoptozisi başlatan proteinlerin kaçmasına izin veren mitokondriyal geçirgenlik geçiş porunu oluşturan bileşenle doğrudan etkileşime girer.

Gfap: Glial fibriler asit protein (GFAP), astrositler için ve Müller hücre aktivasyonunun gösterilmesi için kullanılan bir markerdir [97]. Glokomatöz nörodejenerasyon progresyonunun izlenmesi için kullanılır.

Iba-1: Mikroglia, merkezi sinir sisteminin yerleşik inflamatuvar hücreleridir. Iba-1 mikroglialar için markerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada glokom modellerinin oluşturulması, ilaç uygulamaları, sakrifikasyon işlemi Gazi Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yapılmıştır. İmmunohistokiyasal değerlendirmeler Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniğinde yapılmıştır. Çalışma Helsinki Bildirgesinde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

3.1. DENEKLER

Çalışmada Gazi Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yetiştirilen 36 adet erişkin Wistar albino erkek rat kullanıldı. Deneklerin ortalama ağırlığı 350 ± 25 gr olarak hesaplandı. Denekler standart kafeslerde 3'lü gruplar halinde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde sirkadiyan ritme uygun olarak, 23 santigrat derece oda ısısında, kemirgen diyetine uygun yem ve su verilerek beslenmesi sağlandı. Tüm hayvanların sağ gözüne operasyon yapıldı. Ratların sol gözleri kontrol grubunu oluşturdu. Glokom modeli oluşturulan ratlar şu şekilde sınıflandırılmıştır:

Ratlar rasgele altı gruba ayrılarak:

1. grup: Mekanik optik sinir hasarı uygulanarak ilaç tedavisi verilmeyen grup (n=6)
2. grup: Mekanik optik sinir hasarı uygulanarak brimonidin ile tedavi edilen grup (n=6)
3. grup: Mekanik optik sinir hasarı uygulanarak CoQ10+vit E ile tedavi edilen grup (n=6)
4. grup: Geçici retinal iskemi modeli uygulanarak ilaç tedavisi verilmeyen grup (n=6)

5. grup: Geçici retinal iskemi modeli uygulanarak brimonidin ile tedavi edilen grup (n=6)

6. grup: Geçici retinal iskemi modeli uygulanarak CoQ10+vit E ile tedavi edilen grup (n=6)

İlaç tedavilerine operasyondan hemen sonra başlanarak enükleasyon zamanına kadar devam edildi. Brimonidin saat 8:00 ve 17:00 de birer damla, CoQ10+vit.E saat 8:00 ve 17:00 de birer damla uygulandı. Dördüncü hafta sonunda araştırmadaki 36 adet erkek rata ksilazin - ketamin ile derin genel anestezi yapıldıktan sonra enükleasyon işlemi gerçekleştirildi, intrakardiyak kan alınması ile ratların yaşamlarına son verildi.

3.2. DENEYSEL GLOKOM MODELİ

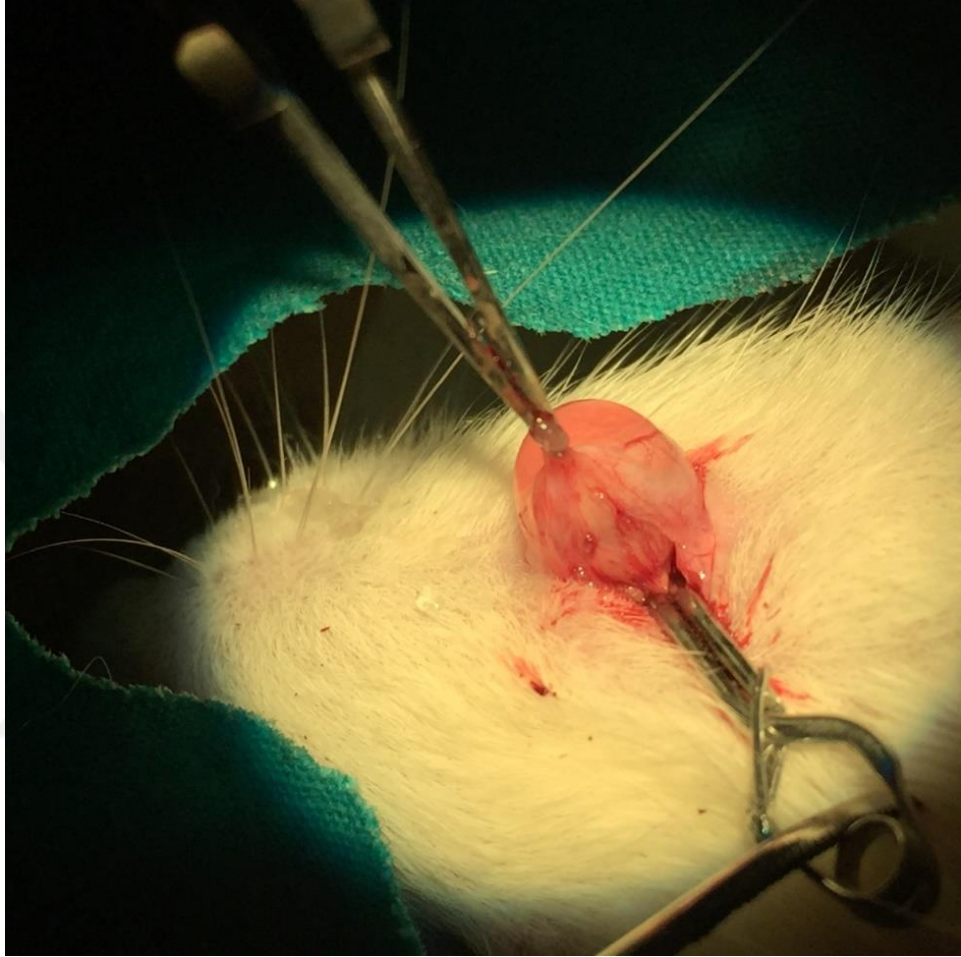
Ratlara ketamin hidroklorid (25 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) intramüsküler yoldan enjekte edilerek genel anestezi verildi. Anestezi uygulamasını takiben ratlara deneysel glokom modelleri uygulandı.

3.2.1. Mekanik Optik Sinir Hasarı Modeli

Genel anesteziye ek olarak ratlara topikal proparakain HCl %0.5 damla uygulandı. Operasyon mikroskobu altında konjonktiva süperiordan açılarak optik sinir künt diseksiyon ile açığa çıkarıldı. Globun 2mm gerisine Yaşargil anevrizma klipsi (katalog No. FT250T; Aesculap AG & Co.) yerleştirildi. Oftalmik arter kontrol edildi. Optik sinire yerleştirilen klips ile 1 dk beklenildi. Sonrasında klips çıkarıldı. Dokular anatomik pozisyonlarına getirilerek işleme son verildi.

Yaşargil Anevrizma Klipsleri (Aesculap AG & Co., Tuttlingen, Almanya) implante edilebilir klipsler, titanyum alaşımdan ISO standartlarına uygun olarak tasarlanmıştır. Bir bilgisayar kontrollü ölçüm tekniği ile her klips kesin tanımlanmış

bir kapatma kuvvetine sahiptir. Yaşargil anevrizması klipsinin kapama kuvveti (katalog No. FT250T; Aesculap AG & Co), 90 gf (Yaklaşık 0,88 N'ye eşdeğerdir). Klipsin blade uzunluğu 9.0 mm, maksimal açıklığı 7.0 mm dir (Resim 3.1).



Resim 3.1. Mekanik optik sinir hasarı modeli

3.2.2. Geçici Retinal İskemi Modeli

30 – gauge iğne ile üst temporal limbustan ön kamaraya girildi. İnfüzyon şişesinin yüksekliğini artırarak GİB 50 dakika süre ile 70-80 mmHg yükseltildi. Retinal iskemi varlığı irisin beyazlaması ve retinal kırmızı refle kaybının ortaya çıkması ile teyit edildi. GİB ölçümleri Tono- Pen (Tono-Pen; Medtronic Solan, FL, USA) ile yapıldı (Resim 3.2).



Resim 3.2. Geçici retinal iskemi modeli

3.3. DOKULARIN HAZIRLANMASI- İMMUNOHİSTOKİMYA

Göz enükleasyon materyalleri %10'luk formalin içerisinde patoloji laboratuvarına gönderildi. Gözün tüm katlarını inceleyebilmek için, tespit solüsyonuna alkol ilave edildi ve ek olarak intaoküler alkol enjeksiyonu yapıldı. Doku 24 saatlik fiksasyon işleminden sonra optik sinir merkez alınarak anteriordan posteriora doğru tam bir kesi ile göz küresi ikiye bölündü. Doku takip cihazına alınan dokulardan elde edilen parafin bloklardan, doku mikroyarray örnekleri oluşturuldu. Dokular 4 mikronluk kesitler halinde Hematoksilen Eosin (H&E) ile boyanarak incelendi.

İmmunhistokimyasal inceleme için; BRN3A (Dilüsyon: 1:500, clone: EP1972Y, EDTA), Bax antikoru (Dilüsyon 1:100, clone:ab 53154, Citrat buffer), GFAP (Dilüsyon: 1:50-1:150, clone: GA-5, Citrat buffer, oncord, CA 94520 USA) ve Iba1 antikoru (Dilüsyon:1:100-1:1000, clone: policlonal, EDTA) kullanıldı.

H&E ve immunhistokimyasal incelemeler tek bir patolog tarafından, 10 BBA'nda (büyük büyütme alanı= 400 lük büyütme objektifi) 4 - 6 alan sayılarak yapıldı.

4. BULGULAR

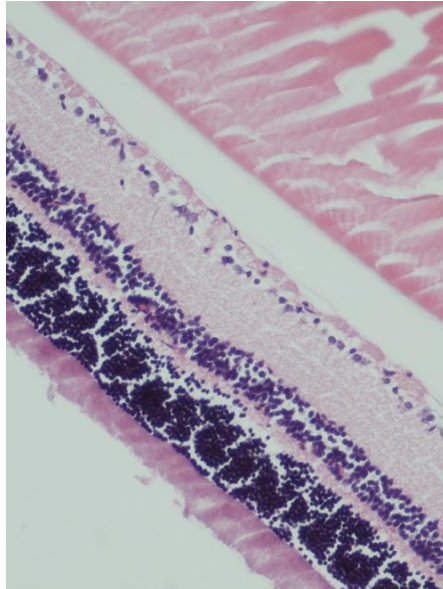
4.1. RETİNA GANGLİON HÜCRE SAYIMI

Çalışmamızda normal retinalarda RGH ortalaması 88.9 ± 7.5 (min:81, max:96), mekanik sinir hasarı uygulanan kontrol grubunda (1. grup) RGH ortalaması 61.0 ± 2.6 (min:58, max:63), geçici iskemi modeli uygulanan kontrol grubunda (4. grup) RGH ortalaması 61.7 ± 3.1 (min:59, max:65) olarak bulundu. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol gruplarındaki RGH sayısındaki azalma her iki glaukom modelinde de istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 4.1, Resim 4.1, 4.2), ($p < 0.05$).

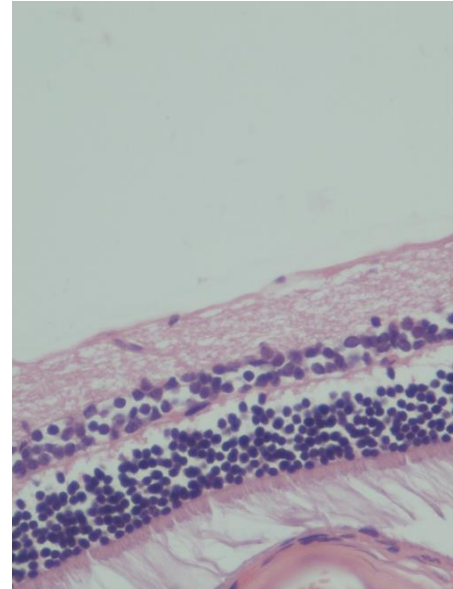
Tablo 4.1. Normal retinalar ile deneysel glaukom modellerindeki (1. grup ve 4. grup) RGH sayılarının karşılaştırılması

Parametreler	Normal Retina	1. grup (Mekanik Optik Sinir Hasarı Kontrol Retina)	4. grup (Geçici İskemi Modeli Kontrol Retina)	p
RGH (hücre/mm ²)	88.9 ± 7.5	61.0 ± 2.6	61.7 ± 3.1	< 0.05

*Kruskal Wallis test. RGH: Retina ganglion hücreleri

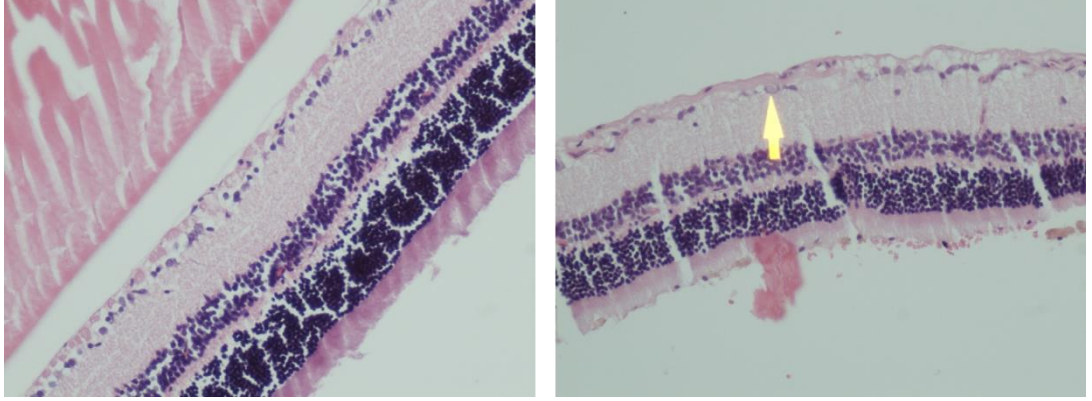


(A)



(B)

Resim 4.1. Normal retina (A) ile mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol grubu (1. grup) (B) karşılaştırılması



(A)

(B)

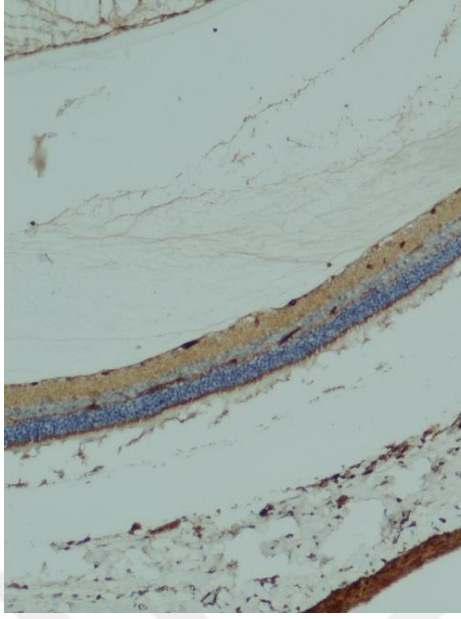
Resim 4.2. Normal retina (A) ile geçici retinal iskemi modeli kontrol grubu (4. grup) (B) karşılaştırılması

4.2. BRİMONİDİN – MEKANİK OPTİK SİNİR HASARI MODELİ

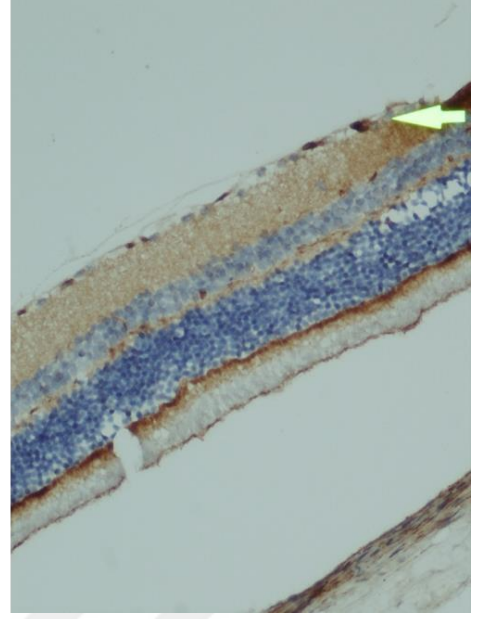
Mekanik optik sinir hasarı modelinde kontrol grubunda (1. grup) RGH ortalaması 61.0 ± 2.6 (min:58, max:63), brimonidin uygulanan grupta (2. grup) RGH ortalaması 63.3 ± 5.1 (min:59, max:69) olarak saptandı. Birinci grup ile karşılaştırıldığında 2. grupta RGH sayısı fazla olmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Çalışmamızda gruplar Brn-3a proteini açısından karşılaştırıldığında mekanik optik sinir hasarı modelinde RGH sayısı 1. grupta ortalama 8.3 ± 3.5 (min:5, max:12), 2. grupta 15.0 ± 1.0 (min:14, max:16) idi. Aynı gruplarda Brn-3a proteini pozitif olan hücrelerin oranı 1. grupta $\%12.9 \pm 4.5$ (min:8.5, max:17.4), 2. grupta $\%24.6 \pm 0.7$ (min:24.1, max:25.4) olarak tespit edildi.

Mekanik optik sinir hasarı modelinde Brn-3a pozitif RGH sayıları açısından 1. grup ve 2. grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Resim 4.3), ($p < 0.05$).



(A)

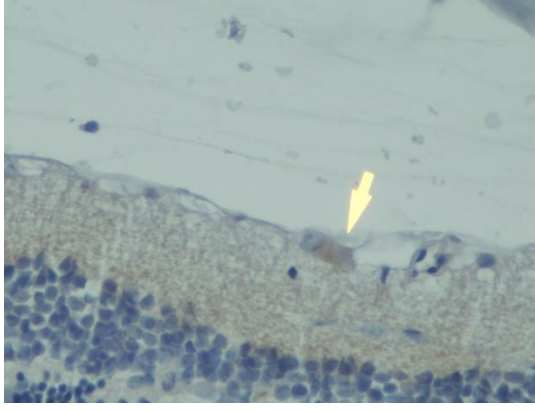


(B)

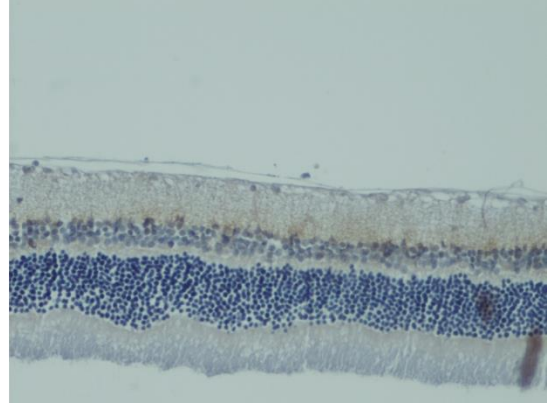
Resim 4.3. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (2. grup) (B) karşılaştırılması

Çalışmamızda gruplar Bax proteini açısından karşılaştırıldığında mekanik optik sinir hasarı modelinde RGH sayısı bakıldığında 1. grupta ortalama 5.7 ± 2.1 (min:4, max:8), 2. grupta 1.3 ± 0.6 (min:1, max:2) iken; aynı gruplarda Bax proteini pozitif olan hücrelerin oranı 1. grupta $\%11.8 \pm 2.0$ (min:9.5, max:13.3), 2. grupta $\%4.5 \pm 1.4$ (min: 3.6, max:6.1) olarak tespit edildi.

Mekanik optik sinir hasarı modelinde Bax pozitif RGH sayıları 1. grup ile karşılaştırıldığında 2. grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma belirlendi (Resim 4.4), ($p < 0.05$).



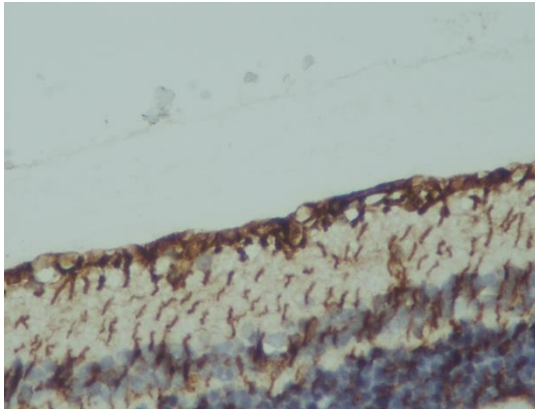
(A)



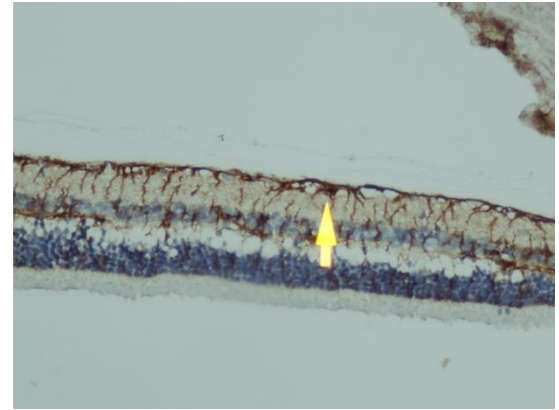
(B)

Resim 4.4. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (2. grup) (B) karşılaştırılması

Çalışmamızda gruplar GFAP açısından karşılaştırıldığında mekanik optik sinir hasarı modelinde GFAP pozitif RGH sayısı 1. grupta ortalama 11.7 ± 2.1 (min:10, max:14), 2. grupta 10.3 ± 1.5 (min:9, max:12) olarak kaydedildi. GFAP pozitif RGH sayıları 1. grup ile karşılaştırıldığında 2. grupta istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Resim 4.5), ($p > 0.05$).



(A)

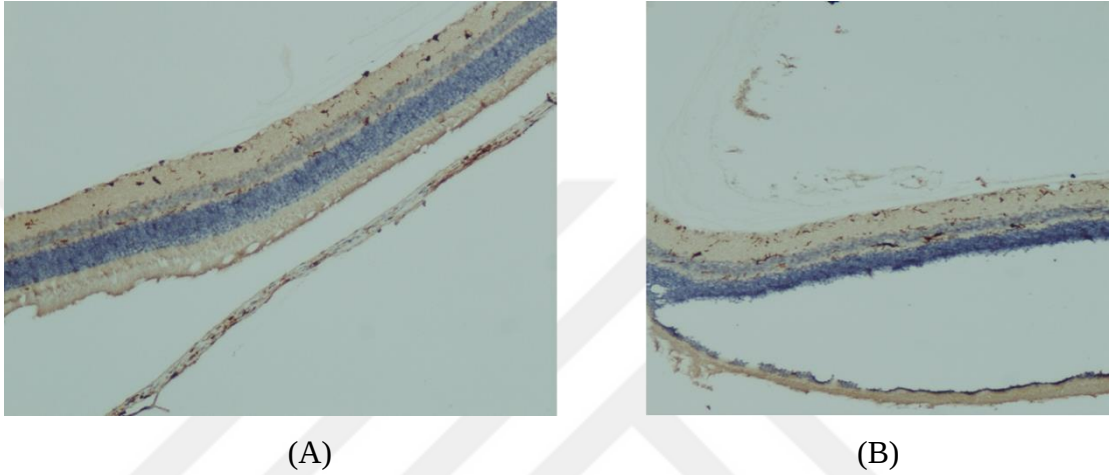


(B)

Resim 4.5. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (2. grup) (B) karşılaştırılması

Çalışmamızda gruplar anti-Iba1 antikoru açısından karşılaştırıldığında mekanik optik sinir hasarı modelinde anti-Iba1 antikoru pozitif RGH sayısı 1. grupta ortalama 64.3 ± 7.8 (min:58, max:73), 2. grupta 76.3 ± 9.5 (min:69, max:87) olarak kaydedildi.

Anti-Iba1 antikoru pozitif RGH sayıları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 1. grup ve 2. grupta arasında anlamlı fark yoktu (Resim 4.6), ($p > 0.05$).

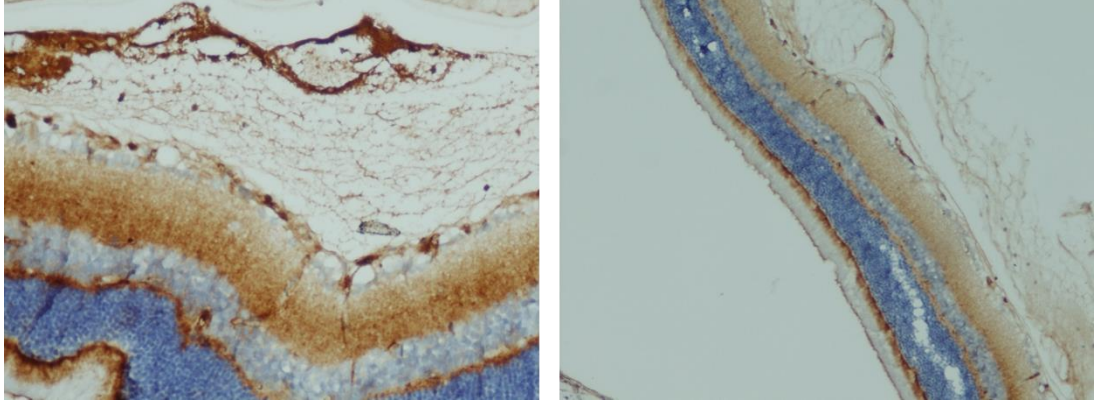


Resim 4.6. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (2. grup) (B) karşılaştırılması

4.3. BRİMONİDİN- GEÇİCİ RETİNAL İSKEMİ MODELİ

Geçici retinal iskemi modelinde kontrol grubunda (4. grup) RGH ortalaması 58.7 ± 3.5 (min:55, max:62), brimonidin uygulanan grupta RGH ortalaması (5. grup) 61.7 ± 3.1 (min:59, max:65) olarak saptandı. Dördüncü grup ile 5. grup karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Geçici retinal iskemi modelinde Brn-3a proteini pozitif RGH sayısına bakıldığında 4. grupta 7.00 ± 2.00 (min:5, max:9), 5. grupta 11.7 ± 3.1 (min:3, max:5) aynı gruplarda Brn-3a proteini pozitif hücrelerin oranı 4. grupta $\%11.3 \pm 2.7$ (min:8.47, max:13.85), 5. grupta $\%16.9 \pm 2.4$ (min: 4.84, max:9.09) olarak tespit edildi. Brn-3a pozitif RGH sayıları 4. grup ile karşılaştırıldığında 5. grupta istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Resim 4.7), ($p > 0.05$).

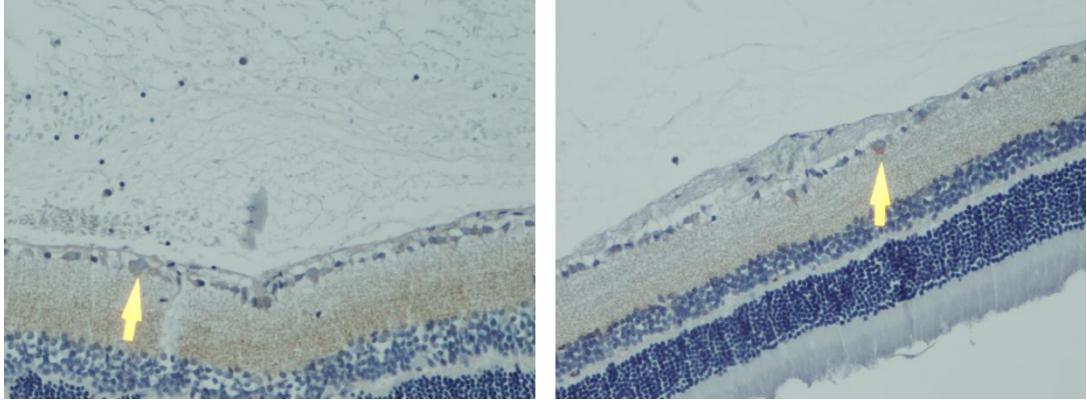


(A)

(B)

Resim 4.7. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (5. grup) (B) karşılaştırılması

Geçici retinal iskemi modelinde Bax pozitif RGH sayısına bakıldığında 4. grupta 20.0 ± 7.9 (min:14, max:29), 5. grupta 11.3 ± 2.1 (min:9, max:13) aynı gruplarda Bax proteini pozitif hücrelerin oranı 4. grupta $\%28.9 \pm 9.4$ (min: 22.2, max:39.7), 5. grupta $\%22.9 \pm 2.3$ (min:20.5, max:25) olarak tespit edildi. Bax pozitif RGH sayıları 4. grup ile 5. grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma yoktu (Resim 4.8), ($p > 0.05$).



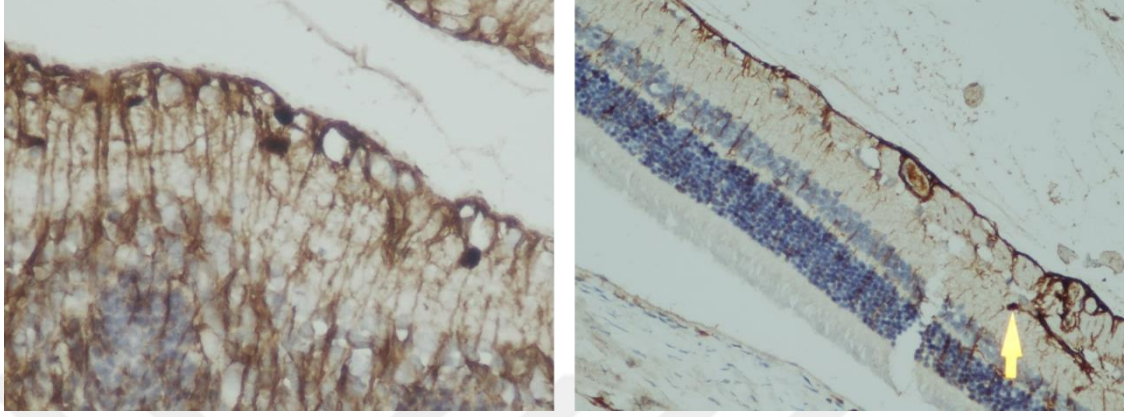
(A)

(B)

Resim 4.8. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (5. grup) (B) karşılaştırılması

Geçici retinal iskemi modelinde GFAP pozitif RGH sayısına bakıldığında 4. grupta ortalama 22.0 ± 3.6 (min:19, max:26), 5. grupta 13.2 ± 1.5 (min:19, max:28) olarak kaydedildi.

Geçici retinal iskemi modelinde GFAP pozitif RGH sayıları 4. grup ile 5. grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma vardı (Resim 4.9), ($p < 0.05$).

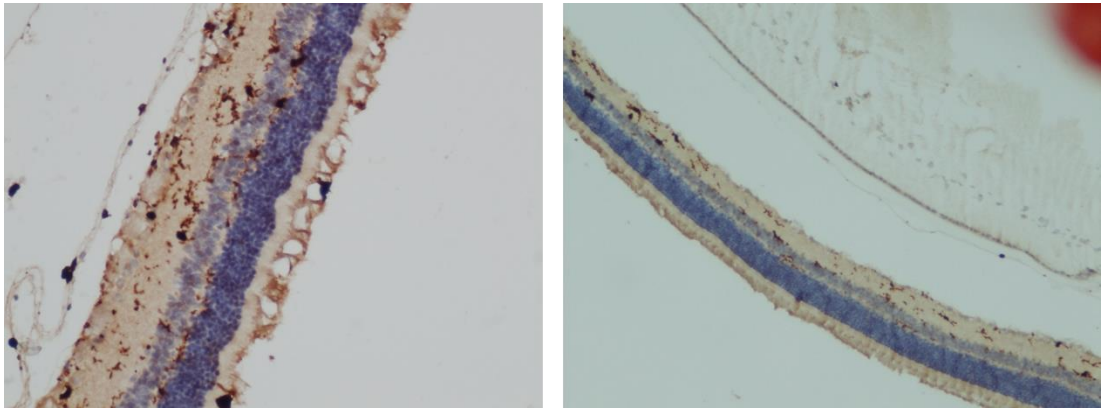


(A)

(B)

Resim 4.9. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (5. grup) (B) karşılaştırılması

Geçici retinal iskemi modelinde anti-Iba1 antikoru pozitif RGH sayısına bakıldığında 4. grupta ortalama 100.7 ± 7.5 (min:92, max:105), 5. grupta 57.7 ± 14.6 (min:61, max:78), olarak kaydedildi. Anti-Iba1 antikoru pozitif RGH sayıları 4. grup ile 5. grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi (Resim 4.10), ($p < 0.05$).



(A)

(B)

Resim 4.10. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve brimonidin tedavisi uygulanan retina (5. grup) (B) karşılaştırılması

Brimonidin molekülü açısından Brn 3a pozitif RGH sayısı her iki glokom modelinde değerlendirildiğinde mekanik optik sinir hasarı modelinde fark anlamlı iken ($p<0.05$), geçici retinal iskemi modelinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Mekanik optik sinir hasarı grubunda Bax proteini ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark varken ($p<0.05$), geçici retinal iskemi modelinde var olan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Her iki glokom modeli GFAP ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde mekanik optik sinir hasarı grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark yokken ($p>0.05$), geçici retinal iskemi modelinde var olan azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

Her iki glokom modeli anti-Iba1 antikoru pozitifliği açısından değerlendirildiğinde mekanik optik sinir hasarı grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark yokken ($p>0.05$), geçici retinal iskemi modelinde var olan azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

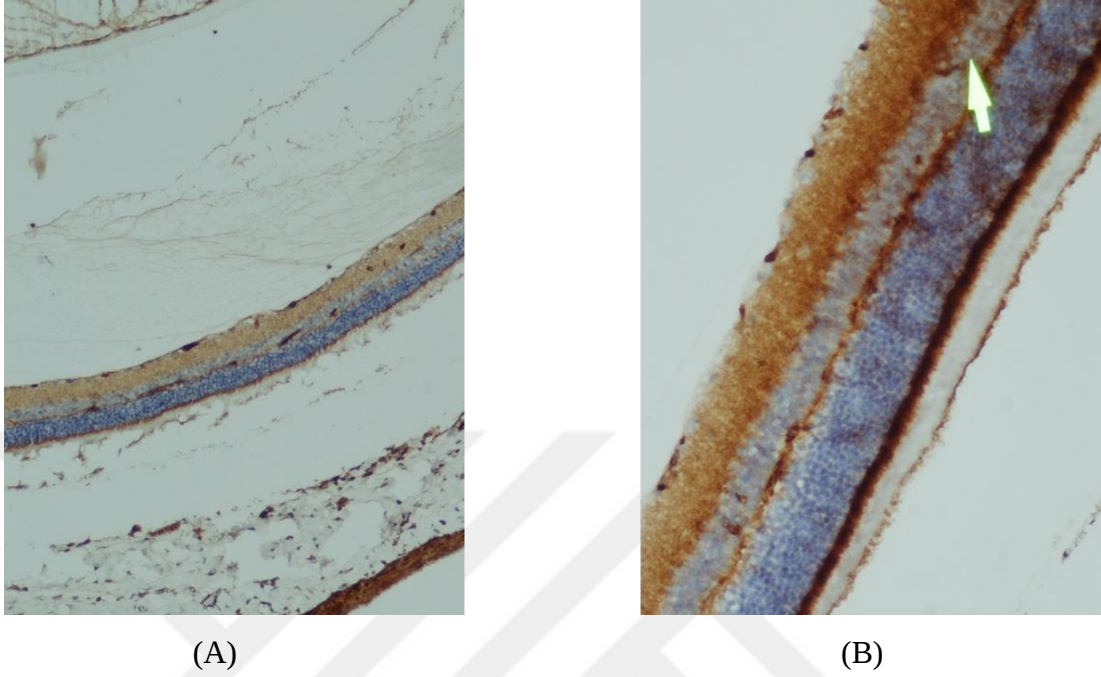
4.4. KOENZİM Q10+VİTAMİN E - MEKANİK OPTİK SİNİR HASARI MODELİ

Mekanik optik sinir hasarı modelinde kontrol grubunda (1. grup) RGH sayısı ortalaması 61.0 ± 2.6 (min:58, max:63),

CoQ10+vit. E uygulanan grupta (3. grup) RGH ortalaması 71.5 ± 4.0 (min:68, max:77) olarak saptandı. Birinci grup ve 3. grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında fark anlamlıydı ($p<0.05$).

Çalışmamızda gruplar Brn-3a proteini açısından karşılaştırıldığında mekanik optik sinir hasarı modelinde RGH sayısı 1. grupta ortalama 15.0 ± 1.0 (min:14, max:16), 3. grupta 22.2 ± 4.8 (min:18, max:29) idi. Aynı gruplarda Brn-3a proteini pozitifliği olan hücrelerin oranı 1. grupta $\%24.6\pm0.7$ (min:24.1, max:25.4), 3. grupta $\%31.4$ (min:23.4, max:42.6) olarak tespit edildi. Brn-3a pozitif RGH sayıları 1. grup

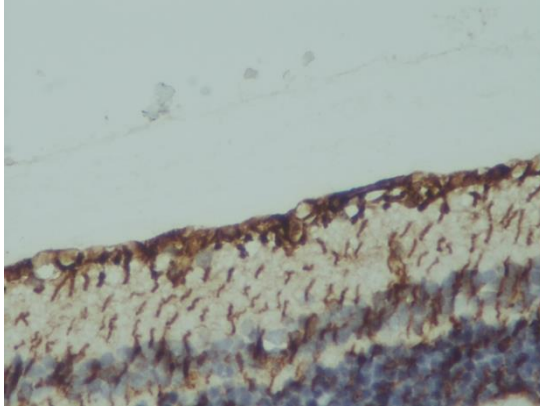
ile karşılaştırıldığında 3. gruptaki Brn-3a sayılarındaki korunma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Resim 4.11), ($p<0.05$).



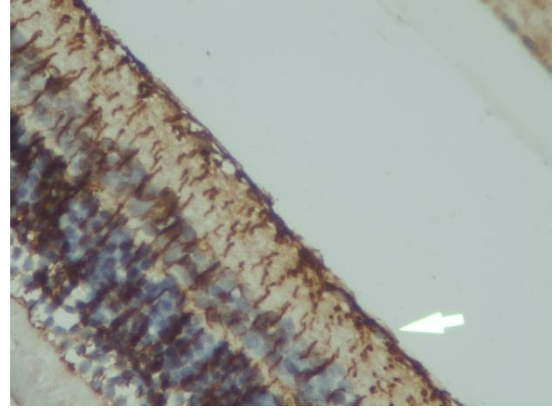
Resim 4.11. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (3. grup) (B) karşılaştırılması

Çalışmamızda gruplar Bax proteini açısından karşılaştırıldığında mekanik optik sinir hasarı modelinde RGH sayısı 1. grupta ortalama 5.7 ± 2.1 (min:4, max:8), 3. grupta 6.0 ± 2.2 (min:3, max:8) aynı gruplarda Bax proteini pozitifliği olan hücrelerin oranı 1. grupta $\%11.8 \pm 2.0$ (min:9.5, max:13.3), 3. grupta $\%13.8 \pm 3.6$ (min:9.1, max:17.8) olarak tespit edildi. Bax pozitif RGH sayıları 1. grup ve 3. grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Çalışmamızda gruplar GFAP açısından karşılaştırıldığında mekanik optik sinir hasarı modelinde GFAP pozitif RGH sayısı 1. grupta 11.7 ± 2.1 (min:10, max:14), 3. grupta 2.5 ± 1.5 (min:1, max:4) olarak kaydedildi. GFAP pozitif RGH sayıları açısından 1. grup ile 3. grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu (Resim 4.12), ($p<0.05$).



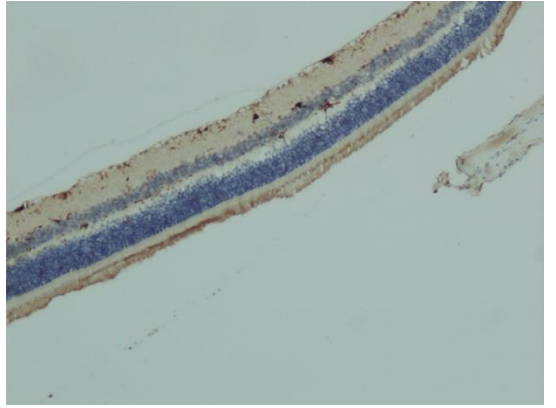
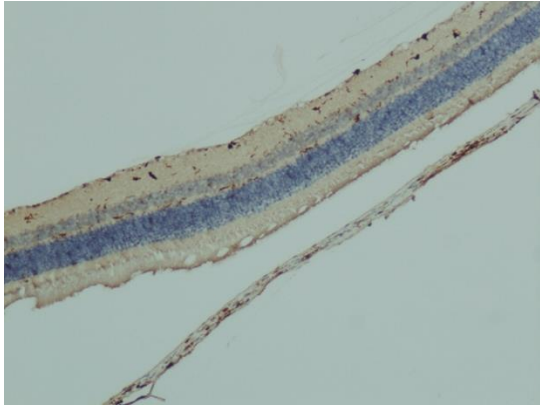
(A)



(B)

Resim 4.12. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (3. grup) (B) karşılaştırılması

Çalışmamızda gruplar anti-Iba1 antikoru açısından karşılaştırıldığında mekanik optik sinir hasarı modelinde anti-Iba1 antikoru pozitif RGH sayısı 1. grupta 64.3 ± 7.8 (min:58, max:73), 3. grupta 72.3 ± 7.8 (min:58, max:73) olarak kaydedildi. Anti-Iba1 antikoru pozitif RGH sayıları 1. grup ile karşılaştırıldığında 3. grupta istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Resim 4.13), ($p > 0.05$).



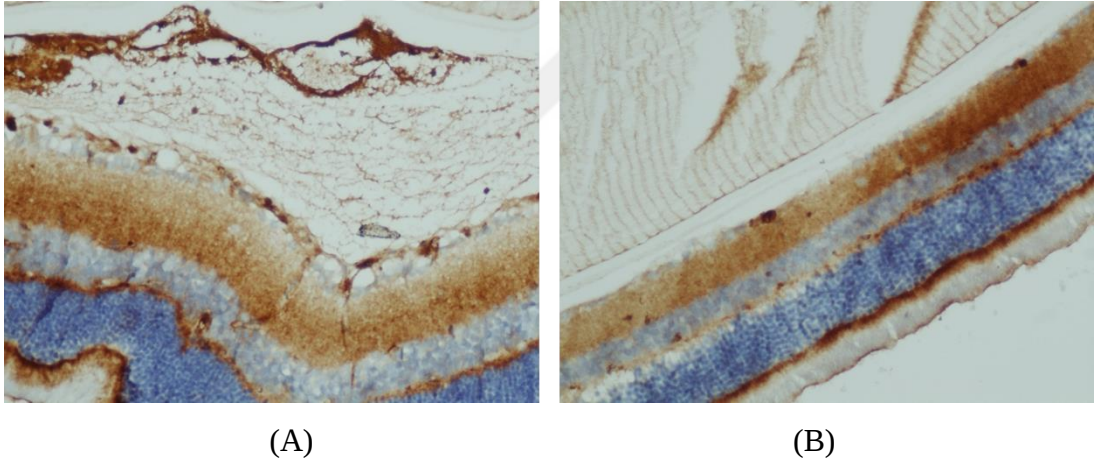
Resim 4.13. Mekanik optik sinir hasarı modeli kontrol retina (1. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (3. grup) (B) karşılaştırılması

4.5. KOENZİM Q10+VİTAMİN E- GEÇİCİ RETİNAL İSKEMİ MODELİ

Geçici retinal iskemi modelinde kontrol grubunda (4. grup) RGH ortalaması 61.7 ± 3.1 (min:59, max:65), CoQ10+vit. E uygulanan grupta (6. grup) RGH ortalaması 68.0 ± 8.2 (min:61, max:77) olarak saptandı.

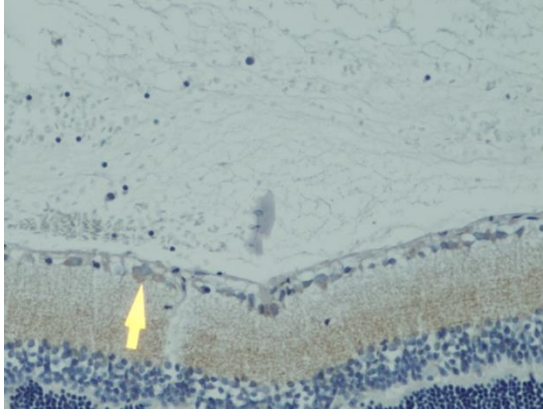
Dördüncü grup ile 6. grup karşılaştırıldığında CoQ10+vit. E uygulanan grupta ortalama daha yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Geçici retinal iskemi modelinde Brn-3a pozitif RGH sayısı 4. grupta 3.7 ± 1.2 (min:5, max:9), 6. grupta 7.0 ± 2.0 (min:9, max:15) aynı gruplarda Brn-3a proteini pozitif hücrelerin oranı 4. grupta $\%6.3 \pm 2.4$ (min:8.5, max:13.9), 6. grupta $\%11.7 \pm 2.7$ (min:14.75, max:19.48), olarak tespit edildi. Brn-3a pozitif RGH sayıları 4. grup ile karşılaştırıldığında 6. grupta istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Resim 4.14), ($p > 0.05$).

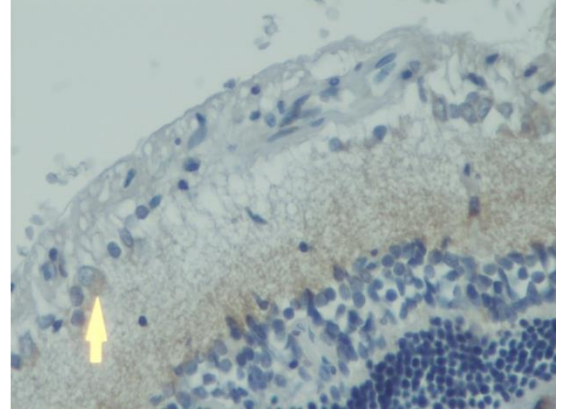


Resim 4.14. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (6. grup) (B) karşılaştırılması

Geçici retinal iskemi modelinde Bax pozitif RGH sayımına bakıldığında 4. grupta 11.3 ± 2.1 (min:9, max:13), 6. grupta 10.5 ± 4.0 (min:7, max:16) aynı gruplarda Bax proteini pozitif hücrelerin oranı 4. grupta $\%22.9 \pm 2.3$ (min:20.5, max:25), 6. grupta $\%14.4 \pm 5.6$ (min:10.0, max:22.2) olarak tespit edildi. Bax pozitif RGH yüzdeleri 4. grup ile 6. grup karşılaştırıldığında istatistiksel fark tespit edildi (Resim 4.15), ($p < 0.05$).



(A)

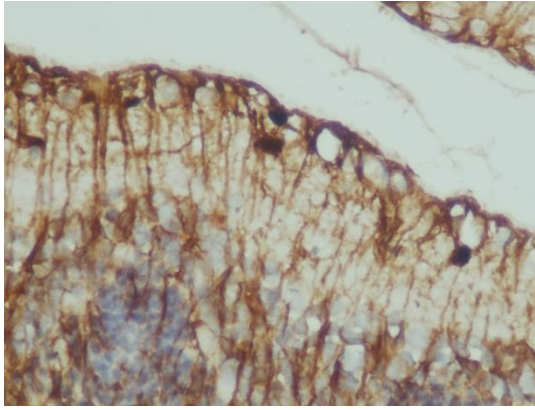


(B)

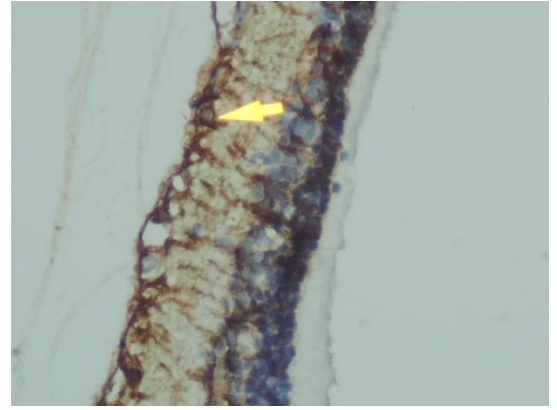
Resim 4.15. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (6. grup) (B) karşılaştırılması

Geçici retinal iskemi modelinde GFAP pozitif RGH sayısı 4. grupta ortalama 22.0 ± 3.6 (min:19, max:26), 6. grupta 14.8 ± 2.9 (min:12, max:15) olarak kaydedildi.

Geçici retinal iskemi modelinde GFAP pozitif RGH sayıları 4. grup ile karşılaştırıldığında 6. grupta azalma olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Resim 4.16), ($p > 0.05$).



(A)

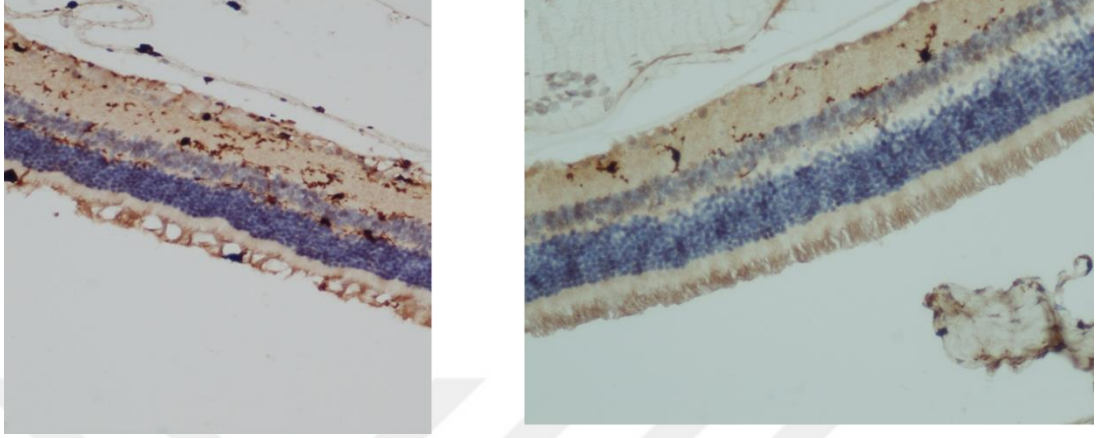


(B)

Resim 4.16. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (6. grup) (B) karşılaştırılması

Geçici retinal iskemi modelinde anti-Iba1 antikoru pozitif RGH sayısı 4. grupta ortalama 100.7 ± 7.5 (min:92, max:105), 6. grupta 70.3 ± 8.6 (min:42, max:71)

olarak kaydedildi. Anti-Iba1 antikoru pozitif RGH sayıları 4. grup ile karşılaştırıldığında 6. grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi (Resim 4.17), ($p<0.05$).



Resim 4.17. Geçici retinal iskemi modeli kontrol retina (4. grup) (A) ve CoQ10+Vit.E tedavisi uygulanan retina (6. grup) (B) karşılaştırılması

CoQ+Vit.E tedavisi açısından her iki glokom modeli değerlendirildiğinde mekanik optik sinir hasarı grubunda Brn3-a proteini ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı varken ($p<0.05$), geçici retinal iskemi modelinde fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Mekanik optik sinir hasarı grubunda Bax proteini ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark yokken ($p>0.05$), geçici retinal iskemi modelinde fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Mekanik optik sinir hasarı grubunda GFAP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark varken ($p<0.05$), geçici retinal iskemi modelinde fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

CoQ+Vit.E molekülü açısından her iki glokom modeli değerlendirildiğinde mekanik optik sinir hasarı grubunda anti-Iba1 antikoru pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı fark yokken ($p>0.05$), geçici retinal iskemi modelinde var olan azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Glokom, dünya çapında 70 milyon kişiyi etkileyen geri döndürülemez körlüğün önde gelen nedenlerindendir [98]. Gelişmiş ülkelerde glokomun prevalansı artmaya yatkındır ve büyük bir halk sağlığı problemi olarak görülmektedir [99]. Populasyona dayalı çalışmalar her on kişiden birinde sonunda mutlaka glokom gelişeceğini ve bu durumun glokomu çok yaygın bir hastalık yaptığını göstermiştir [100]. Yüksek GİB optik sinir ve RGH için önemli bir risk faktörü olsa da, hastaların görsel fonksiyonlarını korumada GİB'yi düşürmek her zaman etkili değildir [101].

Glutamat eksitotoksitesitesi ve oksidatif stress, mitokondriyal disfonksiyon aracılı glokomatöz nörodejenerasyon için önemli patofizyolojik mekanizmalar olarak gösterilmiştir [102].

Çalışmamızda brimonidin ve CoQ 10 + Vit. E moleküllerinin nöron koruyucu etkilerini araştırmak üzere RGH sayımı yapıldı. Brn 3a, Bax antikoru, GFAP ve anti-Iba1 molekülleri immunohistokimyasal olarak değerlendirildi.

Brimonidin açık açılı glokom tedavisinde GİB'yi düşürmek için kullanılmaktadır. Brimonidin etki mekanizması aköz humor üretimini azaltmak ve trabeküler ağ üzerinden çıkışını kolaylaştırmaktır. Brimonidinin in vitro nöron dejenerasyon modellerinde ve glokomun deneysel modellerinde, nöroprotektif bir etkisi olduğu gösterilmiştir [103, 104, 105]. Brimonidinin RGH'leri hipertansif hasardan koruduğu tek mekanizma olarak GİB düşüşü görülmemektedir, çünkü deneysel kemirgen modellerinde sistemik olarak uygulandığında hipotansif etkisinin olmadığı, ancak nöron koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir [104, 106]. İncelenen diğer olası mekanizmalar; apoptotik kaskadın inhibisyonunu, glutamat toksitesitesinin azaltılmasını ve RGH'lerin güçlü bir nöroprotektoru olan endojen beyin türevi nörotrofik faktör (BDNF) ekspresyonundaki artışı içermektedir [106].

Bizim çalışmamızda brimonidin tedavisi uygulanan mekanik optik sinir hasarı ve geçici retinal iskemi modeli gruplarında RGH sayıları arasındaki fark bulunmakla birlikte burada istatistiksel anlamlılık bulunmadı ($p>0.05$).

Ma ve ark. yaptıkları çalışmada mekanik optik sinir hasarı uyguladıkları ratlara intraperitoneal brimonidin enjeksiyonu sonrası sonuçları karşılaştırmışlardır. RGH sayısını kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında brimonidin grubunda RGH sayısını istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulmuşlardır [107].

WoldeMussie ve ark. yaptığı çalışmada episkleral ven koterizasyonu sonrası kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında sistemik tedavi verilen brimonidin gruplarında istatistiksel olarak anlamlı RGH sayısında yükseklik tespit edilmiştir [105].

Yiğit ve ark. akut iskemi sonrası memantin, hiperbarik oksijen tedavisi ve brimonidin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında RGH sayılarını değerlendirdikleri retinalarda kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında memantin grubunda anlamlı fark bulmazken, brimonidin ve hiperarik oksijen tedavisi gruplarında farkı istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır [108].

Bizim çalışmamızda RGH sayısında korunma olmasına rağmen farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması gruplardaki örnek sayısının yetersizliğinden kaynaklanıyor olabilir.

Günümüzdeki araştırmaların çoğu, RGH ölümünün altında yatan patolojik mekanizmaları araştıran ya da yeni terapötikleri değerlendiren genetik veya deneysel glokomatöz modellerde gerçekleştirilmektedir. Tüm glokomatöz modellerde glokomatöz dejenerasyonun gidişatını izlemek için RGH nicel ölçümleri yapılmaktadır [109].

Bu yöntemlerden başlıcaları şunlardır; temel histolojik boyama (hematoksilen eozin), Nissl boyama, nöronal immün boyama (NeuN veya beta tubulin) dır [110, 111, 112]. Bununla birlikte, bu yöntemler ayrıca rat retinasındaki amacrine hücreleri de (tüm hücrelerin yaklaşık%50si) boyadığı için RGH sayısını tam net vermez [113, 114].

Son çalışmalarda RGH'ler, Brn3a, RNA-binding protein with multiple splicing (RBPMs), gama-sinüklein gibi immün boyama yoluyla spesifik RGH markerları ile görselleştirilmiştir [115, 116]. The POU domain class 4 transkripsiyon

faktörü Brn 3a, RGH'lerin büyük çoğunluğunun çekirdeğini ve Fluoro-gold işaretli RGH'lerin %85-97 kadarını etiketlemektedir [117].

Bizim çalışmamızda brimonidin molekülü açısından her iki glokom modelinde Brn 3a pozitif RGH sayıları değerlendirildiğinde mekanik optik sinir hasarı modelinde var olan koruma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Galindo-Romero ve ark. eksitotoksik retinal hasardan sonra $\alpha 2$ -adrenerjik reseptör uyarımıyla nöron korumayı inceledikleri çalışmalarında; NMDA enjeksiyonu yapılan tavuk retinalarında Brn3a pozitif hücrelerin %30-50'sinde kayıp saptamışlardır. Brimonidin ile tedavi edilen grupta işlemden 7 ve 14 gün sonra Brn3a pozitif hücrelerin kaybının azaldığını göstermişlerdir [118].

Literatüre bakıldığında deneysel rat glokom modeli çalışmalarında brimonidin tedavisi uygulanan gözlerde Brn 3a sayımının yapılmadığı görülmektedir, bu yönüyle çalışmamız topikal brimonidin tedavisi uygulanan ve Brn 3a sonuçlarını araştıran ilk çalışma olarak değerlendirilebilir.

Bax, apoptozun birçok yolunda gerekli olan Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik bir üyesidir; ayrıca mitokondrilerden sitoplazmaya çıkarak apoptozisi başlatan proteinlerin kaçmasına izin veren mitokondriyal geçirgenlik geçiş porunu oluşturan bileşenle doğrudan etkileşime girer [119]. Brimonidin aracılı alfa 2 reseptör aktivasyonunun, Bcl-2 ve Bcl-xL dahil olmak üzere sağkalım faktörlerini artıran fosfatidil inositol-3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz / Akt yollarını aktive ettiği bildirilmiştir [120].

Yaptığımız çalışmada mekanik optik sinir hasarı modelinde Bax pozitif RGH sayılarında brimonidin grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma vardı ($p<0.05$).

Lee ve ark. akut retinal iskemi sonrası 4 hafta süre ile sistemik brimonidin tedavisi alan ratlarda Western Blot analizle yapılan değerlendirmede Bax protein seviyelerinde azalma Bcl-xL and pBad ekspresyonunda artma tespit etmişlerdir [121].

Yiğit ve ark. akut iskemi sonrası memantin, hiperbarik oksijen tedavisi ve brimonidin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında TUNEL boyama ile değerlendirdikleri retinalarda topikal brimonidin uygulanan gözlerde apoptoz indeksini istatistiksel olarak anlamlı düşük bulmuşlardır [108].

RGH'lerde apoptozisi değerlendirmek için literatürde genellikle TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Bax protein incelemesi yapılan çalışmalarda protein miktarı tespiti Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Bizim çalışmamızda Bax proteininin immunohistokimyasal olarak inceleniyor olması geçici retinal iskemi modelinde farkı göstermemizde yetersiz kalmış olabilir.

Lindsey ve ark. sistemik brimonidin tedavisinin optik sinir hasarını takiben RGH dendritlerinin belirgin bir şekilde korunmasını sağladığını göstermektedir. Buna ek olarak, çeşitli RGH tiplerinin optik sinir hasarına verdikleri cevaplarda ve brimonidin tedavisi ile elde edilen bu cevaplar açısından farklı olduklarını göstermiştir. Toplam dendrit uzunluğundaki değişiklikler, aynı olmasa da, dallanma karmaşıklığındaki değişiklikler ile benzer bulunmuştur [122].

Çalışmamızda retinadaki reaktif gliosis değerlendirmek için, astrositler ve Müller hücrelerinde değişen glial reaktiviteyi yansıtan işaretçiler arasında en iyi bilinen GFAP ekspresyonunu değerlendirdik. Her iki glkom modeli GFAP ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde geçici retinal iskemi modelinde var olan azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

GFAP retinal stresin bir belirteci olarak kabul edilir, çünkü ekspresyonu farklı retina hasar tiplerinden sonra artar [123, 124, 125] Retina'da, GFAP iki farklı hücre türü, astrosit ve Müller hücresi tarafından eksprese edilir. Astrositler gangliyon hücresi aksonları ve kan damarlarının etrafını sarar. Nöronal sinyallerde ve endotel bariyer özelliklerinin korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir [126, 127] Buna karşılık, retinanın tüm kalınlığını kapsayan Müller hücreleri, iç sınırlayıcı membrandan dış sınırlayıcı membrana kadar, potasyum homeostazı ve glutamat metabolizmasının regülasyonu da dahil olmak üzere retinadaki nöronal fonksiyonu çeşitli mekanizmalarla düzenler [126].

Zhao ve ark. tavşanlarda oluşturdukları mikrotaneciklerle indüklenen oküler hipertansiyon modelinde GFAP molekülünün immunofloresan incelemesini gerçekleştirmişlerdir [128]. Çalışma sonuçlarında kontrol gözlerde astrositler üzerinde bir arka plan GFAP ekspresyonu gösterilirken mikrotanecik enjekte edilen gözlerin büyük bir kısmında güçlü GFAP immünreaktivitesi aktivasyonu gösterilmiştir. Bu durum, astrositler ve Müller hücre proseslerinde tüm retina katmanları boyunca belirgindir [128]. Daha önceki çalışmalarda da kemirgen modellerinde akut ve kronik GİB artışında ve insanlarda glokom fenotip çalışmalarında da GFAP up regülasyonu gösterilmiştir [129, 130, 131, 132].

İn vitro olarak RGH ve glial hücrelerin birlikte kültürlerini kullanarak yapılan çalışmalarda, glokomatöz bir uyarana maruz kalan RGH'lerin apoptotik süreçlere girdiğini, buna karşılık glial hücrelerin aynı stres koşulları altında hayatta kaldıklarını göstermiştir [133, 134].

Glial hücrelerin, glokomatöz lezyonlarda nispeten korunmuş olduğu düşünülmekte ve artmış GFAP ekspresyonu ile aktive edilmiş bir fenotip göstermektedir [135, 132, 125, 136]. Glial hücrelerin bu yanıtı, glokomatöz nörodejenerasyon sırasında ve hatta GİB normalleştikten sonra da kalır [135, 132]. Glial hücreler bu koşullarda hayatta olsa da aşırı glutamatın ekstraselüler ortamdan alınamaması ve glutamin sentetazın değişmesi gibi nöron koruyucu kapasiteyle ilgili işlevsel değişiklikler gösterirler. Dahası, gliotik Müller hücreleri, potasyum kanallarının değişmiş bir ekspresyonuna ve işlevine sahiptir ve bunun sonucu olarak, iyon homeostazı değişkendir ve retinal ödem gelişimi oluşur [137]. Aktive edilmiş glial hücrelerin TNF-alfa ve nitrik oksit sintazı gibi nörotoksik maddelerin üretimi ile nöronal doku üzerinde zararlı etkiler gösterebileceği de ileri sürülmüştür [134].

Kim ve ark. episkleral ven kotarizasyonu ile oluşturulan deneysel glokom modelinde 8 hafta uygulanan topikal brimonidin tedavisinden sonra GFAP ekspresyonunda anlamlı bir azalma bulmuşlardır [104].

WoldeMussie ve ark. episkleral ve limbal venlerin lazerle fotokoagülasyonu ile indüklenen deneysel glokom modelinde sistemik brimonidin ve timolol etkilerini

araştırmışlardır. Brimonidin GFAP boyamasında belirgin bir azalmaya neden olurken timolol grubunda anlamlı bir azalma görülmemiştir [105].

Vidal ve ark. episkleral ven kotarizasyonu ile oluşturdukları deneysel glokom modelinde timolol, latanoprost ve brimonidin tedavilerinde Müller hücre reaktivitesini karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında brimonidin ile 3 ay tedaviden sonra GFAP immünreaktivitesi, tedavi edilmemiş hayvanlara kıyaslandığında önemli ölçüde artmış olarak kalmış, brimonidin ile bu oran daha az olarak gösterilmiştir [131].

Jung ve ark. α 2-adrenoseptör aktivasyonunun glutamat taşıyıcılarını ve NMDA reseptörlerini modüle edip etmediğini kronik oküler hipertansiyon modelinde araştırmışlardır. Episkleral vein kotarizasyonu sonrası günde iki kez brimonidin uygulanan gözlerde topikal brimonidin tedavisinin glutamat taşıyıcısı ve NMDA reseptörünün modülasyonu yoluyla glutamat eksitotoksitesini azalttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada brimonidin tedavisi uygulanan gözlerde belirgin GFAP immunoreaktivitesinde azalma gözlenmiştir [138].

Brimonidin'in GFAP immünreaktivitesini etkilediği mekanizma iyi bilinmemekle birlikte, astrosit alfa 2 adrenerjik reseptörlerin uyarılmasının direkt bir etkisi olduğu düşünülmektedir [104].

Mikroglial hücreler merkezi sinir sistemindeki birincil immun sistem hücreleridir. Sinir sistemi homeostazının devamı, korunması ve restorasyonunda görev yapmaktadırlar. Beyin, omurilik ve retinan parankimasında bulunurlar. Mikroglial hücreler, nöronların hayatta kalması için yaşamsal görevlerde yer almasına rağmen, bir dizi nörodejeneratif bozuklukta nedensel bir faktör olarak kabul edilmişlerdir. Nöronal sağkalımı risk altına sokabilecek stres koşulları altında mikroglial hücreler yeniden aktive olur ve proliferatif süreçlere ve hasar gören hücrelerle etkileşime girebilir hale gelirler [139, 140].

Bizim yaptığımız çalışmada brimonidin molekülü açısından geçici retinal iskemi modelinde anti-Iba1 immunohistokimyasında var olan azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

Literatüre bakıldığında deneysel glokom modelinde birimonidin tedavisi uygulanıp anti-Iba1 cevabı bakılan çalışma bulunmamaktadır.

CoQ10, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin önemli bir bileşenidir ve aynı zamanda diğer nörodejeneratif hastalıklarda nöron koruma etkileri olduğu gösterilen güçlü bir antioksidandır [28].

CoQ10 'un nöron koruyucu etkisi kısmen serbest radikal toplama kapasitesine bağlanmıştır. Mitokondriyal permeabilite geçiş gözeneklerinin özgül bir inhibisyonunu sağlar, bu kanalların açılması mitokondriyal membranın potansiyel çöküşüne neden olarak apoptozise yol açar [141].

Bitki ve hayvan hücresi membranlarında bulunan CoQ10, insan vücudu tarafından da sentezlenebilir. Ancak yaşla birlikte CoQ10 sentezi azalır ve yaşlı insanlarda plazma seviyelerinin düşmesine neden olur [142]. CoQ10 kaybının, kalp yetmezliği ve mitokondriyal defektlere neden olduğu gösterilmiştir [143].

E vitamini, lipid ile çözünen tokoferoller ve tokotriyollerini içeren, güçlü antioksidan aktiviteleri olan gerekli mikro besin öğelerinden oluşan bir ailenin ürünüdür. E vitamini ailesi arasında, α -tokoferol, memeli dokularında bulunan temel bileşendir ve en yüksek biyolojik etkinliğe sahiptir.

Hayvan modellerinde, α -tokoferolün serebral iskemiden sonra görülen hipokampal hücrelerin dejenerasyonunu azalttığı ve Alzheimer hastalığını iyileştirdiği bulunmuştur [144]. CoQ10 alımı endojen E vitamini miktarlarını arttırarak dokuların antioksidatif potansiyelini arttırır.

Bizim çalışmamızda CoQ10+Vit.E gruplarında RGH sayıları ve Brn3a pozitif RGH sayıları değerlendirildiğinde mekanik optik sinir hasarı grubunda istatistiksel olarak anlamlı korunma saptandı ($p<0.05$). Mekanik optik sinir hasarı modelinde GFAP pozitif RGH sayıları karşılaştırıldığında CoQ10 + Vit.E grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu ($p<0.05$).

Nucci ve ark. larının CoQ10'un göziçi uygulanması ile glutamat artışını en aza indirgeyerek sıçanlarda retinal iskemide / reperfüzyon sonrası nöroproteksiyonu

sağladığı 24 saat sonra yapılan incelemede RGH apoptozisinde azalma olduğunu göstermişlerdir [145].

Lee ve ark. CoQ10 içeren diyet verdikleri micelerde oluşturdukları geçici retinal iskemi modelinde RGH sağkalımlarını ve oksidatif stress sonuçlarını değerlendirmişlerdir. CoQ10 kontrol diyeti ile tedavi edilen iskemik retina ile karşılaştırıldığında RGH sağkalımını önemli ölçüde yükselttiği Brn 3a immunflüoresan çalışmaları ile gösterilmiştir [146]. Western Blot analizi ile yapılan incelemelerde Bax protein ekspresyonunda düşüş saptamışlardı, aynı çalışmada TUNEL yöntemi ile değerlendirilen retinalarda apoptozis de azalma tespit edilmiştir [146].

Astroglial ve / veya mikrogial aktivasyon, insan, sıçan veya fare hipertansif retinasında RGH dejenerasyonu ile aynı anda olmaktadır. Aynı çalışmada iskemik retinalarda Western blot ile GFAP ve Iba-1 cevabında bakılmıştır. Kontrol diyetle tedavi edilen iskemik retinanın ganglion hücre ve sinir lif tabakasındaki aktif astroglia ve mikrogial hücrelerde GFAP ve Iba-1 immünreaktivitesinin 12. saatte arttığı, buna karşılık, CoQ10 diyet ile tedavi edilen iskemik retina ile karşılaştırıldığında, iskemik retinada 12 saatte GFAP ve Iba-1 protein ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [146].

Lee ve ark. diğer çalışmasında preglokomatöz farelerde 6 ay süre ile uyguladıkları CoQ diyeti sonuçlarına baktıklarında koenzim Q'nun glokomatöz DBA/2J farelerde Brn3a ile yapılan değerlendirmede RGH sağkalımını yaklaşık %29 arttırdığını göstermişlerdir [102].

Davis ve ark. in vitro ve in vivo oluşturdukları deney modellerinde (hücre kültürü ve episkleral ven koterizasyonu ile oluşturulan oküler hipertansiyon modeli) topikal CoQ molekülünün DARC (Apoptotik Retinal Hücrelerin Saptanması) ve Brn3a histopatolojik değerlendirme ile sonuçlarına baktıklarında CoQ'nun RGH apoptozisini engellediğinin RGH sayısını koruduğunu göstermişlerdir [147].

Yapılan alışmalarada immunohistokimyasal incelemelerde Brn3a için immunflorasana inceleme kullanılmıştır. Bizim alışmamızda immunflorasansın kullanılmamış olması sonuçlarımızı etkilemiş olabilir.

Yaptığımız çalışmada geçici retinal iskemi modelinde Bax pozitif RGH sayılarında istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu ($p<0.05$).

CoQ+Vit.E ile yapılan çalışmalara baktığımızda Nucci ve ark. akut iskemi sonrası intraoküler CoQ tedavisi uyguladıkları ratlarda TUNEL yöntemi ile değerlendirdikleri retinalarda CoQ nun glutamat artışını oksidatif stresi ve enerji yetmezliğini en aza indirdiği ve RGH lm mekanizmaları ile ilişkili olabileceğini düşündüren nöroproteksiyon sağladığını belirtmişlerdir [145].

Literatürdeki alışmalarada RGH apoptozisi TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiştir, bizim çalışmamızda pro-apoptotik bir protein olan Bax ın değerlendirilmesi sonuçlardaki farklılığa neden olmuş olabilir.

Glokomda diğer aktivasyon özelliklerinin yanı sıra mikrogliyal çoğalma hem insanda hem de deneysel hayvan modellerinde bildirilmiştir [148, 149]. Mikrogliyal hücrelerin miktarının belirlenmesi, retinayı da içeren sinir sisteminde devam eden stres durumları hakkında bilgi verir.

Bizim alışmamızda CoQ+Vit.E molekülü açısından anti-Iba1 antikoru pozitifliğinde geçici retinal iskemi modelinde var olan azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

Heiduschka ve ark. yaptıkları çalışmada patojenik Opa 1 mutasyonu taşıyan farelerde yaptıkları çalışmada, bir mikrogliyal hücre bir RGH'yi fagositozalarsa, en azından DiI boyası içeren veziküllerin izlerini içermelidir hipotezini sunmuşlardır [150]. Bir fagositoza bağlı etiketleme kavramı ilk kez Thanos ve ark. tarafından sunulmuştur [151]. Retrograd etiketlemeden altı hafta sonra, Iba-1 ile boyanan mikrogliyal hücrelerde DiI floresansının vezikül benzeri inklüzyonları gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu durum yazaralara RGH'lerin mikrogliyal hücreler tarafından fagositize edildiğini gösterdiğini düşündürmüştür [150].

Tek taraflı lazere bağlı oküler hipertansiyon fare modelinde, mikrogliyal proliferasyon, sadece oküler hipertansiyon gözlerinde değil, aynı zamanda kontralateral gözlerde de ortaya çıkmıştır [152, 153].

Glokomda Müller hücrelerinin gliotik yanıtı ve bunların koruyucu ya da zararlı etkileri hakkında daha fazla bilgi nöron koruma mekanizmalarını uyaran etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve gliozun tahrip edici mekanizmalarının önlenmesi için gereklidir.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak brimoninidn molekülünün mekanik optik sinir hasarı grubunda Brn3a pozitif RGH sayısında anlamlı korunma, Bax protein immunohistokimyasında anlamlı azalma görüldü ve geçici retinal iskemi modelinde ise hem GFAP hem anti-Iba1 moleküllerinde anlamlı azalma vardı.

CoQ+Vit.E tedavisi mekanik optik sinir hasarı modelinde Brn3a pozitif RGH 'lerde korunma vardı, GFAP immunohistokimyasında anlamlı azalma gösterildi. Geçici retinal iskemi modelinde Bax ve anti Iba-1 immunohistokimyasal çalışmalarında anlamlı azalma saptandı.

6. SONUÇ

Glokom tedavisinde hipotansif tedavi değerini ve önemini korumakla birlikte, GİB'dan bağımsız mekanizmaların da RGH hayatiyetinde önemli olduğunun bilinmesi, giderek glokomda nöron koruyucu tedavi yaklaşımlarına ilgiyi artırmaktadır. Literatürde bu konuya yönelik deneysel ve klinik çalışmaların arttığı görölmektedir. Bizim çalışmamızda da nöron koruyucu tedavide güncel iki molekülün iki farklı deneysel glokom modelindeki etkileri araştırıldı. Deneysel çalışmamızda birimonidin ve CoQ10+Vit. E moleküllerinin RGH ve glial hücre markerlarına olan etkileri, günümüz glokom tedavisinde nöron korunma konusunda değerlerinin olabileceğini gösterdi.

ÖZET

İki Farklı Deneysel Glokom Modelinde Topikal Brimonidin ve Koenzim Q10+Vit. E'nin Nöron Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Bu çalışmada ratlarda oluşturulan iki farklı deneysel glokom modelinde topikal brimonidin ve CoQ10+Vit. E kombinasyonunun retina ganglion hücreleri üzerindeki nöron koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

İki farklı deneysel glokom modeli oluşturulan ratlar (1. glokom modeli: mekanik optik sinir hasarı, 2. glokom modeli: geçici retinal iskemi modeli) 6 gruba ayrıldı. Birinci, 2. Ve 3. gruptaki ratlara mekanik optik sinir hasarlandırılması, diğer gruplara geçici retinal iskemi modeli uygulandı. Birinci ve dördüncü grup ratlara (n=6) ilaç tedavisi verilmezken; 2. Ve 5. grup ratlara (n=6) 4 hafta süreyle topikal brimonidin, 3. ve 6. grup ratlara 4 hafta süreyle topikal CoQ10+Vit.E uygulaması yapıldı. Dördüncü hafta sonunda kurban edilen ratların gözleri enükle edilerek patolojik analizleri yapıldı. Patolojik analizde Brn-3a (POU- domain protein), Bax, GFAP (glial fibriler asidik protein) ve anti- Iba1 markerları değerlendirildi.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak brimonidin molekülünün mekanik optik sinir hasarı grubunda Brn3a pozitif RGH sayısında anlamlı korunma (8.3 ± 3.5 karşılık 15.0 ± 1.0), Bax protein immunohistokimyasında anlamlı azalma ($\%11.8 \pm 2.0$ karşılık $\%4.5 \pm 1.4$) görüldü ve geçici retinal iskemi modelinde ise hem GFAP (22.0 ± 3.6 karşılık 13.2 ± 1.5) hem anti-Iba1 (100.7 ± 7.5 karşılık 57.7 ± 14.6) moleküllerinde anlamlı azalma vardı.

CoQ+Vit.E tedavisi mekanik optik sinir hasarı modelinde Brn3a pozitif RGH 'lerde korunma (15.0 ± 1.0 karşılık 22.2 ± 4.8) idi, GFAP immunohistokimyasında anlamlı azalma (11.7 ± 2.1 karşılık 2.5 ± 1.5) gösterildi. Geçici retinal iskemi modelinde Bax ($\%22.9 \pm 2.3$ karşılık $\%14.4 \pm 5.6$) ve anti Iba-1 (100.7 ± 7.5 karşılık 70.3 ± 8.6) immunohistokimyasal çalışmalarında anlamlı azalma saptandı.

Glokom tedavisinde hipotansif tedavi değerini ve önemini korumakla birlikte, GİB'dan bağımsız mekanizmaların da RGH hayatiyetinde önemli olduğunun bilinmesi, giderek glokomda nöron koruyucu tedavi yaklaşımlarına ilgiyi artırmaktadır. Literatürde bu konuya yönelik deneysel ve klinik çalışmaların arttığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda da nöron koruyucu tedavide güncel iki molekülün iki farklı deneysel glokom modelindeki etkileri araştırıldı. Deneysel çalışmamızda brimonidin ve CoQ10+Vit. E moleküllerinin RGH ve glial hücre markerlarına olan etkileri, günümüz glokom tedavisinde nöron korunma konusunda değerlerinin olabileceğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Glokom, Nöron koruma, Brimonidin, CoQ, Vit. E.

ABSTRACT

Investigation of Neuroprotective Effects of Topical Brimonidine Coenzyme Q10+Vitamin E in Two Different Experimental Glaucoma Models

In this study we aimed to create two different experimental glaucoma models in rats and to investigate the neuroprotective effects of topical brimonidine and coenzyme Q10 + Vit.E molecules on retinal ganglion cells. Rats were divided into 6 groups with two different experimental glaucoma models (1st glaucoma model: mechanical optic nerve damage, 2nd glaucoma model: transient retinal ischemia model). Mechanical optic nerve model was created in the 1st, 2nd and 3rd group; transient retinal ischemia model was applied to other groups. While drug treatment was not given to the 1st and 4th group rats (n = 6); topical brimonidine treatment was applied to 2nd and 5th group rats (n = 6), topical coenzyme Q10 + Vit.E was applied to 3rd and 6th group rats for 4 weeks.

At the end of the fourth week, the eyes of sacrificed rats were enucleated and pathological analyzes were performed. Brn-3a (POU-domain protein), Bax, GFAP and anti-Iba1 markers were evaluated in pathological analysis.

In brimonidine groups, significant decrease in the number of Brn3a-positive RGC (8.3 ± 3.5 vs. 15.0 ± 1.0) and decrease in Bax protein immunohistochemistry (11.8 ± 2.0 vs. $4.5 \pm 1.4\%$) were observed in the mechanical optic nerve damage model. In the transient retinal ischemia model, there were significant reduction in both GFAP (22.0 ± 3.6 vs. 13.2 ± 1.5) and anti-Iba1 (100.7 ± 7.5 vs. 57.7 ± 14.6) immunohistochemical studies.

In the mechanic optic nerve damage model, CoQ+Vit.E treatment showed significant protection in Brn3a positive RGCs (15.0 ± 1.0 vs. 22.2 ± 4.8) and reduction in GFAP immunohistochemistry (11.7 ± 2.1 vs. 2.5 ± 1.5). In the transient retinal ischemia model significant decrease in Bax (% 22.9 ± 2.3 versus 14.4 ± 5.6) and anti-Iba-1 (100.7 ± 7.5 vs. 70.3 ± 8.6) immunohistochemical studies were observed.

In the glaucoma knowing that IOP independent mechanisms are also important in the survival of RGC is increasing attention in neuroprotective treatment approaches while hypotensive treatment maintains its value and importance.

In the literature, experimental and clinical studies on this subject are increasing. In our study, neuroprotective effects of two molecules were investigated in two different experimental glaucoma models. Our experimental study has shown that in glaucoma treatment the neuron protecting effect of brimonidine and CoQ 10 + Vit.E can be valuable.

Key words: Glaucoma, Neuro-protection, Brimonidine, Coenzyme Q, Vitamin E.

7. KAYNAKLAR

- [1] Vander, A.J., S.J. A.L. D.S., “Human Physiology The sensory systems,” in *Human Physiology The sensory systems*, 1994, p. Vol. 9. 249-257.
- [2] Guyton A., “Tıbbi fizyoloji,” in *Tıbbi fizyoloji*, 2001, p. Vol. 10. 566-602.
- [3] C. A. Curcio, K. R. Sloan, R. E. Kalina, and A. E. Hendrickson, “Human photoreceptor topography,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 292, no. 4, pp. 497–523, Feb. 1990.
- [4] J. T. Kandel ER, S.J., “Principles of neural science.,” in *Principles of neural science.*, p. Vol. 26 507-522,.
- [5] K. A., “Comprehensive ophthalmology,” *Compr. Ophthalmol.*, pp. 14–15, 2007.
- [6] T. E. LeVere and T. E., “The primary visual system of the rat: A primer of its anatomy,” *Physiol. Psychol.*, vol. 6, no. 2, pp. 142–169, Jun. 1978.
- [7] J. Neitz and G. H. Jacobs, “Reexamination of spectral mechanisms in the rat (*Rattus norvegicus*).,” *J. Comp. Psychol.*, vol. 100, no. 1, pp. 21–9, Mar. 1986.
- [8] H. A. Quigley and A. T. Broman, “The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 90, no. 3, pp. 262–267, Mar. 2006.
- [9] J. E. Grunwald, J. Piltz, S. M. Hariprasad, J. Dupont, and M. G. Maguire, “Optic nerve blood flow in glaucoma: effect of systemic hypertension.,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 127, no. 5, pp. 516–22, May 1999.
- [10] J. E. Grunwald, J. Piltz, S. M. Hariprasad, and J. DuPont, “Optic nerve and choroidal circulation in glaucoma.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 39, no. 12, pp. 2329–36, Nov. 1998.

- [11] Sarıcaoğlu M.S., “Glokomda Yeni Tedavi Yaklaşımları: Gelecekte Ne Var?” *Glo-Kat* 2014;9:73-82
- [12] “Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 126, no. 4, pp. 487–97, Oct. 1998.
- [13] “The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 126, no. 4, pp. 498–505, Oct. 1998.
- [14] L. A. Levin, “Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 48 Suppl 1, pp. S21-4, Apr. 2003.
- [15] R. W. Nickells, “Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 43 Suppl 1, pp. S151-61, Jun. 1999.
- [16] M. E. Pease, S. J. McKinnon, H. A. Quigley, L. A. Kerrigan-Baumrind, and D. J. Zack, “Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 764–74, Mar. 2000.
- [17] H. A. Quigley, “Ganglion cell death in glaucoma: pathology recapitulates ontogeny,” *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.*, vol. 23, no. 2, pp. 85–91, May 1995.
- [18] M. Salinas-Navarro *et al.*, “Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration,” *Exp. Eye Res.*, vol. 90, no. 1, pp. 168–183, Jan. 2010.
- [19] I. Soto *et al.*, “Retinal Ganglion Cells Downregulate Gene Expression and Lose Their Axons within the Optic Nerve Head in a Mouse Glaucoma Model,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 2, pp. 548–561, Jan. 2008.

- [20] W.-K. Ju *et al.*, “Elevated hydrostatic pressure triggers release of OPA1 and cytochrome C, and induces apoptotic cell death in differentiated RGH-5 cells,” *Mol. Vis.*, vol. 15, pp. 120–34, 2009.
- [21] H. J. Kaiser, J. Flammer, M. Wenk, and T. Lüscher, “Endothelin-1 plasma levels in normal-tension glaucoma: abnormal response to postural changes,” *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 233, no. 8, pp. 484–8, Aug. 1995.
- [22] J. Flammer and M. Mozaffarieh, “What Is the Present Pathogenetic Concept of Glaucomatous Optic Neuropathy?,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 52, no. 6, pp. S162–S173, Nov. 2007.
- [23] M. C. Grieshaber, M. Mozaffarieh, and J. Flammer, “What Is the Link Between Vascular Dysregulation and Glaucoma?,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 52, no. 6, pp. S144–S154, Nov. 2007.
- [24] G. A. Cioffi, “Three common assumptions about ocular blood flow and glaucoma,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 45 Suppl 3, pp. S325–31–4, May 2001.
- [25] G. A. Cioffi, “Ischemic model of optic nerve injury,” *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, vol. 103, pp. 592–613, 2005.
- [26] M. Seki and S. A. Lipton, “Targeting excitotoxic/free radical signaling pathways for therapeutic intervention in glaucoma,” *Prog. Brain Res.*, vol. 173, pp. 495–510, 2008.
- [27] P. Jenner, “Oxidative damage in neurodegenerative disease,” *Lancet (London, England)*, vol. 344, no. 8925, pp. 796–8, Sep. 1994.
- [28] M. F. Beal, “Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases,” *Ann. Neurol.*, vol. 38, no. 3, pp. 357–366, Sep. 1995.
- [29] L. A. Kerrigan, D. J. Zack, H. A. Quigley, S. D. Smith, and M. E. Pease, “TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma,” *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 115, no. 8, pp. 1031–5, Aug. 1997.

- [30] A. J. Weber, P. L. Kaufman, and W. C. Hubbard, "Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 39, no. 12, pp. 2304–20, Nov. 1998.
- [31] E. C. Johnson, Y. Guo, W. O. Cepurna, and J. C. Morrison, "Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: Lessons from rat glaucoma models," *Exp. Eye Res.*, vol. 88, no. 4, pp. 808–815, Apr. 2009.
- [32] J. Caprioli, "Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma.," *Acta Ophthalmol. Scand.*, vol. 75, no. 4, pp. 364–7, Aug. 1997.
- [33] X. Huang, D.-Y. Wu, G. Chen, H. Manji, and D. F. Chen, "Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 1, pp. 347–54, Jan. 2003.
- [34] M. Schwartz, "Neuroprotection as a treatment for glaucoma: Pharmacological and immunological approaches.," *Eur. J. Ophthalmol.*, vol. 13, no. Suppl. 3, pp. 27–31.
- [35] L. Frisén, "High-pass resolution perimetry and age-related loss of visual pathway neurons.," *Acta Ophthalmol.*, vol. 69, no. 4, pp. 511–5, Aug. 1991.
- [36] C. A. Girkin, "Strategies for neuroprotection.," *J. Glaucoma*, vol. 10, no. 5 Suppl 1, pp. S78-80, Oct. 2001.
- [37] D. R. LUCAS and J. P. NEWHOUSE, "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina.," *AMA. Arch. Ophthalmol.*, vol. 58, no. 2, pp. 193–201, Aug. 1957.
- [38] D. W. Choi, "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.," *Neuron*, vol. 1, no. 8, pp. 623–34, Oct. 1988.
- [39] J. Gusman, H. Malonne, and G. Atassi, "A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol.," *Carcinogenesis*, vol. 22, no. 8, pp. 1111–7, Aug. 2001.

- [40] M. F. Beal, "Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses?," *Ann. Neurol.*, vol. 31, no. 2, pp. 119–130, Feb. 1992.
- [41] B. K. Siesjö, H. Memezawa, and M. L. Smith, "Neurocytotoxicity: pharmacological implications," *Fundam. Clin. Pharmacol.*, vol. 5, no. 9, pp. 755–67, 1991.
- [42] Y. Nishizawa, "Glutamate release and neuronal damage in ischemia," *Life Sci.*, vol. 69, no. 4, pp. 369–81, Jun. 2001.
- [43] D. D. Limbrick, S. Sombati, and R. J. DeLorenzo, "Calcium influx constitutes the ionic basis for the maintenance of glutamate-induced extended neuronal depolarization associated with hippocampal neuronal death," *Cell Calcium*, vol. 33, no. 2, pp. 69–81, Feb. 2003.
- [44] J. T. Coyle *et al.*, "Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity, and mechanisms of action. Based on an NRP one-day conference held June 30, 1980," *Neurosci. Res. Program Bull.*, vol. 19, no. 4, pp. 1–427, 1981.
- [45] T. P. Obrenovitch, J. Urenjak, E. Zilkha, and T. M. Jay, "Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox," *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 18, no. 2–3, pp. 281–7.
- [46] E. B. Dreyer and S. A. Lipton, "New perspectives on glaucoma," *JAMA*, vol. 281, no. 4, pp. 306–8, Jan. 1999.
- [47] S. A. Lipton, "Retinal ganglion cells, glaucoma and neuroprotection," *Prog. Brain Res.*, vol. 131, pp. 712–8, 2001.
- [48] S. A. Lipton, "Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage," *Surv. Ophthalmol.*, vol. 48 Suppl 1, pp. S38–46, Apr. 2003.

- [49] S. A. Lipton, "Failures and successes of NMDA receptor antagonists: Molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults," *NeuroRX*, vol. 1, no. 1, pp. 101–110, Jan. 2004.
- [50] D. E. Brooks, G. A. Garcia, E. B. Dreyer, D. Zurakowski, and R. E. Franco-Bourland, "Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma.," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 58, no. 8, pp. 864–7, Aug. 1997.
- [51] E. B. Dreyer and C. L. Grosskreutz, "Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG).," *Clin. Neurosci.*, vol. 4, no. 5, pp. 270–3, 1997.
- [52] E. B. Dreyer, D. Zhang, and S. A. Lipton, "Transcriptional or translational inhibition blocks low dose NMDA-mediated cell death.," *Neuroreport*, vol. 6, no. 6, pp. 942–4, Apr. 1995.
- [53] E. B. Dreyer, D. Zurakowski, R. A. Schumer, S. M. Podos, and S. A. Lipton, "Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma.," *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 114, no. 3, pp. 299–305, Mar. 1996.
- [54] N. N. Osborne, "Memantine reduces alterations to the mammalian retina, in situ, induced by ischemia.," *Vis. Neurosci.*, vol. 16, no. 1, pp. 45–52.
- [55] E. WoldeMussie, E. Yoles, M. Schwartz, G. Ruiz, and L. A. Wheeler, "Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats.," *J. Glaucoma*, vol. 11, no. 6, pp. 474–80, Dec. 2002.
- [56] D. Muller, M. Joly, and G. Lynch, "Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP.," *Science*, vol. 242, no. 4886, pp. 1694–7, Dec. 1988.
- [57] R. Schneggenburger, Z. Zhou, A. Konnerth, and E. Neher, "Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels.," *Neuron*, vol. 11, no. 1, pp. 133–43, Jul. 1993.

- [58] T. Gründer, K. Kohler, A. Kaletta, and E. Guenther, "The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat.," *J. Neurobiol.*, vol. 44, no. 3, pp. 333–42, Sep. 2000.
- [59] M. Sheng, J. Cummings, L. A. Roldan, Y. N. Jan, and L. Y. Jan, "Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex," *Nature*, vol. 368, no. 6467, pp. 144–147, Mar. 1994.
- [60] F. A. Stephenson, "Subunit characterization of NMDA receptors.," *Curr. Drug Targets*, vol. 2, no. 3, pp. 233–9, Sep. 2001.
- [61] C. K. Vorwerk *et al.*, "Excitotoxicity can be mediated through an interaction within the optic nerve; activation of cell body NMDA receptors is not required.," *Vet. Ophthalmol.*, vol. 4, no. 3, pp. 201–4, Sep. 2001.
- [62] A. Bringmann *et al.*, "Müller cells in the healthy and diseased retina.," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 397–424, Jul. 2006.
- [63] A. Kawasaki, Y. Otori, and C. J. Barnstable, "Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 11, pp. 3444–50, Oct. 2000.
- [64] J. H. Brandstätter, E. Hartveit, M. Sassoè-Pognetto, and H. Wässle, "Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina.," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 6, no. 7, pp. 1100–12, Jul. 1994.
- [65] C. Matute, M. V. Sánchez-Gómez, L. Martínez-Millán, and R. Miledi, "Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 16, pp. 8830–5, Aug. 1997.
- [66] E. Park, Y. Liu, and M. G. Fehlings, "Changes in glial cell white matter AMPA receptor expression after spinal cord injury and relationship to apoptotic cell death.," *Exp. Neurol.*, vol. 182, no. 1, pp. 35–48, Jul. 2003.

- [67] F. Schuettauf, R. Naskar, C. K. Vorwerk, D. Zurakowski, and E. B. Dreyer, "Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 13, pp. 4313–6, Dec. 2000.
- [68] Z. Z. Chong, F. Li, and K. Maiese, "Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 75, no. 3, pp. 207–46, Feb. 2005.
- [69] G. C. Brown and A. Bal-Price, "Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria.," *Mol. Neurobiol.*, vol. 27, no. 3, pp. 325–55, Jun. 2003.
- [70] P. Calabresi, B. Picconi, E. Saulle, D. Centonze, A. H. Hainsworth, and G. Bernardi, "Is pharmacological neuroprotection dependent on reduced glutamate release?," *Stroke*, vol. 31, no. 3, p. 766–72; discussion 773, Mar. 2000.
- [71] V. Castagne, M. Gautschi, K. Lefevre, A. Posada, and P. G. Clarke, "Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 59, no. 4, pp. 397–423, Nov. 1999.
- [72] D. B. Bylund and D. M. Chacko, "Characterization of alpha2 adrenergic receptor subtypes in human ocular tissue homogenates.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40, no. 10, pp. 2299–306, Sep. 1999.
- [73] L. A. Wheeler, D. W. Gil, and E. WoldeMussie, "Role of alpha-2 adrenergic receptors in neuroprotection and glaucoma.," *Surv. Ophthalmol.*, vol. 45 Suppl 3, pp. S290-4-6, May 2001.
- [74] V. Prokosch *et al.*, "α2-Adrenergic Receptors and Their Core Involvement in the Process of Axonal Growth in Retinal Explants," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 51, no. 12, p. 6688, Dec. 2010.

- [75] J. E. Donello, E. U. Padillo, M. L. Webster, L. A. Wheeler, and D. W. Gil, "alpha (2)-Adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation and preserve retinal function after transient ischemia.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 296, no. 1, pp. 216–23, Jan. 2001.
- [76] F. B. Kalapesi, M. T. Coroneo, and M. A. Hill, "Human ganglion cells express the alpha-2 adrenergic receptor: relevance to neuroprotection," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 89, no. 6, pp. 758–763, Jun. 2005.
- [77] E. Yoles, L. A. Wheeler, and M. Schwartz, "Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 65–73, Jan. 1999.
- [78] C.-J. Dong, Y. Guo, P. Agey, L. Wheeler, and W. A. Hare, "α2 Adrenergic Modulation of NMDA Receptor Function as a Major Mechanism of RGH Protection in Experimental Glaucoma and Retinal Excitotoxicity," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 49, no. 10, p. 4515, Oct. 2008.
- [79] A. Harris, R. C. Sergott, G. L. Spaeth, J. L. Katz, J. A. Shoemaker, and B. J. Martin, "Color Doppler analysis of ocular vessel blood velocity in normal-tension glaucoma.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 118, no. 5, pp. 642–9, Nov. 1994.
- [80] D. Moore, A. Harris, D. Wudunn, N. Kheradiya, and B. Siesky, "Dysfunctional regulation of ocular blood flow: A risk factor for glaucoma?," *Clin. Ophthalmol.*, vol. 2, no. 4, pp. 849–61, Dec. 2008.
- [81] A. Harris and C. P. Jonescu-Cuypers, "The impact of glaucoma medication on parameters of ocular perfusion.," *Curr. Opin. Ophthalmol.*, vol. 12, no. 2, pp. 131–7, Apr. 2001.
- [82] C. P. Jonescu-Cuypers *et al.*, "Effect of Brimonidine Tartrate on Ocular Hemodynamics in Healthy Volunteers," *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 17, no. 3, pp. 199–205, Jun. 2001.

- [83] T. Aung *et al.*, “Randomised controlled trial comparing the effect of brimonidine and timolol on visual field loss after acute primary angle closure.,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 88, no. 1, pp. 88–94, Jan. 2004.
- [84] J.-C. Tsai and H.-W. Chang, “Comparison of the Effects of Brimonidine 0.2% and Timolol 0.5% on Retinal Nerve Fiber Layer Thickness in Ocular Hypertensive Patients: A Prospective, Unmasked Study,” *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 21, no. 6, pp. 475–482, Dec. 2005.
- [85] T. Krupin, J. M. Liebmann, D. S. Greenfield, R. Ritch, S. Gardiner, and Low-Pressure Glaucoma Study Group, “A Randomized Trial of Brimonidine Versus Timolol in Preserving Visual Function: Results From the Low-pressure Glaucoma Treatment Study,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 151, no. 4, pp. 671–681, Apr. 2011.
- [86] A. IZZOTTI, A. BAGNIS, and S. SACCA, “The role of oxidative stress in glaucoma,” *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 612, no. 2, pp. 105–114, Mar. 2006.
- [87] S. M. Ferreira, S. F. Lerner, R. Brunzini, P. A. Evelson, and S. F. Llesuy, “Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients.,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 137, no. 1, pp. 62–9, Jan. 2004.
- [88] A. Goyal, A. Srivastava, R. Sihota, and J. Kaur, “Evaluation of Oxidative Stress Markers in Aqueous Humor of Primary Open Angle Glaucoma and Primary Angle Closure Glaucoma Patients,” *Curr. Eye Res.*, vol. 39, no. 8, pp. 823–829, Aug. 2014.
- [89] J. Yang, G. Tezel, R. V Patil, C. Romano, and M. B. Wax, “Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 42, no. 6, pp. 1273–6, May 2001.
- [90] D. Gherghel, H. R. Griffiths, E. J. Hilton, I. A. Cunliffe, and S. L. Hosking, “Systemic Reduction in Glutathione Levels Occurs in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 46, no. 3, p. 877, Mar. 2005.

- [91] L. K. Geiger, K. R. Kortuem, C. Alexejun, and L. A. Levin, "Reduced redox state allows prolonged survival of axotomized neonatal retinal ganglion cells.," *Neuroscience*, vol. 109, no. 3, pp. 635–42, 2002.
- [92] J. Caprioli, Y. Munemasa, J. M. K. Kwong, and N. Piri, "Overexpression of thioredoxins 1 and 2 increases retinal ganglion cell survival after pharmacologically induced oxidative stress, optic nerve transection, and in experimental glaucoma.," *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, vol. 107, pp. 161–5, Dec. 2009.
- [93] K. I. Swanson, C. R. Schlieve, C. J. Lieven, and L. A. Levin, "Neuroprotective Effect of Sulfhydryl Reduction in a Rat Optic Nerve Crush Model," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 46, no. 10, p. 3737, Oct. 2005.
- [94] M.-L. Ko, P.-H. Peng, S.-Y. Hsu, and C.-F. Chen, "Dietary Deficiency of Vit. E Aggravates Retinal Ganglion Cell Death in Experimental Glaucoma of Rats," *Curr. Eye Res.*, vol. 35, no. 9, pp. 842–849, Sep. 2010.
- [95] N. N. Osborne, G. Chidlow, J. Wood, and R. Casson, "Some current ideas on the pathogenesis and the role of neuroprotection in glaucomatous optic neuropathy.," *Eur. J. Ophthalmol.*, vol. 13 Suppl 3, pp. S19-26, Apr. 2003.
- [96] J. P. Vrabcac and L. A. Levin, "The neurobiology of cell death in glaucoma," *Eye*, vol. 21, pp. S11–S14, Dec. 2007.
- [97] M. Ji *et al.*, "Group I mGluR-Mediated Inhibition of Kir Channels Contributes to Retinal Muller Cell Gliosis in a Rat Chronic Ocular Hypertension Model," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 37, pp. 12744–12755, Sep. 2012.
- [98] R. N. Weinreb and P. T. Khaw, "Primary open-angle glaucoma," *Lancet*, vol. 363, no. 9422, pp. 1711–1720, May 2004.
- [99] H. A. Quigley and S. Vitale, "Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 38, no. 1, pp. 83–91, Jan. 1997.

- [100] M. W. Tuck and R. P. Crick, "The projected increase in glaucoma due to an ageing population.," *Ophthalmic Physiol. Opt.*, vol. 23, no. 2, pp. 175–9, Mar. 2003.
- [101] K. Zhang, L. Zhang, and R. N. Weinreb, "Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 11, no. 7, pp. 541–59, Jun. 2012.
- [102] D. Lee *et al.*, "Coenzyme Q10 inhibits glutamate excitotoxicity and oxidative stress-mediated mitochondrial alteration in a mouse model of glaucoma.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 55, no. 2, pp. 993–1005, Feb. 2014.
- [103] F. D.C. Baptiste, A.T. Hartwick, C.A. Jollimore, W.H. Baldrige, B.C. Chauhan and M. E. K. Tremblay, "Comparison of the Neuroprotective Effects of Adrenoceptor Drugs in Retinal Cell Culture and Intact Retina - Journals - NCBI," *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (8), 2666-2676. 8 2002..
- [104] H. S. KIM, Y. I. CHANG, J. H. KIM, and C. K. PARK, "Alteration of retinal intrinsic survival signal and effect of [alpha]2-adrenergic receptor agonist in the retina of the chronic ocular hypertension rat," *Vis. Neurosci.*, vol. 24, no. 2, pp. 127–139, Mar. 2007.
- [105] E. WoldeMussie, G. Ruiz, M. Wijono, and L. A. Wheeler, "Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 42, no. 12, pp. 2849–55, Nov. 2001.
- [106] M. Hernández, J. H. Urcola, and E. Vecino, "Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments," *Exp. Eye Res.*, vol. 86, no. 5, pp. 798–806, May 2008.
- [107] K. Ma, L. Xu, H. Zhang, S. Zhang, M. Pu, and J. B. Jonas, "Effect of Brimonidine on Retinal Ganglion Cell Survival in an Optic Nerve Crush Model," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 147, no. 2, pp. 326–331, Feb. 2009.
- [108] U. Yiğit *et al.*, "An immunohistochemical analysis of the neuroprotective effects of memantine, hyperbaric oxygen therapy, and brimonidine after acute ischemia reperfusion injury.," *Mol. Vis.*, vol. 17, pp. 1024–33, Apr. 2011.

- [109] S. I. Balendra, E. M. Normando, P. A. Bloom, and M. F. Cordeiro, “Advances in retinal ganglion cell imaging,” *Eye (Lond)*, vol. 29, no. 10, pp. 1260–9, Oct. 2015.
- [110] A. Hedberg-Buenz *et al.*, “RetFM-J, an ImageJ-based module for automated counting and quantifying features of nuclei in retinal whole-mounts,” *Exp. Eye Res.*, vol. 146, pp. 386–392, May 2016.
- [111] B. P. Buckingham *et al.*, “Progressive Ganglion Cell Degeneration Precedes Neuronal Loss in a Mouse Model of Glaucoma,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 11, pp. 2735–2744, Mar. 2008.
- [112] B. Mead, A. Logan, M. Berry, W. Leadbeater, and B. A. Scheven, “Paracrine-Mediated Neuroprotection and Neuritogenesis of Axotomised Retinal Ganglion Cells by Human Dental Pulp Stem Cells: Comparison with Human Bone Marrow and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e109305, Oct. 2014.
- [113] K. Chiu, W.-M. Lau, S. Yeung, R. C.-C. Chang, and K.-F. So, “Retrograde Labeling of Retinal Ganglion Cells by Application of Fluoro-Gold on the Surface of Superior Colliculus,” *J. Vis. Exp.*, no. 16, Jun. 2008.
- [114] A. C. Nuschke, S. R. Farrell, J. M. Levesque, and B. C. Chauhan, “Assessment of retinal ganglion cell damage in glaucomatous optic neuropathy: Axon transport, injury and soma loss,” *Exp. Eye Res.*, vol. 141, pp. 111–124, Dec. 2015.
- [115] F. M. Nadal-Nicolás *et al.*, “Whole Number, Distribution and Co-Expression of Brn3 Transcription Factors in Retinal Ganglion Cells of Adult Albino and Pigmented Rats,” *PLoS One*, vol. 7, no. 11, p. e49830, Nov. 2012.
- [116] A. S. Irina Surgucheva 1, Alejandra D Weisman, Jeffrey L Goldberg, Alexander Shnyra, “ γ -Synuclein as a Marker of Retinal Ganglion Cells - Journals - NCBI.”

- [117] F. M. Nadal-Nicola's *et al.*, "Brn3a as a Marker of Retinal Ganglion Cells: Qualitative and Quantitative Time Course Studies in Naïve and Optic Nerve-Injured Retinas," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 50, no. 8, p. 3860, Aug. 2009.
- [118] C. Galindo-Romero, M. Harun-Or-Rashid, M. Jiménez-López, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso, and F. Hallböök, "Neuroprotection by α 2-Adrenergic Receptor Stimulation after Excitotoxic Retinal Injury: A Study of the Total Population of Retinal Ganglion Cells and Their Distribution in the Chicken Retina.," *PLoS One*, vol. 11, no. 9, p. e0161862, 2016.
- [119] Z. N. Oltvai, C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer, "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.," *Cell*, vol. 74, no. 4, pp. 609–19, Aug. 1993.
- [120] R. K. Lai, T. Chun, D. Hasson, S. Lee, F. Mehrbod, and L. Wheeler, "Alpha-2 adrenoceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat.," *Vis. Neurosci.*, vol. 19, no. 2, pp. 175–85.
- [121] D. Lee *et al.*, "Brimonidine blocks glutamate excitotoxicity-induced oxidative stress and preserves mitochondrial transcription factor a in ischemic retinal injury.," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e47098, 2012.
- [122] J. D. Lindsey, K. X. Duong-Polk, D. Hammond, P. Chindasub, C. K. -s. Leung, and R. N. Weinreb, "Differential Protection of Injured Retinal Ganglion Cell Dendrites by Brimonidine," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, no. 3, pp. 1789–1804, Mar. 2015.
- [123] I.-B. Kim *et al.*, "Reaction of Müller cells after increased intraocular pressure in the rat retina," *Exp. Brain Res.*, vol. 121, no. 4, pp. 419–424, Aug. 1998.
- [124] X. Wang, Y.-K. Ng, and S. S.-W. Tay, "Factors contributing to neuronal degeneration in retinas of experimental glaucomatous rats," *J. Neurosci. Res.*, vol. 82, no. 5, pp. 674–689, Dec. 2005.

- [125] X. Wang, S. S.-W. Tay, and Y.-K. Ng, "An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma," *Exp. Brain Res.*, vol. 132, no. 4, pp. 476–484, Jun. 2000.
- [126] A. BRINGMANN *et al.*, "Müller cells in the healthy and diseased retina," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 397–424, Jul. 2006.
- [127] E. L. Fletcher *et al.*, "A review of the role of glial cells in understanding retinal disease," *Clin. Exp. Optom.*, vol. 91, no. 1, pp. 67–77, Jan. 2008.
- [128] J. Zhao *et al.*, "Optic neuropathy and increased retinal glial fibrillary acidic protein due to microbead-induced ocular hypertension in the rabbit.," *Int. J. Ophthalmol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1732–1739, Dec. 2016.
- [129] K. J. Cho, J. H. Kim, H.-Y. L. Park, and C. K. Park, "Glial cell response and iNOS expression in the optic nerve head and retina of the rat following acute high IOP ischemia-reperfusion.," *Brain Res.*, vol. 1403, pp. 67–77, Jul. 2011.
- [130] S. Zhang *et al.*, "Detection of early neuron degeneration and accompanying glial responses in the visual pathway in a rat model of acute intraocular hypertension," *Brain Res.*, vol. 1303, pp. 131–143, Nov. 2009.
- [131] L. Vidal, F. Díaz, A. Villena, M. Moreno, J. G. Campos, and I. Pérez de Vargas, "Reaction of Müller cells in an experimental rat model of increased intraocular pressure following timolol, latanoprost and brimonidine.," *Brain Res. Bull.*, vol. 82, no. 1–2, pp. 18–24, Apr. 2010.
- [132] G. Tezel, B. C. Chauhan, R. P. LeBlanc, and M. B. Wax, "Immunohistochemical Assessment of the Glial Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Glaucoma," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 44, no. 7, p. 3025, Jul. 2003.
- [133] G. Tezel and X. Yang, "Caspase-Independent Component of Retinal Ganglion Cell Death, In Vitro," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 45, no. 11, p. 4049, Nov. 2004.

- [134] G. Tezel and M. B. Wax, "Increased production of tumor necrosis factor- α by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells.," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 23, pp. 8693–700, Dec. 2000.
- [135] A. Kanamori, M. Nakamura, Y. Nakanishi, Y. Yamada, and A. Negi, "Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma," *Exp. Eye Res.*, vol. 81, no. 1, pp. 48–56, Jul. 2005.
- [136] Y. K. N. X. Wang, S.S. Tay, "An electron microscopic study of neuronal degeneration and glial cell reaction in the retina of glaucomatous rats (PDF Download Available)."
- [137] A. Reichenbach, A. Wurm, T. Pannicke, I. Iandiev, P. Wiedemann, and A. Bringmann, "Müller cells as players in retinal degeneration and edema," *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 245, no. 5, pp. 627–636, Apr. 2007.
- [138] K. In Jung, J. Hyun Kim, and C. Kee Park, " β 2-Adrenergic modulation of the glutamate receptor and transporter function in a chronic ocular hypertension model," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 765, pp. 274–283, Oct. 2015.
- [139] K. D. Barron, "The microglial cell. A historical review.," *J. Neurol. Sci.*, vol. 134 Suppl, pp. 57–68, Dec. 1995.
- [140] H. Kettenmann and A. Verkhratsky, "Neuroglia: the 150 years after," *Trends Neurosci.*, vol. 31, no. 12, pp. 653–659, Dec. 2008.
- [141] L. Papucci *et al.*, "Coenzyme Q₁₀ Prevents Apoptosis by Inhibiting Mitochondrial Depolarization Independently of Its Free Radical Scavenging Property," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 30, pp. 28220–28228, Jul. 2003.
- [142] F. L. Crane, "Biochemical functions of coenzyme Q₁₀," *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 20, no. 6, pp. 591–8, Dec. 2001.

- [143] F. L. Rosenfeldt *et al.*, “Coenzyme Q10 protects the aging heart against stress: studies in rats, human tissues, and patients.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 959, pp. 355–9–5, Apr. 2002.
- [144] M. Sano *et al.*, “A Controlled Trial of Selegiline, Alpha-Tocopherol, or Both as Treatment for Alzheimer’s Disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 336, no. 17, pp. 1216–1222, Apr. 1997.
- [145] C. Nucci *et al.*, “Retinal Damage Caused by High Intraocular Pressure? Induced Transient Ischemia is Prevented by Coenzyme Q10 in Rat,” in *International review of neurobiology*, vol. 82, 2007, pp. 397–406.
- [146] D. Lee *et al.*, “Coenzyme Q10 ameliorates oxidative stress and prevents mitochondrial alteration in ischemic retinal injury.,” *Apoptosis*, vol. 19, no. 4, pp. 603–14, Apr. 2014.
- [147] B. M. Davis *et al.*, “Topical Coenzyme Q10 demonstrates mitochondrial-mediated neuroprotection in a rodent model of ocular hypertension,” *Mitochondrion*, 2017.
- [148] L. Yuan and A. H. Neufeld, “Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 64, no. 5, pp. 523–532, Jun. 2001.
- [149] A. Bosco *et al.*, “Early Reduction of Microglia Activation by Irradiation in a Model of Chronic Glaucoma,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e43602, Aug. 2012.
- [150] P. Heiduschka *et al.*, “Electrophysiological and Histologic Assessment of Retinal Ganglion Cell Fate in a Mouse Model for *OPA1* -Associated Autosomal Dominant Optic Atrophy,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 51, no. 3, p. 1424, Mar. 2010.
- [151] S. Thanos, J. Kacza, J. Seeger, and J. Mey, “Old dyes for new scopes: the phagocytosis-dependent long-term fluorescence labelling of microglial cells in vivo.,” *Trends Neurosci.*, vol. 17, no. 5, pp. 177–82, May 1994.

- [152] R. de Hoz *et al.*, “Rod-Like Microglia Are Restricted to Eyes with Laser-Induced Ocular Hypertension but Absent from the Microglial Changes in the Contralateral Untreated Eye,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e83733, Dec. 2013.
- [153] B. Rojas *et al.*, “Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers,” *J. Neuroinflammation*, vol. 11, no. 1, p. 133, Jul. 2014.

