



T.C.

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

DENEYSEL SIÇAN GLOKOM MODELİNDE  
BRİMONİDİN TARTRAT ve MELATONİNİN  
RETİNA GANGLİON HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ  
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI

GÖZ HASTALIKLARI

UZMANLIK TEZİ

DR. DENİZ MARANGOZ

Tez Danışmanı:

PROF. DR. B. ILGAZ YALVAÇ

İstanbul - 2014

## TEŞEKKÜR

BU PROJENİN PLANLANMASI, SÜRDÜRÜLMESİ VE TAMAMLANMASI SÜRECİNDE HEP YANIMDA OLAN TEZ DANIŞMANIM PROF. DR. B. ILGAZ YALVAÇ'A, YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI BAŞKANI PROF. DR. FERDA ÇİFTÇİ'YE, YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ GÖZ MERKEZİ BAŞHEKİMİ PROF. DR. SİNAN TATLIPINAR'A, YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANI PROF. DR. BAYRAM YILMAZ'A, İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANI PROF. DR. İSMAİL SEÇKİN'E, İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI'NDA GERÇEKLEŞEN LABORATUVAR AŞAMALARINDA, VERİLERİN DEĞERLENDİRMESİNDE VE TEZ YAZIM AŞAMASINDA BANA HEP YARDIMCI OLAN DOÇ. DR. ELİF GÜZEL'E VE DOKTORA ÖĞRENCİSİ ASLI GÜMÜŞEL'E, VERİLERİN İSTATİSTİKLERİNİN YAPILMASI SÜRECİNDE EMEĞİ GEÇEN YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİYOİSTATİSTİK VE TIBBİ BİLİŞİM ANABİLİM DALI ÖĞRETİM GÖREVLİSİ YRD. DOÇ. DR. ELİF ÇİĞDEM KASPAR'A, YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL ARAŞTIRMALAR MERKEZİ'NDEKİ (YÜDETAM) AŞAMALARDA BENİMLE BİRLİKTE ÇALIŞAN YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI'NDAN SİĞNEM EYÜBOĞLU DİNÇ'E VE AHMET APAYDIN'A, YÜDETAM'DAN SELİM DOĞAN, UĞUR AKDAŞ VE VETERİNER HEKİM ENGİN SÜMER'E, ...VE ANNEM SEMA GÜZELBEY, AĞABEYİM DR. SALİH MARANGOZ VE DAYIM DR. ASIM GÜZELBEY'E BU SÜREÇTE SEVGİ VE DESTEKLERİYLE YANIMDA OLDUKLARI İÇİN TEŞEKKÜR EDERİM.

DR.DENİZ MARANGOZ

İSTANBUL-2014

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
KISALTMALAR.....	7
TABLO DİZİNİ.....	9
ŞEKİL ve RESİM DİZİNİ.....	10
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	12
2.GENEL BİLGİLER.....	13
2.1 Aköz hümör ve göz içi basıncı.....	13
2.1.1.Aköz hümör yapımı ve dışa akımı.....	13
2.2. Glokom tanımı.....	16
2.3. Farklı glokomatöz disk tiplerinin klinik özellikleri.....	16
2.4. Glokom sınıflaması ve terminolojisi.....	17
2.4.1.Primer konjenital formlar.....	17
2.4.1.1. Primer konjenital glokom/ Çocukluk çağı glokomu.....	17
2.4.1.2. Glokom ile bağlantılı konjenital anormallikler.....	18
2.4.2. Primer açık açılı glokomlar.....	18
2.4.2.1. Primer juvenil glokom.....	18
2.4.2.2. Primer açık açılı glokom / Yüksek basınçlı glokom.....	18
2.4.2.3. Primer açık açılı glokom / Normal basınçlı glokom.....	19
2.4.2.4. Primer açık açılı glokom şüphesi.....	19
2.4.2.5. Oküler hipertansiyon.....	19
2.4.3. Sekonder açık açılı glokomlar.....	20
2.4.3.1.Oküler hastalığa sekonder açık açılı glokomlar.....	20
2.4.3.1.1.Eksfoliyatif glokom.....	20
2.4.3.1.2. Pigmenter glokom.....	21
2.4.3.1.3. Lense bağlı sekonder açık açılı glokom.....	21
2.4.3.1.4. İntraoküler hemoraji ilişkili glokom.....	21
2.4.3.1.5. Üveitik glokom.....	22
2.4.3.1.6. İntraoküler tümörlere bağlı glokom.....	22

2.4.3.1.7. Retina dekolmanı ilişkili glokom.....	22
2.4.3.1.8. Oküler travmaya bağlı açık açılı glokom.....	22
2.4.3.2. İyatrojenik sekonder açık açılı glokomlar.....	23
2.4.3.2.1 Kortikosteroid tedavisine bağlı glokom.....	23
2.4.3.2.2 Oküler cerrahi veya laser uygulamasına bağlı sekonder açık açılı glokom.....	23
2.4.3.3 Ekstrabulbar durumlara bağlı sekonder açık açılı glokom.....	24
2.4.3.3.1 Yüksek episkleral venöz basınca bağlı glokom.....	24
2.4.4. Primer açı kapanması.....	24
2.4.4.1. Akut açı kapanması.....	25
2.4.4.2. İntermittan açı kapanması.....	25
2.4.4.3. Kronik açı kapanması.....	25
2.4.4.4. Akut açı kapanması atağı sonrası durum.....	25
2.4.4.5. Kapanabilir açı.....	26
2.4.5. Sekonder açı kapanması.....	26
2.4.5.1. Pupiller blok ile birlikte sekonder açı kapanması.....	26
2.4.5.2. Pupiller blok olmadan, anteriordan çekilme nedeniyle oluşan sekonder açı kapanması.....	26
2.4.5.3. Pupiller blok olmadan posteriordan itme nedeniyle oluşan sekonder açı kapanması.....	27
2.4.5.3.1. Aköz yanlış yönlenme (siliyer blok veya malign) glokom.....	27
2.4.5.3.2. İris ve siliyer cisim kistleri, intraoküler tümörler.....	27
2.4.5.3.3. Silikon yağı veya gaz bulunan vitreus boşluğu.....	27
2.4.5.3.4. Üveal efüzyon.....	27
2.4.5.3.5. Prematürite retinopatisi (evre 5).....	27
2.4.5.3.6. Sekonder glokomla ilişkili olabilecek konjenital anomaliler.....	27
2.5. Glokom Tedavisi.....	28

2.5.1. Medikal Tedavi.....	28
2.5.1.1. Prostaglandin analogları.....	28
2.5.1.2. Beta adrenerjik antagonistler.....	29
2.5.1.3. Adrenerjik agonistler.....	29
2.5.1.4. Karbonik anhidraz inhibitörleri.....	29
2.5.1.5. Parasempatomimetik ajanlar.....	30
2.5.1.6. Hiperosmotik ajanlar.....	30
2.5.2. Cerrahi tedavi.....	31
2.5.2.1. Laser cerrahisi.....	31
2.5.2.1.1. Laser iridotomi.....	31
2.5.2.1.2. Laser trabeküloplasti.....	31
2.5.2.1.3. Laser iridoplasti.....	31
2.5.2.1.4. Siklofotokoagülasyon.....	32
2.5.2.2. İnsizyonel cerrahi.....	33
2.5.2.2.1. Non-penetrant cerrahi.....	33
2.5.2.2.1.1. Derin sklerektomi.....	33
2.5.2.2.1.2. Viskokanalostomi.....	33
2.5.2.2.2. Penetrant cerrahi.....	33
2.5.2.2.2.1. Trabekülektomi.....	34
2.5.2.2.2.2. Trabekülotomi.....	34
2.5.2.2.2.3. Tüp implantasyonu.....	34
2.6. Retina ganglion hücresi ve glokom.....	34
2.7. Apoptozis.....	37
2.8. Nöroproteksiyon.....	40
2.8.1. Brimonidin tartrat ve nöroproteksiyondaki rolü.....	41
2.8.2. Melatonin ve nöroproteksiyondaki rolü.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1. Denekler.....	45
3.2. Episkleral ven koterizasyonu ile göz içi basınç artışının sağlanması.....	45

3.3. İntraperitoneal serum fizyolojik, melatonin ve brimonidin tartrat injeksiyonları.....	46
3.4. Göz içi basınç ölçümleri.....	47
3.5. %3 Fluorogold ile retina ganglion hücrelerinin retrograd olarak işaretlenmesi ve değerlendirilmesi.....	47
3.6. Deneklerin sakrifikasyonu ve enükleasyon.....	48
3.7. Preparatların fiksasyonu ve histolojik kesit alınması.....	49
3.8. Apoptotik hücre tayini ve apoptotik indeks hesabı.....	49
3.8.1. TUNEL protokolü.....	50
3.9. İstatistiksel analiz.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Göz içi basıncı değişimleri.....	52
4.2. Uygulanan maddelerin olası nöron koruyucu (nöroprotektif) etkilerinin apoptotik indeks verileri üzerinden karşılaştırılması.....	56
4.3. %3 Fluorogold ile işaretli retina ganglion hücrelerinin birim uzunluktaki sayısının gruplar arasında karşılaştırılması.....	59
4.4. TUNEL ve %3 Fluorogold işaretli retina ganglion hücrelerinin histolojik görünümleri.....	62
5. TARTIŞMA.....	74
6. SONUÇ.....	83
7. ÖZET.....	84
8. ABSTRACT .....	85
9. KAYNAKLAR.....	86

## KISALTMALAR

GİB.....:	Göz içi basıncı
AH.....:	Aköz hümör
KAH.....:	Karbonik anhidraz
RGH.....:	Retina ganglion hücresi
YÜDETAM..:	Yeditepe Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Laboratuvarı
i.p .....	İntraperitoneal
EVK.....:	Episkleral ven koterizasyonu
K.....:	Kontrol
B.....:	Brimonidin tartrat
M.....:	Melatonin
PG.....:	Prostoglandin
NaKATPaz.:	Sodyum potasyum adenozin trifosfataz
NMDA.....:	N-metil D-aspartat
5-FU.....:	5 Fluorourasil
MMC.....:	Mitomisin C
RPE.....:	Retina pigment epiteli
APAF-1.....:	Apoptozis aktive edici faktör 1
TUNEL.....:	Uridin deoksinükleotidil transferaz deoksi uridin trifosfat uç işaretleme
GABA.....:	Gama aminobutirik asit
FDA .....	Food and Drug Administration
ASK-1.....:	Apoptozis sinyal düzenleyici kinaz 1
CREB.....:	cAMP'ye cevap veren bağlanma proteini
siRNA.....:	Küçük müdahale edici ribonükleik asit
ROCK.....:	Rho kinaz inhibitörleri
Cop-1.....:	Kopolimer-1, Glatiramer asetat
MS.....:	Multipl skleroz

NP.....: Nanoparçacık  
GLAST.....: Glutamat aspartat taşıyıcı  
NOS.....: Nitrik oksit sentaz  
OPH.....: Oligodendrosit prekürsör hücre





## TABLO DİZİNİ

**Tablo.1.** Deneklerin bazal GİB ölçümleri ile episkleral ven koterizasyonu uygulandıktan sonraki 4.gün GİB ölçümlerinin kıyaslanmasında elde edilen tanımlayıcı istatistik verileri tabloda verilmiştir. Kıyaslama için *Wilcoxon Signed Rank* testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık p değeri ile ifade edilmekte olup  $<0,05$  olarak belirlenmiştir. **(sayfa 53)**

**Tablo.2.** Episkleral ven koterizasyonundan sonraki 4. gün GİB ölçümleri ile deneyin son gününde ölçülen 30.gün GİB değerlerinin kıyaslanmasından elde edilen tanımlayıcı istatistik verileri tabloda verilmiştir. Kıyaslama için *Wilcoxon Signed Rank* testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık p değeri ile ifade edilmekte olup  $<0,05$  olarak belirlenmiştir. **(sayfa 55)**

**Tablo.3.** Grupların denek sayıları (n); deneklerin gözlerinden elde edilen preparatların TUNEL boyaması sonrası elde edilen apoptotik indeks verilerinin ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri verilmiştir. **(sayfa 56)**

**Tablo.4.** Grupların denek sayıları (n); %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenen canlı retina ganglion hücrelerinin birim uzunluktaki (100 $\mu$ m) sayılarının tanımlayıcı istatistik verileri tabloda sunulmuştur. **(sayfa 59)**

## **ŞEKİL ve RESİM DİZİNİ**

**Şekil.1.** İntrinsik apoptotik yolak (**sayfa 38**)

**Şekil.2.** Retina ganglion hücrelerinin apoptotik indekslerinin gruplara göre dağılımı. Apoptotik indeks verileri yüzde (%) olarak belirtilmiştir. K:Kontrol, B:Brimonidin, M:Melatonin, G:Glokom. İstatistiksel yöntem olarak *tek yönlü ANOVA testi* ve takiben *Holm-Sidak metodu* kullanılmıştır. \*G ile G+B grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ( $p<0.05$ ).(**sayfa 57**)

**Şekil.3.** %3 Fluorogold işaretli retina ganglion hücrelerinin birim uzunluktaki (100µm) sayısının gruplara göre dağılımı. K: Kontrol, B: Brimonidin, M: Melatonin, G: Glokom. İstatistiksel yöntem olarak *tek yönlü ANOVA testi* ve takiben *Holm-Sidak metodu* kullanılmıştır. \*G ile G+B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır( $p<0.05$ ). (**sayfa 60**)

**Resim.1.** Retinanın tabakaları (**sayfa 35**)

**Resim.2.** Araştırmacılardan biri deneği sabitlerken diğer araştırmacı deneğin bacağını gererek abdominal kavitenin sol tarafına intraperitoneal injeksiyonu yaparken görülmektedir. (**sayfa 46**)

**Resim.3.** Genel anestezi altında, stereotaksik cihaza yerleştirilen deneğin kafatasında, Paxinos ve Watson sıçan beyin atlasına göre, delinmesi planlanan noktalar işaretlenmiş olarak görülmektedir. (**sayfa 48**)

**Resim.4.** %4'lük tamponlanmış formaldehid solüsyonunda fikse edilmiş gözün görünümü. A) Cam tabla üzerinde göz küresi ve lensin görünümü. B) İki parçaya kesilmiş göz küresi ve tek parça halinde lensin görünümü. (**sayfa 49**)

**Resim.5.** TUNEL kiti ile muamele edilen kontrol (K) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede. (**sayfa 62**)

**Resim.6.** TUNEL kiti ile muamele edilen brimonidin tartrat (B) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede. (**sayfa 63**)

**Resim.7.** TUNEL kiti ile muamele edilen melatonin (M) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede. (**sayfa 64**)

**Resim.8.** TUNEL kiti ile muamele edilen glokom (G) grubu preparatları. TUNEL pozitif boyanan apoptotik retina ganglion hücreleri (RGH) siyah ok ile gösterilmiştir A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede. **(sayfa 65)**

**Resim.9.** TUNEL kiti ile muamele edilen glokom+brimonidin tartrat (G+B) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile, TUNEL pozitif boyanan apoptotik retina ganglion hücresi siyah ok ile gösterilmiştir A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede. **(sayfa 66)**

**Resim.10.** TUNEL kiti ile muamele edilen glokom+melatonin (G+M) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücresi (RGH) beyaz ok ile, TUNEL pozitif boyanan apoptotik retina ganglion hücreleri (RGH) siyah ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B)x40 büyütmede. **(sayfa 67)**

**Resim.11.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Kontrol (K) grubu. x40 büyütmede. **(sayfa 68)**

**Resim.12.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Brimonidin tartrat (B) grubu. x40 büyütmede. **(sayfa 69)**

**Resim.13.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Melatonin (M) grubu. x40 büyütmede. **(sayfa 70)**

**Resim.14.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Glokom (G) grubu. x40 büyütmede. **(sayfa 71)**

**Resim.15.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Glokom+brimonidin tartrat (G+B) grubu. x40 büyütmede. **(sayfa 72)**

**Resim.16.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücresi (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Glokom+melatonin (G+M) grubu. x40 büyütmede. **(sayfa 73)**

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

**Glokom, retina ganglion hücrelerinin (RGH) seçici olarak geri dönüşümsüz hasarı ile seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır<sup>1</sup>.**

Glokomda, göz içi basınç (GİB) artışı en önemli risk faktörüdür ve üç belirleyicisi bulunmaktadır. Bunlar: 1. Siliyer cismin hümör aköz yapım hızı. 2. Trabeküler ağ - Schlemm kanal sisteminde aköz dışı akıma karşı bulunan direnç, 3. Episkleral venöz basınç düzeyi<sup>2</sup>. Göz içi basıncını düşüren tedavi yaklaşımlarına rağmen glokomatöz optik sinir hasarında ilerleme görülebilmesi nedeniyle, günümüzde GİB düşürücü tedavilere ek olarak kullanılabilecek nöron koruyucu (nöroprotektif) tedavi araştırmalarına yönelinmiştir.

Glokomatöz hasar ile apoptozise uğrayan hücre, retina ganglion hücre (RGH) olduğu için, nöroprotektif ajan araştırmalarının hedefi olmaktadır. Dolayısıyla, incelenen molekül, RGH'nin apoptozise uğramasını önleyebiliyorsa, glokom için koruyucu olduğu düşünülebilmektedir<sup>3</sup>.

Bildiğimiz kadarıyla literatürde **melatonin**in, RGH üzerindeki nöroprotektif etkisi açısından **brimonidin tartrat** ile karşılaştırmalı bir çalışması bulunmamaktadır.

Bu çalışmamızda, nörodejeneratif bir hastalık olan glokomun medikal tedavisi ile bir arada kullanılabileceğini düşündüğümüz potansiyel bir ajan olarak **melatonin**in, nöroprotektif etkisi çalışmalarla daha önce gösterilmiş olan **brimonidin tartrat** ile deneysel hayvan glokom modeli üzerinde karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. AKÖZ HÜMÖR VE GÖZ İÇİ BASINCI**

Gözün ön ve arka kamarasını dolduran sıvı aköz humör (AH) olarak adlandırılmaktadır. AH, intrauterin oküler gelişimde ve yaşam süresince göz küresi bütünlüğünün korunmasında önemli olan GİB düzeyini oluşturmada, kornea, lens ve trabeküler ağın metabolizması için gerekli maddeleri sağlamada, metabolizma artıklarını uzaklaştırmada, yüksek askorbat konsantrasyonunu sağlamada, parakrin sinyallere ve immun cevaplara aracılık etmede ve gözün optik sisteminin bir parçası olarak transparan bir optik ortam sağlamada görevlidir.<sup>4</sup>

#### **2.1.1 AKÖZ HÜMÖR YAPIMI VE DIŞA AKIMI**

AH oluşumunda iki mekanizma bulunmaktadır. Bunlar, aktif sekresyon ve pasif sekresyondur. Aktif sekresyon, siliyer cismin pars plikata parçasındaki siliyer uzantılarda bulunan pigmentli olmayan (non-pigmente) epitelde gerçekleştirilmektedir. Hücre membranında bulunan  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$  (sodyum-potasyum-adenozin trifosfataz) pompası,  $\text{Na}^+$  iyonlarını arka kamaraya pompalar. Oluşan ozmotik basınç gradiyentini takiben siliyer epitelde su geçişi olur. Siliyer epitel boyunca bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) ve karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) arasında hızlı bir dönüşüm yoluyla  $\text{HCO}_3^-$  transportunu sağlayan ise karbonik anhidraz (KAH) enzimidir. KAH,  $\text{HCO}_3^-$  oluşumunun aköz yapımındaki rolünün,  $\text{Na}^+$ 'un transportu için gereken pH düzeyine katkı sağlamak yoluyla olduğu düşünülmektedir. Aktif klor ( $\text{Cl}^-$ ) sekresyonu da, non-pigmente epitel hücre yüzeyinden gerçekleşmektedir. Enerji bağımlıdır ve aktif metabolizmayı etkileyen hipoksi, hipotermi gibi faktörler tarafından inhibe edilmektedir. Diğer yandan, aktif sekresyon GİB'den bağımsızdır.<sup>5</sup> Gözde, KAH enziminin 4 izoenzimi (KAH-1, 2, 3, 4) bulunmaktadır. GİB'i düşürmede kullanılan ilaçların hedeflerinden biri olan KAH izoenzimi ise KAH-2'dir. KAH-2 enzimi, hem pigmente hem de non-pigmente epitel hücrelerinde bulunmaktadır. KAH enzimi inhibisyonu ile, aköz sıvısına  $\text{Na}^+$  ve  $\text{HCO}_3^-$  geçişi engellenmekte ve aköz üretiminde azalma sağlanmaktadır.<sup>6</sup>

Diğer mekanizma ise pasif sekresyondur. Pasif sekresyonun ultrafiltrasyon ve basit difüzyon olmak üzere iki bileşeni bulunmaktadır ve kapiller hidrostatik basınç, onkotik basınç ve GİB değerlerinden etkilenmektedirler. Ultrafiltrasyon basınç bağımlı olarak gradiyent yönünde hareketi ifade eder<sup>6</sup>. Siliyer cisimdeki kapiller hidrostatik basınç ile GİB arasındaki fark sayesinde sıvı arka kamaraya geçmektedir. Difüzyon, yük ve konsantrasyona bağlı olarak iyonların hücre zarından geçişini ifade eder.<sup>7</sup>

AH, pupilla açıklığı vasıtasıyla arka kamaradan ön kamaraya geçer. Kornea ve iris arasında oluşan anatomik bölge iridokorneal açığı olarak tanımlanır. AH'nin %80'i trabeküler ağ (*sırası ile uveal, korneaoskleral, jukstakanaliküler ağ*), Schlemm kanalı ve toplayıcı kanallar (*sırası ile intraskleral aköz venler, episkleral ve konjunktival venler, ön siliyer ve superior oftalmik ven, kavernoöz sinüs*) yolu ile venöz sisteme drene olur. Buna "*trabeküler yol*" denir. Trabeküler yoldan dışa akım sırasında en yüksek direnç jukstakanaliküler trabeküler dokuda ortaya çıkar. AH'nin kalan miktarı ise iris stroması ve siliyer kattan geçerek suprakoroideal aralığa geçer. Bu akım yoluna da "*uveoskleral yol*" denir. Bu yol ile dışa akım prostoglandin PGF<sub>2α</sub> analogları ve sikloplejik ajanlar ile artarken, miyotikler ile azalır<sup>5</sup>. Yücel ve ark. insan ve koyun gözünde korpus siliyarede lenfatik belirleyiciler saptamışlardır. Bu bilgi, gözde "*uveolenfatik yol*" olarak tanımlayabileceğimiz bir yol ile de aköz hümör drenajının korpus siliyare içinden gerçekleşebileceğini ortaya koymaktadır<sup>8</sup>.

Normal şartlarda aköz yapımı ve aköz çıkışı arasında belli bir denge vardır. Bu denge "**Goldmann eşitliği**" ile sağlanır. Bu eşitlik;

$$F = (P_o - P_v) C + U$$

**F:** Aköz yapım hızı (µl/dakika)

**P<sub>o</sub>:** Göz içi basıncı (mmHg)

**P<sub>v</sub>:** Episkleral venöz basınç (mmHg)

**C:** Trabeküler dışa akım kolaylığı (µl/dakika/mmHg)

**U:** Uveoskleral dışa akım hızı (µl/dakika)

GİB, aköz humorün yapım hızı ve dışa akım hızı ile belirlenir. Aköz dışa akım hızı ise episkleral venöz basınç ve GİB arasındaki fark ile doğru orantılıdır. AH dışa akım kolaylığı tonografi ile ölçülür. Normal değeri  $0,28 \pm 0,05 \mu\text{l/dakika/mmHg}$ 'dir. AH dışa akımı, GİB ile orantılı olarak gerçekleşir.

Episkleral venöz basıncın normal değeri  $9 \pm 1,6 \text{ mmHg}$ 'dir. Genellikle sabit bir değerde olmasına karşın episkleral venöz basıncın her 1 mmHg'lik artışına karşılık GİB'de 1mmHg artış olur. Çeşitli orbital hastalıklarda, karotikokavernöz fistül ve venöz drenajın tıkanıdığı durumlarda artar.

Popülasyondaki dağılım göz önüne alındığında 11-21mmHg normal GİB aralığı olarak değerlendirilmektedir. Bunu yanı sıra,  $GİB < 21 \text{ mmHg}$  olmasına rağmen glokomatöz hasar bulunan (**normal tansiyon glokomu**) hastalar olabildiği gibi, GİB 30mmHg'ye kadar ulaşan ancak glokomatöz hasar bulunmayan (**oküler hipertansiyon**) hastalar da görülebilmektedir. Normal GİB değerleri gün içerisinde *-ölçüm yapılan saate, kalp atımlarına, kan basıncı değerlerine göre-* değişkenlik göstermektedir<sup>5</sup>. Diurnal ritme bağlı olarak sabah GİB ölçümleri akşam saatlerine göre 3-6 mmHg daha yüksek olma eğilimindedir. Diurnal GİB düzeylerine en önemli katkı plazma kortizollerini tarafından olmaktadır. Uykunun erken dönemlerinde plazma kortizollerinin en az düzeyde olduğu ve uykunun son üçte birlik bölümünde plazma kortizollerinde artış olmasıyla GİB düzeylerinin de en yüksek seviyelere ulaştığı saptanmıştır<sup>9</sup>.

Aköz yapım hızı gece  $1-2 \mu\text{l/dakika}$ , gündüz  $3 \mu\text{l/dakika}$  olup ortalama  $2 \mu\text{l/dakika}$ dır. Aköz hümanın içeriği plazmadan farklıdır. AH, plazmaya göre daha hipertonic ve asit yapıdadır (pH:7.2). Bileşimindeki askorbat, hidrojen, klorid ve laktik asit miktarı daha fazla iken; glukoz, sodyum, protein ve bikarbonat oranı daha düşüktür.<sup>5</sup>

## **2.2.GLOKOM TANIMI**

Glokom, retina ganglion hücrelerinde apoptozise yol açan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Glokom gelişiminde risk faktörleri; ailede glokom öyküsü, göz içi basınç (GİB) yüksekliği, ileri yaş, mevcut optik sinir başı hasarı, santral kornea kalınlığının ortalama değerlerin altında olması, korneal histereziste azalma, miyopi, psödoeksfolyasyon varlığıdır<sup>10</sup>. Bu faktörler içerisinde kontrol edilebilen tek faktör GİB yüksekliğidir.

## **2.3.FARKLI GLOKOMATÖZ DİSK TİPLERİNİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ**

**\*Fokal İskemik:** Optik sinir başının fokal çentiklenmesi veya edinilmiş pit, bazı olgularda peripapiller atrofi bulgularını içerir. Etiyolojide vazospazm bulunmaktadır. Hastaların üçte ikisi kadındır. Eşlik eden diğer bulgular, el ve ayaklarda soğukluk, migren, optik sinir başının kenarında mum alevi hemorajilerdir.

**\*Senil Sklerotik:** Sığ optik çukurluk, olguların çoğunda peripapiller atrofi. Hastaların çoğunluğu ileri yaş grubundadır. Etiyolojide oftalmik arter kan akımında azalma olduğu düşünülmektedir. Sistemik kardiyovasküler hastalık ve hipertansiyon eşlik etmektedir.

**\*Miyopik Disk:** Papiller atrofiye bağlı hilal (kresent) görünümü ile birlikte eğik (tilted) disk görülmektedir.

**\*Konsantrik Çukurluk:** Optik rimde bölgesel incelme olmadan görülen yuvarlak, konsantrik çukurluktur. Damarsal risk faktörlerinin prevalansı düşüktür. Genç yaş grubunda görülür. GİB düzeyi belirgin derecede artmıştır.<sup>11</sup>



## **2.4. GLOKOM SINIFLAMASI VE TERMİNOLOJİSİ**

Glokom için farklı sınıflandırmalar kullanılmaktadır. Burada, Avrupa Glokom Derneği (EGS)'nin 2008 yılında yayınladığı rehberde<sup>12</sup> kullanılan sınıflandırma temel alınmıştır.

### **2.4.1. PRİMER KONJENİTAL FORMLAR**

#### **2.4.1.1. Primer Konjenital Glokom / Çocukluk Çağı Glokomu**

Primer konjenital glokomu bulunan çocuklarda tipik bulgu genişlemiş ve/veya ödemli kornea, Haab çizgileri ve yüksek GİB ölçümüdür. Hastalığın klasik semptom üçlüsü epifora, fotofobi ve blefarospazmdir. 3 yaşa kadar GİB yükselmesi korneada gerilmeye (*buna bağlı olarak buftalmus gelişir. Buftalmus: kornea çapında artışı, göz küresinde büyümeyi ifade eder*), Descemet membranında yırtıklara (*buna bağlı olarak korneada Haab çizgileri gelişir*), kornea ödeme ve kornea opaklaşmasına neden olur. 3 yaş sonrasında korneada genişleme durur ancak GİB yükselmesi devam ettikçe skleral esneme nedeniyle ilerleyici miyopi gelişir. %70 bilateraldir. Doğumdan sonraki ilk 1 ay içinde (yenidoğan glokomu), ilk 2 yıl içerisinde (infantil glokom), 2 yaş sonrasında (geç tanıli primer konjenital glokom) ortaya çıkabilir.<sup>13</sup> Spesifik kromozomal anomaliler (1p36 ve 2q21) tanımlanmıştır.

Yaşamın ilk yıllarında saptandıysa, korneal çap >12mm olarak ölçülebilmekte ve buftalmus görünümü oluşabilmektedir. Korneal ödem, optik sinir başındaki çukurlukta genişleme (çukurluk/disk oranı>0.3) veya basınca bağlı optik sinir başında gerilme saptanabilir. Gonyoskopide irisin anteriora yerleşimli olduğu görülebilir ancak genellikle açı yapıları zorlukla ayırt edilebilmektedir.

Primer konjenital glokom gelişimi, trabeküler ağda dışa akım direncine bağlıdır. Ön kamara açısının nöral krest kökenli hücrelerinde gelişimsel bir anomali sonucu trabeküler ağda bası ve iris kökünün anteriora yerleşimli olduğu saptanmıştır.<sup>13</sup> En sık görülen form izole trabekülo-disgenezistir ve aköz dışa akımın azalmasına yol açarak GİB yükselmesi ile sonuçlanır.

### **2.4.1.2. Glokom ile Bağlantılı Konjenital Anormallikler**

Gonyodisgenesis saptanan Axenfeld-Rieger sendromu ve Peter's anomalisi olgularıyla, Sturge-Weber sendromu, Rubenstein-Taybi sendromu, aniridi, nörofibromatozis, Marfan sendromu, Pierre Robin sendromu, homosistinuri, Lowe sendromu, mikrosferofaki, mikrokornea, rubella, kromozomal anomaliler, geniş başparmak sendromu, persistan hiperplastik primer vitreus bulunan olgularla birlikte glokom görülebilmektedir.

### **2.4.2. PRİMER AÇIK AÇILI GLOKOMLAR**

Karakteristik morfolojik değişikliklerin bulunduğu bir grup kronik, yavaş seyirli, ilerleyici optik nöropatidir. Kronik basit glokom olarak da tanımlanmaktadır ve genellikle erişkin başlangıçlı bilateral göz tutulumu ile seyreder. Karakteristik özellikleri; GİB >21mmHg ölçülmesi, glokomatöz optik sinir hasarı bulunması, açık ön kamara açısı, hasar ilerledikçe karakteristik görme alanı kaybı gelişmesi, optik nöropatinin non-glokomatöz nedenleri ve sekonder glokom bulgularının olmaması ile karakterizedir.<sup>14</sup>

#### **2.4.2.1. Primer Jüvenil Glokom**

Etiyolojisi bilinmemekle birlikte, oluşma mekanizması aköz dışı akımda azalmadır. 10-35 yaşlar arasında başlayabilmektedir. 1.kromozom (1q21-q31) ve MYOC geni ile ilişkili olduğu tanımlanmıştır. Görme alanı kaybı oluşana kadar asemptomatiktir. Tedavisiz durumda GİB 21mmHg ve üzerinde saptanmaktadır. Optik sinir başında rim hasarı, retina sinir lifi tabakasında yaygın olarak kayıp ve görme alanında glokomatöz defekt mevcuttur. Gonyoskopik muayenede, ön kamara açısının açık olduğu görülmektedir.

#### **2.4.2.2. Primer Açık Açılı Glokom / Yüksek Basıncılı Glokom**

TIGR ve MYOC gen mutasyonlarının ilişkili olabileceği düşünülen etiyojisi bilinmeyen glokomatöz optik nöropati grubudur. Genellikle 35 yaş ve sonrasında başlamaktadır. GİB yüksektir. Görme kaybı ileri seviyede olmadıkça asemptomatik seyretmektedir. Optik sinir başında karakteristik

glokom hasarı görülür. Beraberinde retina sinir lifi tabakasında lokalize veya difüz defektler saptanabilmektedir. Gonyoskopide kapanabilir olmayan, gonyodisgenesis bulunmayan açık bir açı görünümü mevcuttur. Primer açık açılı glokom (PAAG) gelişiminde faktörler; yüksek GİB, ileri yaş, birinci derece akrabalarda PAAG öyküsü, miyopi, diabetes mellitustur.<sup>14</sup> Semptom ve bulgular, ilerleyici retina ganglion hücre ölümü ve görme alan kaybına bağlı olmaktadır.

#### **2.4.2.3. Primer Açık Açılı Glokom / Normal Basıncılı Glokom**

Etiyolojisi bilinmemektedir. Normal basınçlı glokom (NBG) bulunan ailelerde optinörin mutasyonu bulunmuştur. 4.dekadda başlamaktadır. Normal GİB düzeyleri ve diurnal eğri saptanır. Optik sinir görünümü ve görme alanı tipik glokomatöz hasar görüntüsündedir. Disk hemorajileri bulunabilir. Gonyoskopide açık ön kamara açısı saptanır bu nedenle intermittan açı kapanmasının dışlanması gerekir. Öyküde steroid kullanımı yoktur. Santral kornea kalınlığına bakmak gerekir. Ortalamanın altında (ince) santral kornea kalınlığı saptanabilmektedir.

#### **2.4.2.4. Primer Açık Açılı Glokom Şüphesi**

Tanım olarak görme alanı (glokomatöz kayıp), retina sinir lifi tabakası (incelme), optik sinir görünümü (genişlemiş optik sinir çukurluğu, asimetric çukurluk / disk oranı, nöroretinal rimde çentiklenme ya da daralma, disk hemorajisi) değerlendirmelerinden en az birinde glokom şüphesi bulunmasıdır.<sup>15</sup>

#### **2.4.2.5. Oküler Hipertansiyon**

Ön kamara açısının açık, görme alanı değerlendirmesinin normal olduğu, herhangi bir sekonder glokom bulgusu olmadan sadece GİB değerinin 21 mmHg ve üzerinde olduğu durumdur. Oküler hipertansiyon bulunan olgularda glokom gelişimi açısından risk faktörleri; yüksek GİB, ileri yaş, düşük santral kornea kalınlığı ölçümü, çukurluk /disk oranının yüksek olması, görme alanında patern standart deviasyonun (PSD) yüksek olmasıdır. Optik sinir ve retina sinir lifi tabakası normaldir. Gonyoskopide ön kamara açısı

açıktır. Santral kornea kalınlığını ölçmek gerekir çünkü bu olgularda ortalamanın üzerinde (kalın) santral kornea kalınlığı ölçümleri elde edilebilmektedir.<sup>14</sup>

### **2.4.3. SEKONDER AÇIK AÇILI GLOKOMLAR**

Oküler veya ekstraoküler hastalıklar nedeniyle oluşan, yüksek GİB, ilerleyici glokomatöz optik nöropati ve görme alanı kaybı tablosudur. Sekonder açık açılı glokomlarda gonyoskopik değerlendirmede ön kamara açısı en az 270° açıktır.

#### **2.4.3.1. OKÜLER HASTALIĞA SEKONDER AÇIK AÇILI GLOKOMLAR**

##### **2.4.3.1.1. Eksfoliyatif Glokom**

Gözde ve vücudun diğer bölgelerinde anormal bir fibrilogram protein (eksfoliyatif materyal) üretilmekte ve bu eksfoliyatif materyal ile pigment granülleri trabeküler ağda birikerek aköz dışı akımı engellemekte ve belirgin düzeyde GİB artışına yol açmaktadır. Gonyoskopik muayenede açı dar veya kapalıdır ve pigment granüllerinin Schwalbe hattında veya önünde birikmesiyle Sampaolesi çizgisini oluştururlar. 10 yıllık süreçte olguların üçte birinde glokom tablosu gelişmektedir. Genellikle 60 yaş üzerindeki kişilerde görülmektedir. Genellikle bilateral olup bir gözde daha ciddi bir tablo oluşmaktadır. Elastin fibrillerinin anormal sentezine neden olan LOXL1 gen mutasyonunun ilişkili olduğu düşünülmektedir.<sup>15</sup> GİB 21mmHg üzerinde olmakla birlikte genellikle primer açık açılı glokom olgularındaki ortalama GİB düzeyinin de üzerinde ölçümler elde edilmektedir. Biyomikroskopide pupilla kenarında ve ön kapsül periferinin yüzeyinde kepeksi eksfoliyatif materyal - özellikle *pupilla dilatasyonu sonrasında*- görülmektedir. Pupilla kolareti düzensizdir ve genellikle güve-yeniği görüntüsündedir. Sıklıkla nükleer katarakt, iris orta-santralinde pigment kaybı, açıda pigment granülleri görülür. Lens zonüllerinde zayıflığa neden olarak fakodonezise, lens sublüksasyonuna ve katarakt cerrahisi sırasında komplikasyonlara yol açmaktadır.

### **2.4.3.1.2. Pigmenter Glokom**

Melanin granüllerinin trabeküler ağda birikerek yarattığı tıkanıklık sonucunda aköz dışı akımda azalma oluşmaktadır. Melanin granülleri, irisin posterior yüzeyi ile zonüller arasında oluşan sürtünme sonucunda iristen salınmaktadır. Ters pupilla blok teorisine göre iris, valv görevi görmekte ve GİB yükselmesine ikincil olarak ön kamara basıncı arka kamaradan yüksek olmaktadır. 3 ile 5. dekad arasında başlar. Pupilla dilatasyonu, göz kırpma ve egzersiz ile belirgin GİB artışı görülür. Biyomikroskopik muayenede derin ön kamara, midperiferal iris pigment epitelinde radyal atrofi (transillüminasyon defektleri), trabeküler ağda, Schlemm kanalında, iris yüzeyinde, lens ekvatorunda, kornea endotelinde vertikal iğsi desende pigment kümeleri (Krukenberg içcikleri) görülmektedir.<sup>15</sup>

### **2.4.3.1.3. Lense bağlı sekonder açık açılı glokom**

Hem açık açılı hem açı kapanması glokomuna yol açabilir. Üç alt başlıkta incelenir. Lens partikülü glokomu (*lens proteinlerine bağlı inflamatuvar hücrelerin ve lens proteinlerinin trabeküler ağı tıkaması ile*), fakolitik glokom (*matür veya hipermatür kataraktın intakt kapsülünden sızan lens proteinleri nedeniyle*), fakoantijenik glokom (*travmatik veya cerrahi olarak lens travması veya diğer gözde katarakt cerrahi sonrası lens proteinlerine karşı immün sistemde gelişen duyarlılaşma sonucu trabeküler ağda oluşan granülatöz inflamasyon*). Sıklıkla ağrı, kızarıklık ve inflamasyon bulunur. GİB> 21mmHg. Biomikroskopik muayenede lens travması ve/veya katarakt varlığı, beraberinde iritis olabilir.

### **2.4.3.1.4. İntraoküler hemoraji ilişkili glokom**

Trabeküler ağın rijit kırmızı kan hücreleri (hayalet hücre glokomu, orak hücre hastalığı) ile tıkanması ile veya normal kırmızı kan hücreleri (hifema) ile oluşmaktadır.

Eski vitreus hemorajisi kaynaklı kırmızı kan hücreleri (hayalet hücreler) hyaloid ön yüzünün rüptürü ile, intraoküler cerrahi, travma sonrası irisin trabeküler ağı tıkaması ile oluşur. Ağrı, kızarıklık semptomları olmakta ve rekürrensler gelişebilmektedir.

### **2.4.3.1.5. Üveitik Glokom**

Anterior ve intermediyer üveitin farklı tipleri unilateral veya bilateral trabeküler ağ tıkanıklığına yol açabilir. En sık olarak juvenil romatoid artrit (JRA), Fuchs iridosikliti, Posner-Schlossman sendromu (glokomatosiklitik kriz), herpes simplex, herpes zoster, sifiliz, sarkoidoz, Behçet hastalığı, sempatik oftalmi, pars planit ile birlikte görülür. İnflamatuvar hücreler, presipitatlar, hücresel artıklar, ön kamara açısında neovaskülarizasyona bağlı trabeküler ağda ödem ve tıkanıklık oluşabilir. Periferik anterior sineşiye bağlı sekonder açı kapanması glokomu da gelişebilir. Herhangi bir yaşta başlayabilir. Ağrı, kızarıklık, fotofobi, görme azlığı görülebilir.

### **2.4.3.1.6. İntraoküler tümörlere bağlı glokom**

Ön kamara açısının tümör ile invazyonu ile, siliyer cismin rotasyonuna veya lens-iris ara yüzeyinin anteriora yer değiştirmesi sonucunda gelişen açı kapanması ile, intraoküler hemoraji ile, açıda neovaskülarizasyon ile, tümör hücrelerinin, inflamatuvar hücrelerin ve hücresel debrisin trabeküler ağda birikimleri ile gelişebilmektedir. En sık olarak siliyer cismin primer veya metastatik tümörlerinin ön kamara açısını direk invazyonu sonucu gelişir. Glokoma yol açan erişkin tümörleri üveal melanom, metastatik karsinom, lenfoma, lösemi, çocukluk çağı tümörleri ise retinoblastoma, juvenil ksantogranüloma ve medulloepitelyomadır.<sup>15</sup>

### **2.4.3.1.7. Retina dekolmanı ilişkili glokom**

Neovaskülarizasyon, proliferatif retinopati, skar dokusu oluşumu, pigment dispersiyonu, inflamasyon, fotoreseptör sensitizasyonu, retinadaki fotoreseptör dış segmentlerinden kaynaklı hücresel debri ile trabeküler ağın tıkanması (Schwartz Sendromu) ile gelişebilir. Semptom olarak kızarıklık ve ağrı söz konusu olabilir. Bu olgularda retina dekolmanı mevcuttur ve retina dekolmanı cerrahisi de glokoma yol açabilir.

### **2.4.3.1.8. Oküler travmaya bağlı açık açılı glokom**

Sekonder travmatik glokom, açık açılı ya da açı kapanması nedeniyle oluşabilir. Etiyolojiyi bulmak için tüm olası travmatik hasar bölgeleri

değerlendirilmelidir. Trabeküler ağdaki travmatik değişikliklere bağlı aköz dışa akımda azalma, skar dokusu oluşumu ve trabeküler ağda inflamasyon ve kırmızı küreler, hücre debris, lens ile indüklenen glokom, açığı resesyonu ile açıda tıkanıklık oluşum mekanizmalarıdır. Kızarıklık, ağrı, görme azlığı olabilir ya da hiç şikayet olmayabilir. Yavaş seyirli GİB yükselişi olur. Biyomikroskopik muayenede kimyasal yanıklar, hifema, travmatik katarakt, ödemli lens, üveit, açığı resesyonu, iris sfinkter rüptürü bulunabilir.

## **2.4.3.2. İYATROJENİK SEKONDER AÇIK AÇILI GLOKOMLAR**

### **2.4.3.2.1 Kortikosteroid tedavisine bağlı glokom**

Kortikosteroidlere bağlı trabeküler ağda değişiklikler sonucu trabeküler yoldan dışa akım azlığı gelişir (TIGR/MYOC geni ile ilişkili). Yüksek doz steroid tedavi sonrası, trabeküler ekstrasellüler materyal (glikoproteinler) değişiklikleri aköz dışa akımın azalmasına yol açmaktadır. Genellikle kortikosteroid tedavisi kesildikten sonra GİB düzeyi normale döner. Bu olgularda TIGR gen modifikasyonu bulunduğu gösterilmiştir. Miyopik, diyabetik olgular ve PAAG hastaları, kortikosteroid tedavisine bağlı glokom gelişimine daha meyillidir. Ağrı, kızarıklık yoktur, kornea ödemi olabilir. Uzun süreli hastalık durumunda tipik glokomatöz optik sinir başı ve görme alanı hasarı oluşabilir.

### **2.4.3.2.2 Oküler cerrahi veya laser uygulamasına bağlı sekonder açık açılı glokom**

Viskoelastik materyal, inflamatuvar debris, intraoperatif olarak katarakt cerrahisi sonrasında ön kamarada vitreus, lens partikülleri, prostoglandin salınımı geçici olarak GİB yükselmesi oluşur. Laser iridotomi, kapsülotomi ve laser trabeküloplasti sonrası akut sekonder GİB yükselmesi. Genellikle 24 saat içerisinde -sıklıkla ilk 4 saatte- yükselir. Göz içerisine verilmiş olan silikon yağı emülsifiye olarak ön kamaraya geçer ve makrofajlar tarafından fagositoza uğrar ve trabeküler ağda (özellikle üst kadranda) birikir.

### **2.4.3.3 EKSTRABULBAR DURUMLARA BAĞLI SEKONDER AÇIK AÇILI GLOKOM**

#### **2.4.3.3.1 Yüksek episkleral venöz basınca bağlı glokom**

Episkleral venöz basıncın artmasına bağlı olarak trabeküler yoldan aköz dışı akımı azalır. Bu nedenle GİB'de artış meydana gelir. Akut başlangıçlı olabilir. Klinik özellikler değişken olmakla birlikte GİB> 21mmHg ölçülmekte, dilate konjesyone episkleral venler, kemozis, fasiyal lenfödem görülebilmektedir. Episkleral venöz basınçta artış yaratan durumlar; dural şantlar, kimyasal yanıklar, episkleral venlerin radyasyon hasarı, endokrin orbitopati, orbital (retrobulbar) tümör, psödötümör, orbital flebit, orbital veya intrakraniyal fistül, Sturge-Weber sendromu, Ota nevüs, kavernoöz sinüs trombozu, juguler ven obstrüksiyonu (radyal boyun kesileri) superior vena kava obstrüksiyonu, pulmoner venöz obstrüksiyondur.

#### **2.4.4. PRİMER AÇI KAPANMASI**

Açı kapanması, gonyoskopik muayenede iridotrabeküler temas saptanmasıdır. Primer açı kapanmasının evreleri;

- **Primer açı kapanması şüphesi:** GİB düzeyi normal, periferik anterior sineşi yok, glokomatöz optik nöropati bulgusu yok. Tek muayene bulgusu  $\geq 2$  kadranda iridotrabeküler temas olmasıdır.
- **Primer açı kapanması:** Periferik anterior sineşi oluşumu, iridotrabeküler temas ve/veya yüksek GİB ölçümü saptanabilir ancak glokomatöz optik nöropati bulgusu yoktur.
- **Primer açı kapanması glokomu:** Glokomatöz optik nöropatiye neden olan iridotrabeküler temas, periferik anterior sineşi ve yüksek GİB düzeyi saptanmaktadır.



### **2.4.4.1. Akut açk kapanması**

Trabeküler ağ ve iris apozisyonuna bağlı hızlı ve aşırı GİB yükselmesi oluşur ve spontan gerilememektedir. GİB genellikle 50-80mmHg düzeylerindedir. Korneal ödem vardır. Başlangıçta özellikle epitelyal ödem bulunur. Dar ön kamara açısı vardır. Periferik iris anteriora itilmiştir ve Schwalbe hattı ile temas halindedir. Gonyoskopide 360° iridotrabeküler temas vardır. Pupilla mid-dilatedir ve ışık reaksiyonu azalmıştır ya da yoktur. Venöz konjesyon ve siliyer injeksiyon bulunur. Fundus muayenesinde disk ödemi, venöz konjesyon ve splinter hemorajiler, optik sinirde glokomatöz çukurluk görülebilir. Bradikardi veya aritmi eşlik edebilir. Bulanık görme, halo, ağrı, etkilenen gözde frontal başağrısı, bulantı, kusma, abdominal kramplar, çarpıntı görülebilir.

### **2.4.4.2. İntermittan açk kapanması**

Akut açk kapanması glokomu tablosuna benzer ancak daha hafif klinik bulguları bulunmaktadır ve spontan olarak geriler. Pupil reaktif ve yuvarlaktır. Optik disk riminde atrofi ve muayenede relatif afferent pupil defekti (RAPD) görülebilir.

### **2.4.4.3. Kronik açk kapanması**

Sineşiye bağlı ön kamara açısında kalıcı olarak kapanma nedeniyle oluşur. Gonyoskopide farklı derecelerde periferik anterior sineşi görülür. İridotrabeküler temasın yaygınlığına göre GİB düzeyi değişmektedir. Görme alanında ve optik sinir başında tipik glokomatöz hasar görünümü olabilir. Ağrı yoktur, geçici açk kapanması ataklarına bağlı halo görme şikayetleri olabilir.

### **2.4.4.4. Akut açk kapanması atağı sonrası durum**

Yamalı iris atrofi, iris torsiyonu, posterior sineşi, pupil reaksiyonu zayıftır ya da yoktur. Geçirilmiş açk kapanması ataklarına bağlı anterior lens yüzeyinde epitel infarktlarının oluşturduğu “glaucomflecken” görünümü oluşabilir. Gonyoskopide periferik anterior sineşi görülebilir. Endotelyal hücre sayısı azalmış olabilir.

#### **2.4.4.5. Kapanabilir aç**

Pupiller blok, plato iris, iridotrabeküler temas, periferik anterior sineşi görülebilir. GİB yükselebilir. Diğer gözde akut aç

### **2.4.5. SEKONDER AÇI KAPANMASI**

#### **2.4.5.1. Pupiller Blok ile birlikte sekonder aç**

Katarakta, travmatik katarakta bağı şişmiş lens, anterior lens dislokasyonu (*Weill Marchesani, zonüler laksite, travma, Marfan Sendromu*), posterior sineşi, sekluzyo veya okluzyo pupil, afak silikon yağı bulunan olgular, mikrosferofaki varlığı, miyotik ilaç uygulanan olgularda lens anteriora yer değiştirir ve pupil bloğuna yol açar, GİL ile indüklenen pupilla bloğu (*ön kamara lensi veya ön kamaraya disloke olmuş arka kamara lensi*) pupilla bloğu irisi anteriora iter ve aç kapanır. İris inflamasyonu veya iridosiklit, posterior sineşiye yol açarak pupilla bloğuna neden olur ve anteriora doğru şişkinleşerek “iris bombe” oluşur. Akut sekonder aç kapanması glokomu ile sonuçlanır.

#### **2.4.5.2. Pupiller blok olmadan, anteriordan çekilme nedeniyle oluşan sekonder aç**

Oküler mikrovasküler hasar sonucu indüklenen iridotrabeküler fibrovasküler membran oluşumu ile neovasküler glokom oluşur. Trabeküler ağ, iris dokusu veya membran varlığı nedeniyle sürekli olarak anteriora çekilir ve açığı tıkar. İridokorneal endotelyal sendromu (ICE) progresif endotelyal membran formasyonu ve ilerleyici iridotrabeküler adezyon, uzun süreli primer aç kapanması glokomu nedeniyle periferik anterior sineşi oluşumu, penetran travma sonrası veya ön segment cerrahisi sonrası epitelial ve fibröz membran oluşumu, argon laser trabeküloplasti, erken ve geç periferik anterior sineşi ve trabeküler ağ örten endotelyal membran, endotelyal posterior polimorfoz distrofi, aniridi ile birlikte görülebilmektedir.

### **2.4.5.3. PUPİLLER BLOK OLMADAN POSTERİORDAN İTME NEDENİYLE OLUŞAN SEKONDER AÇI KAPANMASI**

#### **2.4.5.3.1 Aköz yanlış yönlendirme (siliyer blok veya malign) glokomu**

Siliyer cisim ve irisin anteriora rotasyonu nedeniyle açı kapanması gelişir. Lens oransal olarak büyük ya da şişmiş (fakomorfik) olabilir. Aköz hüner, vitreus içirisine (posterior aköz yanlış yönlendirme) veya kristalin lensin arkasına (prelenticüler yanlış yönlendirme) yönelebilmektedir.

#### **2.4.5.3.2. İris ve siliyer cisim kistleri, intraoküler tümörler**

#### **2.4.5.3.3. Silikon yağı veya gaz bulunan vitreus boşluğu**

#### **2.4.5.3.4. Üveal efüzyon**

Panretinal koagülasyon, santral retinal ven oklüzyonu, skleral çökertme, nanoftalmusa bağlı koroidal venöz basınç artışı, sklerit, üveit, HIV infeksiyonuna bağlı inflamasyona ikincil veya tümör kaynaklı olarak gelişebilmektedir.

#### **2.4.5.3.5. Prematürite Retinopatisi (evre 5)**

Ağrı, kızarıklık, kornea ödemi semptomları ve muayenede ön kamarada daralma görülür.

#### **2.4.5.3.6. Sekonder glokomla ilişkili olabilecek konjenital anomaliler**

Ailesel iris hipoplazisi, anormal yüzeyel iris damarları, aniridi, Sturge-Weber sendromu, nörofibromatöz, Marfan sendromu, Pierre Robin sendromu, homosistinuri, gonyodisjenezi, Lowe sendromu, mikrokornea, mikrosferofaki, rubella, persistan hiperplastik primer vitreus bulunmaktadır. Altta yatan patolojiye ikincil oluşan açı kapanması ise iris ve siliyer cismin anteriora itilmesi ile meydana gelir. Semptom ve bulgular ağrı, kızarıklık, korneal ödem, ön kamarada daralmadır. Laser iridotomi ve cerrahi iridektomi yapılması

tedavi edici değildir. Ayırıcı tanıda Posner Schlosmann sendromu (iridosiklitik kriz), endotelit, trabekülit (diskiform herpetik keratitteki gibi), neovasküler glokom bulunur.

## **2.5. GLOKOM TEDAVİSİ**

Glokom tanısı konulan hastaları tedavi etme kararı ve ne yoğunlukta bir tedavi uygulanacağı üç temel faktörle belirlenmektedir. Bunlar; hastanın yaşam beklentisi, tanı anında glokomun evresi ve hastalığın ilerleme hızıdır. Göz önüne alınan diğer faktörler ise GİB düzeyi, optik sinir hemorajisinin varlığı ve aile öyküsü olup olmadığıdır.

Hastalığın evresi çok önemlidir. Örneğin oküler hipertansiyondan hafif düzeyde glokom aşamasına geçen bir hasta ile tanı anında ileri evre glokomu olan bir hastanın merkezi görme kaybı gelişme riski farklıdır. Aynı evrede aynı GİB düzeyinde glokom tanısı almış genç bir hastanın uzun vadede görme kaybı gelişme riski yaşlı bir hastaya göre daha yüksektir.<sup>16</sup>

### **2.5.1. MEDİKAL TEDAVİ**

**2.5.1.1. Prostaglandin Analogları:** Klinik kullanımda olan dört prostoglandin analogu vardır: Latanoprost, Travoprost, Bimatoprost, Tafluprost. Uveoskleral dışa akımda artış yapar. Latanoprost ve Travoprost ön ilaçtır ve korneal esterazlar tarafından hidrolize olduktan sonra aktifleşir. Zirve etkisine 10-14 saatte ulaşmaktadır ve en fazla etkiyi elde edebilmek için günde tek doz gece kullanılmalıdır. Bu sayede vazodilatasyona bağlı semptomlarda da azalma sağlanmaktadır. İris renginde ve göz çevresi cilt renginde koyulaşma, ön üveit herpetik keratit, hipertrikozis, distikiyazis gibi yan etkileri vardır.

**2.5.1.2. Beta adrenerjik antagonistler:** Topikal beta adrenerjik antagonistler, siliyer epiteldeki cAMP'yi inhibe ederek GİB düşüşü sağlar. Günde iki kez uygulanması önerilmektedir ve topikal uygulamadan 1 saat sonra etkisi başlamakta ve kesildikten sonra bile 4 haftaya kadar etkili olmaktadır. Miyotikler, karbonik anhidraz inhibitörleri ve prostoglandin analogları ile birlikte kullanıldığında aditif etkisi olmaktadır. Uzun süreli kullanıma bağlı olarak taşiflaksi nedeniyle ilaç etkinliğinde azalma oluşabilmektedir. Betaksolol, selektif beta<sub>1</sub> adrenerjik antagonist iken, Karteolol, Levobunolol, Metipranolol, Timolol Maleat ve Timolol Hemihidrat non-selektif etkilidir. Beta<sub>1</sub> adrenerjik reseptörler kardiyak, beta<sub>2</sub> adrenerjik reseptörler ise pulmoner etkilidir.

**2.5.1.3. Adrenerjik agonistler:** Alfa<sub>1</sub> adrenerjik reseptör agonistlerinin oküler etkileri vazokonstrüksiyon, pupilla dilatasyonu ve göz kapağı retraksiyonudur. Alfa<sub>2</sub> reseptör agonistleri (apraklonidin ve brimonidin tartrat), sinir son uçlarından epinefrin salınımını azaltarak -mekanizması tam anlaşılammakla birlikte- trabeküler dışa akımda arttırmakta, aköz yapımını ve episkleral venöz basıncı da azaltmaktadır. GİB düşürücü etkilerine ek olarak glokom olgularında nöroprotektif etkinliği olduğu düşünülmektedir. Brimonidin tartratın sistemik yan etkileri ağız kuruluğu ve letarjidir. Santral sinir sistemine geçmesine bağlı olarak, infantlarda ve küçük çocuklarda solunum durması, hipotansiyon, nöbet riski bulunmaktadır bu nedenle <12kg olan çocuklarda kullanılmamalıdır.

**2.5.1.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri:** Siliyer epitelde bulunan karbonik anhidraz enzimini inhibe ederek aköz yapımında azalma sağlamaktadır. Karbonik anhidraz enzimi siliyer epitelin yanısıra, kornea endotelinde, iriste, retina pigment epitelinde, beyinde, böbrekte, kırmızı kan hücrelerinde de bulunmaktadır. Sistemik etkili oral karbonik anhidraz inhibitörleri (asetazolamid, methazolamid) alındıktan 1 saat sonra etki göstermeye başlar maksimum etkisi 2-4 saatte oluşur. 250-500mg'lık tabletlerden günde dört defaya kadar dozda verilebilmektedir. Hipokalemiye bağlı parmaklarda parestezi, abdominal kramplar, diyare, libido kaybı, ağızda acı tat, kilo kaybı, bulanık görme ve punktat keratopati gibi yan etkileri

olabilmektedir. Sulfa türevi ilaçlardır ve sulfa allerjisi olan hastalarda reaksiyona neden olabilmektedir. Nadir de olsa aplastik anemiye yol açabilmektedirler.

#### **2.5.1.5. Parasempatomimetik Ajanlar (Kolinergikler =**

**Miyotikler):** Direkt etkili ve indirek etkili olmak üzere iki gruptur. Direkt etkili ajanlar (Pilocarpin, Karbakol, Asetilkolin), postganglionik parasempatik sinir son uçlarındaki asetilkolin salımını artırırken, indirek etkili ajanlar, asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu ile sinir son uçlarındaki asetilkolinin yıkımını azaltırlar. (Demekaryum Bromid, Ekotiyofat iyodid, Fizostigmin). Asetilkolinin longitudinal siliyer kaslarda kontraksiyona yol açarak skleral mahmuzda gerilme ve buna bağlı trabeküler ağda gerilme etkisi sonucu aköz dışı akım hızını artırır. Direkt etkili ajanlar, katarakt, neovasküler glokom varlığında kontrendikedir ve açı kapanması glokomu bulunan olgularda pupil boğunu kötüleştireceği (paradoksik açı kapanması) için bu hastalar miyotik ajan verilmeden önce dikkatle değerlendirilmelidir. İndirek ajanlar aktif üveit varlığında kontrendikedir. En sık yan etkiler bronkospazm, intestinal kramplar, pupilla boğunda artış, psödomiyopi, siliyer spazm, retina dekolmanı, iris kistleri, konjunktival kalınlaşmadır.<sup>16,17</sup>

#### **2.5.1.6. Hiperosmotik Ajanlar:**

Akut GİB yükselmelerinde en etkili ajanlardır. Kan osmolalitesini arttırarak kan ve vitreus arasında osmotik gradiyent yaratırlar ve vitreus boşluğundan suyu çekerek GİB düşüşü sağlarlar. Hiperosmotik ajanlar (Gliserol, 1.5g/kg p.o; Mannitol, 1.5g/kg i.v.) vasküler kompartmandaki sıvı volümünü arttırdıkları için hastalar böbrek ve kalp yetmezliği riski açısından değerlendirilmelidir. Kan şekeri düzeyini etkiledikleri için diyabetik hastalarda dikkatli olunmalıdır.<sup>16,17</sup>

## **2.5.2. CERRAHİ TEDAVİ**

### **2.5.2.1. Laser Cerrahisi**

#### **2.5.2.1.1. Laser İridotomi**

Klinik olarak belirgin ya da olası pupilla bloğu bulunan hastalarda endikedir. Akut ve kronik açı kapanmasının ve periferik anterior sineşinin oluşumunu önler. İrisin superior kadranlarına (üst göz kapağı tarafından örtüleceği için) laser atışı yapılmalıdır. Uzun siliyer arterlere zarar verme riski olduğu ve görsel rahatsızlığa yol açabileceği için saatin 3 ve 9 kadranlarına laser atışı yapılmamalıdır. Görünür damarlara uzak atış yapılmalıdır. Arkus senilis varlığında olabildiğince periferik, iris kriptlerinde mümkün olan en ince alana atış yapılmalıdır.

#### **2.5.2.1.2. Laser Trabeküloplasti**

Primer açık açılı glokom, pigmenter glokom ve eksfoliyatif glokomda ilk tedavi yaklaşımı olarak tercih edilebilir. Tolere edilebilen maksimum medikal tedaviye ve gonyoskopide açının açık görülmesine rağmen istenen GİB düşüşünün sağlanamadığı olgularda endikedir.<sup>18</sup> Gonyoskopi lensi ile açı yapıları görünür hale getirildikten sonra anterior pigmente trabeküler ağ ile non-pigmente trabeküler ağ arasına gelecek şekilde trabeküler ağda kesintili olarak 180-360°lik alana laser atışları yapılarak bu bölgedeki dokunun büzülmesi ve komşu alanlarda gerilme sağlanarak aköz dışı akım hızının artırılması sağlanır.

#### **2.5.2.1.3. Laser İridoplasti**

Periferik iris stromasında argon laser ile oluşturulan yanıklar sonucu dokuda kontraksiyon ve iris planında düzleşme saplanmış olur. Primer olarak plato iris nedenli açı kapanması glokomunda kullanılır. Nanoftalmus olgularında açı kapanması gelişince tercih edilmektedir. Komplikasyonları, hafif düzeyde iritis, kornea endotelinde yanıklar, geçici postoperatif GİB yükselmesi, arka sineşi, kalıcı pupilla dilatasyonu.<sup>18</sup>

### **2.5.2.1.4. Siklofotokoagülasyon**

Filtrasyon cerrahisi uygulanamayacak, ya da başarısız cerrahi geçmişi olan hastalarda, inatçı glokom formlarında (neovasküler glokom, inflamatuvar glokom, tümörle ilişkili glokom, kronik açı kapanması glokomu) ve seton implantasyon cerrahisine alternatif olarak uygulanabilecek bir tedavi yöntemidir. “Eksternal siklofotokoagülasyon” ve “endosiklofotokoagülasyon” olmak üzere ikiye ayrılır. Eksternal yaklaşım da kendi içerisinde “transskleral” ve “transpupiller” olarak ikiye ayrılmaktadır.

Transskleral siklofotokoagülasyonda Nd:YAG, diod, krypton laserler kullanılabilir. Bu yöntemin GİB düşürme mekanizması olarak öne sürülen iki teori bulunmaktadır. Birincisi, siliyer epitele direkt etki ile pars plikataya hasar oluşturarak aköz yapımını azalttığı yönündedir. İkincisi ise vasküler hasar ve kronik inflamasyon oluşturularak transskleral veya uveoskleral yol üzerinden aköz dışı akımı arttırdığı düşünülmekte ancak henüz kanıtlanamamıştır.<sup>19</sup> 1500mW güçte 1,5-2 sn süre ile laser uygulanır. Saatin 3 ve 9 kadrantlarına laser atışı yapmadan limbus posteriorunda 360° alana, yaklaşık 12 -24 laser atışı yapılır.<sup>14</sup>

Endoskopik yöntem, limbus veya pars plana girişimi ile uygulanabilmektedir. Siliyer cisimlerin pupilla açıklığından görüntülenemeyeceği durumlarda tercih edilir. Endoskopik probun karşı kadrantından skleral indentasyon yapılarak siliyer çıkıntılar görünür hale getirilir ve laser probunun ucu siliyer çıkıntılardan 2-3mm mesafede olacak şekilde konumlandırılır. Her bir çıkıntıda beyaz renk değişikliği ve yüzeysel bir doku hasarı oluşturacak enerji seviyesinde (genellikle 1000mW) 0,1-0,2 saniye süre ile laser uygulanır.<sup>19</sup>

Transpupiller, yöntem sadece aniridi durumunda, geniş bir cerrahi iridektomi alanından veya geniş periferik anterior sineşi nedeniyle irisin anteriora yer değiştirdiği olgularda tercih edilir.

Komplikasyonlar, persistan inflamasyon, hifema, korneal dekompanseasyon, görme keskinliğinde azalma, kronik hipotoni, fitizistir.



## **2.5.2.2. İNSİZYONEL CERRAHİ**

### **2.5.2.2.1. NON-PENETRAN CERRAHİ**

Açık açılı glokom olgularında tercih edilmektedir

#### **2.5.2.2.1.1. Derin Sklerektomi:**

Schlemm kanalının dış segmetini çıkaracak şekilde, skleral flep altında korneoskleral derin bir lamel eksize edilir. Skleral flep örtüldüğünde skleral göl oluşturulmuş olur. Kollajen implant yardımı ile bu skleral gölün açık tutulması sağlanmış olur.

#### **2.5.2.2.1.2. Viskokanalostomi**

Derin lamel diseksiyonu ve eksizyonu yapıldıktan sonra Schlemm kanalı içerisine hyaluronik asit injekte edilmektedir. Schlemm kanalının ve toplayıcı kanalların genişletilerek dışa akımın artırılması amaçlanmaktadır.

## **2.5.2.2.2. PENETRAN CERRAHİ**

### **2.5.2.2.2.1.Trabekülektomi**

Tolere edilebilen maksimum medikal tedavi ve laser tedavisine rağmen yeterli GİB düşüşü sağlanamayan ve optik sinir fonksiyonunda azalma görülen olgularda endikedir. Ön kamara ve subkonjunktival boşluk arasında fistül oluşturulur. Erken komplikasyonlar, hipotoni, ön kamarada daralma, aköz yanlış yönlenmesi, hifema, katarakt oluşumunda hızlanma, geçici GİB yükselmesi, kistoid maküler ödem, hipotoni makulopatisi, koroidal efüzyon, suprakoroidal hemoraji, persistan uveit, görme kaybı iken geç komplikasyonlar; filtrasyon blebinin sızdırması veya başarısız olması, katarakt, blebit, endoftalmi, bleb migrasyonu, hipootoni, pitozis, göz kapağı retraksiyonudur.

### **Antimetabolitler**

Trabekülektomi cerrahisi sonrası uzun süreli GİB kontrolü sağlanıp sağlanamayacağının belirleyicisi skar dokusu oluşumudur. Skar dokusu

gelişiminde yüksek risk bulunan durumlar; neovasküler glokom, önceden yapılan başarısız filtran glokom cerrahisi, konjunktival insizyon yapılmış katarakt cerrahisi, intrakapsüler cerrahi uygulanmış afak hasta, son üç ayda yapılmış intraoküler cerrahi, inflamatuvar göz hastalıkları (üveit, oküler pemfigoid, Steven-Johnson sendromu), genç yaş, kronik topikal ilaçların kullanımı. Adjuvan olarak kullanılabilen antimetabolitler ise 5-Fluorourasil (5-FU) ve Mitomisin C (MMC)'dir.

### **2.5.2.2.2.Trabekülotomi**

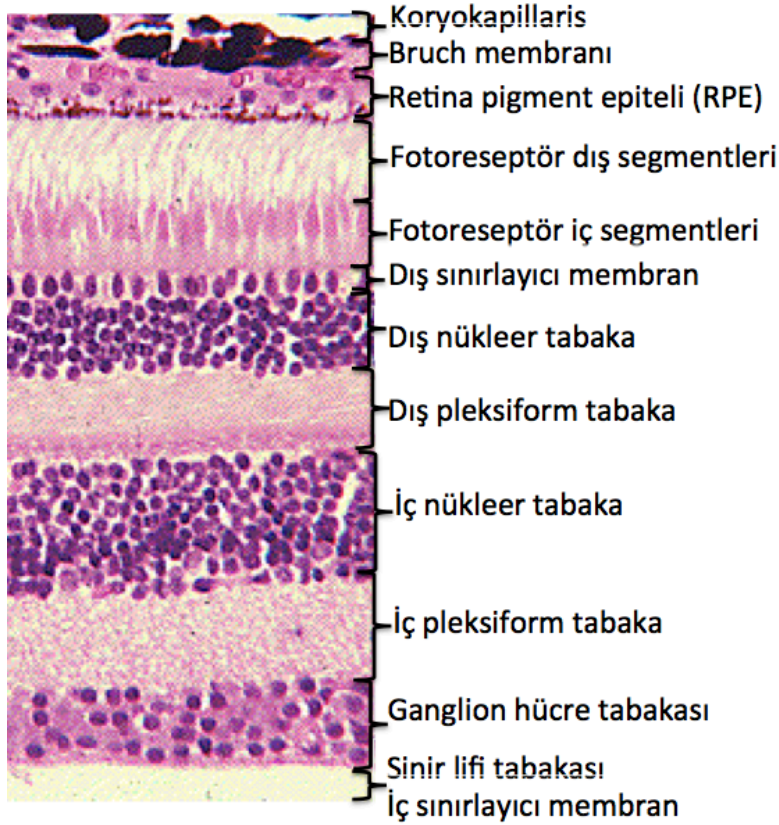
Genellikle konjenital glokomlarda tercih edilir, erişkin glokomlarında etkisi azdır. Cerrahi yöntemde, parsiyel kalınlıkta bir skleral flep oluşturulur. Schlemm kanalı ab externo yaklaşımla kanüle edilir ve ön kamaraya doğru yırtılarak trabeküler ağın açılması sağlanır.

### **2.5.2.2.3. Tüp İmplantasyonu**

Trabekülektomi sonrası başarısız olacağı ön görülen hastalarda tercih edilmektedir. Kullanılan tüp drenajları Molteno, Krupin, Beerveldt, Ahmed, Schocket'tir. Başarısız bir tüp implantasyon cerrahisi açısından risk faktörleri, önceden başarısız olmuş olan antimetabolitli filtrasyon cerrahisi, geçirilmiş oküler cerrahiye bağlı aşırı konjunktival skar dokusu veya oküler yüzey hastalığı, aktif neovasküler hastalık, pediatrik afaki durumlarıdır.

## **2.6 RETİNA GANGLİON HÜCRESİ ve GLOKOM**

Retina, histolojik olarak retina pigment epitel ve duysal retinayı içeren on katmandan oluşmaktadır. Dıştan içe doğru; retina pigment epiteli (RPE) ve bazal lamina, fotoreseptör (basil ve koni) iç ve dış segmentleri, dış sınırlayıcı membran, dış nükleer tabaka (fotoreseptörlerin çekirdekleri), dış pleksiform tabaka, iç nükleer tabaka, iç pleksiform tabaka, ganglion hücre tabakası, sinir lifi tabakası (ganglion hücrelerin aksonları) ve iç sınırlayıcı membran.<sup>20</sup>



**Resim.1.** Retinanın tabakaları

**Retina ganglion hücresi**, görsel uyarıları retinadan beyindeki görme merkezine taşıyan bir santral sinir sistemi hücrelidir. Primat retinasında 5 tip retina ganglion hücresi bulunmaktadır. ON-Midget RGH (P hücresi), OFF-Midget RGH (P hücresi), ON-Parasol RGH (M hücresi), OFF-Parasol RGH (M hücresi), Küçük çok katmanlı RGH. ON ve OFF midget hücreleri yüksek keskinlikte görmeden sorumludur ve ON-OFF parasol hücrelerle birlikte, toplam RGH popülasyonunun yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Midget hücreler, parasol hücrelere oranla daha geniş bir alana dağılımı mevcuttur. Küçük çok tabakalı RGH ise mavi-sarı renk bilgisinin iletiminde rol almaktadır. Bu 5 tip RGH'in elektrik stimülasyonuna cevaplarının varlığı, yapay görme sağlayabilecek retinal protezlerin tasarımında olmazsa olmazdır. Midget RGH (P hücresi) lateral genikulat çekirdekdeki parvosellüler yolak ile, Parasol RGH(M hücresi) ise magnosellüler yolak ile bağlantılıdır. M hücresinin, retinada geniş bir dağılımı mevcuttur. Hızlı bir aksonal iletme sahiptir. Görsel hareket yönlerine duyarlıdır, renk ve ışık uyarılarına hassas değildir. P hücresi ise daha küçük dendritik uzantılara sahiptir ve dağılım alanı M

hücresinden daha dardır. Daha yavaş bir iletme sahiptirler. Şekil ve görsel detaylara hassastırlar. Işığın farklı dalgaboylarına duyarlıdır.<sup>21</sup> Yeni tanımlanmış bir hücre olarak, intrinsek fotosensitif RGH bulunmaktadır. Melanopsin içeren bu hücreler optik sinir üzerinden hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdeğe ulaşır ve sirkadyen ritmin düzenlenmesinde rol alırlar.<sup>22</sup> Ayrıca pupillanın ışık refleksinin oluşumunda katkı yapmaktadırlar.<sup>23</sup> ON-OFF hücreler ışık uyarısını bipolar hücreye iletimleri sırasındaki davranışlarına göre isimlendirmişlerdir. ON hücreler uyarımı koruyarak iletici bir rol üstlenirken OFF hücreler uyarıyı söndürme yönünde davranış sergilemektedir. ON-OFF hücreler kontrast duyarlılığın oluşumunda etkilidirler. ON hücreler, OFF hücrelere göre daha hızlı bir cevap kinetiğine sahiptir. ON hücreler neredeyse çizgisel bir ışık cevabı oluştururlarken OFF hücreler kuvvetli bir uyarı düzleştirici etkiye sahiptir, böylece bilgiyi azaltma yönünde etki yapar.<sup>24</sup>

Tüm glokom tiplerinin ortak özelliği, retina ganglion hücresinde ilerleyici dejenerasyon gelişmesidir. RGH apoptozisini başlatan mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte iki teori bulunmaktadır. Bunlar mekanik ve vasküler teorilerdir. Optik sinir başının olduğu bölgedeki RGH aksonlarına mekanik hasar ve optik sinir başının vasküler patolojilerine sekonder olarak gelişen retina iskemisi nedeniyle RGH'de direkt hasar meydana gelmektedir. Mekanik hasarın, lamina kribrosa denilen ve aksonların içinden geçtiği laminar plaklarda gerçekleştiği düşünülmektedir. Kollajen yapıdaki bu laminar plakların porlarında basınç etkisi ile yapısal değişiklikler olmakta ve içinden geçen aksonlarda bası ve sıkışmaya yol açmaktadır. Aksonlarda bası ve sıkışma sonucu, nörotrofin olarak adlandırılan küçük moleküllerin akson içerisindeki transport bozulmaktadır. Nörotrofin eksikliğinin RGH hasarında rolü olduğu düşünülmektedir. Hem mekanik hem iskemik hasara sekonder olarak optik sinirin glial hücrelerinde aktivasyon olmaktadır. Normal şartlarda glial hücrelerin aksonları koruyucu bir rolü bulunmakla birlikte akson hasarını tetikleyici olduğu düşündüren çalışmalar mevcuttur. Bu konuda farklı teoriler bulunmaktadır. Nitrik oksit gibi nörotoksik bileşenlerin iletimini sağlayarak, ya da glikojen yıkımında azalmaya veya aksonları çevreleyen kapillerlerde vazokonstruksiyona sekonder hücresel enerjide azalmaya yol açtığı öne

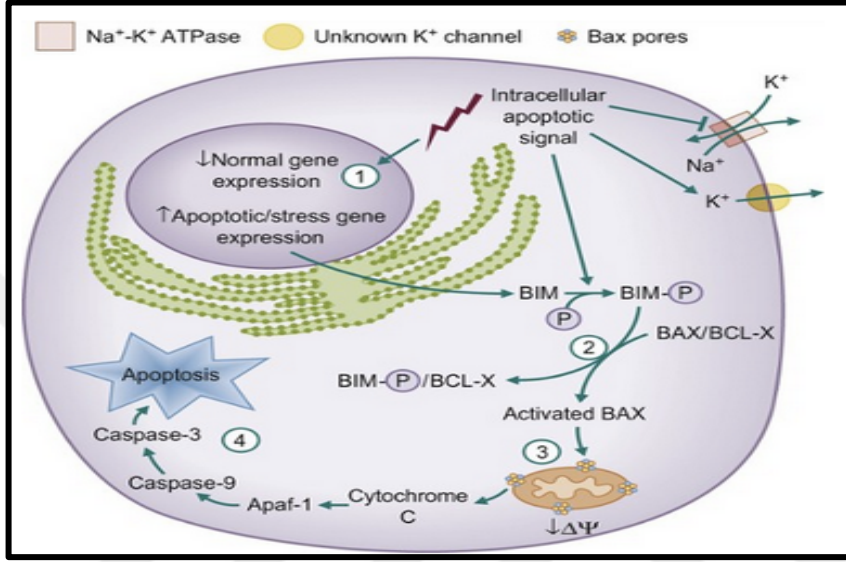
sürülmektedir. Glial hücreler tarafından vazokonstriksiyonun uyarılmasının glokom sırasındaki iskemik hasar ile mekanik hasar arasında bağlantı oluşturduğu düşünülmektedir. Whitmore ve ark, nörodejeneratif bir hastalık olan glokomda, retina ganglion hücrelerinin somasından bağımsız olarak, belirli akson, sinaps veya dendritlerde kompartmantal dejenerasyon olduğu görüşünü ortaya atmışlardır.<sup>25</sup> Proapoptotik BAX proteininin kaybında, yüksek GİB düzeyini takiben gelişen soma kaybından korumakta, ancak aksonal dejenerasyonu önlememektedir. Büyük ganglion hücreleri ve sinir liflerinin deneysel primat glokom modellerinde selektif olarak hasarlandığı gösterilmiştir.<sup>26</sup> Bu sonuçları destekleyen başka bir çalışmada ise büyük RGH'den lateral genikulat nükleustaki magnoselüler hücrelere olan anterograd aksonal transportta bozulma olduğu gösterilmiştir. Etkilenmemiş ve glokomlu gözlerde yapılmış olan bu çalışmalardaki kafa karıştırıcı nokta ise, RGH'nin apoptozise uğraması sonucunda boyutunda küçülme olduğudur. Bu nedenle midget ve daha büyük boyutta olan parasol RGH tipleri arasında soma boyutu ve dendritik özelliklerin kıyaslandığı çalışmalar yapılmıştır ve her iki RGH popülasyonunun da hemen hemen aynı oranda hücre kaybı ve boyutta küçülme olduğu sonucu elde edilmiştir.<sup>27</sup> Jakobs ve ark çalışmasında sıçanlarda, farklı RGH alt tiplerinin belirlenmesi için farklı işaretleme metodları kullanılmış ve RGH kaybının belirli bir alt tipe özgü olmadığı sonucuna varılmıştır.<sup>28</sup>

## **2.7. APOPTOZİS**

Programlı hücre ölümü olarak tarif edilen apoptozis, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana yolak ile gerçekleşebilmektedir . **Intrinsik yolak**, intraselüler strese sekonder olarak oluşur. Bcl-2 gen ailesinin üyeleri tarafından kontrol edilmektedir ve kaspaz isimli proteazların mitokondrial fonksiyonlarda değişiklik yaratması üzerinden gelişmektedir. İlk tetikleyici kaspaz-9'dur. Diğer yandan **ekstrinsik yolak**, ekstraselüler ligandın hücre yüzeyindeki ölüm reseptörüne bağlanması ile başlatılmaktadır. Mitokondrinin dahil olmadığı bu kaskad, kaspaz-8'in aktivasyonu ile devam etmektedir. Kaspaz-8 aynı zamanda Bcl-2 gen ailesinden Bid'in tBid olacak şekilde aktiflenmesi sonucu intrinsik yolak da aktiflenmiş ve hücre ölümü süreci

hızlandırılmış olur. RGH'nin apoptozis mekanizmasının intrinsik yolak ile olduğu düşünülmektedir.

Mitokondri dış membranında bulunan porlardan içeriye sitokrom-c girişi apoptotik yolak aktivasyonu için kritiktir. Bax proteininin yokluğu hem akut hem kronik optik sinir hasar modellerinde RGH kaybını önlemektedir.<sup>29,30</sup>



**Şekil.1. İntersik apoptotik yolak.**

İntersik apoptotik yolak dört temel evreden<sup>31</sup> oluşmaktadır.

**Birinci evre:** Gen ekspresyonunda değişiklikler olmasıdır. Normal genlerin ekspresyonunda azalma (Thy-1, NF-L, Bcl-X, Fem1c, Brn3b ve TrkB reseptörü)<sup>32,33,34</sup> görülebilmektedir ve klinik önemli henüz bilinmemektedir. Diğer yandan stres cevabında etkili genler (Hsp72, alfa ve beta kristalinler)<sup>35,36,37</sup> ve proapoptotik genlerde (Bim ve Bax) upregülasyon görülmektedir.

**İkinci evre:** Kaskadın Bcl-2 ailesine ait moleküllerinin aktivasyonu ile karakterizedir. Bcl-2 ailesi 3 alt aileye ayrılmaktadır. Birinci aile, hücre yaşamını destekleyen (Bcl-2 ve Bcl-X), ikinci aile, apoptozise yönelten (proapoptotik; BAX, BAK), üçüncü aile ise sadece BH-3 proteinlere sahip olan (proapoptotik etkiye sahip olup proapoptotik aileye - BH-3 parçası hariç-yapısal olarak benzemeyen) ailedir<sup>38</sup>. BH-3 parça, Bcl-2 ailesi üyelerinin

birbirleriyle etkileşimlerinde önemli role sahiptir. Kaskad aktivasyonunda iki mekanizma olduğu öne sürülmektedir<sup>39</sup>. Direkt modelde, sadece BH-3 proteini olan aile (duyarlaştırıcılar) Bcl-X'e bağlanır ve aktivator moleküllerin yer değiştirmesini sağlar. Bu aktivator moleküller (ki onlar da sadece BH-3 protein aile üyeleridir) direk olarak proapoptotik olan BAX ve BAK'a bağlanırlar. İndirek model ise sadece BH-3 ailesi üyeleri antiapoptotik proteinlere bağlanarak proapoptotik proteinlere temas ederek duyarsızlaşmalarını önleyerek fonksiyon gördüklerini savunur. Günümüzdeki literatürlerin çoğu indirek modelin BAX/BAK aktivasyonu üzerinde durmaktadır<sup>40</sup>.

**Üçüncü evre:** Tipik özelliği mitokondrinin sürece dahil olmasıdır. Mitokondri disfonksiyonu, glokomdaki RGH ölümünün belirgin özelliğidir. Mitokondri iç membranı boyunca elektrokimyasal gradiyent kaybı, reaktif oksijen radikallerinin oluşumu ve sitokrom-c'nin salınımı bunun kanıtıdır. Mitokondrideki değişikliklerin çoğu, özellikle sitokrom-c'nin salınımı proapoptotik protein olan BAX tarafından düzenlenmektedir. Mittag ve ark çalışmasına kadar, BAX'ın RGH apoptotik kaybında önemli rol oynadığı bilinmekle birlikte mitokondrinin sürece dahil olduğu tam anlamıyla gösterilmemişti.<sup>29,30,41</sup> Bu çalışmada, kronik GİB yükselmesi modeli oluşturulan sıçanlarda mitokondriyal membran potansiyeli ölçülmüş ve bu değerler geç evre apoptotik hücrelerden ve etkilenmemiş gözlerden elde edilen değerlerle kıyaslanmış ve mitokondriyal membran potansiyelinde etkilenen gözlerde %17.5'lik bir azalma olduğu saptanmıştır. Tatton ve ark ise mitokondri membran potansiyelindeki azalmanın mitokondriyal geçirgenlik artışı nedeniyle olduğunu belirtmiş ve bunun BAX'ın etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir<sup>42</sup>. Dış mitokondri membranında por oluşumu sonucunda artan geçirgenlik sonucunda sitokrom-c ve apoptozis başlatıcı faktör gibi apoptotik yolak açısından önemli faktörlerin salınımı meydana gelir.

**Dördüncü Evre:** Mitokondriden salınan moleküller ile tetiklenen kaspazların ve endonükleazların aktivasyonunun olduğu evredir. İntrinsik yolakta kaspaz aktivasyonu olması için aktive edici bir bileşim olan **apoptozom**un oluşması gereklidir. Apoptozomu oluşturan dört faktör; sitokrom c, apoptozis aktive edici faktör 1 (Apaf-1) adenosin trifosfat (ATP) ve prokaspaz-9'dur<sup>43</sup>. Tüm bileşenlerin var olduğu bir ortamda prokaspaz-9,

Apaf-1'in etkisiyle aktif form olan kaspaz-9'a dönüşür. Kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktive ederek endonükleazların ve diğer kaspazların aktivasyonunu sağlar. Aktif endonükleaz temas ettiği DNA molekülünü sindirir.<sup>44</sup> Bir sonraki aşamada ise apoptozisin belirleyici özelliği olan piknotik nükleus oluşumudur ve uç uridin deoksinükleotidil transferaz dUTP işaretleme (*TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling*) yöntemi ile belirlenmektedir. Sonuç olarak kaspazların aktivasyonu hücrenin kendi kendini sindirmesi ile sonuçlanır.<sup>45</sup>

## **2.8.NÖROPROTEKSİYON**

Bir etken maddenin glokomda nöroprotektif bir ajan olarak değerlendirilmesi için dört kriter bulunmaktadır. 1)etken maddenin retinada bir reseptör hedefi olmalı 2)hayvan modellerinde RGH yaşam süresine anlamlı etki sağladığı (nöroprotektif etkisi) gösterilmiş olmalı 3)uygulanan etken madde dozu arka segmentte nöroprotektif etki yaratacak konsantrasyona ulaşabilmeli 4)etken maddenin nöroprotektif olduğu klinik çalışmalarla gösterilmeli<sup>46</sup>.

**Nöroproteksiyon** konusunda çalışılmakta olan patofizyolojik yollar; N-metil D-aspartat (NMDA) inhibitörleri (Memantin; Brimonidin; Lomerizin, Cilnidipin gibi Ca<sup>++</sup> kanal blokajı<sup>47,48</sup>), nörotrofinler<sup>49</sup> (intrinsik apoptotik sinyalleri inhibisyonu ile), antiapoptotik yollar (Cilostazol<sup>50</sup>; N-beta-alanil-5-S-glutatyoni-3,4-dihidroksifenilalanin(5-GAD) BCL-2 aktivasyonu ile), biyoenerjetikler<sup>51</sup> (Nikotinamid, Koenzim Q10, Tiyoredoksinler, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) inhibitörleri, mitokondriyal permeabilitenin regülasyonu ve antioksidan etki ile), TNF-alfa, immün ve inflamatuvar modülatuarlar (Peroksiredoksin-6, reaktif oksijen radikallerini azaltarak, TNF-alfa ve glutamat ile indüklenen RGH hasarında azalma<sup>52</sup>), kök hücre replasmanı (Oligodendrosit Prekürsor Hücre (OPH) transplantasyonu sonrası aktive OPH tarafından salınan nörotrofik faktörlerin etkisi ile<sup>53</sup>)dır.



## **2.8.1. BRİMONİDİN TARTRAT ve NÖROPROTEKSİYONDAKI ROLÜ**

Brimonidin tartrat (BMD; UK14304, Alphagan®) selektif alfa<sub>2</sub> adrenerjik reseptör agonistidir. Alfa<sub>2</sub> adrenerjik reseptörler, retinada ganglion hücre tabakasında ve iç nükleer tabakada bulunmaktadır. Siliyer epiteldeki reseptörlerdeki etkisi ise adenilat siklaz enzimini inhibe ederek cAMP'yi azaltmak ve bu sayede aköz üretimini azaltmak üzerinden gerçekleşmektedir<sup>54</sup>. Diğer yandan prostoglandin salınımı ile ve/veya siliyer kasta gevşeme etkisiyle uveoskleral dışa akımda artışa da neden olarak da GİB düşüşü sağlamaktadır. GİB düşürücü etkisinden bağımsız olarak RGH üzerinde nöroprotektif etkisi olduğu çeşitli hayvan modellerinde<sup>55,56,57,58,59</sup> gösterilmiştir.

RGH yüzeyinde, alfa<sub>2</sub> adrenerjik reseptör<sup>3</sup> ve NMDA reseptör<sup>60</sup> ekspresyonu bulunmaktadır. Brimonidin Tartrat, selektif alfa<sub>2</sub> adrenerjik agonisttir. Bu reseptörler üzerinden insülin ve adrenalin gibi hormonların, serotonin ve glutamat gibi nörotransmitterlerin etkileri modüle olmaktadır. Alfa<sub>2</sub> adrenerjik reseptörlerin nöroprotektif, analjezik, antiepileptik terapötik etki sağlamada aracılığı bulunmaktadır. Optik sinirde ve retinada hasar oluşturulan hayvan modellerinde, intraperitoneal brimonidin tartrat uygulamasının RGH'nin yaşam sürelerinde istatistiksel anlamlı uzama sağladığı gösterilmiştir. Bu etkisini, N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör fonksiyonlarını inhibe ederek ve/veya presinaptik glutamat salınımınınin modülasyonu ile yaptığı ve RGH hücreleri üzerinde koruma sağladığı düşünülmektedir.<sup>61,62</sup>

Bir selektif alfa<sub>2</sub> agonist olarak brimonidin tartratın nöroprotektif etkisini oluşturan olası mekanizmalar glutamat salınımının, iç retina katmanlarına kalsiyum akımının, RGH'de NMDA reseptör uyarılarının düzenlenmesi ve trofik faktör uyarılarının upregüle olmasıdır.<sup>62,63,64</sup>

Aviles-Trigueros ve ark yaptığı bir çalışmada akut iskemik hasarı takiben brimonidin tartrat uygulamasının, retinadan superior kollikulus doğru olan RGH aksonal transportunu koruduğu gösterilmiştir.<sup>65</sup>

Lambert ve ark çalışması, fosfat tamponlu salin solüsyonu verilen, brimonidin tartrat verilen ve kontrol grubu olmak üzere üç grup sıçan gözüne unilateral episkleral ve limbal venlere laser fotokoagülasyon uygulanarak oküler hipertansiyon oluşturulmuştur. sistemik brimonidin tedavisinin GİB düzeyini değiştirmediği diğer yandan RGH akson dansitesi ve total akson sayısı karşılaştırıldığında brimonidin verilen grupta kontrol grubu ile fark bulunmadığı saptanmıştır.<sup>66</sup>

## **2.8.2. MELATONİN ve NÖROPROTEKSİYONDAKİ ROLÜ**

**Melatonin** (N-asetil 5-metoksitriptamin); sirkadyen ritmin düzenlenmesi (suprakiazmatik nukleus (SKN) aktivitesinin, MT<sub>1</sub> ve MT<sub>2</sub> reseptörleri üzerinden modülasyonu<sup>67,68</sup>), immün modülasyon (lenf nodlarındaki CD<sub>4</sub><sup>+</sup> hücrelerin stimülasyonu ve CD<sub>8</sub><sup>+</sup> hücrelerin inhibisyonu<sup>69</sup>), nöroproteksiyon (nörotrofik faktörlerin salınımında artış<sup>70</sup>), antioksidan (mitokondride reaktif oksijen radikal oluşumunda azalma<sup>68</sup>) etkisi olduğu çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, uyku halinde artış ve vücut sıcaklığında düşme ile yüksek melatonin düzeyi arasında ilişki olduğuna dair kanıtlar da mevcuttur<sup>67</sup>. Melatoninin fizyolojik etkilerinin yanısıra, farmakolojik dozlarda onkostatik ve antiproliferatif etkileri nedeniyle melanoma, gastrointestinal kanserler, meme kanseri, prostat kanseri için terapötik etki potansiyeli taşıdığı düşünölmektedir<sup>68</sup>. Melanopsin fotopigmenti içeren RGH'den ışık ve karanlık verileri retinohipotalamik yolak vasıtasıyla SKN'a ve buradan postganglionik sempatik lifler vasıtasıyla pineal beze ulaşarak Melatonin biyosentezini sağlamaktadır<sup>71</sup>. Memelilerde kan dolaşımında bulunan Melatonin, pineal bezden kaynaklanmaktadır ve gün içindeki düzeyi <10pg/ml iken gece kan dolaşımındaki miktarı maksimum 200pg/ml olarak saptanmıştır<sup>67</sup>. Pineal bezin yanısıra, gastroinestinal sistem, cilt, lenfositler, plateletler, kemik iliği hücreleri, timüs ve retinada da Melatonin sentezi olmakla birlikte otokrin ya da parakrin etki göstermektedir.<sup>70</sup> Amyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalarında yapılan melatonin güvenlik çalışmasında, yüksek dozda (300mg/gün) melatonin uygulanan hastaların 2 senelik takip sürecinde herhangi bir yan etki bildirilmemiştir<sup>72</sup>.

Literatüre bakıldığında melatoninin nöroprotektif etkisinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Park ve ark<sup>73</sup> çalışmasında, iskemik retina hayvan modelinde melatoninin RGH üzerine nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Vornicescu ve ark çalışmasında hipobarik hipoksik hayvan modelinde melatoninin, serebral dokuda nöroprotektif etkisi olduğu ve ilerleyici kognitif hasarın önlenmesinde etkili bir ajan olabileceği belirtilmiştir<sup>74</sup>. Liu ve ark<sup>75</sup> yaptığı hayvan çalışmasında intrahipokampal melatonin injeksiyonunun Alzheimer Hastalığı'nda amiloid-beta ilişkili kognitif hasara karşı koruyucu olduğu sonuçları bildirilmiştir. Lima ve ark<sup>76</sup> çalışmasında, pilokarpin ile indüklenen status epileptikus hayvan modelinde melatonin uygulamasının uyarılabilirliği azalttığı, antiinflamasyon ve antioksidan etki ile antikonvülzan etki sağladığı belirtilmiştir. Diğer yandan yüksek dozlardaki melatoninin GABA düzeyini azaltması nedeniyle, prokonvülzan etki yaratabileceği öne sürülmüştür. Vimala PV ve ark çalışmasında melatoninin MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> ve 5HT<sub>2c</sub> reseptörleri üzerindeki kombine etkisi ile sirkadyen re-senkronizasyon, glutamat salınımında azalma, antioksidan, nöroprotektif ve nörogenezis uyarıcı etkilerinin epilepsiden ve komplikasyonlarından koruyucu etki sağladığı belirtilmiştir.<sup>77</sup>

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. DENEKLER**

Bu çalışmada, 36 adet dişi, ağırlıkları 150-250 gr arasında değişen, 4-6 aylık Wistar albino sıçanlar denek olarak kullanıldı. Denekler, 'Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (YÜDETAM) temin edildi. Deney süreci, hayvanların bakımı ve barınma koşulları 'Yeditepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu' tarafından onaylanmıştır.

Deney grupları ilk olarak, kontrol grupları (n=18) ve episkleral ven koterizasyonu ile glokom modeli oluşturulacak olan glokom grupları (n=18) denekleri olarak ikiye ayrıldı. Her grupta altışar (n=6) denek olacak şekilde alt gruplar planlandı.

**1.Grup (K=kontrol):** Üç günde bir sıklıkta olmak üzere, göz içi basınç ölçümü yapılan ve sadece intraperitoneal (i.p.) yolla serum fizyolojik enjeksiyonu uygulanan denekler.

**2.Grup (B=brimonidin tartrat):** Üç günde bir sıklıkta olmak üzere, göz içi basınç ölçümü yapılan ve sadece i.p. yolla brimonidin tartrat enjeksiyonu uygulanan denekler.

**3.Grup (M=melatonin):** Üç günde bir sıklıkta olmak üzere, göz içi basınç ölçümü yapılan ve sadece i.p. yolla melatonin enjeksiyonu uygulanan denekler.

**4.Grup (G=glokom):** Üç günde bir sıklıkta olmak üzere, göz içi basınç ölçümü yapılan ve episkleral ven koterizasyonu ile glokom modeli oluşturulduktan sonra i.p. serum fizyolojik uygulanan denekler.

**5.Grup (G+B=glokom+brimonidin tartrat):** Üç günde bir sıklıkta olmak üzere, göz içi basınç ölçümü yapılan ve episkleral ven koterizasyonu ile glokom modeli oluşturulan ve i.p. yolla brimonidin tartrat enjeksiyonu uygulanan denekler.

**6.Grup (G+M=glokom+melatonin):** Üç günde bir sıklıkta olmak üzere, göz içi basınç ölçümü yapılan ve episkleral ven koterizasyonu ile glokom modeli oluşturulduktan sonra i.p. yolla melatonin enjeksiyonu uygulanan denekler.

Denekler, standart kafeslerde ad libitum beslenme şartlarında, kontrollü 21°C ve %50 nem ortamında barındırıldı. Odanın aydınlatması floresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00 – 18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi. Deneyin başlangıcında, tüm hayvanların ağırlık ve göz içi basınç ölçümleri yapıldı. Deney süresince, göz içi basınç ölçümleri üç günde bir, ağırlık ölçümleri ise haftada bir olarak yapılmaya devam edildi.

### **3.2. EPİSKLERAL VEN KOTERİZASYONU İLE GÖZ İÇİ BASINÇ ARTIŞI SAĞLANMASI**

Deneklere, ketamin hidroklorid (100 mg/kg; Ketolar; Parke-Davis, SL, Barcelona, Spain) ve ksylazin (10 mg/kg; Rompun; Bayer, SA, Barcelona, Spain) karışımı anestezi madde intramüsküler yolla enjekte edildi. Deneklerin parmak kısırmaya refleks cevabının kontrolü yapılarak, genel anestezi etkisi altında olduklarından emin olundu. Operasyon mikroskobu altına koterizasyon işlemi sırasında deneklerin vücut ısılarının kontrolü amacıyla ısıtıcı tabla (MAY HB-901) yerleştirildi. Tüm deneklerin sağ gözlerine koterizasyon (Elektromag M20-80 Koter Cihazı, Bipolar) işlemi uygulanması planlandığından sol yan pozisyon verilip deneklerin boynu desteklenerek mikroskop altındaki ısıtıcının üzerine dikkatlice yerleştirildi. Koterizasyon işlemi için gerekli plak deneklerin başının altına yerleştirildikten sonra topikal anestezi amacıyla %0,5 proparakain hidroklorid (ALCAINE® oftalmik solüsyon, Alcon Laboratories, inc, TX, USA) damlatılarak, steril koşullarda sağ gözlerde dört episkleral venin üç tanesi koterize edildi. Koterizasyon işlemi, sağ gözde konjonktiva makas ile açıldıktan sonra superior rektus kasına komşu yerleşimli iki adet dorsal episkleral ven ve lateral rektus kasına komşu yerleşimli 1 adet temporal episkleral ven çevre dokulardan izole edilerek bipolar koter ucu ile koterize edildi. Sol gözlerde ise sadece venler izole edildi ancak koterizasyon uygulanmadı.<sup>78</sup> Her iki oküler yüzeye antibiyotik pomad

sürülerek işleme son verildi. Genel anesteziden uyanana kadar geçen süre içerisinde denekleri hipotermiden korumak amacıyla, önceden hazırlanmış olan ikinci ısıtıcının üzerine yerleştirildi. İşlemi takip eden, dört gün boyunca antibiyotik pomad ile postoperatif bakımları yapıldı. Deneğin dahil olduğu grup doğrultusunda 1cc/gün serum fizyolojik, 1mg/kg/gün %0.2 brimonidin tartrat, 4mg/kg/gün melatonin i.p. yolla enjekte edildi.

### **3.3. İNTRAPERİTONEAL SERUM FİZYOLOJİK, MELATONİN ve BRİMONİDİN TARTRAT ENJEKSİYONLARI**

Tüm deneklere üç günde bir olmak üzere i.p yolla 1cc serum fizyolojik (%0,9 NaCl izotonik solüsyon), 1mg/kg/gün brimonidin tartrat (%0,15, Alphagan-P®, Allergan, Inc. Irvine, CA, USA) ve 4mg/kg/gün melatonin (Sigma-Aldrich, MO, USA) dozlarında enjeksiyonlar yapıldı. Denekleri, peritonitten korumak amacıyla enjeksiyonlar abdominal kavitenin sağ ve solu olmak üzere değişimli olarak uygulandı.



**Resim.2.** Araştırmacılarından biri deneği sabitlerken diğer araştırmacı deneğin sol bacağına gererek abdominal kavitenin sol tarafına intraperitoneal enjeksiyonu yaparken görülmektedir.

### **3.4. GÖZ İÇİ BASINÇ ÖLÇÜMLERİ**

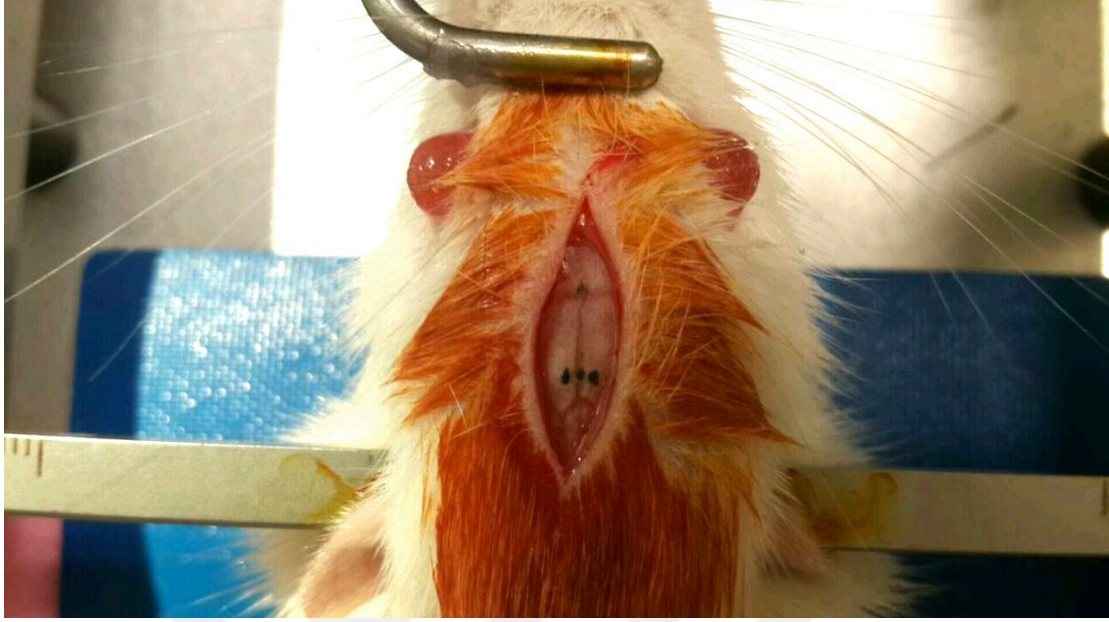
Göz içi basınç ölçümü için, tüm hayvanların her iki gözüne önce lokal anestezi etki amacıyla %0,5 proparakain hidroklorid (ALCAINE® oftalmik solüsyon, Alcon Laboratories, inc, TX, USA) damlatıldı. Topikal anestezi sonrasında TONOPEN XL® aplanasyon tonometresi (Reichert Inc., Depew, NY, USA) kullanılarak elde edilen üç adet ölçümün ortalamaları tek veri olarak kaydedildi

### **3.5. %3 FLUOROGOLD İLE RETİNA GANGLİON HÜCRELERİNİN RETROGRAD OLARAK İŞARETLENMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Deneklerin, glokom modeli oluşturulduktan sonra 26. gününde intramüsküler olarak ketamin hidroklorid (100 mg/kg) ve xylazin (10 mg/kg) ile anesteziye alındı. Deneklerin parmak kıstırma yanıtları ve göz refleksleri izlenerek anesteziye girdikleri saptandı ve spontan hareketleri kaybolan deneklerin insizyon bölgesi antiseptik ajan olan 10% povidon-iyodin (betadin®, Sanofi-Aventis, Virginia, QLD, AUS) ile silinerek operasyona hazır hale getirildi. Denekler stereotaksik cihaza (Rodent Stereotaxic Instruments, David Kopf Instruments, CA, USA) önce ağız kısmından sonra da kulaklarından, kafatasının üst yüzeyi yere tam paralel olacak şekilde sabitlendiler. Operasyon boyunca deneklerin vücut ısıları kontrol altında tutuldu (Homeothermic blanket system, CMA).

Aseptik koşullar altında, kafa derisi açılarak bregma görünür hale getirildi ve enjeksiyon yapılacak superior kollikulus koordinatları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi. Bu atlasla göre, beyin yüzeyinden 2mm derinlikte, bregmadan 2,92mm posteriorda ve orta hattın 0,5 mm lateralindeki noktalar belirlendikten sonra drill aleti (Saeshin, Strong 204) ile kafatası delinerek (her iki hemisferde) superior kollikulusa %3 Fluorogold (Fluorochrome, Inc.; Denver, CO, USA) enjeksiyonu yapıldı. İnsizyon bölgesi 3.0 ipek iplik (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş. Trabzon, Türkiye) ile dikildi ve bu bölgeye % 10 povidon iyodin sürüldü. Denekler, retrograd olarak

florogold verildikten sonra RGH'nin tam olarak işaretlendiğinden emin olunması amacıyla 4 gün daha canlı tutuldu.



**Resim.3.** Genel anestezi altında, stereotaksik cihaza yerleştirilen deneğin kafatasında, Paxinos ve Watson sıçan beyin atlasına göre delinmesi planlanan noktalar işaretlenmiş olarak görülmektedir.

Retrograd olarak %3 Fluorogold verilerek canlı retina ganglion hücrelerinin işaretlenmesi amaçlandı. Bu yöntemle tüm deneklerin gözlerinden elde edilen kesitlerdeki %3 Florogold ile işaretli apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri, gruplara kör iki bağımsız araştırmacı tarafından araştırma mikroskopunun (Olympus DP72 kamera ataçmanlı Olympus BX61, Japan) U-MN-1 floresan filtresi kullanılarak, x20 büyütmede alana giren işaretli retina ganglion hücreleri sayıldı. Her kesit için birim uzunluktaki (100 $\mu$ m) hücre sayısı belirlenerek gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

### **3.6. DENEKLERİN SAKRİFİKASYONU VE ENÜKLEASYON**

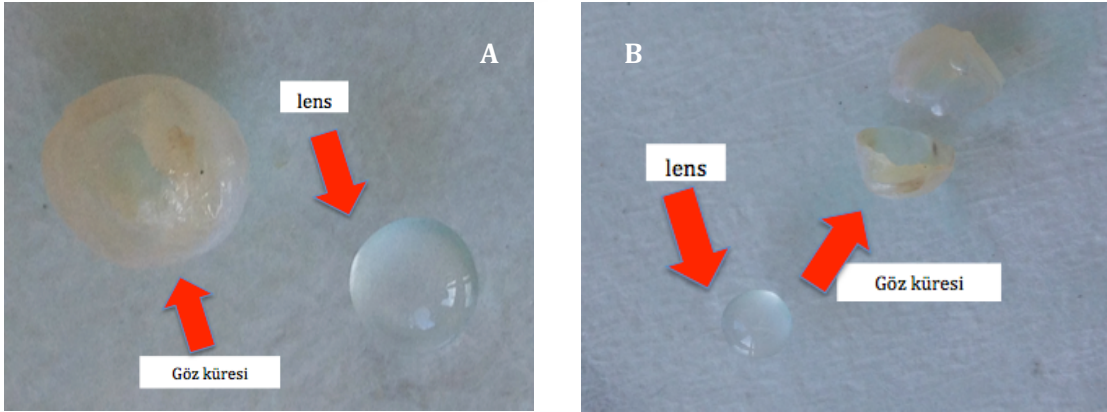
Denekler %3 Fluorogold injeksiyonu sonrası genel anesteziden uyanana kadar bireysel kafeslerde tutuldu. Operasyon sonrası her gün iki kez kontrol edildi ve iyileşene kadar dikişlerinin pansumanı yapıldı. Deney takviminin 30. gününde deneklere yüksek saflıkta karbondioksit solutma yöntemiyle ötenazi



uygulandı ve deneyler sonlandırıldı. Deneklerin gözleri, kantotomi sonrası konjonktiva çepeçevre kesilerek serbestleştirildikten sonra posteriorda optik sinir kesilerek çıkarıldı.

### **3.7. PREPARATLARIN FİKSASYONU VE HİSTOLOJİK KESİT ALINMASI**

Deneklerin enükle edilmiş sağ gözlerine limbustan insülin enjektörü ile %4'lük tamponlanmış formaldehit çözeltisi enjekte edildikten sonra %4'lük tamponlanmış formaldehit çözeltisi bulunan tüplerin içerisine alınarak fikse edildi. 1 saat sonra gruplara ait her iki göz ekvator düzleminde jilet yardımıyla ortadan ikiye bölündü. Yeniden taze fiksatife konarak bir gece boyunca bekletildi. Sonrasında 1 gece su ve birer gece yükselen alkol serilerinde (70°, 90°, 96°, 100°) bırakıldıktan sonra 5 dakika toluolde bekletildi. 1,5 saat boyunca sıvı parafin içerisinde tutulan dokular parafine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan ekvatoryal düzlemde kızaklı mikrotom (Thermo Scientific, Microm HM 430, Walldorf, Germany) kullanarak 5µm kalınlığında histolojik kesitler alındı.



**Resim.4.** %4'lük tamponlanmış formaldehid solüsyonunda fikse edilmiş gözün görünümü. A) Cam tabla üzerinde göz küresi ve lensin görünümü. B) İki parçaya kesilmiş göz küresi ve tek parça halinde lensin görünümü.

### **3.8. APOPTOTİK HÜCRE TAYİNİ ve APOPTOTİK İNDEKS HESABI**

Apoptotik hücre tayini için, çalışmadaki altı grubun tüm deneklerine ait göz kesitlerine, ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Merck Milipore, S7101, Germany) kullanılarak in situ DNA uç işaretleme (TUNEL= terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling) yöntemi uygulandı. TUNEL yöntemi ile doku kesitlerinde bulunan apoptozise uğramış ölü hücrelerin işaretlenmesi amaçlandı ve kitin üretici protokolü doğrultusunda preparatlar TUNEL kiti ile işleme tabi tutuldu. İşaretlenen apoptotik hücreler gruplara kör iki bağımsız araştırmacı tarafından araştırma mikroskobu (Olympus DP72 kamera ataçmanlı Olympus BX61, Japan) kullanılarak X40 büyütmede sayıldı. Her denek için “**apoptotik indeks(AI)**” hesabı şu formüle göre yapıldı;

$$\text{AI} = (\text{Apoptotik hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

#### **3.8.1. TUNEL PROTOKOLÜ**

Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alındı 56°C'lik etüvde bir gece bekletildi. Etüvden çıkarılan kesitler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra parafini uzaklaştırmak için 3x10 dakika toluolde bekletildi. Sırasıyla 2x5 dakika 100° alkolde, 1x5 dakika 96° alkolde, 1x5 dakika 70° alkolde ve son olarak 1x5 dakika fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS) içinde bekletildi. Proteinlerin sindirilmesi amacıyla kesitlerin üzerine Proteinaz K (20µg/ml) damlatıldı ve 15 dakika sonra distile su ile 2x2 dakika çalkalandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler, içinde %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bulunan şalede 5 dakika bekletildi. Kesitler PBS ile 2x5 dakika yıkandı ve dokuların etrafı dikkatlice kurularak hidrofobik kalem ile sınırlandırıldı. Dokuların her birinin üzerine kite ait dengeleyici tampondan (buffering tampon) 50 µl damlatıldı ve üzerlerine plastik lameller konarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Plastik lameller kaldırıldı, dokuların etrafı dikkatlice kurulandı ve kesitlerin üzerine TDT enzimi damlatıldı. Tekrardan plastik lameller ile kapatılıp nemli ortamda 37°C'lik etüvde 1 saat inkübe

edildi. Plastik lameller kaldırılıp, dokuların etrafı dikkatlice kurulandı ve dokuların üzerine 50µl kite ait durdurma-yıkama tamponu damlatıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı ve kesitlere 50 µl kite ait Anti-Digoksinin-Peroksidaz damlatıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Kesitler PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Üzerlerine 50 µl kite ait DAB substrat solüsyonu damlatıldı. Mikroskop altında pozitif renk reaksiyonu 6. dakikada gözlemlendi ve kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Kesitler 2x2 dakika distile suda yıkandı ve zıt boya olarak hematoksin kullanıldı (40 saniye). %96 ve %100 alkolden hızlıca geçirilen kesitler toluol içerisinde alındı ve ardından entellan ile kapatıldı.

### **3.9. İSTATİKSEL ANALİZ**

İstatistiksel değerlendirme için SPSS (Windows için), versiyon 22.0 (2013; IBM Corp., Armonk, NY, USA) programı ve *Sigma Plot* (Windows için), versiyon 11.0 (Systat Software inc. CA, USA) kullanıldı. Açıklayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama ve standart sapma şeklinde verildi. Histolojik kesitlerden elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi. Verilerin *Kolmogorov-Smirnov* testi ile normal dağılım gösterdiği saptandı. Normal dağılıma uygunluğu tespit edilen değişkenlerin çoklu grup karşılaştırmaları için *tek-yönlü ANOVA*'yı takiben *post hoc Holm-Sidak* testleri ile analiz edildi. Göz içi basınç ölçümlerinin zamana göre karşılaştırmaları için, örnek sayısı az olduğu için nonparametrik bir test olan *Wilcoxon signed rank test* kullanılarak yapıldı. İstatistiksel hesaplamalar.  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi

## **4. BULGULAR**

### **4.1. GÖZ İÇİ BASINCI (GİB) DEĞİŞİMLERİ**

Tüm deneklerin gözlerine topikal anestezi uygulanmasını takiben Tonopen XL® aplanasyon tonometresi kullanılarak, 30 günlük deney süresince üç günde bir yapılan GİB ölçümlerinden elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı.

Buna göre, deneklerin sağ gözlerinde bulunan dört episkleral venin üç tanesine koterizasyon işlemi uygulanarak glokom modeli oluşturulması hedeflenen glokom, glokom+brimonidin, glokom+melatonin gruplarında, episkleral ven koterizasyonu sonrası 4. günde elde edilen GİB değerlerinin bazal GİB değerlerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi, istatistiksel olarak kıyaslandığında ise anlamlı fark saptandı ( $p<0,05$ )(**Tablo.1.**).

Brimonidin grubundaki deneklere episkleral ven koterizasyonu uygulanmadan sadece intraperitoneal (i.p.) brimonidin tartrat enjeksiyonu yapıldıktan sonraki 4. günde elde edilen GİB ölçümlerinin, bazal GİB ölçüm değerleri ile kıyaslanması sonucunda, 4. gün ölçümlerinde bazal GİB değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşme olduğu saptandı ( $p<0,05$ )(**Tablo.1.**). Aynı grup deneklerin 4. gün GİB ölçümleri ile deneyin son günü olan 30. gün ölçümleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında i.p. brimonidin tartrat uygulaması ile anlamlı bir GİB düşüşü elde edildiği sonucuna varıldı( $p<0,05$ )(**Tablo.2.**).

Episkleral ven koterizasyonu yapılan denek gruplarında işlemten sonraki 4. günde elde edilen GİB verileri ile deneyin en son günü sakrifikasyon öncesinde alınan 30. gün GİB ölçüm verileri karşılaştırıldı.

Buna göre G+B ve G+M gruplarında bulunan deneklerin 30. gün ölçümlerinde, 4. gün ölçümlerine kıyasla, elde edilen GİB verilerinde düşüş olduğu gözlemlendi ve istatistiksel karşılaştırma yapıldığında da anlamlı farklılık olduğu saptandı ( $p<0,05$ )(**Tablo.2.**).

Grup	Ölçüm zamanı	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma	P değeri
Kontrol	Bazal	5	7,0	16,0	11,8	3,70	0,458
	4.gün		10,0	14,0	12,2	1,48	
Brimonidin	Bazal	5	11,0	16,0	13,2	2,16	<b>0,042</b>
	4.gün		7,0	13,0	10,0	2,23	
Melatonin	Bazal	6	7,0	19,0	14,66	4,03	0,66
	4.gün		7,0	16,0	12,5	3,39	
Glokom	Bazal	5	11,0	20,0	15,4	3,84	<b>0,043</b>
	4.gün		25,0	44,0	29,8	7,98	
Glokom + Brimonidin	Bazal	5	7,0	14,0	11,4	2,96	<b>0,042</b>
	4.gün		27,0	38,0	31,6	4,72	
Glokom + Melatonin	Bazal	6	7,0	21,0	14,16	5,63	<b>0,028</b>
	4.gün		18,0	42,0	31,33	8,50	

**Tablo.1.** Deneklerin bazal GİB ölçümleri ile episkleral ven koterizasyonu uygulandıktan sonraki 4.gün GİB ölçümlerinin kıyaslanmasında elde edilen tanımlayıcı istatistik verileri tabloda verilmiştir. Kıyaslama için *Wilcoxon Signed Rank* testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık p değeri ile ifade edilmekte olup <0,05 olarak belirlenmiştir.

Ayrıca, sadece i.p. melatonin uygulanan M grubunda 4.günde ölçülen GİB verileri ile 30.günde elde edilen GİB verileri arasında fark saptanmazken (**Tablo.1.**), episkleral ven koterizasyonu yapılarak glokom modeli oluşturulan ve i.p. melatonin enjeksiyonu yapılan grupta 30.gün GİB verileri 4.günde elde edilen GİB verileriyle kıyaslandığında istatistiksel anlamlı bir düşüş olduğu saptandı. (**Tablo.2.**)



Grup	Ölçüm zamanı	n	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma	P değeri
Kontrol	4.gün	5	10,0	14,0	12,2	1,48	0,74
	30.gün		13,0	19,0	16,2	2,28	
Brimonidin	4.gün	5	7,0	13,0	10,0	2,23	0,041
	30.gün		6,0	11,0	7,4	1,41	
Melatonin	4.gün	6	7,0	16,0	12,5	3,39	0,496
	30.gün		9,0	16,0	11,66	2,42	
Glokom	4.gün	5	25,0	44,0	29,8	7,98	0,893
	30.gün		25,0	37,0	29,2	4,91	
Glokom + Brimonidin	4.gün	5	27,0	38,0	31,6	4,72	0,043
	30.gün		15,0	19,0	17,0	1,58	
Glokom + Melatonin	4.gün	6	18,0	42,0	31,33	8,50	0,046
	30.gün		14,0	29,0	28,33	5,50	

**Tablo.2.** Episkleral ven koterizasyonundan sonraki 4. gün GİB ölçümleri ile deneyin son gününde ölçülen 30.gün GİB değerlerinin kıyaslanmasından elde edilen tanımlayıcı istatistik verileri tabloda verilmiştir. Kıyaslama için *Wilcoxon Signed Rank* testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık p değeri ile ifade edilmekte olup <0,05 olarak belirlenmiştir.

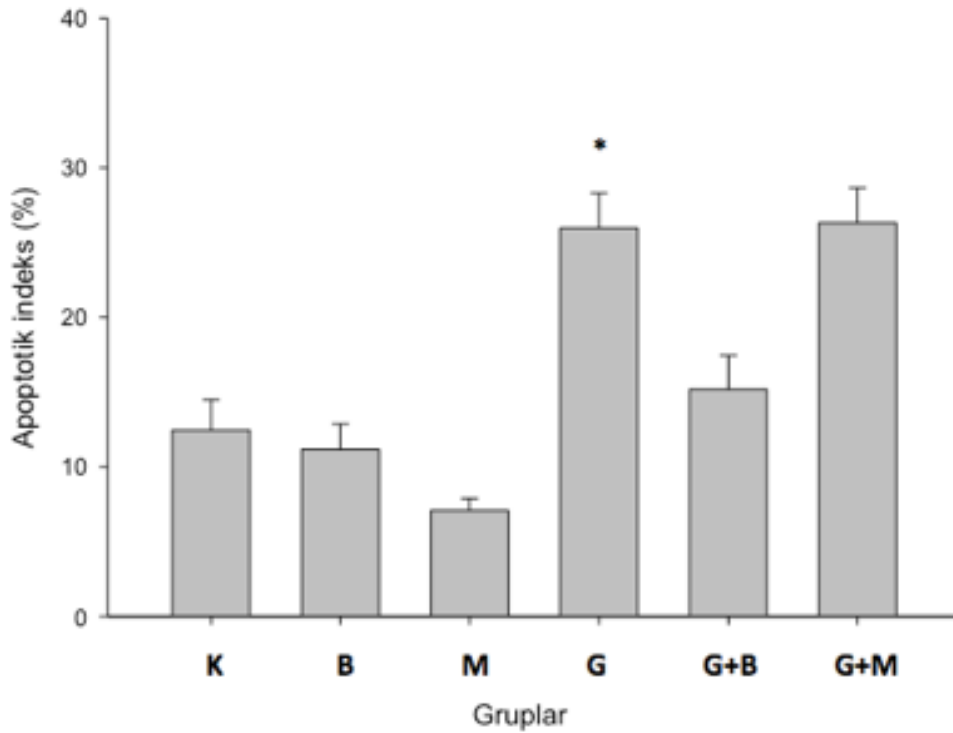
## 4.2. UYGULANAN MADDELERİN OLASI NÖRON KORUYUCU (NÖROPROTEKTİF) ETKİLERİNİN APOPTOTİK İNDEKS VERİLERİ ÜZERİNDEN KARŞILAŞTIRILMASI

Deneklerin gözlerinden alınan kesitler TUNEL kiti ile muamele edildikten sonra apoptotik ve toplam hücre sayımları gerçekleştirildi. Elde edilen veriler üzerinden **apoptotik indeks** ( $(\text{apoptotik hücre} / \text{toplam hücre sayısı}) \times 100$ ) değerleri elde edildi (**Tablo.3.**). G, G+B ve G+M gruplarının apoptotik indeks verilerinin glokom modeli oluşturulmamış olan gruplardan daha yüksek olduğu görüldü.

APOPTOTİK İNDEKS VERİLERİ (%)					
Grup	n	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	5	7,42	17,3	12,462	4,544
Brimonidin	5	7,47	16,15	11,172	3,817
Melatonin	6	4,82	10,46	7,075	2,032
Glokom	5	21,73	32,75	25,960	5,232
Glokom + Brimonidin	5	9,42	23,3	15,180	5,078
Glokom + Melatonin	6	18,43	33,48	26,298	5,793

**Tablo.3.** Grupların denek sayıları (n); deneklerin gözlerinden elde edilen preparatların TUNEL boyaması sonrası elde edilen apoptotik indeks verilerinin ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri verilmiştir.





**Şekil.2.** Retina ganglion hücrelerinin apoptotik indekslerinin gruplara göre dağılımı. Apoptotik indeks verileri yüzde (%) olarak belirtilmiştir. K:Kontrol, B:Brimonidin, M:Melatonin, G:Glokom. İstatistiksel yöntem olarak *tek yönlü ANOVA testi* ve takiben *Holm-Sidak metodu* kullanılmıştır. \*G ile G+B grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır( $p<0.05$ ).

Episkleral ven koterizasyonu ile glokom modeli oluşturularak i.p. yolla brimonidin tartrat enjeksiyonu yapılan glokom+brimonidin (**G+B**) grubu deneklerinden elde edilen apoptotik indeksler ile intraperitoneal yolla serum fizyolojik enjekte edilen kontrol (**K**) grubunun apoptotik indeksleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır. (**Şekil.2.**)

Glokom oluşturulduktan sonra intraperitoneal brimonidin enjeksiyonu yapılan **G+B** grubu denekleri ile glokom modeli oluşturulan ve intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan **G** grubu deneklerinin apoptotik indeks değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır( $p<0,05$ )(**Şekil.2.**).

Glokom modeli oluşturulan ve i.p. melatonin enjekte edilen **G+M** grubu deneklerinin apoptotik indeks verileri ile i.p. serum fizyolojik enjekte edilen **K** grubu, i.p. melatonin enjekte edilen **M** grubu ve brimonidin enjekte edilen **B** grubu deneklerinin apoptotik indeks verilerinin karşılaştırılmasında **G+M** ile **K,B,M** grupları

arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Ancak **G+M** grubu deneklerinin apoptotik indeks verileri ile **G** grubu deneklerinin apoptotik indeks verileri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (**Şekil.2.**).

Ayrıca beklenen şekilde **G** grubu deneklerinin apoptotik indeks verileri ile **K**, **B**, **M** grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (**Şekil.2.**).

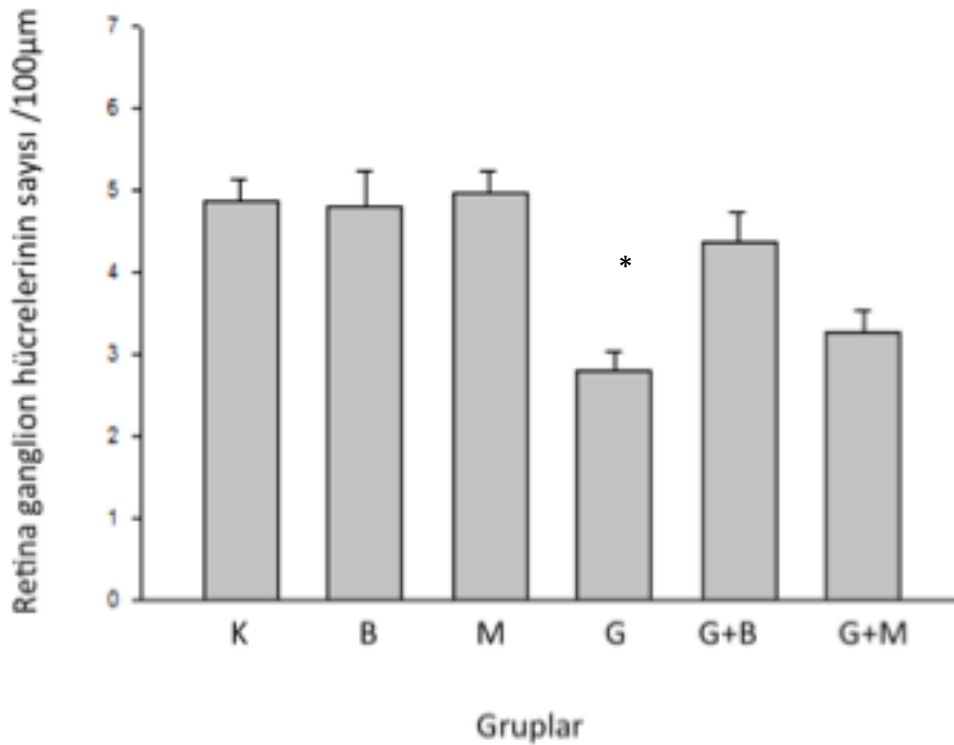


### **4.3. %3 FLUOROGOLD İLE İŞARETLİ RETİNA GANGLİON HÜCRELERİNİN BİRİM UZUNLUKTAKİ SAYISININ GRUPLAR ARASINDA KARŞILAŞTIRILMASI**

%3 Florogold ile retrograd olarak in vivo işaretlenen ve sakrifikasyon sonrasında işaretli (apoptozise uğramamış olan) retina ganglion hücrelerinin floresan mikroskobu altında sayımları yapılarak birim uzunluktaki (100µm) hücre sayısı hesaplandı. Tanımlayıcı istatistik verileri tablodaki gibidir(**Tablo.4.**).

<b>FLOROGOLD İŞARETLİ RGH HÜCRE SAYISI / 100µm</b>					
<b>Grup</b>	<b>n</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Sapma</b>
Kontrol	5	4,03	5,52	4,864	0,63
Brimonidin	5	3,31	6,02	4,79	1,01
Melatonin	6	3,98	5,74	4,95	0,66
Glokom	5	2,24	3,46	2,79	0,50
Glokom + Brimonidin	5	3,09	5,0	4,38	0,75
Glokom + Melatonin	6	2,19	4,08	3,26	0,67

**Tablo.4.** Grupların denek sayıları (n); %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenen canlı retina ganglion hücrelerinin birim uzunluktaki (100µm) sayılarının tanımlayıcı istatistik verileri tabloda sunulmuştur.



**Şekil.3.** %3 Fluorogold işaretli retina ganglion hücrelerinin birim uzunluktaki (100µm) sayısının gruplara göre dağılımı. K: Kontrol, B: Brimonidin, M: Melatonin, G: Glukom. İstatistiksel yöntem olarak *tek yönlü ANOVA testi* ve takiben *Holm-Sidak metodu* kullanılmıştır. \*G ile G+B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ( $p < 0.05$ ) bulunmaktadır.

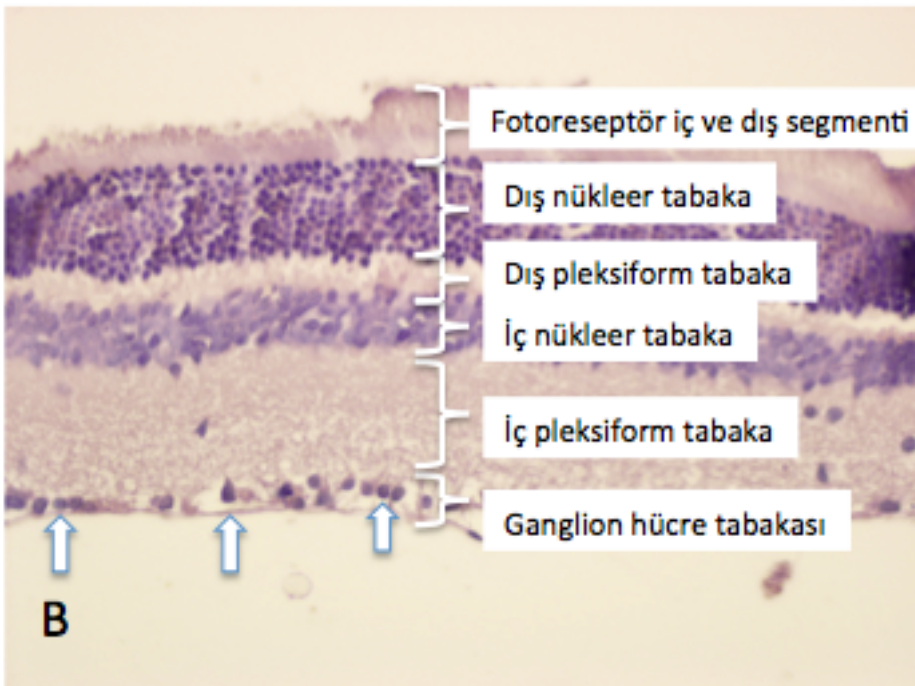
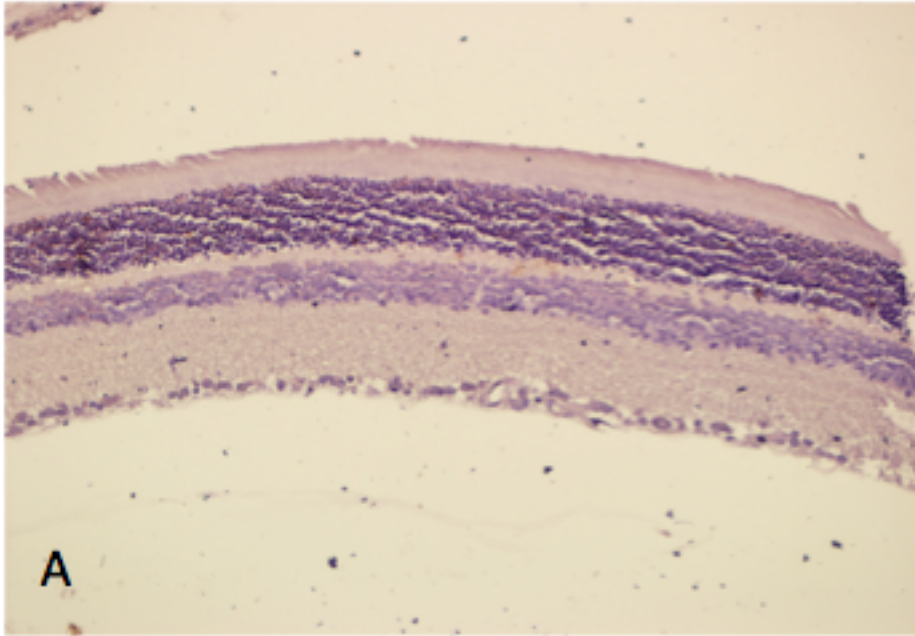
Glukom oluşturulan ve i.p serum fizyolojik enjekte edilen **G** grubu denekleri ile glukom oluşturduktan sonra i.p. brimonidin tartrat enjeksiyonu yapılan **G+B** grubu deneklerinin tümüne deneyin 26. gününde %3 Fluorogold verilerek, apoptozise uğramamış olan retina ganglion hücrelerinin işaretlenmiş olduğu doku kesitlerinden elde edilen veriler karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). (**Şekil.3.**)

Episkleral ven koterizasyonu sonrası i.p brimonidin verilen **G+B** grubunun sadece i.p serum fizyolojik enjekte edilen **K** grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, glukom oluşturularak i.p melatonin verilen **G+M** grubu ile **K** grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). (**Şekil.3.**)

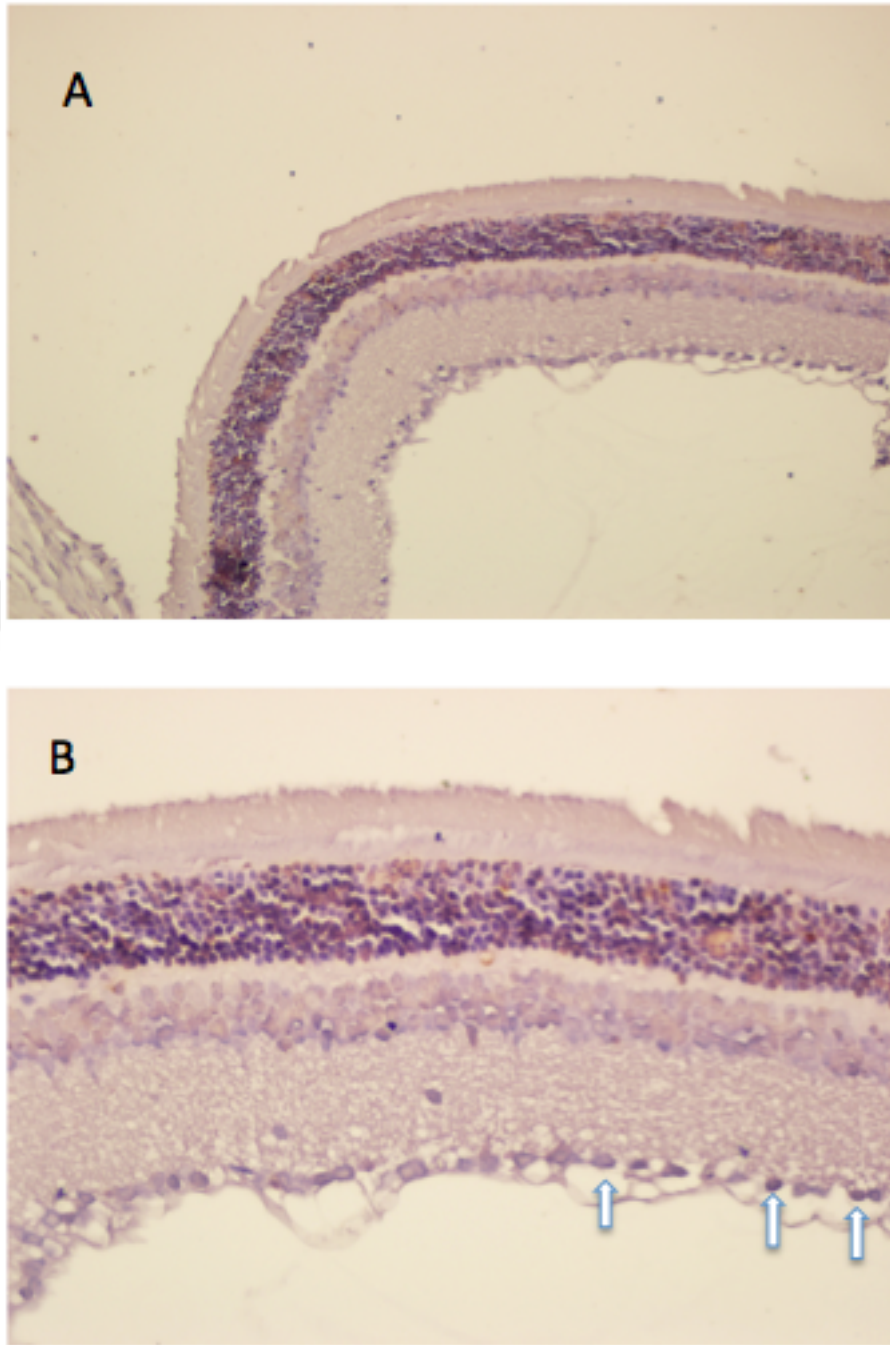
Glokom modeli oluşturulduktan sonra i.p melatonin enjeksiyonları yapılan **G+M** grubu ile glokom oluşturulan ve i.p serum fizyolojik verilen **G** grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. (**Şekil.3.**)



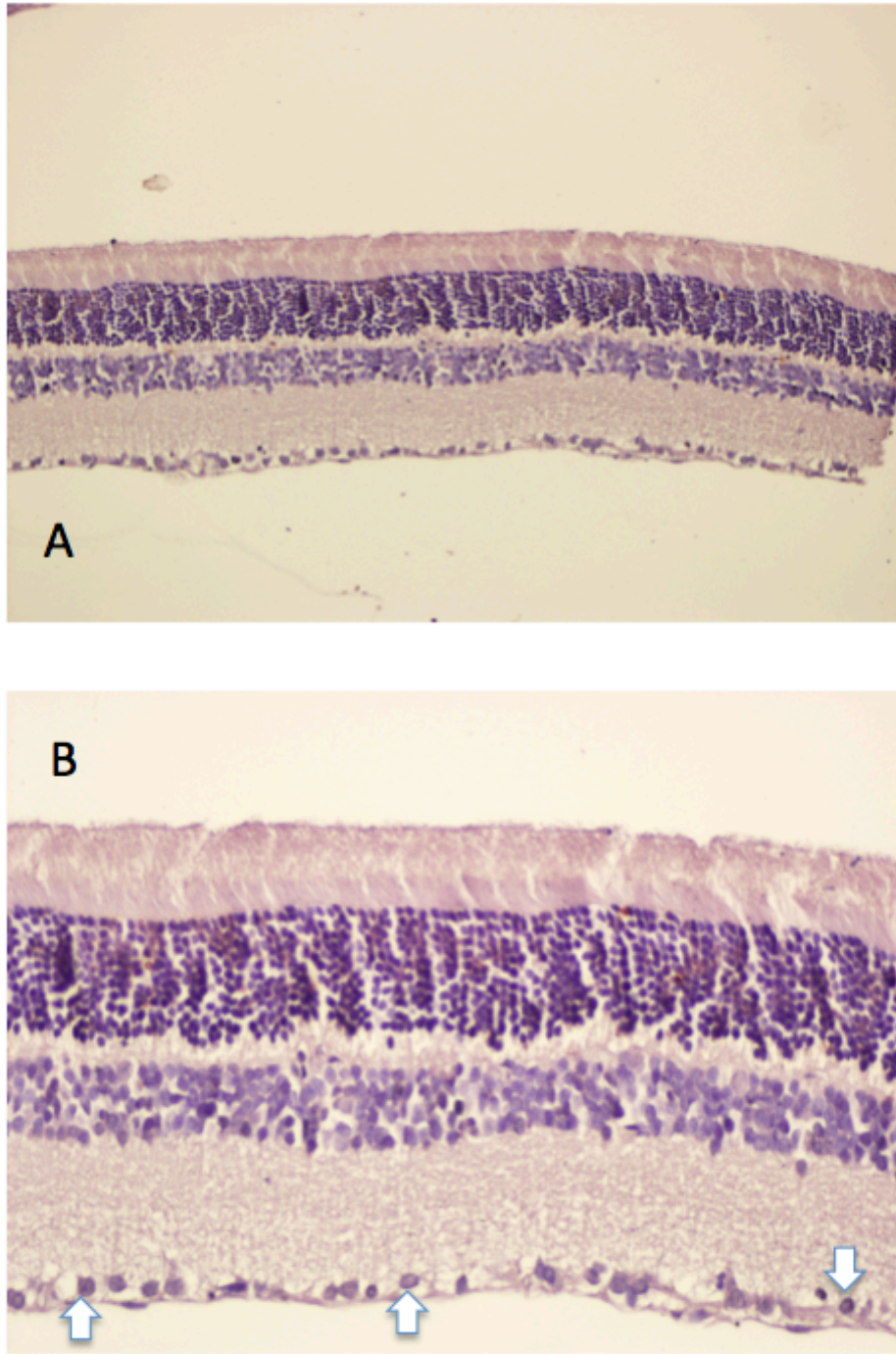
#### 4.4. TUNEL VE %3 FLUOROGOLD İŞARETLİ RETİNA GANGLİON HÜCRELERİNİN HİSTOLOJİK GÖRÜNÜMLERİ



**Resim.5.** TUNEL kiti ile muamele edilen kontrol (K) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede

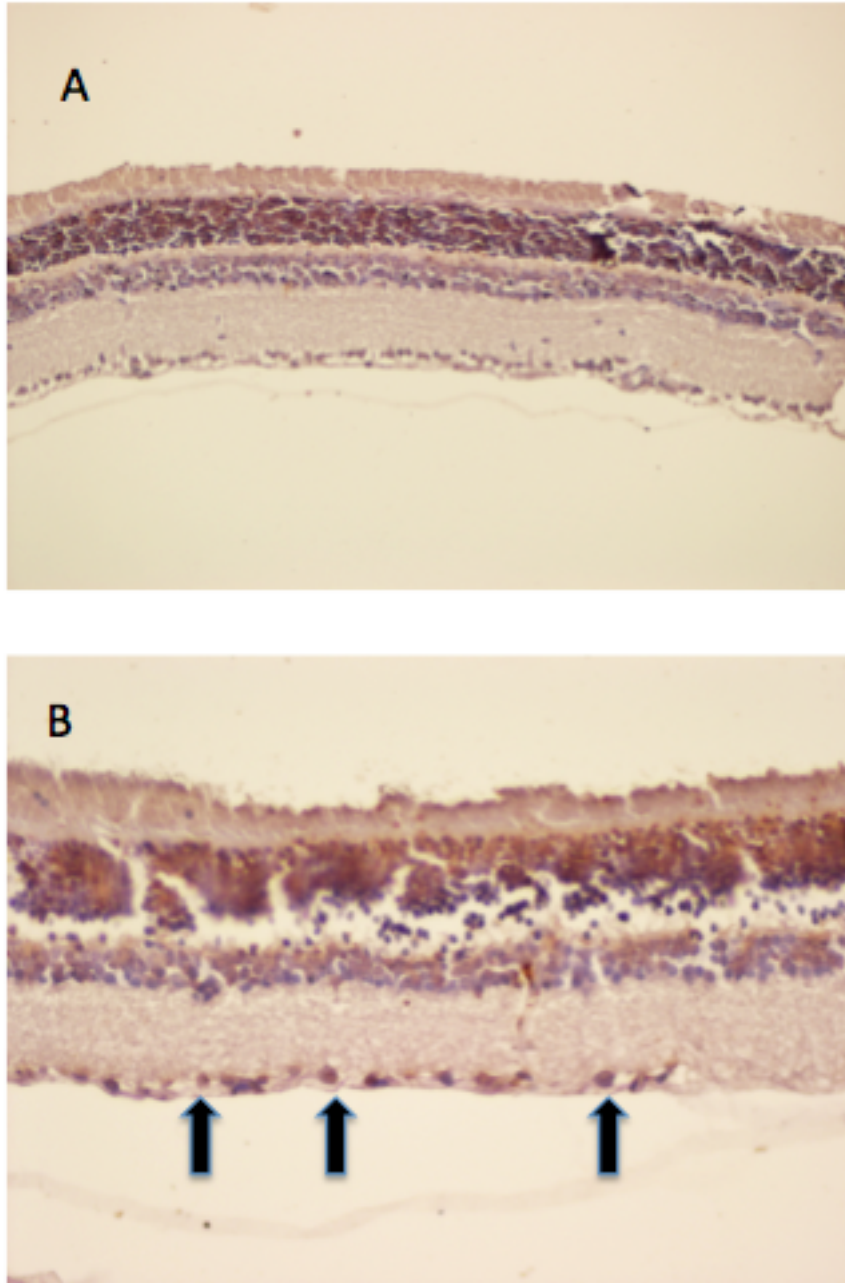


**Resim.6.** TUNEL kiti ile muamele edilen brimonidin tartrat (B) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede.

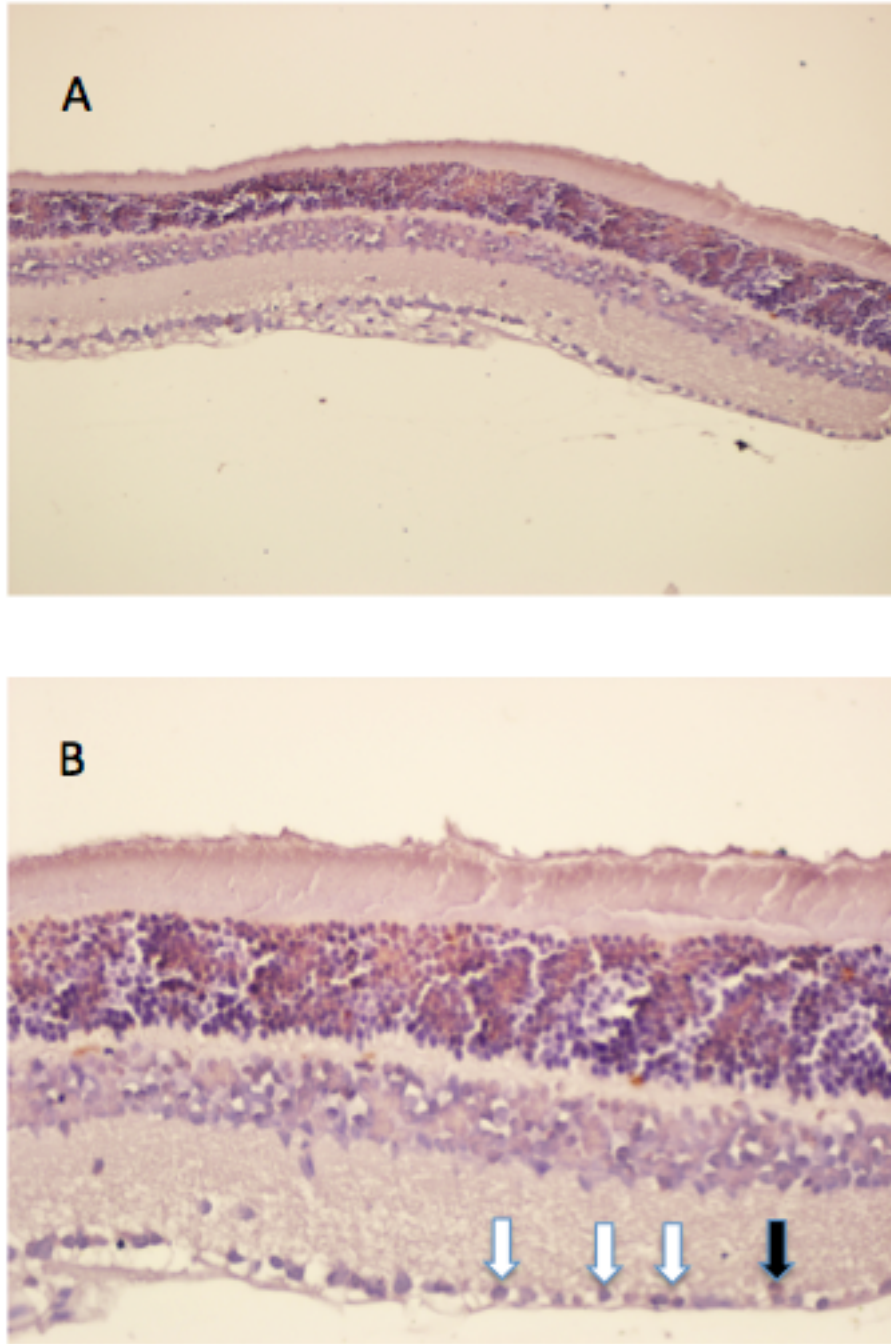


**Resim.7.** TUNEL kiti ile muamele edilen melatonin (M) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede.

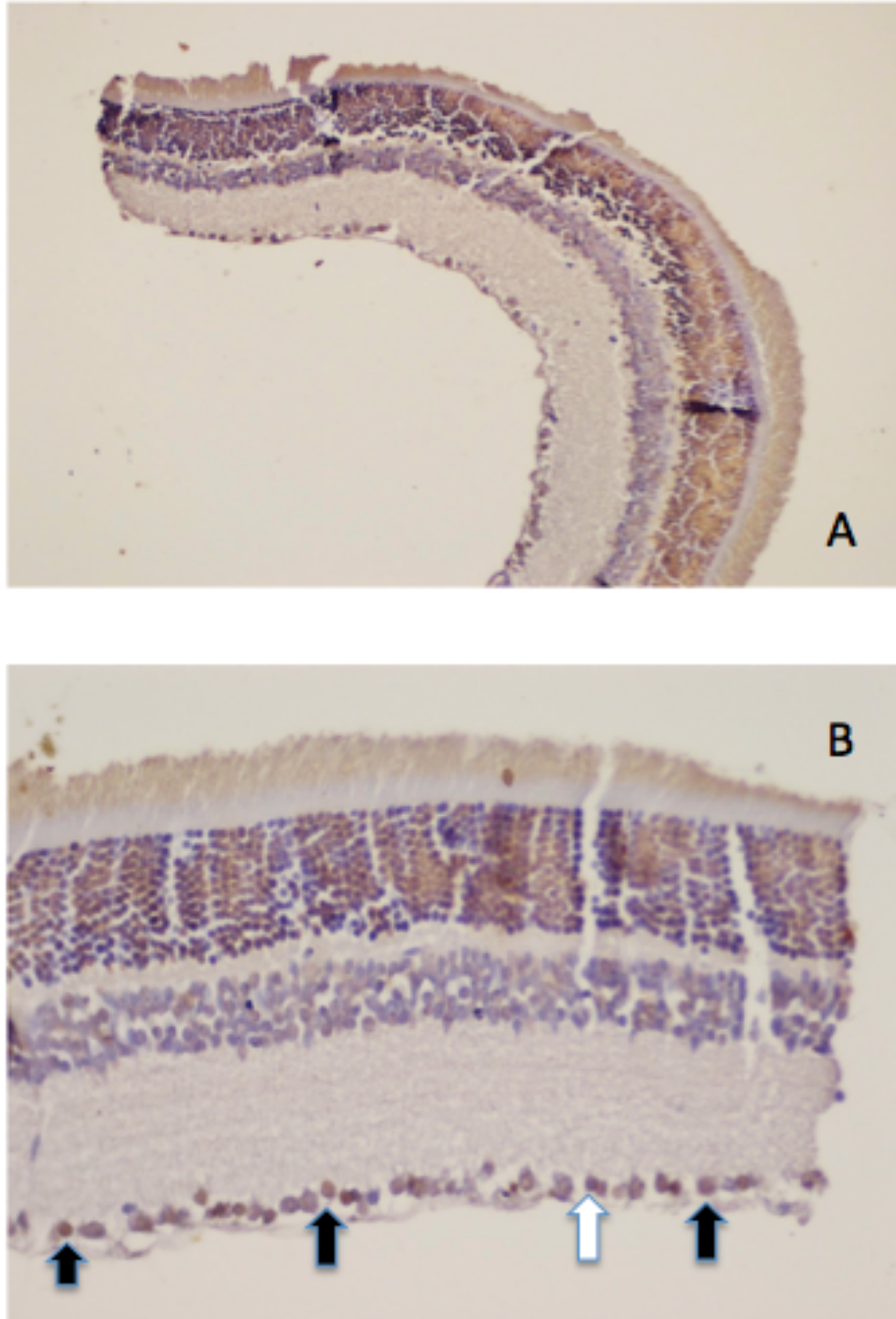




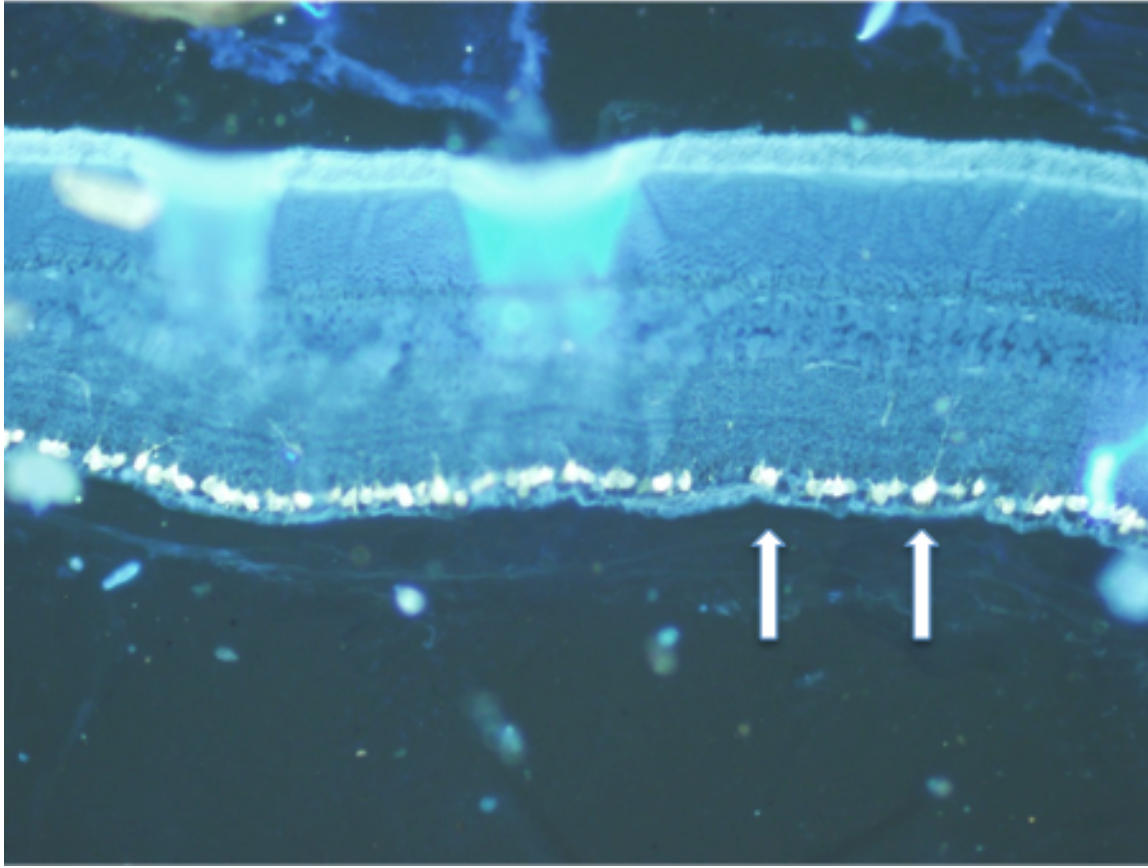
**Resim.8.** TUNEL kiti ile muamele edilen glokom (G) grubu preparatları. TUNEL pozitif boyanan apoptotik retina ganglion hücreleri (RGH) siyah ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede.



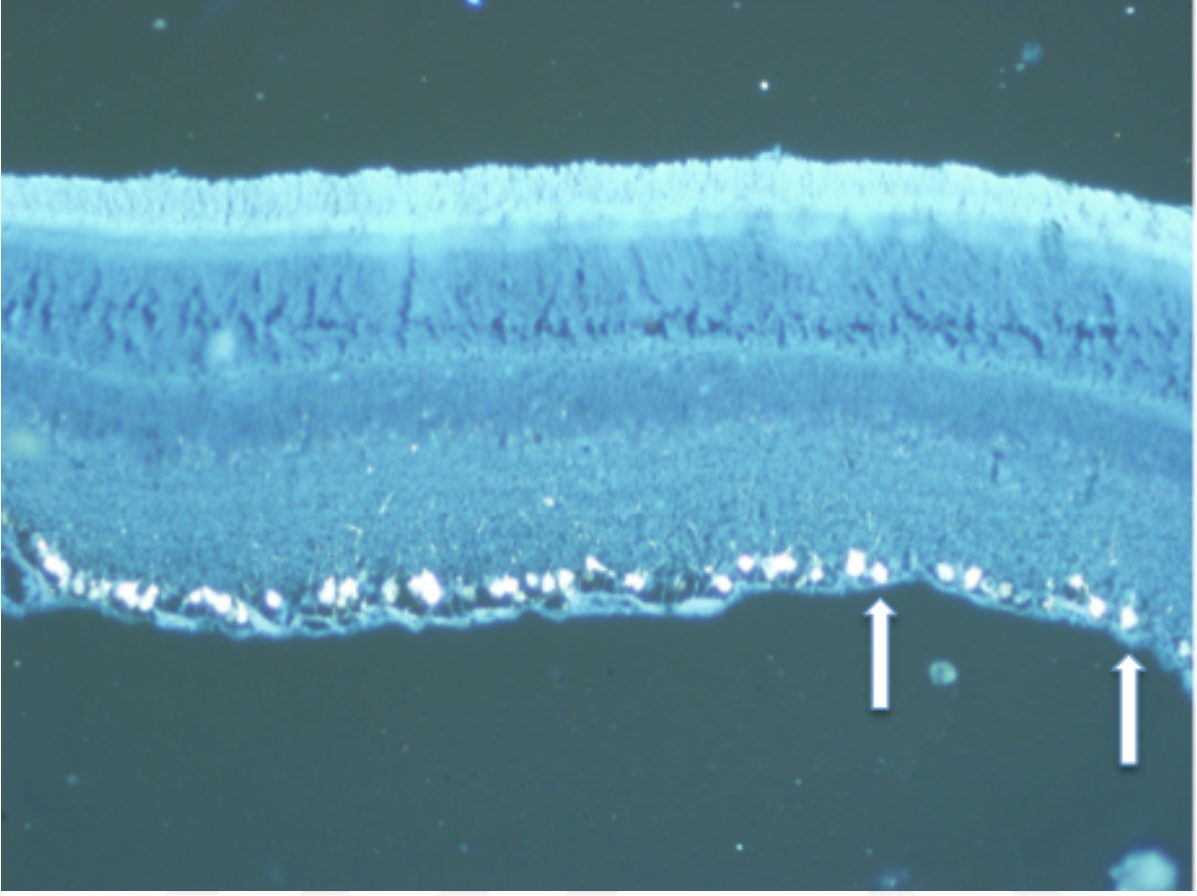
**Resim.9.** TUNEL kiti ile muamele edilen glokom+brimonidin tartrat (G+B) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile, TUNEL pozitif boyanan apoptotik retina ganglion hücresi siyah ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede.



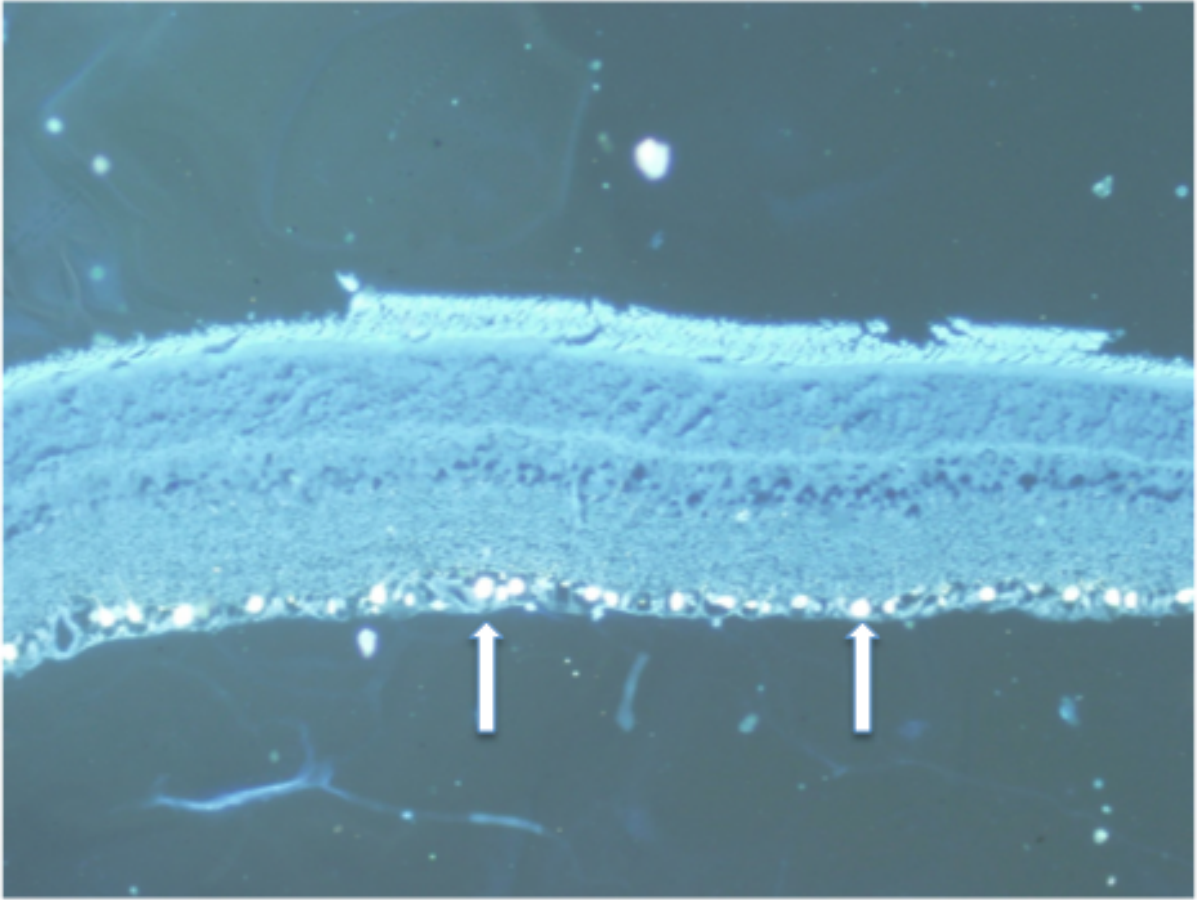
**Resim.10.** TUNEL kiti ile muamele edilen glokom+melatonin (G+M) grubu preparatları. Apoptozise uğramamış retina ganglion hücresi (RGH) beyaz ok ile, TUNEL pozitif boyanan apoptotik retina ganglion hücreleri (RGH) siyah ok ile gösterilmiştir. A) x20 büyütmede B) x40 büyütmede.



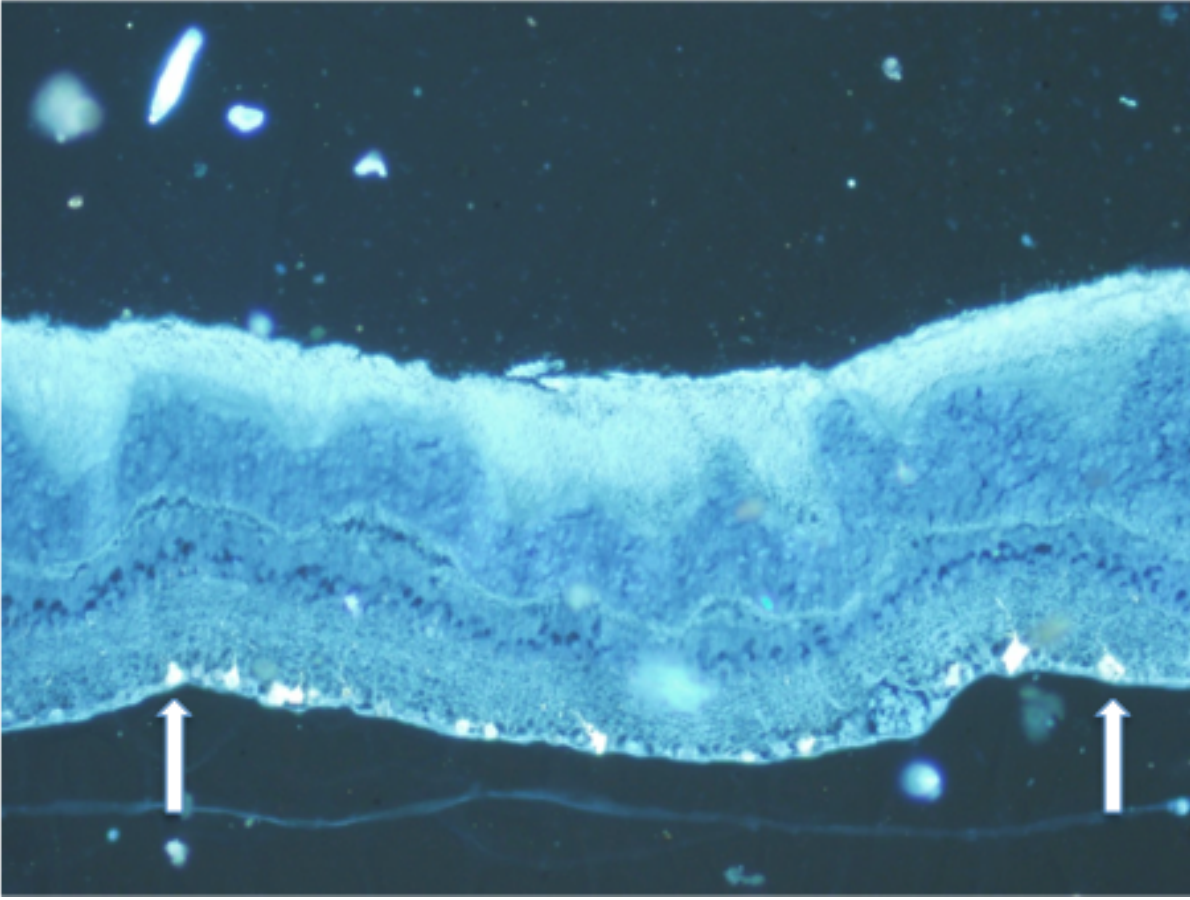
**Resim.11.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Kontrol (K) grubu. x40 büyütmede



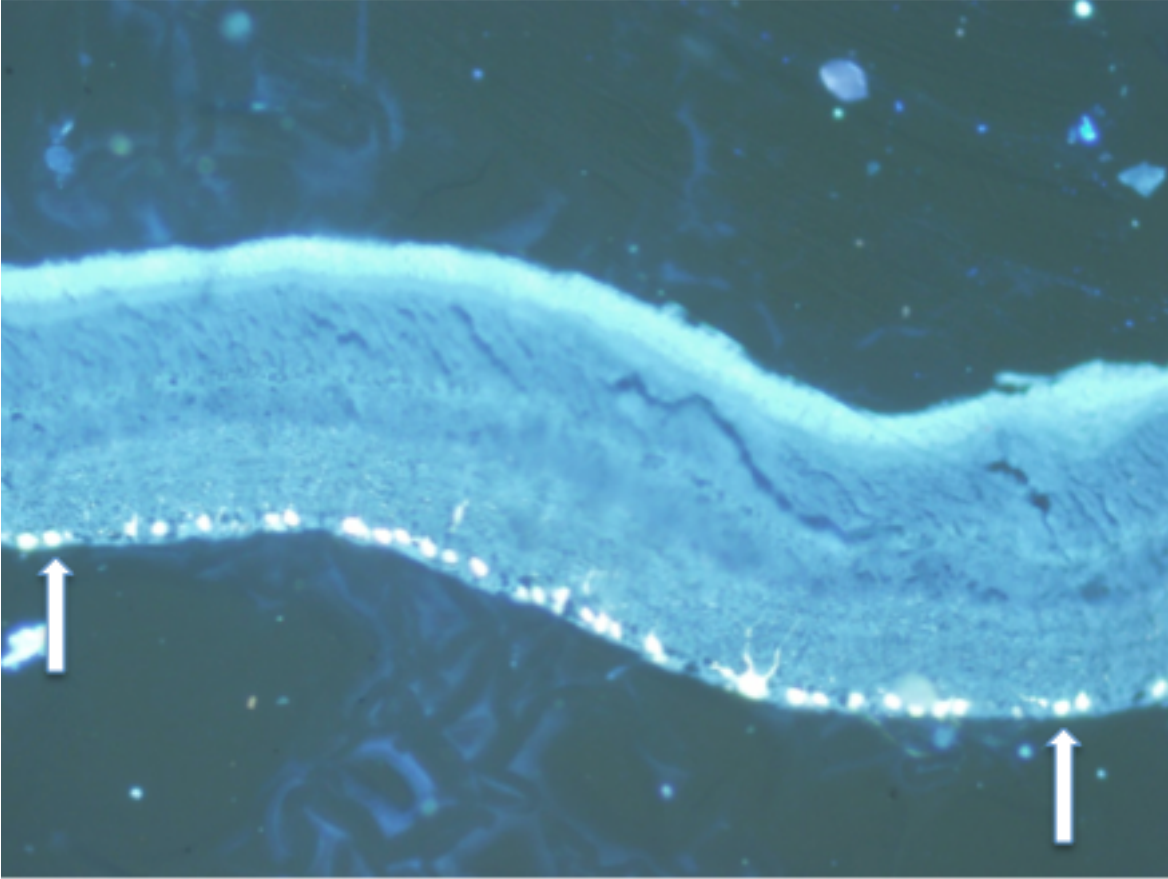
**Resim.12.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Brimonidin tartrat (B) grubu. x40 büyütmede



**Resim.13.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Melatonin (M) grubu. x40 büyütmede

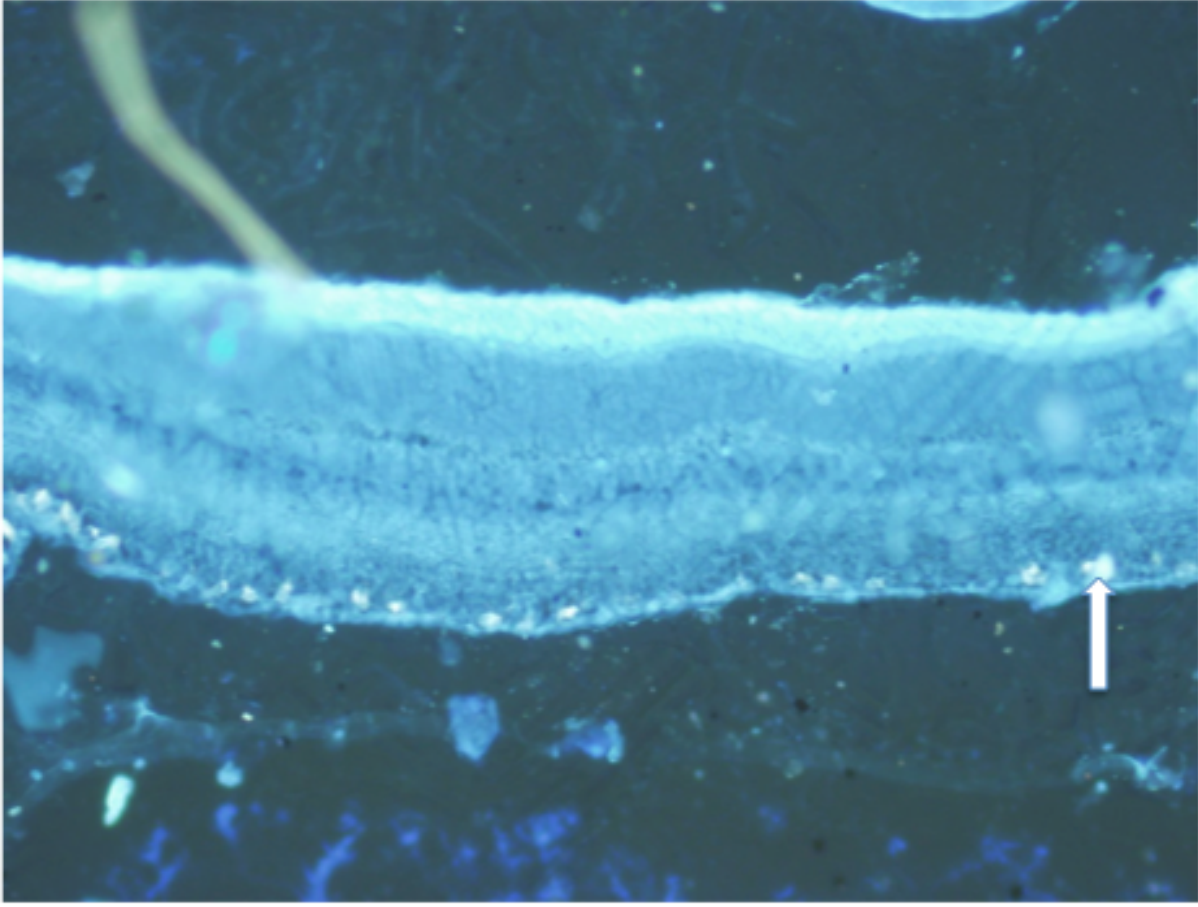


**Resim.14.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Glokom (G) grubu. x40 büyütmede



**Resim.15.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücreleri (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir. Glokom+brimonidin tartrat (G+B) grubu. x40 büyütmede.





**Resim.16.** %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlenmiş olan apoptozise uğramamış retina ganglion hücresi (RGH) beyaz ok ile gösterilmiştir, Glokom+melatonin (G+M) grubu. x40 büyütmede

## **5. TARTIŞMA**

Glokom, yaşam standardında azalmaya ve hatta gözün kaybına yol açabilecek, dünya genelinde önemli bir toplum sağlığı sorunudur. İlerleyici optik sinir hasarı, retina ganglion hücre hasarı ve buna bağlı görme alanı kaybı ile seyreden bir grup hastalıktan oluşmaktadır. En sık görülen formu açık açılı glokomdur ve GİB yüksekliği, birlikte olabileceği gibi, hastalık tablosuna eşlik etmeyebilir. Glokomatöz hasar sürecinde genetik ve çevresel çok sayıda faktörün etkisi söz konusu olmakla birlikte en önemli risk faktörü GİB yüksekliğidir.<sup>31</sup> Bu nedenle günümüzde, glokom tedavisi olarak GİB düşürücü ajanlar ve yöntemler asıl tedavi yaklaşımını oluşturmaktadır. GİB düşürücü tedavilerin glokomun ilerleyici hasar sürecinde koruyucu olduğu çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>57,79,80</sup>

Üzerinde çalışılmakta olan çok sayıda antiglokomatöz ve nöroprotektif molekül mevcuttur. Latrunkulinler: Latrunkulin-A ve Latrunkulin-B, aktin mikofilamanlarının serbest aktin monomerleri ile birleşmesini önleyerek hücrede, hücre ile hücre dışı matriks arasında ve hücreler arası bağlarda gevşeme meydana getirmektedir. Latrunkulin-B'nin insanlarda GİB düşürücü etkisi olduğu bildirilmiştir.<sup>81</sup> Bu etkisini trabeküler ağ yapısında meydana gelen değişimlerle sağladığı düşünülmektedir. İntrakameral ve intravitreal uygulamalar sonrasında retinada damar geçirgenliğinde, retinal elektrofizyolojide, anjiyografik retina görüntüsünde bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir.<sup>82</sup> Rasmussen ve ark, Latrunkulin-B'nin güvenliği, tolere edilebilirliği ve GİB düşürücü etkinliğinin değerlendirildiği çok merkezli plasebo kontrollü ilk insan çalışmasının sonucu olarak Latrunkulin-B'nin oküler hipertansiyon ve primer açık açılı glokom olgularında etkin bir GİB düşürücü etkisi olmasının yanısıra güvenli bir topikal ajan olduğu bildirilmiştir.<sup>83</sup>

PGE<sub>2</sub> agonistleri: Nörotoksisiteden koruyucu etkisi bulunmaktadır. PGE<sub>2</sub> agonistleri reseptörüne (EP<sub>2</sub>) bağlanınca adenilat siklaz aktive olur ve intrasellüler cAMP aktivasyonu sonucu protein kinaz A enzimi aktiflenir ve cAMP'ye cevap veren bağlanma proteininin (CREB) fosforilasyonunu sağlar. CREB beyinde nöronal plastisitenin ve uzun süreli hafızanın oluşturulmasını ve hücre yaşamının devamlılığını ve nörogenezisi sağlamaktadır.<sup>84</sup> B-adrenerjik reseptörü hedefleyen siRNA molekülleri. Moreno-Montanes ve ark tarafından SYL040012 isimli siRNA molekülünün beta-2 reseptör antagonizma etkisinin faz-1 klinik araştırma sonuçlarına

göre, topikal olarak uygulanan sağlıklı gönüllülerde istatistiksel olarak anlamlı GİB düşüş sağlandığı bildirilmiştir.<sup>85</sup> Rho kinaz (ROCK) inhibitörleri: Rho kinaz, bir serin/treonin protein kinaz olup bir çok hücrel sinyal yolağında görevlidir. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve hücrenin hareketinden sorumludur. Primer açık açılı glomk olgularının optik sinir başında yüksek RhoA düzeyleri saptandığı bildirilmiştir.<sup>86</sup> ROCK inhibitörlerinin, mitokondride ve hücre çekirdeğinde oksidatif stresi azaltarak RGH üzerinde nöroprotektif etkisi ve trabeküler ağ yapısında değişikliğe yol açarak GİB düşürücü etki yarattığı düşünülmektedir.<sup>87</sup> Kopolimer-1 (Cop-1; Glatiramer asetat), multipl sklerozis (MS) için FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış nöroprotektif etkinliği olan bir aşıdır. T hücreler üzerinde etki yaparak kontrollü bir inflamasyon ile koruyucu otoimmünite sağlamaktadır. Bu sayede hasarlı optik sinir dokusunun yenilenmesine yardımcı olmaktadır.<sup>88</sup> Bu şekilde nörodejenrasyonun yavaşlatılması ve hatta durdurulması sağlanırken otoimmün hastalık gelişim riski bulunmadığını bildirmişlerdir.<sup>89</sup> Intravitreal brimonidin tartrat implantlarının tavşan gözlerinde polimer tabanlı bir yapı olarak geliştirilmiş olup oküler toksisite adına yapılan ilk çalışmasının sonuçlarında 3 aya kadar etken maddenin salınımı sağlanmış ve kullanımının güvenli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bunun bir tavşan çalışması olduğunu ve aynı etken maddenin insanlarda uygulandığında retina ve diğer oküler dokulara zararlı etkilerinin olabile ihtimalini göz önünde bulundurmak gerektiğini belirtmişlerdir.<sup>90</sup> Nanoparçacık ilaç iletim sistemleri de çalışılmakta olan bir diğer alandır. Grove ve ark'ın çalışmasında direkt olarak optik sinir aksonlarının nöroproteksiyonunu sağlayabilme hipotezi ile kapsül içerisinde tasarlanan nanoparçacık (NP) - brimonidin tartrat molekülünün optik sinir kılıfından geçişi amaçlanmıştır. Böylece optik sinir aksonlarına ulaşan yeni bir ilaç uygulama yolu tanımladıklarını belirtmişlerdir.<sup>91</sup>

Mevcut moleküllerin etkilerinin karşılaştırılması ve yeni moleküllerin geliştirilmesi amacıyla yapılan hayvan araştırmalarında çeşitli glomk modelleri kullanılmaktadır. Glomk modellerinin oluşturulmasında ana basamak GİB yükselmesinin sağlanmasıdır. Bu amaçla oluşturulan glomk modelleri **I) Primat glomk modelleri**; 1) Trabeküler ağın laser fotokoagülasyonu 2) İntrakameral lateks mikrokürelerinin injeksiyonu 3) İntrakameral jel (poliakrilamid) injeksiyonu 4) İntrakameral enzim (alfa kimotripsin) injeksiyonu 5) Topikal steroid uygulaması **II) Kemirgen glomk modelleri**: 1) Oküler hipertansiyon modelleri. a) Episkleral ven

koterizasyonu b)Episkleral ven içerisine hipertonic salin injeksiyonu c)Trabeküler ağ üzerine laser fotokoagülasyon 2)Oküler hipertansiyon olmadan RGH hasarı. a)Optik sinirin mekanik travması b)İskemi-reperfüzyon modelleri c)Eksitotoksik ajanların göz içine enjeksiyonu. 3)Genetik modeller. a)BDA/2J türü farelerde sekonder açı kapanması glokomu b)DBA/2NN1A türü farelerde spontan GİB artışı c)Miyosilin gen mutasyonu ile primer açık açılı glokom d)Kalsitonin reseptör benzeri reseptör gende mutasyon ile akut açı kapanması glokomu e) Glutamat taşıyıcılarının (GLAST: glutamat aspartat taşıyıcı) eksikliği sonucu gelişen retina ganglion hücre hasarı.<sup>92</sup>

**III)Domuz Glokom Modelleri.** İnsan gözünden daha büyük boyutta ve aköz hümör drenajı daha farklı bir sisteme sahiptir. Bunun yanı sıra insan retinasına en çok benzeyen hayvan modelini oluşturmaktadır. Üç episkleral venin koterizasyonu sonrası üçüncü haftada 1.3 kat GİB artışı görülmekte ve bu etkinin yaklaşık 21 hafta sürdüğü ifade edilmektedir.<sup>93</sup> **IV)In vitro sistemler.** Kemirgenlerden elde edilen retina ganglion hücre kültürü veya retinal eksplant kültürü, in vivo çalışmalara kıyasla daha kontrollü çalışmalar yapmaya imkan sağlamaktadır. Retina ganglion hücre kültürü ile tek tip hücre üzerinde çalışılabilirken, retinal eksplant kültürü çalışıldığında ise tüm retina katmanları, retina pigment epiteli ile birlikte ya da ayrı ayrı kullanılabilir. **V)Diğer memeli modelleri.** Tavşan, glokom filtrasyon cerrahisi çalışmalarında standart olarak kullanılan hayvan modelidir. Albino Yeni Zelanda tavşanında konjenital glokom saptandığı bildirilmiştir. Beagles ve Bassets cinsi köpeklerde 6-12. aylarda, Cocker cinsi köpeklerde ise daha erken yaşta spontan glokom ortaya çıkmaktadır. **VI)Memeli olmayan modeller.** Tavuklarda uzun süreli ışık uyarımının açık açılı glokomu indüklediği, horozlarda ise genetik geçişli açı kapanması glokomu izlenebildiği bilinmektedir<sup>92</sup>.

1995 yılında Shareef ve ark<sup>78</sup> tarafından tanımlanan episkleral ven koterizasyonu, yöntemi araştırmacılar tarafından ilgi görmüş ve bu yöntemin kullanılmasıyla araştırmalar hız ve yaygınlık kazanmıştır. Bu yöntemle 4 episkleral venin 3 tanesine koter uygulanması ile aköz dışı akımda azalma ve GİB düzeyinde yükselme amaçlanmaktadır. Laser ile indüklenen glokomun tersine episkleral ven koterizasyonu yönteminde siliyer sinir hasarlanmamakta, trabeküler doku bütünlüğü bozulmamaktadır. Bir diğer avantaj ise, episkleral ven koterizasyonu ile sağlanan GİB yükselmesinin yaklaşık 6 ay boyunca (bir sıçanın yaşam süresi) sürdürülebilmesidir.<sup>94</sup>

Bizim çalışmamızda G, G+B ve G+M grubundaki deneklerin sağ gözlerinden, episkleral ven koterizasyonu uygulanmadan önce alınan bazal GİB ölçümleriyle, episkleral venöz koterizasyon uygulandıktan sonraki 4.günde elde edilen GİB verileri kıyaslandığında, işlem sonrası 4.günde istatistiksel anlamlı bir yükselme saptanması glokom modelimizin başarılı olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, deney sonrasında yapılan preparat incelemelerinde TUNEL ile işaretli apoptotik hücrelerden elde edilen apoptotik indeks verilerinin istatistiksel değerlendirmesinde, episkleral ven koterizasyonu yapılan glokom grubunda apoptotik indeksin anlamlı yüksek seviyeleri de glokom modelimizin başarılı olduğunu desteklemektedir.

Hernandez ve ark'ın sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, episkleral ven koterizasyonu ile glokom modeli oluşturulduktan 3 gün sonra başlanan ve 12 hafta süresince haftada bir aralıklarla i.p. yolla uygulanan brimonidin tartrat injeksiyonunun göz içi basınç düzeylerinde anlamlı bir düşüş oluşturmadığını bildirmişlerdir.<sup>95</sup>

Bizim çalışmamızda ise sıçanlarda episkleral ven koterizasyonu ile glokom modeli oluşturulduktan sonra aynı günde başlanan ve 3 günde bir aralıklarla 4 hafta devam edilen i.p. brimonidin tartrat enjeksiyonunun, deney sonundaki GİB ölçümlerinde, koterizasyon sonrası 4.günde elde edilen GİB ölçümlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sağladığı saptandı. Böylece topikal uygulamada elde edilen GİB düşürücü etkisinin yanında sistemik uygulamada da GİB düşürücü etkisinin olabileceğinin literatüre katkı olduğunu düşünmekteyiz.

Ayrıca, sadece i.p. melatonin uygulanan M grubunda 4.gün ile 30.gün GİB verileri arasında fark saptanmadı. Ancak episkleral ven koterizasyonu yapılarak glokom modeli oluşturulan ve i.p. melatonin enjeksiyonu yapılan grupta 30.gün GİB verilerinin 4.gün verilerine göre kıyaslanmasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü(p<0,05). Bu bulgu, melatoninin sadece glokom varlığında GİB düşürücü etkisi olduğunu düşündürmektedir.

RGH'nin apoptozise uğraması glomatöz hasarın bir sonucudur. GİB yükselmesi ile RGH apoptozisi sürecinde glomatöz hasarın, 5 evre olduğuna dair bir teori bulunmaktadır. Birinci evrede GİB yükselmesi ve lamina kribrosada bulunan optik sinir glial hücrelerinin aktivasyonunun gerçekleşmesi. İkinci evrede akson hasarı ve dejenerasyon sürecinin başlaması. Whitmore ve ark'a göre nöronlar hücre gövdesi, dendritler, akson ve sinapslar olmak üzere kompartmanlardan oluşmakta ve

glokom hasarı kompartmanları farklı etkilemektedir. Her bir kompartmandaki hasarın aynı olma koşulu olmadığını belirtmektedirler.<sup>25</sup> Libby ve ark çalışmasında, proapoptotik bir gen olan Bax geninin etkisizleştirildiği DBA/2j farelerde aksonların tamamen hasarlandığı ancak retina ganglion hücre gövdelerinde dejenerasyona rastlanmadığı bildirilmiştir.<sup>29</sup> Üçüncü evre RGH apoptozisi - primer dejenerasyon. Apoptozis iki yolla aktive olmaktadır. İntrinsik yolda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu mevcuttur ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumu sonucunda sitokrom-c'nin salınımı ile kaspaz-proteaz kaskadı aktiflenmiş olur. Ekstrinsik yolak ile hücre yüzeyinde Fas-Fas ligand etkileşimi ile hücrenin ölümü yönünde sinyal başlatılmış olur ve bu sinyal direk olarak kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır. Ekstrinsik yolak çoğunlukla immun sistem hücrelerinin intrinsik yolak ise nöronların uğradığı apoptotik süreçtir. Dördüncü evre, RGH apoptozisi - sekonder dejenerasyon: hasarlanan nöronlardan glutamat salınımı olduğu, NMDA reseptörü vasıtasıyla hücre içerisine çok miktarda kalsiyum iyonu girişi olduğu evredir. Beşinci evre ise nörodejenerasyon sürecine glial hücrelerin aktivasyonu ile karakterizedir. GİB yükselmesini takiben retinada, ilk olarak Müller hücreleri tarafından nörotrofik faktörler sentezlenir ve salınır. Bu ilk hücresel cevabın, hasarlı RGH çevresinde lokal nöroprotektif bir mikroçevre oluşturma çabası olduğu düşünülmektedir. Bu sürecin devamında ise ganglion hücre gövdeleri ölür, sinir lifi tabakası incilir. Müller hücreleri ve astrositler tarafından yeni bağ dokusu oluşturularak glial skar ile sonuçlanmaktadır.<sup>96</sup> Apoptozisin ilk evresinde, epidermal büyüme faktörü (EGF) optik sinir başındaki glia hücrelerini aktive eden erken sinyal moleküllerindedir. Liu B ve ark çalışmasında, sıçan glokom modelinde EGF reseptörü tirozin kinaz inhibitörü tedavisi uygulandığında ganglion hücre kaybında azalma olduğu saptanmıştır.<sup>97</sup> Stresle indüklenen RGH apoptozisinde önemli rol oynayan apoptozis sinyal düzenleyici kinaz-1 (ASK-1) primer olarak RGH tarafından eksprese edilmektedir.<sup>98</sup> ASK-1 eksik olan farelerde RGC apoptozisinde azalma ve RGH yaşam sürelerinde uzama olduğu görülmüştür.<sup>99</sup>

Brimonidin tartrat, selektif alfa<sub>2</sub> adrenerjik reseptör agonisti olarak siliyer epiteldeki Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz üzerine etkisi ile aköz hümörün yapımını azaltır ve trabeküler ağdan dışa akımını kolaylaştırır. Brimonidin tartratın nöroprotektif etkisi çeşitli optik nöropati modelleri (optik sinir hasarı,<sup>55</sup> geçici iskemi,<sup>100,101</sup> deneysel glokom<sup>46,57</sup>) ile çalışılmıştır.

Aviles-Trigueros ve ark'ın Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda yaptığı bir çalışmada, oftalmik damarların 90 dakika süreyle bağlanması ile geçici iskemi yaratılmış ve 8 hafta sonra anterograd olarak kolera toksin-B ile işaretleme yapılmış. Topikal salin uygulanan kontrol grubu deneklerinde anterograd akımın bozulduğu, anterograd lif dejenerasyonunun olduğu görülürken, brimonidin tartrat uygulanan deneklerde retinotektal innervasyonun korunduğu saptanmıştır.<sup>65</sup>

Geçici iskemi ile indüklenen RGH hasarına karşı, brimonidin tartratın hasardan 1 saat öncesi ile hasardan sonraki dört saate kadarki uygulamalarda koruyucu olduğu bildirilmiştir.<sup>101</sup> Bizim çalışmamızda, glokom modeli kullanıldı ve hasardan sonraki 15 dakika içerisinde intraperitoneal enjeksiyonlar uygulandı.

Brimonidin tartratın nöroprotektif etkisinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ancak alfa<sub>2</sub> reseptörlerin aktivasyonunun proapoptotik mitokondrial sinyalleri<sup>42</sup> inhibe ettiği ve hücrenin canlılığını sağlayan anti-apoptotik BCL-2 proteini ve temel fibroblast büyüme faktörünün (bFGF) sentezini artırarak RGH yaşam süresini arttırdığı düşünülmektedir.<sup>46</sup>

Brimonidin tartratın alfa<sub>2</sub> adrenerjik reseptörleri aktive etmesi için 2nM ve üzerinde konsantrasyonda olması gerekmektedir. Maymunlarda yapılan çalışmada topikal %0.2'lik brimonidin kullanıldığında vitreustaki konsantrasyonu 82nM ( $\pm$ 45) olmaktadır. Sıçanlarda yapılan intraperitoneal brimonidin tartrat enjeksiyonu sonrasında ise vitreusta 22nM, retinada 390nM konsantrasyona ulaştığı bildirilmiştir.<sup>102</sup>

Hayvanlarda alfa<sub>2</sub> adrenerjik reseptörü aktive etmek için brimonidin tartrat %0,15'lik konsantrasyonlu preparatı, yeterli vitreus konsantrasyonunu sağlamaktadır. Brimonidin tartratın %0.2'lik (koruyucu madde olarak benzalkonium klorid=BAK bulunur) ile %0.15'lik (koruyucu madde olarak 'purite' bulunur) konsantrasyondaki preparatlarının etkinlik ve aköz konsantrasyonları benzer olmakla birlikte brimonidin tartrat %0.15'lik konsantrasyonlu preparatı, allerjik reaksiyonlar açısından daha tolere edilebilirdir<sup>103</sup>

Sıçanlarda iskemik ve mekanik optik sinir hasarı modellerinde hasar oluşturulmadan bir saat önce topikal brimonidin tartrat uygulanmasının RGH apoptozisini önlemede etkili olacağını bildirmişlerdir.<sup>104</sup>

Brimonidin tartratın nöroprotektif etkinliğinin mekanizması tam olarak anlaşılammış olsa da, glutamat düzeylerinde azalma yaratarak, beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) ve fibroblast büyüme faktörünün (FGF) düzeylerinde artış sağlayarak ve antiapoptotik genlerin (BCL-2, BCLXL)<sup>46</sup> uyarılması ile hücrenin yaşaması yönündeki sinyalleri uyararak yaptığı düşünülmektedir.<sup>105</sup>

Brimonidin tartratın nöroprotektif etkisi literatürde bulunan çalışmalarda bildirilmiştir. Burada Brimonidin tartratın nöroprotektif etkisinin GİB düşürücü etkisi ile mi moleküler etki ile mi oluştuğunu kesin söylemek mümkün olmamakla birlikte iki mekanizma da katkı yapıyor olabilir.

Lee ve ark çalışmasında, saflaştırılmış RGH üzerinde glutamat ile indüklenen nörotoksinite oluşturularak brimonidin tartrat uygulaması yapılmış ve sonuç olarak brimonidin tartrat uygulanan grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu saptanmamıştır. Bu bulgu, brimonidin tartratın, GİB düşürücü etkiden bağımsız nöroprotektif etkisi bulunduğunu desteklemektedir.<sup>106</sup>

Bizim çalışmamızda, glokom oluşturularak i.p brimonidin tartrat injeksiyonu yapılan G+B grubu denekleri ile glokom modeli oluşturulması sonrası i.p. serum fizyolojik injeksiyonu yapılan G grubu deneklerinin apoptotik indeks değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunması ( $p < 0,05$ ) brimonidin tartratın apoptozise karşı koruyucu olduğunu destekleyen bir bulgudur.

Yine bizim çalışmamızda, glokom modeli oluşturularak i.p. brimonidin tartrat injeksiyonu yapılan G+B grubu deneklerinden elde ettiğimiz apoptotik indeksler ile i.p serum fizyolojik injekte edilen kontrol (K) grubundan elde ettiğimiz apoptotik indekslere göre istatistiksel anlamlı fark bulunmaması, brimonidin tartratın glokoma bağlı gelişen hasarın hücresel etkilerini kontrol grubu seviyelerine indirerek apoptotik hücre ölümünden koruyucu olduğunu desteklemektedir.

Melatonin yüksek lipofilik özelliği sayesinde yüksek çözünür ve kolay yayılabilir bir moleköl özelliği taşımaktadır. Bu sayede organizmada bulunan morfofizyolojik bariyerleri, (kan-beyin bariyeri, hücre zarı, bazal membran vb) kolaylıkla geçebilmekte ve tüm vücut sıvılarına ulaşabilmektedir.<sup>107</sup>

Melatonin reseptörleri organizmada yaygın olarak bulunmaktadır. Her iki melatonin reseptörü (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub>) de retinanın iç ve dış nükleer tabakalarında ve



ganglion hücre tabakasında bulunmaktadır.<sup>108</sup> MT<sub>1</sub> reseptörü vazokonstriksiyon cevabı, hücre çoğalmasında, hücre metabolizmasında rol alırken ve MT<sub>2</sub> dopamin salınımı, vazodilatasyon, lökosit migrasyonu ve immün cevaplarda rol almaktadır.<sup>109</sup>

Melatonin epifiz bezinin yanı sıra siliyer cisimden ve retinal fotoreseptörlerden de ritmik olarak sentezlenmektedir. Aköz hümör içerisinde, gece en yüksek seviyelerde gündüz ise en düşük seviyelerde bulunmaktadır.<sup>110,111</sup> MT<sub>1</sub> reseptörünün RGH'de de bulunduğu çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>112</sup> Alcantara-Contreras ve ark çalışmasında MT<sub>1</sub> reseptör eksikliği oluşturulan 3-12 aylık farelerin, MT<sub>2</sub> reseptör eksikliği yaratılan farelere kıyasla gece GİB düzeylerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.<sup>113</sup>

Melatonin, endojen salınımı olan potent bir antioksidan ve serbest radikal temizleyici olmasından ötürü nöroprotektif potansiyeli olduğu düşünülen bir nörohormondur. Nitrik oksit ile indüklenen retina hasarı modelinde melatoninin RGH kaybını inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>114</sup>

Dardiotis ve ark çalışmasında transgenik farelerde ailesel amyotrofik lateral skleroz modelinde melatonin uygulamasının nöroprotektif etkisinin olmadığı ve hatta nörodejenerasyonu alevlendirdiği bildirilmiştir.<sup>115</sup>

Erten ve ark'ın tavşanlar üzerinde yaptığı omurilik çalışmasında, aorta klemplenmeden 10 dakika önce ve 10 dakika sonra olmak üzere iki gruba intraperitoneal olarak 10mg/kg dozda melatonin injeksiyonu yapılmıştır. Trikarboksilit asit siklusunda bulunan malonaldehid düzeyleri ve antioksidan enzim (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) aktiviteleri ölçülmüş ve melatonin uygulamasının iskemik omurilik hasarından önce verilen gruptaki antioksidan enzim aktivitelerinde istatistiksel anlamlı yükseklik olduğu saptanmıştır. Bu yüksekliği, hem melatoninin antioksidan enzimleri aktive etmesine, hem de melatoninin bizzat antioksidan, serbest radikal temizleyici aktivitesine bağlamışlardır.<sup>107</sup>

Özdemir ve ark yaptığı çalışmada, 7 günlük immatür sıçanlarda oluşturulan travmatik beyin hasarı modeli üzerinde 5mg/kg ve 20mg/kg dozlarda i.p. melatonin enjeksiyonu uygulanmıştır. TUNEL kiti kullanılarak apoptozis değerlendirilmesi yapıldığında, hasarın hemen ardından yapılan tek seferlik i.p. melatonin enjeksiyonunun hipokampüsteki nöron kaybını ve bilişsel fonksiyon bozukluğunu

önlediği sonucuna varılmıştır. 5mg ve 20mg'lık enjeksiyon dozları arasında akut hipokampal hasarı ve uzun dönemde fonksiyon kayıplarını önlemede bir farklılık saptanmamıştır.<sup>116</sup>

Bizim alışmamızda, glokom oluşturularak i.p. melatonin injeksiyonu yaptığımız G+M grubu deneklerinden elde edilen apoptotik indeks verileri ile, glokom modeli oluşturularak i.p serum fizyolojik injeksiyonu yapılan G grubu deneklerinin apoptotik indeks verileri karşılaştırıldığında, apoptotik indeks verileri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamış olması, glokoma bağlı hasar sürecinde melatoninin nöron koruyucu (nöroprotektif) etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Ancak, sadece bu çalışma sonucuna göre melatoninin nöroprotektif olmadığı yargısına varmak doğru olmamakta ve daha geniş denek sayılarıyla çalışmaların gerektiğini düşünmekteyiz

## **6. SONUÇLAR**

1. Çalışmamızda sıçanlarda episkleral ven koterizasyonu glokom oluşturulması planlanan G, G+B ve G+M grup deneklerinin gözlerinde aplanasyon tonometresi yardımıyla yapılan bazal ölçümlerle, episkleral ven koterizasyonu sonrası 4.günde yapılan ölçümlerin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı bir yükselme saptanması deneklerde glokom modelinin oluşturulduğunu desteklemektedir.
2. Glokom oluşturularak i.p. brimonidin tartrat injeksiyonu yapılan G+B grubu denekleri ile glokom modeli oluşturulması sonrası i.p. serum fizyolojik injeksiyonu yapılan G grubu deneklerinin apoptotik indeks değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunması ( $p<0,05$ ) brimonidin apoptozise karşı koruyucu olduğunu destekleyen bir bulgudur.
3. Glokom modeli oluşturularak i.p. brimonidin tartrat injeksiyonu yapılan G+B grubu deneklerinden elde edilen apoptotik indeksler ile i.p serum fizyolojik injekte edilen kontrol (K) grubu apoptotik indekslerine göre istatistiksel anlamlı fark bulunmaması, brimonidin tartratın glokoma bağlı gelişen hasarın hücresel etkilerini kontrol grubu seviyelerine indirerek apoptotik hücre ölümünden koruyucu olduğunu desteklemektedir.
4. Glokom oluşturularak i.p. melatonin injeksiyonu yapılan G+M grubu deneklerinden elde edilen apoptotik indeks verileri ile, glokom modeli oluşturularak i.p serum fizyolojik injeksiyonu yapılan G grubu deneklerinin apoptotik indeks verileri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmamış olması melatoninin glokoma bağlı hasar sürecinde nöron koruyucu etkisinin (nöroprotektif etki) olmadığını göstermektedir.

## **7. ÖZET**

**AMAÇ:** Dünya genelinde, körlüğün önde gelen sebeplerinden olan glokom ilerleyici bir optik nöropatidir. Bu çalışmada, brimonidin tartrat ile melatoninin retina ganglion hücreleri üzerindeki nöroprotektif etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı.

**MATERYAL ve METOD:** 36 adet 150-250 gr ağırlığında ve 4-6 aylık Wistar albino sıçan, kontrol (K), brimonidin tartrat (B), melatonin (M), glokom (G), glokom+brimonidin (G+B) ve glokom+melatonin (G+M) olmak üzere 6 gruba ayrıldı. G, G+B ve G+M grubu deneklerine episkleral ven koterizasyonu ile glokom modeli oluşturuldu. Tüm deneklere, üç günde bir intraperitoneal enjeksiyonlar yapıldı. 26. günde genel anestezi altında, retina ganglion hücreleri %3 Fluorogold ile retrograd olarak işaretlendi. Sakrifikasyon ve enükleasyon sonrasında elde edilen doku kesitleri TUNEL kiti ile muamele edilerek apoptotik hücrelerin sayımı yapıldı. Floresan mikroskopunda, U-MN-1 filtresi altında, retrograd olarak %3 Fluorogold ile işaretli apoptozise uğramamış retina ganglion hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Göz içi basınç ölçümleri non-parametrik bir test olan Wilcoxon signed rank test ile, apoptotik indeks verileri ve %3 Fluorogold işaretli hücrelerin sayımından elde edilen veriler ise tek-yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Holm Sidak testi ile değerlendirildi.

**BULGULAR:** B, G+B ve G+M gruplarında istatistiksel anlamlı olarak GİB düşüşü saptandı. Sadece intraperitoneal brimonidin tartrat enjeksiyonu yapılan deneklerin G+B ile K gruplarının apoptotik indeksleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. %3 Fluorogold ile işaretli hücre sayımları karşılaştırıldığında G+M ile G grubu arasında fark bulunmazken, G+B ile G grubu arasında istatistiksel anlamlı fark olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).

**SONUÇ:** Brimonidin tartratın, hem sistemik uygulama ile GİB azaltıcı etkisinin de olabileceği hem de retina ganglion hücrelerini apoptozisten koruyarak apoptotik indeks seviyelerini kontrol düzeylerine kadar indirdiği sonucuna varıldı. Bunun yanı sıra melatoninin sadece glokom varlığında GİB azaltıcı etki sağladığı gözlemlendi. Ancak melatoninin bu çalışmada glokom hasarı karşısında, nöron koruyucu bir etkisi olduğu gösterilemedi.

**ANAHTAR KELİMELER:** melatonin, brimonidin tartrat, nöroproteksiyon, glokom, retina ganglion hücresi

## **8. ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** Glaucoma, a leading cause of blindness worldwide, is a progressive optic neuropathy. In this study, we aimed to compare the neuroprotective effects of brimonidine tartrate and melatonin on retinal ganglion cells (RGCs).

**MATERIALS AND METHODS:** Thirty-six Wistar-albino, 150-250 grams, 4-6 month-old rats were separated into six groups: Control (C), brimonidine tartrate (B), melatonin (M), glaucoma (G), G+B, G+M. Glaucoma model was established by unilateral episcleral venous cauterization. Intraocular pressure (IOP) measurements were performed under topical anesthesia every three days. At day 26, RGCs were retrogradely labelled with 3% Fluorogold, which was injected into the superior colliculus under general anesthesia. At day 30, sacrifice and enucleation were performed. TUNEL kit was used for labelling apoptotic RGCs. Calculation of apoptotic index was done. By using electron microscope with U-MN-1 filter, 3% Fluorogold labelled cells were counted. Both apoptotic index values and 3% Fluorogold labelled cell counts were analyzed by one way ANOVA followed by post hoc Holm-Sidak test. IOP measurements were analyzed using a non-parametric test, Wilcoxon signed-rank test.

**RESULTS:** Statistically significant IOP reduction were noted in B, G+B and G+M groups. G+B group had a decreased apoptotic index value compared to G group ( $p < 0.05$ ). On the contrary, no statistical significance was found between G and G+M groups. Labelled cell counts were significantly higher in G+B than in G group. On the other hand, there was no difference between G+M and G group labelled data.

**CONCLUSIONS:** Our research showed that brimonidine tartrate had a significant IOP reducing effect when applied systemically and also it appears to be neuroprotective on retinal ganglion cells against glaucomatous injury. Intraperitoneal melatonin injections caused a significant IOP reduction only under glaucomatous conditions. There was no significant difference between G+M and G groups. Our research showed no neuroprotective effect of melatonin on retinal ganglion cells in glaucomatous neurodegeneration process.

**KEYWORDS:** melatonin, brimonidine tartrate, neuroprotection, glaucoma, retinal ganglion cell.

## **9. KAYNAKLAR**

1. Danesh-Meyer HV. Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions. *Curr Opin Ophthalmol.* 2011 Mar; 22(2): 78-86
2. Intraocular Pressure and Aqueous Humor Dynamics. Chapter-2. AAO Basic and Clinical Science Course, 2012-2013, Section-10, Glaucoma s:13-26
3. Kalapesi FB, Coroneo MT, Hill MA. Human ganglion cells express the alpha-2 adrenergic receptor: relevance to neuroprotection. *Br J Ophthalmol.* 2005 Jun; 89(6): 758-63.
4. Allingham RR. Aköz Hümör Dinamiğinin Hücresel ve Moleküler Biyolojisi. Shields Textbook of Glaucoma (Türkçesi). Altıncı Baskı. Çeviri: Aktaş Z. Çeviri ed: Tekeli O. Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins. 2014; s:3-23
5. Yalvaç BI. Glokom açısından gözün embriyoloji, anatomi ve fizyolojisi. Bölüm-35, Temel Göz Hastalıkları. Ed: O'Dwyer, Akova YA. Güneş Kitabevi. 2011; s:457-63.
6. Iris and Ciliary Body. Chapter-9. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Course, 2012-2013. Section-2, Fundamentals and Principles of Ophthalmology. s: 253-64.
7. Intraocular Pressure and Aqueous Humor Dynamics, Chapter-2. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Course, 2012-2013. Section-10, Glaucoma. s: 13-26.
8. Yücel YH, Johnston MG, Manoj TL et al. Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye: A novel "uveolymphatic" outflow pathway. *Experimental Eye Research* 2009; 89: 810-19.
9. Weitzman ED, Henkind P, Leitman M, Hellman L. Correlative 24-hour relationships between intraocular pressure and plasma cortisol in normal subjects and patients with glaucoma *Brit. J. Ophthal.* 1975;(59) 566
10. Clement C, Bhartiya S, Shaarawy T. New perspectives on target intraocular pressure. *Surv Ophthalmol.* 2014 Apr; 1-12.
11. Broadway DC, Nicoleta MT, Drance SM. Optic disc appearances in primary open-angle glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999;43(suppl.1); s:223-43
12. Classification and Terminology, Chapter-2. Terminology and Guidelines for Glaucoma. European Glaucoma Society, 3<sup>rd</sup> edition, 2008. s: 93-109

13. Childhood Glaucoma, Chapter-6. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Course, 2012-2013. Section-10, Glaucoma. s: 139-158.
14. Kanski J, Bowling B. Glaucoma, Chapter-10. Clinical Ophthalmology, A Systemic Approach. Elsevier-Saunders. 2011: s:312-400.
15. Open-Angle Glaucoma, Chapter-4. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Course, 2012-2013. Section-10, Glaucoma. s:73-108.
16. Medical Management of Glaucoma. Chapter-7. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Course, 2012-2013. Section-10, Glaucoma. s:159-177
17. Treatment Principles and Options, Chapter-3. Terminology and Guidelines for Glaucoma. European Glaucoma Society, 3<sup>rd</sup> edition, 2008. s:117-57
18. Surgical Therapy for Glaucoma. Chapter-8. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Course, 2012-2013. Section-10, Glaucoma. s:179-212.
19. Allingham RR. Siklodestrüktif Cerrahi. Shields Textbook of Glaucoma (Türkçesi). Altıncı Baskı. Çeviren: İzgi B. Çeviri ed: Tekeli O. Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins. 2014:565-77.
20. The Eye, Chapter-2. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Course, 2012-2013. Section-2, Fundamentals and Principles of Ophthalmology. s:41-82.
21. Jepson LH, Hottowy P, Mathieson K, Gunning DE, Dabrowski W et al. Focal electrical stimulation of major ganglion cell types in the primate retina for the design of visual prostheses. J Neurosci. 2013 Apr 24;33(17):7194-205.
22. Pickard GE, Sollars PJ. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2012;162:59-90.
23. Markwell EL, Feigl B, Zele AJ. Intrinsically photosensitive melanopsin retinal ganglion cell contributions to the pupillary light reflex and circadian rhythm. Clin Exp Optom. 2010 May;93(3):137-49.
24. Chichilnisky EJ, Kalmar RS. Functional asymmetries in ON and OFF ganglion cells of primate retina. J Neurosci. 2002 Apr 1;22(7):2737-47.
25. Whitmore AV, Libby RT, John SW. Glaucoma: thinking in new ways – a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes? Prog Retin Eye Res. 2005;(24):639-62.

26. Weber AJ, Kaufman PL, Hubbard WC. Morphology of single retinal ganglion cells in the glaucomatous primate retina. *IOVS*. 1998;(39):2304-20.
27. Morgan JE, Uchida H, Caprioli J. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 2000;(84):303-310.
28. Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, et al. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol*. 2005;(171):313-325.
29. Libby RT, Li Y, Savinova OV, et al. Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage. *PLoS Genet*. 2005;(1):17-26.
30. Li Y, Schlamp CL, Poulsen KP, et al.: Bax-dependent and independent pathways of retinal ganglion cell death induced by different damaging stimuli. *Exp Eye Res*. 2000;(71):209-213.
31. Nickells RW: The molecular biology of retinal ganglion cell death: caveats and controversies. *Brain Res Bull*. 2004;(62):439-46
32. Weishaupt JH, Klocker N, Bahr M: Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells. *J Mol Neurosci*. 2005;(26):17-25.
33. Cheng L, Sapienza P, Kittlerova P, et al.: TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci*. 2002;(22):3977-86.
34. Schlamp CL, Thliveris AT, Li Y, et al.: Insertion of the beta Geo promoter trap into the Fem1c gene of ROSA3 mice. *Mol Cell Biol*. 2004;(24):3794-803.
35. Park KH, Cozier F, Ong OC, et al.: Induction of heat shock protein 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;(42):1522-30.
36. Farkas RH, Chowdhury I, Hackam AS, et al.: Increased expression of iron-regulating genes in monkey and human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;(45):1410-17.
37. Piri N, Song M, Kwong JM, et al.: Modulation of alpha and beta crystallin expression in rat retinas with ocular hypertension-induced ganglion cell degeneration. *Brain Res*. 2007;(1141):1-9.
38. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;(26):1324-37.



39. Levin LA, Geszvain KM: Expression of ceruloplasmin in the retina: induction after optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;(39):157-63.
40. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al.: Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science.* 2007;(315):856-59.
41. Mittag TW, Danias J, Pohorenc G, et al.: Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;(41):3451-59.
42. Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Sud A, et al.: Maintaining mitochondrial membrane impermeability. An opportunity for new therapy in glaucoma? *Surv Ophthalmol.* 2001;(45)(Suppl. 3):277-83.
43. Bao Q, Shi Y: Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* 2007;(14):56-65.
44. Slee EA, Adrain C, Martin SJ: Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;(6):1067-74.
45. Levin LA, Albert DM. Retinal ganglion cell death in glaucoma. Chapter 27. *Ocular Disease, Mechanism and Management.* Elsevier-Saunders. 2010;207-13.
46. Wheeler L, WoldeMussie E, Lai R. Role of alpha-2 agonist in Neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 48 (Suppl 1); 2003; 47-51.
47. Sakamoto K, Kawakami T, Shimada M, Yamaguchi A, Kuwagata M et al. Histological protection by cilnidipine, a dual L/N-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker, against neurotoxicity induced by ischemia-reperfusion in rat retina. *Exp Eye Res.* 2009 May;88(5):974-82.
48. Fitzgerald M, Payne SC, Bartlett CA, Evill L, Harvey AR. Secondary retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of the calcium channel blocker lomerizine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Nov;50(11):5456-62.
49. Johnson EC, Guo Y, Cepurna WO, Morrison JC. Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp Eye Res.* 2009 Apr;88(4):808-15.
50. Koriyama Y, Tanii H, Ohno M, Kimura T, Kato S. A novel neuroprotective role of a small peptide from flesh fly, 5-S-GAD in the rat retina in vivo. *Brain Res.* 2008 Nov 13;1240:196-203.

51. Munemasa Y, Ahn JH, Kwong JM, Caprioli J, Piri N. Redox proteins thioredoxin-1 and thioredoxin-2 support retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Gene Ther.* 2009 Jan;16(1):17-25.
52. Tulsawani R, Kelly LS, Fatma N, Chhunchha B, Kubo E. et al. Neuroprotective effect of peroxiredoxin 6 against hypoxia-induced retinal ganglion cell damage. *BMC Neurosci.* 2010 Oct 5;11:125.
53. Bull ND, Irvine KA, Franklin RJ, Martin KR. Transplanted oligodendrocyte precursor cells reduce neurodegeneration in a model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Sep;50(9):4244-53.
54. Ogidigben M, Chu TC, Potter DE. Alpha-2 adrenoceptor mediated changes in aqueous dynamics: effect of pertussis toxin. *Exp Eye Res.* 1994 Jun;58(6):729-36.
55. Yoles E, Wheeler LA, Schwartz M. Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Jan;40(1):65-73.
56. Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, de Imperial JM, Villegas-Pérez MP. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol.* 2001 May;45 Suppl 3:261-7
57. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Nov;42(12):2849-55.
58. Hernández M, Urcola JH, Vecino E. Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments. *Exp Eye Res.* 2008 May;86(5):798-806.
59. Ma K, Xu L, Zhang H, Zhang S, Pu M, Jonas JB. Effect of brimonidine on retinal ganglion cell survival in an optic nerve crush model. *Am J Ophthalmol.* 2009 Feb;147(2):326-31.
60. Sun D, Rait JL, Kalloniatis M. Inner retinal neurons display differential responses to N-methyl-D-aspartate receptor activation. *J Comp Neurol.* 2003 Oct 6;465(1):38-56.
61. Dong CJ, Guo Y, Agey P, Wheeler L, Hare WA. Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Oct;49(10):4515-22.

62. Liu W, Yuen EY, Allen PB, Feng J, Greengard P, Yan Z. Adrenergic modulation of NMDA receptors in prefrontal cortex is differentially regulated by RGS proteins and spinophilin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Nov 28;103(48):18338-43.
63. Gao H, Qiao X, Cantor LB, WuDunn D. Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells. *Arch Ophthalmol*. 2002 Jun;120(6):797-803.
64. Dong CJ, Guo Y, Wheeler L, Hare WA. Alpha2 adrenergic receptor-mediated modulation of cytosolic Ca<sup>++</sup> signals at the inner plexiform layer of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Mar;48(3):1410-5.
65. Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, García-Avilés A, Lafuente MP, Rodríguez ME et al. Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol*. 2003 Dec;184(2):767-77.
66. Lambert WS, Ruiz L, Crish SD, Wheeler LA, Calkins DJ. Brimonidine prevents axonal and somatic degeneration of retinal ganglion cell neurons. *Mol Neurodegener*. 2011 Jan 13;6(1):4.
67. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*. 2005 Feb;9(1):25-39.
68. Srinivasan V, Cardinali DP, Srinivasan US, Kaur C, Brown GM, Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection. *Ther Adv Neurol Disord*. 2011 Sep;4(5):297-317.
69. Castrillón PO, Cardinali DP, Pazo D, Cutrera RA, Esquifino AI. Effect of superior cervical ganglionectomy on 24-h variations in hormone secretion from the anterior hypophysis and in hypothalamic monoamine turnover during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis in rats. *J Neuroendocrinol*. 2001 Mar;13(3):288-95.
70. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Melatonin-- a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*. 2011 Mar;93(3):350-84.
71. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1070-3.

72. Weishaupt JH, Bartels C, Pölking E, Dietrich J, Rohde G et al. Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. *J Pineal Res.* 2006 Nov;41(4):313-23.
73. Park SW, Lee HS, Sung MS, Kim SJ. The effect of melatonin on retinal ganglion cell survival in ischemic retina. *Chonnam Med J.* 2012 Aug;48(2):116-22.
74. Vornicescu C, Boşca B, Crişan D, Yacoob S, Stan N, Filip A, Şovrea. Neuroprotective effect of melatonin in experimentally induced hypobaric hypoxia. *Rom J Morphol Embryol.* 2013;54(4):1097-106.
75. Liu XJ, Yuan L, Yang D, Han WN, Li QS, et al. Melatonin protects against amyloid- $\beta$ -induced impairments of hippocampal LTP and spatial learning in rats. *Synapse.* 2013 Sep;67(9):626-36.
76. Lima E, Cabral FR, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Amado D. Melatonin administration after pilocarpine-induced status epilepticus: a new way to prevent or attenuate postlesion epilepsy? *Epilepsy Behav.* 2011 Apr;20(4):607-12.
77. Vimala PV, Bhutada PS, Patel FR. Therapeutic potential of agomelatine in epilepsy and epileptic complications. *Med Hypotheses.* 2014 Jan;82(1):105-10.
78. Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res* 1995; 61: 379-82.
79. Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L et al. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol.* 2003 Jan;121(1):48-56.
80. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol.* 2002 Oct;120(10):1268-79.
81. Ethier CR, Read AT, Chan DW. Effects of latrunculin-B on outflow facility and trabecular meshwork structure in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;(47):1991-8.
82. Kiland JA, Miller CL, Kim CB, et al. Effect of H-7 and Lat-B on retinal physiology. *Curr Eye Res.* 2006;(31):441-55.

83. Rasmussen CA, Kaufman PL, Ritch R, Haque R, Brazzell RK et al. Latrunculin B Reduces Intraocular Pressure in Human Ocular Hypertension and Primary Open-Angle Glaucoma. *Transl Vis Sci Technol*. 2014 Sep 3;3(5):1.
84. Jiang J, Dingledine R. Prostaglandin receptor EP2 in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 July ; 34(7): 413–23.
85. Moreno-Montañés J, Sádaba B, Ruz V, Gómez-Guiu A, Zarranz J. Phase I clinical trial of SYL040012, a small interfering RNA targeting  $\beta$ -adrenergic receptor 2, for lowering intraocular pressure. *Mol Ther*. 2014 Jan;22(1):226-32.
86. Goldhagen B, Proia AD, Epstein DL, Rao PV. Elevated levels of RhoA in the optic nerve head of human eyes with glaucoma. *J Glaucoma*. 2012;(21):530-8.
87. Yamamoto K, Maruyama K, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y et al. The novel Rho kinase (ROCK) inhibitor K-115: a new candidate drug for neuroprotective treatment in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Oct 2;55(11):7126-36.
88. Schwartz M. Vaccination for glaucoma: dream or reality?. *Brain Res Bull*. 2004 Feb 15;62(6):481-4.
89. Kipnis J, Schwartz M. Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. *Trends Mol Med*. 2002 Jul;8(7):319-23.
90. Deokule SP, Baffi JZ, Guo H, Nazzaro M, Kaneko H. Evaluation of extended release brimonidine intravitreal device in normotensive rabbit eyes. *Acta Ophthalmol*. 2012 Aug;90(5):e344-8
91. Grove K, Dobish J, Harth E, Ingram MC, Galloway RL. Trans-meningeal drug delivery to optic nerve ganglion cell axons using a nanoparticle drug delivery system. *Exp Eye Res*. 2014 Jan;118:42-5.
92. Yıldız BK, Ünlü M, Aktaş Z. Deneysel Glokom Modelleri. *Glokom-Katarakt Dergisi, Gazi Göz Vakfı*. 2012;7(4):201-8.
93. Ruiz-Ederra J1, García M, Hernández M, Urcola H, Hernández-Barbáchano E et al. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res*. 2005 Nov;81(5):561-9.
94. Vecino E, Sharma S. Glaucoma animal models. Chapter-15. *Glaucoma Basic and Clinical Concepts*. Intech Open Access Publisher, 2011: 319-34.

95. Hernandez M. et al Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine latanoprost or combined treatments. *Experimental Eye Research*.2008;(86):798-806.
96. Nickells RW. From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. *Can J Ophthalmol* 2007;(42):278-87.
97. Liu B, Chen H, Johns TG, Neufeld AH. Epidermal growth factor receptor activation: an upstream signal for transition of quiescent astrocytes into reactive astrocytes after neural injury. *J Neurosci*. 2006 Jul 12;26(28):7532-40.
98. Hattori K, Naguro I, Runchel C, Ichijo H. The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signal*.2009;7-9.
99. Harada C, Namekata K, Guo X, Yoshida H, Mitamura Y et al. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST-deficient mice, a model of normal tension glaucoma. *Cell Death Differ*. 2010 Nov;17(11):1751-9.
100. Donello JE, Padillo EU, Webster ML, Wheeler LA, Gil DW. alpha(2)-Adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation and preserve retinal function after transient ischemia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jan;296(1):216-23.
101. Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sobrado-Calvo P, García-Avilés A, Miralles de Imperial J et al. Neuroprotective effects of alpha(2)-selective adrenergic agonists against ischemia-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Aug;42(9):2074-84.
102. Acheampong AA Distribution of brimonidine into anterior and posterior tissues of monkey rabbit and rat eyes. *Drug Metab Dispos* 2002;30:421-9.
103. Kent AR et al 2006 Vitreous concentration of topically applied brimonidine purite %0.15. *Ocul J Pharmacol Ther* 2006;(22):242-6.
104. Wheeler LA, Lai R, Woldemussie E. From the lab to the clinic: activation of an alpha-2 agonist pathway is neuroprotective in models of retinal and optic nerve injury. *Eur J Ophthalmol*. 1999 Jan-Mar;9(Suppl 1):17-21.
105. Saylor M, McLoon LK, Harrison AR, Lee MS. Experimental and Clinical Evidence for Brimonidine as an Optic Nerve and Retinal Neuroprotective Agent. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(4):402-6
106. Lee KYC, Nakayama M, Aihara M, Chen YN, Araie M. Brimonidine is neuroprotective against glutamate-induced neurotoxicity, oxidative stress and hypoxia in purified rat retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 2010; (16): 246-51.

107. Erten SF, Kocak A, Ozdemir I, Aydemir S, Colak A et al. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia. *Spinal Cord* 2003;(41):533-8.
108. Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Mar;43(3):889-97.
109. Mathes AM, Kubulus D, Weiler J, Bentley A, Waibel L et al. Melatonin receptors mediate improvements of liver function but not of hepatic perfusion and integrity after hemorrhagic shock in rats. *Crit Care Med*. 2008 Jan;36(1):24-9.
110. Chiquet C, Claustrat B, Thuret G, Brun J, Cooper HM, Denis P. Melatonin concentrations in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*. 2006 Aug;142(2):325-27
111. Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays*. 2008 Jul;30(7):624-33.
112. Baba K, Pozdeyev N, Mazzoni F, Contreras-Alcantara S, Liu C, Kasamatsu M, Martinez-Merlos T, Strettoi E, Iuvone PM, Tosini G. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A*. 2009; 106:15043–8.
113. Alcantara-Contreras S, Baba K, Tosini G. Removal of melatonin receptor type 1 increases intraocular pressure and retinal ganglion cells death in the mouse. *Neurosci Lett*. 2011 Apr 20;494(1):61-4
114. Siu AW, Ortiz GG, Benitez-King G, To CH, Reiter RJ. Effects of melatonin on the nitric oxide treated retina. *Br J Ophthalmol*. 2004 Aug;88(8):1078-81.
115. Dardiotis E, Panayiotou E, Feldman ML, Hadjisavvas A, Malas S et al. Intraperitoneal melatonin is not neuroprotective in the G93ASOD1 transgenic mouse model of familial ALS and may exacerbate neurodegeneration. *Neurosci Lett*. 2013 Aug 26;548:170-5.
116. Özdemir D, Tugyan K, Uysal N, Sonmez U, et al. Protective effect of melatonin against head trauma-induced hippocampal damage and spatial memory deficits in immature rats. *Neuroscience Letters*. 2005;(385):234-39.