



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

# **DENEYSEL GLOKOM MODELİNDE ERİTROPOETİNİN NÖROPROTEKSİYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Yusuf ONAY**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Tolga KOCATÜRK**

**AYDIN-2021**

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL GLOKOM MODELİNDE**  
**ERİTROPOETİNİN NÖROPROTEKSİYON**  
**ÜZERİNE ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Yusuf ONAY**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Tolga KOCATÜRK**

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-20030 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

**AYDIN-2021**

## TEŞEKKÜR

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki eğitimim boyunca ve tez çalışmamda yardımlarını, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Tolga KOCATÜRK'e, eğitimime sağladığı katkılardan dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Sema ORUÇ DÜNDAR'a, Doç. Dr. Harun ÇAKMAK'a, Dr. Öğr. Gör. Ayşe İpek AKYÜZ ÜNSAL'a ve eğitim süremi sonlarına doğru emekli olan, bilgi ve tecrübesiyle bize her zaman yol gösteren Prof. Dr. Seyhan BAHAR ÖZKAN'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Uzmanlık tezimin proje aşaması ve hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen ve çalışmamın deney ve histopatoloji aşamalarında yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Kemal ERGİN ve değerli asistanı Dr. Serhan ÇAMOĞLU'na ve ayrıca immunohistokimya boyama aşamasındaki desteklerinden dolayı ADÜ Patoloji Anabilim Dalı'na ve ADÜ Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi sorumlusu Vet. Dr. Serdar AKTAŞ ile yardımcısı Rıfat AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım boyunca birlikte çalışma olanağı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma, tüm hemşire, sekreter ve sağlık personeline sağladıkları güzel ortamdan dolayı teşekkür ederim.

Meşakkatli eğitim sürecim boyunca bana hep destek olan ve bugünlere gelmemi sağlayan anneme, babama, bana her zaman yaşam enerjisi sağlayan kızım İnci Sena ONAY ve mutluluk kaynağım sevgili eşim Hanım ONAY'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız...

Dr. Yusuf ONAY

# İÇİNDEKİLER

|                                                                         |      |
|-------------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR .....                                                          | i    |
| TABLolar DİZİNİ.....                                                    | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                    | v    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                                     | vi   |
| RESİMLER DİZİNİ .....                                                   | viii |
| 1. GİRİŞ.....                                                           | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                  | 3    |
| 2.1. Görme Sistemi ve Anatomisi.....                                    | 3    |
| 2.1.1. Retina Anatomisi .....                                           | 3    |
| 2.1.2. Optik disk anatomisi.....                                        | 7    |
| 2.1.3. Siliyer Cisim, Trabeküler Ağ Yapısı ve Aköz Hümör Dinamiği ..... | 9    |
| 2.2. Glokom .....                                                       | 10   |
| 2.2.1. Glokom Tanımı .....                                              | 10   |
| 2.2.2. Glokom Patogenezi .....                                          | 11   |
| 2.2.3. Glokomatöz Optik Nöropati .....                                  | 12   |
| 2.3. Glokom Sınıflandırması .....                                       | 14   |
| 2.3.1. Primer Açık Açılı Glokom .....                                   | 16   |
| 2.3.1.1. Primer Açık Açılı Glokom Epidemiyolojisi.....                  | 16   |
| 2.3.1.2. Primer Açık Açılı Glokom Patofizyolojisi .....                 | 16   |
| 2.3.1.3. Primer Açık Açılı Glokom Risk faktörleri .....                 | 17   |
| 2.3.2. PrimerAçı Kapanması Glokomu .....                                | 18   |
| 2.4. Glokom Tanı Kriterleri.....                                        | 18   |
| 2.5. Glokom Tedavisi .....                                              | 21   |
| 2.5.1. Nöroproteksiyon ve Eritropoetin .....                            | 23   |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                    | 26 |
| 3.1. Deney Hayvanları.....                                                 | 26 |
| 3.2. Deney Gurupları .....                                                 | 26 |
| 3.2.1. Grup 1- Kontrol Gurubu:.....                                        | 26 |
| 3.2.2. Grup 2- Glokom Grubu: .....                                         | 26 |
| 3.2.3. Grup 3- Subkonjonktival Eritropoetin Tedavi Grubu (SUBEPO): .....   | 26 |
| 3.2.4. Grup 4-Topikal Eritropoetin Tedavi Grubu (TEPO):.....               | 27 |
| 3.3. Anestezi Tekniği.....                                                 | 27 |
| 3.4. Subkonjonktival -Topikal EPO Uygulamaları ve Glokom İndüksiyonu ..... | 27 |
| 3.5. Göz İçi Basınç Ölçümleri .....                                        | 29 |
| 3.6. Ötenazi ve Enükleasyon .....                                          | 29 |
| 3.7. İmmunohistokimyasal İnceleme.....                                     | 30 |
| 3.8. İmmünhistokimya Cihazındaki Aşamaların Listesi .....                  | 30 |
| 3.9. Histoloji ve Retina Kalınlığı Değerlendirilmesi.....                  | 31 |
| 3.10. İstatiksel Analiz .....                                              | 33 |
| 4. BULGULAR .....                                                          | 33 |
| TARTIŞMA.....                                                              | 45 |
| SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                    | 51 |
| ÖZET .....                                                                 | 52 |
| ABSTRACT .....                                                             | 53 |
| KAYNAKLAR.....                                                             | 54 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo I. Hematoksilen eozin boyama prosedürleri.....                                     | 32 |
| Tablo II. Gruplara Göre Retina Kalınlığı Karşılaştırması .....                           | 34 |
| Tablo III. Gruplara Göre Retina Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları .....                  | 35 |
| Tablo IV. Gruplara Göre İç Pleksiform Tabaka Kalınlığı Karşılaştırması.....              | 36 |
| Tablo V. Gruplara Göre İç Pleksiform Tabaka Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları.....       | 37 |
| Tablo VI. Gruplara Göre Ganglion Hücre Tabakası Kalınlığı Karşılaştırması.....           | 38 |
| Tablo VII. Gruplara Göre Ganglion Hücre Tabakası Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları ..... | 39 |
| Tablo VIII. Gruplara Göre Ganglion Hücre Kompleksi Kalınlığı Karşılaştırması .....       | 40 |
| Tablo IX. Gruplara Göre Ganglion Hücre Kompleksi Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları ..... | 41 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Retina optik koherens tomografi (OCT) görüntüsü .....                          | 4  |
| Şekil 2. Normal bir bireyde Optik Disk.....                                             | 8  |
| Şekil 3. Sağlıklı ve glokomlu bireylerde görme alanı .....                              | 13 |
| Şekil 4. Sağlıklı ve glomatöz optik disklerin oftalmoskopik fotoğrafları .....          | 19 |
| Şekil 5. Başlangıç, 3. ve 6. haftada göz içi basınç karşılaştırması .....               | 33 |
| Şekil 6. Gruplara Göre Retina Kalınlığı Karşılaştırması.....                            | 34 |
| Şekil 7. Gruplara Göre Retina Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları.....                    | 35 |
| Şekil 8. Gruplara Göre İç Pleksiform Tabaka Kalınlığı Karşılaştırması.....              | 36 |
| Şekil 9. Gruplara Göre İç Pleksiform Tabaka Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları.....      | 37 |
| Şekil 10. Gruplara Göre Ganglion Hücre Tabakası Kalınlığı Karşılaştırması .....         | 38 |
| Şekil 11. Gruplara Göre Ganglion Hücre Tabakası Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları.....  | 39 |
| Şekil 12. Gruplara Göre Ganglion Hücre Kompleksi Kalınlığı Karşılaştırması .....        | 40 |
| Şekil 13. Gruplara Göre Ganglion Hücre Kompleksi Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları..... | 41 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|        |                                                          |
|--------|----------------------------------------------------------|
| EPO    | : Eritropoetin                                           |
| OCT    | : Optik koherens tomografi                               |
| RPE    | : Retina pigment epiteli                                 |
| RGC    | : Retina ganglion hücreleri                              |
| GİB    | : Göz içi basınç                                         |
| ECM    | : Hücre dışı matriks                                     |
| OR     | : Olasılık oranı                                         |
| GON    | : Glokomatöz optik nöropati                              |
| LGN    | : Lateral genikülat nükleus                              |
| SC     | : Süperior kollikulus                                    |
| IODDS  | : Göz içi ilaç iletim sistemleri                         |
| EPOR   | : Eritropoetin reseptörü                                 |
| rHuEPO | : İnsan rekombinant eritropoetini                        |
| GA     | : Görme alanı                                            |
| NO     | : Nitrik oksit                                           |
| PAAG   | : Primer açık açılı glokom                               |
| PKAG   | : Primer kapalı açılı glokom                             |
| GCC    | : Ganglion Hücre Kompleksi (Ganglion Cell Complex)       |
| RNFL   | : Retina Sinir Lifi Tabakası (Retinal Nerve Fiber Layer) |
| IPL    | : İç Pleksiform Tabaka                                   |
| FFA    | : Fundus Floresein Anjiografi                            |
| TA     | : Trabeküler Ağ                                          |
| BDNF   | : Brain Derived Neurotrophic Factor                      |

|      |                              |
|------|------------------------------|
| PLGA | : Polilaktitkoglikolid asit  |
| OD   | : Optik Disk                 |
| IHC  | : İmmunohistokimyasal boyama |
| H-E  | : Hematoksilen eozin boyama  |
| µm   | : Mikrometre                 |
| mm   | : Milimetre                  |
| AK   | : Ön Kamara                  |
| HA   | : Hyaluronik asit            |

## RESİMLER DİZİNİ

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Resim 1. Glokom indüksiyonundan önce.....                               | 28 |
| Resim 2. Glokom indüksiyonundan sonra.....                              | 28 |
| Resim 3. Deney aşaması.....                                             | 29 |
| Resim 4. Kontrol Grubu H-E boyama 40X büyütme .....                     | 42 |
| Resim 5. Glokom H-E boyama 40X büyütme.....                             | 42 |
| Resim 6. Subkonjonktival Eritropoetin Grubu H-E boyama 40X büyütme..... | 43 |
| Resim 7. Topikal Eritropoetin Grubu H-E boyama 40X büyütme.....         | 43 |
| Resim 8. Bcl-2 immunohistokimyasal boyama 40X büyütme .....             | 44 |
| Resim 9. Bax antikoru immunohistokimyasal boyama 40X büyütme .....      | 44 |

# 1. GİRİŞ

Glokom dünya çapında geri döndürülemeyen körlüğün başta gelen nedenlerindendir. Retinal ganglion hücrelerin (RGC) aksonlarının dejenerasyonu ve terminal dönemde hücre kaybı ile karakterize, öncelikle görme alanı (GA) kaybıyla sonuçlanan ilerleyici nörodejeneratif bir göz bozukluğu olarak kabul edilmektedir (1).

Glokomun nedenleri kesin olarak bilinmemekle birlikte apoptozisin indüklenmesine bağlı retinal ve glial hücre ölümüne yol açan nörodejeneratif bir hastalıktır. Glokoma bağlı görme kaybı için kritik olan nokta, optik sinirde oluşan hasar ve buna bağlı olarak RGC'lerin ilerleyici dejenerasyonu sonucu meydana gelir. Glokom patogeneziyle ilişkili faktörler arasında yüksek göz içi basıncı, artmış oksidatif stres, yaşlanma, glutamat nörotoksitesisi, optineurin ve miyosilin gibi duyarlılık genleri bulunmaktadır (2).

Glokomun hasar sürecinde etkili olan birçok faktör bulunmakla birlikte, göz içi basınç (GİB) yüksekliği bilinen en önemli risk faktörüdür. Ancak günümüzde GİB düşürücü ajanların kullanımı ile basınç seviyesi etkin şekilde düşürülmesine rağmen, glokoma bağlı optik sinir hasarının önlenemediği hastalar bulunması nedeni ile nöroprotektif ajanların geliştirilmesi hedeflenmiştir. GİB'in düşürülmesi gibi tedaviler dolaylı olarak nöroprotektif tedaviler olarak kabul edilebilse de, nöroprotektif tedavi nöronun direkt kendisini hedef alır (3, 4). Günümüzde, mevcut tedavide öncelikli amaç GİB'i düşürmek olup bu amaçla medikal tedavi, lazer ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. RGC'lerde meydana gelen fonksiyon kaybının temelinde programlanmış hücre ölümü olan apoptozis yer almaktadır. Bu sebeple glokomun tedavisinde RGC için nöroprotektif terapötik yaklaşımların geliştirilmesi son derece önemlidir (5).

Eritropoetin (EPO), geleneksel olarak vücudumuzdaki kırmızı kan hücrelerinin üretilmesinden sorumlu olduğu düşünülen doğal glikoprotein yapılı bir hormondur. Hematopoietik etkisine ek olarak, bu sitokin, merkezi sinir sisteminde de gözlenen nöroprotektif ve nörorejeneratif özellikleri gösterilmiştir. Diyabetik retinopati, retina dekolmanı, glokom, prematüre retinopatisi, yaşa bağlı maküler dejenerasyon ve optik nevrin gibi birçok oküler hastalıkta, birçok klinik öncesi çalışma yapılmıştır. EPO'nun RGC'lerin

apoptozunu önlediği, görsel fonksiyonu koruduğu çok sayıda glokom modelinde gösterilmiştir ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir (6).

Daha önce retinada EPO'nun terapötik etkileri sistemik yollar, intravitreal, subkonjonktival ve retrobulbar gibi farklı oküler uygulamalar ile test edilmiştir. Sistemik yol istenmeyen bir ikincil etkiye, hematopoezde artışa neden olurken, oküler uygulamalar koryoretinit, retina dekolmanı, katarakt, vitreit ve hatta endoftalmi gibi oküler komplikasyonlara yol açabilmektedir (6).

Daha önceki çalışmalarda, sıçanlarda yapılan glokom hayvan modelinde, EPO'nun subkonjonktival yoldan uygulandığı zaman hem fizyolojik hem de glokom koşullarında retinal ganglion hücre katmanına ulaştığı gösterilmiştir. Subkonjonktival uygulama yolunun, EPO'nun oküler hastalıklar için girişime bağlı minimal riski olan güvenli ve kolay bir prosedür olduğu gösterilmiştir (6).

Çalışmamızda daha önce yapılmamış bir çalışma modeli olan, EPO molekülünün topikal ve subkonjonktival yoldan uygulanmasının deneysel sıçan glokom modelinde RGC'lerin apoptozisinin ve nöroprotektif etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Literatürde topikal EPO tedavisinin bu şekilde uygulandığı bir çalışma bulunmamaktadır. Planlanan çalışma sonrasında EPO'nun apoptozis üzerindeki etkisinin aydınlatılması, sonraki yapılacak klinik ve deneysel çalışmalara aynı zamanda ilaç tedavilerine zemin oluşturması hedeflenmektedir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Görme Sistemi ve Anatomisi**

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

#### **2.1.1. Retina Anatomisi**

Retina objelerin görüntülerinin odaklandığı sinir tabakası olup nöronları oksipital kortekse kadar uzanır. Retina, merkezi sinir sisteminin bir parçasıdır ve nöronlar, glial hücreler ve kan damarlarından oluşur. Retinanın nöronal bileşeni altı tür nörondan oluşur: fotoreseptörler (basiller ve koniler), bipolar hücreler, yatay hücreler, amakrin hücreler ve retinal ganglion hücreleridir.

Çekirdeği dış nükleer tabakada bulunan fotoreseptörler ışığa tepki verir ve ikinci dereceden nöronlarla sinaps yapar. Retinal internöronların hücre gövdeleri (yatay, bipolar ve amakrin hücreleri) baskın olarak iç nükleer tabakada bulunur ve görsel bilgileri fotoreseptörlerden retinanın en iç tabakasında bulunan RGC modifiye eder ve iletirler. RGC'ler, görsel sinyalleri beynine ileten retinanın çıkış hücreleridir. RGC'lerin aksonları optik diskte (OD) birleşir, optik sinir başındaki lamina cribrosa'yı geçerek optik siniri oluştururlar. Retina pigment epiteli (RPE) koriokapillaris tabakasının üstünde bulunan Bruch membranı üzerinde olup, rejenerasyon kapasitesi düşüktür ve retinanın fonksiyonel işleyişi için çok önemli görevleri vardır. Glokomda, retinal hastalıklar ve elektrofizyolojik testler açısından retinadaki her tabakanın önemi bulunmaktadır (1, 5, 7).

Retinanın tabakaları içten dışa doğru:

1-İç limitan membran

2-Sinir lifleri tabakası

3-Ganglion hücreleri tabakası

4-İç pleksiform tabaka

5-İç nükleer tabaka

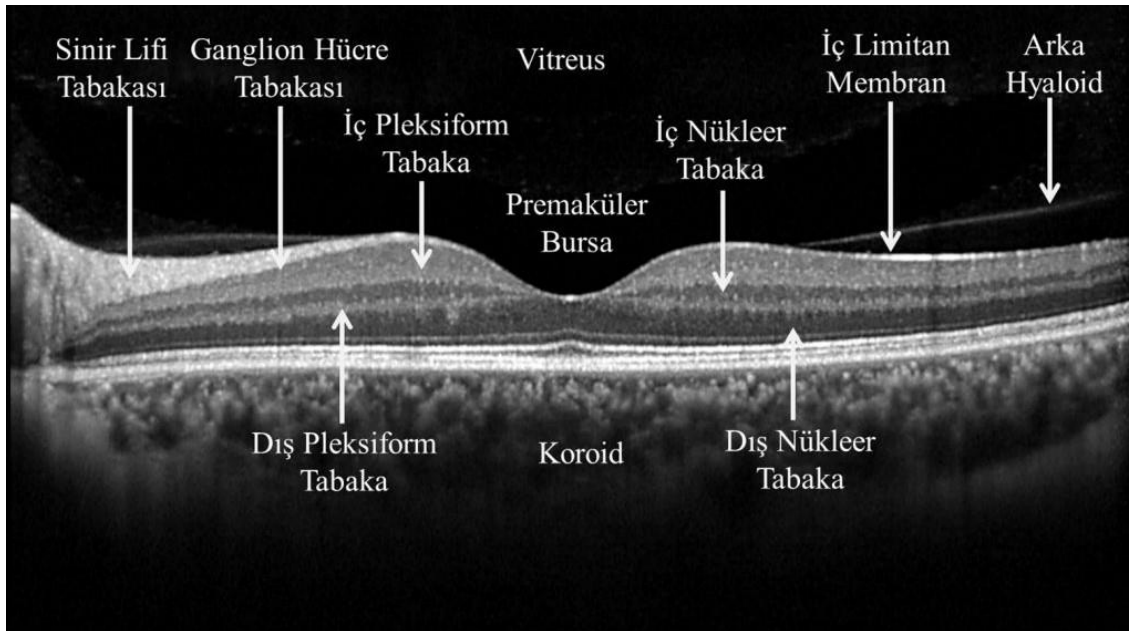
6-Dış pleksiform tabaka

7-Dış nükleer tabaka

8-Dış limitan membran

9-Koni ve basiller

10-Retina pigment epiteli'dir.



Şekil 1. Retina optik koherens tomografi (OCT) görüntüsü

**İnternal limitan membran:** Müller hücreleri retinada bulunan en büyük hücre olan radyal glial hücrelerdir. Bu tabaka müller hücrelerinin ayakları tarafından oluşturulur, vitreus ile nöral retina arasında difüzyon bariyeri olarak görev yapmaktadır. Vitreusla temas halinde olan iç yüzü düzgün olup dış yüzü ise ayaksı çıkıntılar nedeniyle düzgün değildir. En iç kısımda lamina interna, ortada lamina densa ve en dış kısımda ise lamina eksterna yer alır. Fibronektin, laminin, tip I ve tip IV kollajen internal limitan membranın yapıtaşlarıdır. OD kenarında astroglial hücrelerin bazal laminası olarak devam eder ve Elschnig membranı olarak adlandırılır. Yaşla birlikte tabakanın kalınlığı artar. Retina ve vitreus arasındaki yapısal bağlantılar nedeniyle tanjansiyel traksiyonel kuvvetlere bağlı meydana gelen retinal patolojilerden sorumlu tutulmaktadır (8, 9).

**Retina Sinir Lifi Tabakası (RNFL):** Yaklaşık 1,2 milyon gangliyon hücresi aksonları tarafından oluşturulur, lamina cribrosa'dan sonra miyelinli hal alır ve optik sinire katılarak lateral genikülat ganglionu kadar devam eder. Ganglion hücre aksonları, nazalde yelpaze gibi, temporalde maküla çevresinde arkuat bir yapı oluşturarak toplanır. Foveadan çıkan aksonlar ise doğrudan mediale yönlendirilerek OD'ye katılırlar, bu demete papillomaküler band denir. OD kenarında tabakanın kalınlığı en fazla olup (20 – 30 mikron), periferde doğru giderek inceler. Süperfisyal kapiller pleksus bu tabakada bulunmaktadır (7, 10).

**Ganglion Hücre Tabakası (GCL):** Ganglion hücrelerinin gövdelerinin bulunduğu tabakadır. Retinada yaklaşık 1,2 milyon dolayında bulunan ganglion hücreleri multipolar olup aksonları retina sinir lifi tabakasına (RNFL) katılırken, dendritleri iç pleksiform tabakada bipolar hücreler ve amakrin hücrelerle sinaps yapar. Bu tabaka foveolada bulunmaz, maküлада birkaç sıralı iken maküla dışında tek sıra halindedir. Ganglion Hücre Tabakası iç pleksiform tabaka ile birlikte glokoma sekonder değişikliklerin en sık izlendiği tabaka olup görme alanı (GA) kayıpları ile koreledir. Glokom takibinde GA ile beraber bu tabakaların yapısal testlerle takibi önemlidir (10).

**İç Pleksiform Tabaka (İPL):** Ganglion hücrelerinin bipolar hücreler ve amakrin hücrelerle sinaps yaptığı tabakadır. Bu tabaka foveolada bulunmaz (11).

**İç Nükleer Tabaka:** Bu tabakada içten dışa doğru amakrin hücreler, Müller hücreler, interpleksiform hücreler, bipolar hücreler ve en dışta horizontal hücreler yer alır. Amakrin hücreleri; bipolar nöronlar, ganglion hücreler ve amakrin hücreleri ile bağlantı kuran

hücrelerdir. Bu hücreler; bipolar hücrelerden eksitator glutamaterjik input alırken, diğer amakrin hücrelerden GABA-c reseptörü aracılığıyla inhibitör inputlar alarak ‘on-off’ mekanizması ile lateral inhibisyon ve sinyal modifikasyonu sağlar. Bipolar nöronlar, fotoreseptörlerden gelen uyarıyı ganglion hücrelerine ileten ve sinyal integrasyonunda rol oynayan glutamaterjik ya da glisinerjik nöronlardır. Horizontal hücreler; fotoreseptörlerle bipolar nöronlar arasındaki elektriksel ileti ve sinyal modifikasyonundan sorumlu hücrelerdir. Derin kapiller pleksus bu tabakada bulunmaktadır (11, 12).

**Dış Pleksiform Tabaka:** Bipolar hücrelerin fotoreseptörlerle ve horizontal hücrelerle sinaps yaptığı bölgedir. Fotoreseptörler, invajinasyon yoluyla oluşan sinaptik bölgelerinin her birinde bir bipolar ve iki horizontal hücre ile bağlantı kurarlar ve bu bölgelere ‘triad’ denir. Konlar birden fazla triada katılırken basiller yalnızca bir triada katılır. Maküla bölgesinde basillerin ve konların aksonları daha uzundur ve foveada oblik seyrettikleri için dış pleksiform tabaka daha kalın ve daha fibrözdür. Bu bölgeye Henle tabakası denir. Sistemik hipertansiyon gibi durumlarda lipid ve diğer kan ürünlerinin yıldız paterninde birikmesi Henle tabakasının bu özelliğindendir. Retinal ve koroidal dolaşıma diğer tabakalara göre daha uzak olduğundan dolayı bu bölge dejeneratif değişikliklere daha hassastır ve birikimler daha sık görülür (7, 10).

**Dış Nükleer Tabaka:** Fotoreseptör hücre nükleusları ve gövdelerinin bulunduğu tabakadır. Koni ve basil hücreleri bulunur (7).

**Dış Limitan Membran:** Fotoreseptörlerin gövdelerinde bulunan terminal barlarla Müller hücrelerinin bağlantıları sonucu meydana gelen, fotoreseptör gövdesiyle iç-dış segment kısmını ayıran gerçek olmayan membrandır (11).

**Fotoreseptör tabakası:** Rod ve koni hücreleri iç ve dış segment, bu segmentleri birbirine bağlayan siliumdan oluşan fotoreseptör hücreleridir. Bu tabakada fotoreseptör hücrelerinin iç ve dış segmentleri yer almaktadır. Dış segment mukopolisakkarit matriks ile sarılmış ve RPE ile temas halindedir. Dış segmentte pigment molekülü içeren yatay yerleşimli devamlı yenilenen diskler bulunmaktadır, yeni oluşan diskler devamlı silium bölgesinde dış segmente eklenirken eski diskler dışarı doğru yer değiştirir ve retina pigment epiteli apikal villusları tarafından tutulur. Bir gözde yaklaşık 120 milyon basil, 6 milyon koni bulunmaktadır. Foveada yalnızca koni hücreleri bulunmakla beraber periferde doğru koni hücrelerinin sayısı azalır. Basiller ise perifoveal bölgede yoğunlaşmıştır. Basiller tek bir

fotonu dahi algılayabilecek kadar hassastır ve karanlıkta renkleri grinin tonları şeklinde görmeyi sağlarken konların hassasiyeti daha düşük olmakla beraber fototransdüksiyon sırasında daha hızlı yanıt verirler ve parlak ışıktaki, renkli görmeyi sağlarlar. Koni hücreleri farklı pigment moleküllerinden dolayı 437 nm (mavi) dalga boyuna hassas S konlar, 533 nm (yeşil) dalga boyuna hassas M konlar ve 564 nm (kırmızı) dalga boyuna hassas pigment içeren L konlar olmak üzere 3 farklı alt gruba ayrılırlar (11, 12).

**Retina Pigment Epiteli:** Nöral retina ile koroid arasında uzanır. OD'den ora serrataya kadar uzanarak siliyer cismin pigmentli epiteli olarak devam eder. Bu hücreler multipl nükleusludur, melanozom adı verilen sitoplazmik granüllerin yanı sıra fundus floresein anjiografide koroid floresansını (FFA) engelleyen lipofuksin granülleri de içermektedir. RPE hücreleri birbirlerine zonula okludenslerle bağlanarak su ve iyonların serbest geçişini engeller ve dış kan retina bariyeri olarak işlev görür. RPE'nin bazal membranı Bruch membranının iç tabakasını oluşturur. Apikal kısımları fotoreseptör tabakasıyla komşudur ve apikalde bulunan villuslar fotoreseptörlerin dış segmentini sarar, fotoreseptör dış kısmından dökülen diskleri fagosite eder ve bir taraftan yeni disk sentezi sağlar. Her bir RPE hücresine yaklaşık 45 fotoreseptör hücresi düşer. A vitamini depolayan RPE A vitamini metabolizmasına da katılır. Fotoreseptörlerin dış segmentini sararak metabolik alışverişte, dış segment yenilenmesinde görev alır. İnter fotoreseptör matriksin devamlılığını, koryokapillaristen gelen maddelerin retinaya iletimini, subretinal mesafedeki sıvının devamlı aktif şekilde transportunu sağlar. İçerdiği melanin granülleri sayesinde ışık saçılımını önler (7, 10, 11).

**Retina ganglion hücreleri:** Retina tarafından işlenen tüm görsel bilgilerin beyne iletilmesi için son ortak yolu sağlar. Bu nedenle RGC dejenerasyonu önemli bir görsel etkiye sahiptir ve dünya çapında geri dönüşü olmayan körlüğün önde gelen nedenidir (13).

### 2.1.2. Optik disk anatomisi

Optik sinir başı RGH aksonlarının optik sinir kanalında toplanmasıyla oluşur. Sinir lifleri OD üzerinde kanala doğru keskin bir dönüş yapar. Bu kanal lamina kribrosa ile örtülüdür. Yaklaşık 1.200.000 adet sinir lifi, 1000 dolayında demetlere ayrılarak, 200-300 adet değişik boyuttaki delikten geçmek durumundadır. OD boyutları önemli varyasyon göstermekle birlikte vertikal 1,88 mm ve horizontal olarak 1,77 mm boyutlarındadır. Skleranın hemen arkasında, myelin kılıfının katılımıyla sinir 3 mm'lik boyuta ulaşır (14).

Optik Disk aynı zamanda retinal damarların giriş çıkış yaptıkları yerdir (Şekil 2).



**Şekil 2.** Normal bir bireyde Optik Disk

Glokomda OD ve çevresinde bazı değişiklikler görülmektedir. Bu değişiklikler karmaşık ve çoğu kez birbiriyle bağımlı gibi görünmeyen patolojik nedenlerle ortaya çıkmaktadır. GİB artışı, vazospazm, disk yapısında anomaliler, kan akımında anomaliler, anormal kollajen ve venöz dönüşü engelleyen hastalıklar bu etkenlerdendir.

Optik disk, glokomun değerlendirilmesi açısından en önemli bölgedir. OD, intrapapiller ve parapapiller olarak iki kısımda incelenebilir. İkisi arasındaki sınırı, OD ön duvarını yapan Elscnig'in peripapiller skleral halkası belirler. OD çapı, OD şekli, nöroretinal rim büyüklüğü, nöroretinal rim şekli, optik çukurluğun optik disk alanına göre oranı (C/D), OD hemorajileri, parapapiller koryoretinal atrofi, retinal damar çapları ve SLT, OD morfolojisini belirleyen değişkenlerdir (15).

### 2.1.3. Siliyer Cisim, Trabeküler Ağ Yapısı ve Aköz Hümör Dinamiği

Göz küresinin iç duvarında, irisin arka yüzeyinin hemen arkasında yer alan bir doku halkasıdır. Siliyer cismin tabanı, kasılması lensin daha yuvarlak bir şekil almasına neden olan siliyer kasına ev sahipliği yapar. Bunun nedeni, lensin siliyer gövdeye yapışan zonüller adı verilen ince bağlarla askıda kalmasıdır. Siliyer kası kasıldığında zonüllerin ankraj noktası hafifçe içe doğru hareket ederek zonüller üzerindeki gerilimi gevşetir ve lensin doğal esnekliği daha küresel bir şekil almasına neden olur. Odak noktamız bu şekilde değişir (16).

Aköz hümör (AH), gözün ön ve arka bölmelerini yıkayan berrak şeffaf bir sıvıdır. Kornea, lens ve trabeküler ağ örgüsüne (TA) besin sağlamak gibi çok sayıda işleve katılır. Daha da önemlisi, göz içi dokusunu destekleyen gücün korunmasına da katkıda bulunur ve böylece göze belirli bir GİB sağlar. GİB, siliyer süreçler tarafından sürekli üretimi ve drenajı arasında dinamik bir denge ile normal değerler içinde tutulur (17).

İris ile kornea arasındaki anatomik bölge iridokorneal açı olarak adlandırılmıştır. İridokorneal açı içinde yer alan TA örgüsü, AH'ün göz dışına drenajı için ana yolu oluşturur. Çok katmanlı hücre dışı matriks (ECM) içindeki TA, örgülü hücrelerden oluşan fenestre edilmiş üç boyutlu bir yapıdır. TA, AH'ün gözün ön kamarasına bitişik Schlemm kanalına ve ardından toplayıcı kanallar yoluyla venöz sisteme çıkışını düzenleyerek GİB'i kontrol eder. TA 'ın işlev bozukluğu, GİB yükselmesinin öncelikli nedenidir (18).

Trabeküler yolda AH'ün dışa akımı esnasında karşılaştığı en yüksek direnç justakanaliküler dokuda meydana gelir. Trabeküler yoldan AH'ün %80 kadarı dışa aktarılırken geri kalan kısmı uveoskleral yoldan aktarılır (19). AH'ün dinamiklerindeki denge eksikliği, genellikle GİB'de artışa yol açar, dünya çapında körlüğün ikinci önde gelen nedeni olan glokom gibi spesifik oküler patolojilerde önemli bir risk faktörüdür (17). AH'ün dışa akım miktarının GİB ile ilişkili olduğu saptanmıştır. GİB'in popülasyondaki normal dağılımı incelendiğinde beklenen aralığı 11-21 mmHg olarak gözlenmiştir (19).

Göz içi basıncı, gözün iç yüzey alanına aköz hümör tarafından uygulanan kuvvetin büyüklüğünü içeren bir ölçümdür. GİB teorik olarak aşağıda belirtilen Goldmann denklemi ile belirlenebilir. Bu değişkenlerin herhangi birindeki bir değişiklik veya dalgalanma, kaçınılmaz olarak GİB'yi değiştirecektir (20).

$$GİB = (F / C) + P$$

F= Aköz hümör akış oranı,

C= Aköz hümör çıkış oranı,

P=Episkleral venöz basınç

## 2.2. Glokom

### 2.2.1. Glokom Tanımı

Glokom, optik sinir başında RGC ölümüyle sonuçlanan bir grup nörodejeneratif hastalığı kapsar. Durumun asemptomatik doğası, glokom hastalarının yarısından fazlasının durumlarının farkında olmadığı anlamına gelmektedir (21). Glokom, geri döndürülemez görme kaybının dünya çapında önde gelen nedenidir. Nispeten geç bir aşamaya kadar asemptomatik olabileceği için tanı sıklıkla gecikir (22). Glokom birçok hastalık gibi yaş ile birlikte artmaktadır, 40 yaşın üzerindeki kişilerin %1 bu patolojiden etkilenir, 70 yaşın üzerindeki kişilerde %5'e ve 80 yaşın üzerindekilerde glokom görülme oranı %10'a yükselir.

Açık açılı glokom, glokomun en yaygın şeklidir ve GİB'i artıran TA dejenerasyonu ile karakterizedir. Bu oküler hipertansiyon, optik siniri oluşturan RGC aksonlarının bozulmasına ve ardından RGC'lerin giderek artan kaybına neden olur. Görsel belirtiler önce çevresel ve sonra merkezidir. Normal göz içi basıncının ortalama değeri 15,7 mmHg'dır ancak sağlıklı kişilerde bile belirgin kronobiyojik ve bireyler arası farklılıklar gösterir. Mevcut tedaviler temel olarak göz içi basıncı düşürmeyi amaçlamaktadır (1, 23, 24).

Glokom ve eşlik eden makula dejenerasyonu giderek artan, yaşlı nüfusla birlikte, tüm dünyayı etkileyen oftalmolojik hastalıklar arasındadır. 2020 yılında dünyada 79,6 milyon glokom hastası olması, 2040 yılında 111,8 milyona çıkması beklenmektedir. Glokomun asemptomatik kronik bir hastalık olması nedeniyle, hastaların yaklaşık yarısı tanılarının farkında değildir ve tedavi görmemektedir, yaklaşık %10 kadar hasta ise bilateral körlükle sonuçlanmaktadır (25-27). Türkiye'de görülme sıklığı %2-2,5 olarak tahmin edilmekte olup, glokom tanısı konmuş hasta sayısının 550 bin olduğu ve bu sayının tüm hastaların sadece dörtte birini oluşturduğu düşünülmektedir (24).

Kadınların genellikle erkeklerden daha uzun yaşaması, glokom ve glokom körlüğü riskini artırır. Ayrıca glokomda genetik faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir ve hastalık tanısı alan akraba sayısı ile birlikte glokomun kalıtsal riski artabilir. Glokom tanılı kişinin birinci derece akrabaları (ebeveynler, kardeşler veya çocuklar) yaklaşık 9 kat artmış glokom gelişme riskine sahiptir.

Miyopinin glokom için önemli bir risk faktörü olduğu bulunmuştur. Çalışmalar miyopi derecesiyle birlikte glokom gelişme ve ilerleme riskinin arttığını göstermektedir. Klinik bazlı çalışmalarda, sistemik hipertansiyon, vazospazm ve akut hipotansiyon, glokom için potansiyel risk faktörleri olarak saptanmıştır (28-31).

### **2.2.2. Glokom Patogenezi**

Glokom, optik sinirin progresif nörodejenerasyonu ve retinal ganglion hücrelerinin kaybı ile karakterize nöropatiler grubudur (22, 32). Ganglion hücrelerinin kaybı, GİB'in seviyesi ile ilişkilidir, ancak diğer faktörler de rol oynayabilir (22, 33). RGCler, fotoreseptörlerden sinyaller alan, bunları işleyen ve bunları aksonlarda optik sinir yoluyla beyindeki diğer merkezlere ileten merkezi sinir sisteminin nöronlarıdır. Bu aksonlar, retinadaki gangliyon hücre çekirdeklerinden OD'e ve daha sonra retina damarlarıyla birlikte, kollojenden oluşan elek benzeri bir yapı olan lamina cribrosa'dan geçer. Lamina cribrosa'nın arkasında, miyelin kılıfı ile çevrili aksonlar optik sinir olarak devam eder. Yüksek GİB, düşük perfüzyon basıncı ve / veya düşük beyin omurilik sıvısı basıncı, lamina cribrosa boyunca gradiyenti artırır. Bu durum papiller hipoperfüzyona neden olarak lamina cribrosa'nın yapısal değişikliğe uğramasına ve yeniden şekillenmesine ve optik sinir liflerinde aksonal taşınmanın bozulmasına neden olur (24).

Glokomdaki retinal ganglion hücre kaybının patofizyolojisine ait görüş nörotrofik faktörlerin retrograd aksoplazmik transport blokajı, azalan vasküler perfüzyona bağlı iskemi, serbest radikallerin oluşumu, nitrik oksit toksisitesi, glutamat aracılı eksitotoksisite ve genetik faktörler şeklinde olup, temelde bu süreçlerin biri veya birkaçının birlikteliği ve bu sürecin sonucunda oluşan apoptoz aracılı hücre ölümüdür (34, 35).

Bu nedenle glokom tedavisinde etkili olabilecek bir nöron koruyucu ajanın etki mekanizması, glokomun etyopatogenezinde saklıdır. Akut ve kronik nörodejeneratif

hastalıklarda mitokondrial disfonksiyona yol açtığı bilinen glutamat aracılı eksitotoksik hasar için glokomatöz hasarın patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (36, 37).

### **2.2.3. Glokomatöz Optik Nöropati**

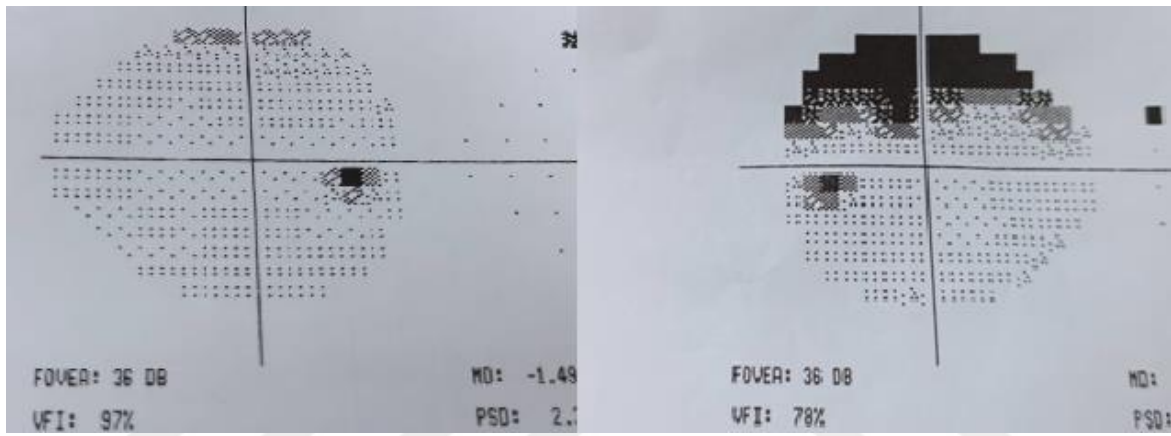
Glokomatöz optik nöropati (GON), glokoma bağlı görme bozukluğundan sorumlu birincil patolojik durumdur (38). Ancak, GİB ve diğer risk faktörlerinin GON'a nasıl yol açtığı tam olarak anlaşılamamıştır (39). Glokom, retina gangliyon hücrelerinin ölümü ve optik sinir başındaki bağ dokularının yeniden şekillenmesi ile tanımlanan karmaşık bir yaşlanma bozukluğudur. Optik sinir başındaki GİB'e bağlı aksonal hasar apoptoza yol açar. RGC'lerin kaybı, yavaş ilerleyen bir süreci takip eder. Hastalığın klinik özellikleri patolojik olayları desteklemiştir. Retina gangliyon hücrelerinin ölümü beyinde sekonder nöron kaybına neden olur. GİB'icini düşürmeye yönelik terapi orta derecede etkili olsa da oküler bağ dokusunun yeniden şekillenmesini değiştirmek, aksondan somaya hasar sinyali kesmek ve çeşitli hayatta kalma mekanizmalarını düzenlemek için yeni tedaviler geliştirilmektedir (40).

Glokomatöz optik nöropati için kanıtlanmış ana risk faktörü, optik sinir başının basınç duyarlılığının izin verdiğinden daha yüksek bir GİB'dir. Koch varsayımlarını karşılayan çok sayıda çalışma, yüksek GİB varlığının GON'a yol açtığını, GİB düşürülmesinin GON'nın ilerlemesini durdurduğunu ve GİB'deki yeniden artışın GON'nın ilerlemesine tekrar neden olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, istatistiksel olarak normal veya düşük GİB'e sahip birçok glokomlu hasta vardır ve düşük GİB değerlerine rağmen ilerleyen GON geliştirirler. Bu gözlemler GİB'in, optik sinir başının fizyolojisi ve patofizyolojisi için ana basınca bağlı parametre olan translamina cribrosa basınç farkının sadece iki belirleyicisinden biri olduğu bulgularına yol açmıştır. İkinci parametre, lamina cribrosa boyunca göz içi basınca karşı basınç olarak gelişen orbital serebrospinal sıvı basıncıdır. Translamina cribrosa basınç farkının yanı sıra, orbital serebrospinal sıvı basıncından etkilenen diğer oküler parametreler koroid kalınlığı, retina ven basıncı ve çapı, retina ven tıkanıklıklarının oluşumu ve diyabetik retinopatinin varlığı ve şiddeti olabilir (41).

Yakın zamana kadar, bu hastalığın patofizyolojisine ilişkin eksik bilgi, maalesef hastalığın ilerlemesi üzerinde sadece yavaşlatıcı bir etkiye sahip olan mevcut tedavilerle (farmasötik veya cerrahi) sonuçlanmıştır. Son araştırmalar, GON'nin klasik nörodejeneratif patolojilerle ortak nöroinflamatuvar mekanizmaları paylaşan bir hastalık olduğunu

göstermektedir. RGC'lerin ölümüne ek olarak, nöroinflamasyon bu hastalığın ilerlemesinde ve yayılmasında anahtar bir unsur gibi görünmektedir. Gerçekte, glial hücrelerin erken reaktivitesi retinada ve aynı zamanda glokom hastalarının merkezi görme yollarında ve oküler hipertansiyonun preklinik modellerinde de gözlenmiştir. Dahası, nöronal lezyonlar retina yapısıyla sınırlı olmayıp, aynı zamanda merkezi görsel yollarda da ortaya çıkar (1).

Glokomun diğer bir ayırt edici özelliği, tipik olarak RNFL'deki RGC akson gruplarının kaybı ile ilişkili olan GA kusurları ile ilgilidir. GA kaybı periferik olarak başlar zamanla santral körlük gelişir (Şekil 3) (1).



**Şekil 3.** Sağlıklı ve glokomlu bireylerde görme alanı

Kliniğimizde takipli bir hastanın (Sol) Sağlıklı bir gözden normal GA. (Sol)daki karanlık alan, fizyolojik kör noktaya karşılık gelir. (Sağ) Glokomlu bir hastadan anormal bir GA. Görme kusurları (karanlık alanlar) çoğunlukla hastalığın erken dönemlerinde periferiktir ve progresyonla merkezi görmeyi etkileyebilir.

Glokom ve diğer optik nöropatiler arasındaki fark, görme keskinliği ve renkli görme kaybının geç meydana gelmesidir. Çünkü en erken etkilenen lifler periferik retinayı besleyenlerdir. Son çalışmalar, makuladaki retinal ganglion hücrelerindeki liflerin de etkilendiğini göstermiştir; ancak glokomlu hastaların büyük çoğunluğu hastalığın geç dönemlerinde görme keskinliğine ve renk görme kaybı öyküsüne sahiptir. Geç merkezi görme kaybı glokomda görülmekle birlikte diğer ön optik nöropatilerde de görülebilmektedir. Glokom, diğer optik nöropatiler gibi, hasarın hücre gövdesinde değil, öncelikle aksonlarda meydana gelen patofizyolojik özelliğini paylaşır. Diğer bir deyişle, diğer tüm birincil optik

nöropatilerde olduğu gibi, aksonal hasara bağlı bir hastalıktır (42).

### 2.3. Glokom Sınıflandırması

Primer glokom ve Sekonder glokom terimleri sınıflamada yardımcı olabilmekte ve halen yaygın şekilde kullanılmaktadır. Primer glokom, aköz dışa akımına direnç gelişmesi ve açı kapanması ile ilişkilidir. Primer glokom genellikle her iki gözü de etkiler. Sekonder glokom ise, aköz dışa akım azalması ile giden oküler veya sistemik hastalıklar ile ilişkilidir. Sekonder glokom genellikle asimetriktir veya tek taraflıdır.

Glokom, aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (European Glaucoma Society, 2014):

#### I. Primer Açık Açılı Glokomlar

##### 1. Primer açık açılı glokom

###### a. Primer açık açılı glokom/Yüksek tansiyonlu glokom

###### b. Primer açık açılı glokom/Normal tansiyonlu glokom

##### 2. Primer jüvenil glokom

##### 3. Primer açık açılı glokom şüphesi

##### 4. Oküler hipertansiyon

#### II. Sekonder Glokomlar

##### 1. Sekonder açık açılı glokom

###### a. Oküler hastalığa bağlı sekonder açık açılı glokomlar

###### i. Eksfoliasyon (psödoeksfoliasyon) glokomu

###### ii. Pigmenter glokom

###### iii. Lens kaynaklı açık açılı glokom

###### iv. İntraoküler kanama ile ilişkili glokom

###### v. Üveitik glokom

vi. Neovasküler glokom

vii. İntraoküler tümöre bağlı glokom

viii. Retina dekolmanına bağlı glokom

b. Oküler travmaya bağlı açık açılı glokom

2. İyatrojenik sekonder açık açılı glokomlar

a. Kortikosteroid tedavisine bağlı glokom

b. Oküler cerrahi ve lasere bağlı sekonder açık açılı glokom

3. Ekstraoküler hastalıklara bağlı sekonder açık açılı glokom

a. Episkleral venöz basınç artışına bağlı sekonder açık açılı glokom

### III. Primer Açık Kapanması

1. Primer açı kapanması şüphesi

2. Akut açı kapanması

3. İntermittan açı kapanması

4. Kronik açı kapanması glokomu

5. Akut açı kapanması atağı sonrası durum

### IV. Sekonder Açık Kapanması

1. Pupiller blok ile beraber olan sekonder açı kapanması

2. Pupiller blok olmadan anterior çekme mekanizması ile olan

3. Pupiller blok olmadan anterior itme mekanizması ile olan

### V. Çocukluk Çağı Glokomları

1. Primer konjenital glokom

2. Geç başlangıçlı çocukluk çağı açık açılı glokom/Erken juvenil glokom

3. Sekonder çocukluk çağı glokomu

Glokomlar ayrıca iki geniş kategoriye de ayrılabilir: açık açılı glokom ve açık kapanması glokomu. Amerika Birleşik Devletleri'nde vakaların %80'inden fazlası açık açılı glokomdur; ancak, kapalı açılı glokom, ciddi görme kaybı olan orantısız sayıda hastadan sorumludur. Hem açık açılı hem de kapalı açılı glokom primer hastalık olabilir. Sekonder glokom travma, kortikosteroidler gibi bazı ilaçlar, enfeksiyon, malignite veya pigment dispersiyonu veya psödo-exfoliasyon gibi durumlardan kaynaklanabilir (22).

### **2.3.1. Primer Açık Açılı Glokom**

En sık görülen glokom formu primer açık açılı glokomdur. Bazı glokomlar için bazı genetik mutasyonlar tanımlanmış olsa da primer açık açılı glokom ile ilişkili olanlar sınırlıdır ve çoğu primer açık açılı glokom hastası için etiyoloji hala belirsizdir (32). İlk başvuru ileriye ilerlemiş hastalık ve tedaviye uyumsuzluk, glokomlu hastaları hastalığın körlüğe ilerleme riski ile karşı karşıya bırakmaktadır (43).

Primer açık açılı glokom genellikle, fundoskopik değerlendirme ve görme alanı değerlendirmesini (perimetri kullanarak) içeren rutin göz muayenesi sırasında teşhis edilir. Tonometri ile ölçülen GİB'te meydana gelen bir artış, teşhis için gerekli değildir. Primer açık açılı glokom yönetimi, Retinal ganglion hücrelerinin nöroproteksiyonunu ve aksonal rejenerasyonu hedefleyen yeni tedaviler geliştirme aşamasında olmasına rağmen, göz içi basıncı düşürmek için topikal ilaç tedavilerini ve cerrahi operasyonu içerir (43, 44)

#### **2.3.1.1. Primer Açık Açılı Glokom Epidemiyolojisi**

Açık açılı glokom prevalansı yaşla birlikte artar, 40-44 yaşlarında %0,4'ten 70-74 yaşlarında %2,7'ye ve Avrupa kökenli kişilerde 90 yaşın üzerinde %10,0'a yükselir. Erkekler kadınlardan daha sık etkilenir (olasılık oranı [OR] 1.30). Etnik gruplar arasında belirgin farklılıklar ortaya çıkarmıştır. Özellikle, Afrika kökenli kişilerde, Avrupalılara göre 2,8 kat daha yüksek glokom prevalansı varken, kapalı açılı glokom ve normal basınçlı glokom Asyalılarda daha yaygındır. Konjenital glokom ve juvenil glokom ise genel olarak nadirdir (24).

### **2.3.1.2. Primer Açık Açılı Glokom Patofizyolojisi**

Glokom, progresif aksonal patoloji ve RGC'lerin apoptozu ile karakterize, optik sinir başında yapısal değişikliklere ve geri dönüşü olmayan görme kaybına neden olan bir patolojidir. Öncelikle insan olmayan primatlarda ve daha yakın zamanda ve yaygın olarak kemirgenlerde olmak üzere çeşitli GON'a meydana getirmek için deneysel modelleri geliştirilmiştir. Bu modeller, glokomatöz hasarın altında yatan mekanizmaları incelemek için önemli araştırma araçları sağlamaktadır (45). Birincil açık açılı glokom, genellikle, azaldığında hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilen artmış GİB ile ilişkilidir (46). Semptomlardan bağımsız olarak, primer açık açılı glokom hastaları periferik iris ve TA örgüsünün birleşmesine sekonder olarak yüksek GİB geliştirir ve bu durum aköz hümörün önünde bariyer oluşturur. Primer açık açılı glokom, optik sinir dejenerasyonuna neden olabilen çok yüksek GİB ile sonuçlanabilir (47).

### **2.3.1.3. Primer Açık Açılı Glokom Risk faktörleri**

Primer açık açılı glokomu olan birçok hasta asemptomatik seyreder ve bu sebeple bu hastalığa sahip olduklarından bihaberdirler. Glokom görme kaybına neden olan optik sinirde progresif hasara GON'a neden olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır; önemli bir risk faktörü, yüksek göz içi basıncıdır (47, 48). Primer açık açılı glokom için diğer risk faktörleri arasında ileri yaş, siyah ırk, miyopi, ailede glokom öyküsü ve diabetes mellitus bulunur (43).

Glokom riski yaşla birlikte artar. Ancak bu, yaşla ilgili çoğu hastalık için doğrudan bir bağlantı değildir. Kırılganlık kavramı, hızlandırılmış fiziksel ve bilişsel gerileme, engellilik ve ölüm için daha yüksek bir riskle sonuçlanan, spesifik olmayan bir savunmasızlık durumudur (28).

Aile öyküsü varlığı glokom için risk faktörü olarak bildirilmiş olsa da bir gen mutasyonu ile ilişkilendirilememiştir. Glokomun erken evrelerde asemptomatik seyretmesi nedeniyle aile öyküsünün net olmadığı açıktır (28). Glokomu olan hastaların kardeşlerinde glokom varlığı %10,7 iken, glokomu olmayan hastaların kardeşlerinde glokom prevalansı %0,7 olarak saptanmıştır (49).

Diabetes mellitus, 1980'den bu yana dünya çapında yaygınlığında neredeyse dört katına çıkan, büyüyen bir uluslararası halk sağlığı sorununu temsil etmektedir. Bilinen birçok mikrovasküler komplikasyonu olmasına rağmen, diyabetik retinopatiden kaynaklanan görme kaybı, etkilenen bireyler için en yıkıcı olanlardan biridir. Ek olarak, diyabetik hastaların glokom için daha büyük bir riske sahip olduğunu gösteren artan kanıtlar mevcuttur. Glokomun patofizyolojisi tam olarak anlaşılmamış olsa da hem diyabet hem de glokom, bazı ortak risk faktörlerini ve patofizyolojik benzerlikleri paylaşıyor gibi görünmektedir. Ayrıca, diyabet varlığının ve yüksek seyreden açlık glikoz seviyelerinin, göz içi basıncının yükselmesi ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (50).

Miyopinin glokom için önemli bir risk faktörü olduğu bulunmuştur. Yüksek miyopi derecesi ve belirli yaş gruplarında artan aksel uzunluğun risk faktörleri olarak tanımlanması, miyopi derecesiyle birlikte glokom gelişme ve ilerleme riskinin arttığını göstermektedir (28).

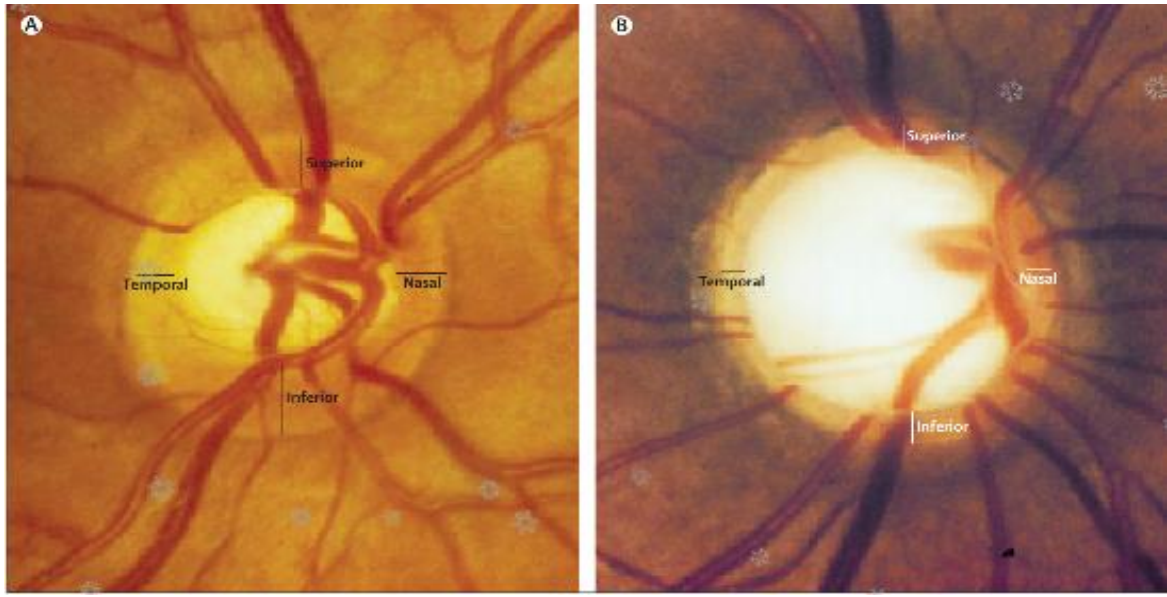
### **2.3.2. Primer Açık Kapanması Glokomu**

Primer açık kapanması glokomu, progresif bir optik sinir dejenerasyonudur ve drenaj açısının kapanmasından kaynaklanan oküler hipertansiyona sekonder olarak, OD hacminin karakteristik genişlemesi ve görme alanı kaybıyla ilişkili GON olarak tanımlanır (51). Açık kapanması, iris ve TA arasındaki apozisyonel yaklaşım veya adezyondan kaynaklanır. İleri yaş, hipermetropi ve doğu Asya etnik kökenleri birincil açık kapanması glokomu için ana risk faktörleridir (52). Primer açık kapanması glokomu için ana tedavi stratejisi, göz içi basıncının azaltılması, kapalı açının yeniden açılması ve daha fazla açık kapanmasının önüne geçmektir. Trabekülektomi, gonyoşineliyaliz, glokom implantı ve siklodestrüktif prosedürler etkili cerrahi seçeneklerdir. Her biri primer açık kapanması glokomu yönetiminde kendi artıları ve eksileri olan önemli operasyonel müdahalelerdir (51).

### **2.4. Glokom Tanı Kriterleri**

Glokom, optik sinir başının çukurlaşması ve görme alanı hasarı ile karakterize heterojen bir hastalık grubudur. Dünya çapında geri döndürülemez körlüğün en sık nedenidir. Göz içi basıncı başlangıca göre %30-50 azalırsa ilerleme genellikle durur. 40 yaş ve üzerindeki nüfusta dünya çapında yaşa göre standartlaştırılmış yaygınlığı yaklaşık %3,5'tir.

Glokomun kronik formları ağrısızdır ve semptomatik görme alanı kusurları geç ortaya çıkar. Oftalmolojik muayene ile erken teşhis zorunludur (52). Sağlıklı ve glokomatöz OD'lerin oftalmoskopik fotoğrafları şekil 2'de gösterilmiştir. Sağlıklı OD'te, nöroretinal çerçeve en geniş kısmı alt bölgede, ardından üst bölge ve nazal bölge ve son olarak temporal bölge (ISNT kuralı olarak anılır) ile normal şekline sahiptir (A). Glokomatöz OD'te, nöroretinal çerçeve sağlıklı OD'ten çarpıcı şekilde daha incedir ve daha sonra optik çanak daha büyüktür ve kap daha derindir (B) (52).



**Şekil 4.** Sağlıklı ve glokomatöz optik disklerin oftalmoskopik fotoğrafları

Kronik glokom formları ağrısız olduğundan, ölçülebilir görme alanı kusurları glokomun erken bir aşamasında gelişmediğinden ve kusurlar genellikle her iki görme alanında aynı isimde olan yerlerde meydana gelmediğinden, etkilenen bireyler tarafından glokomun kendi kendine tespiti genellikle hastalığın geç evrelerinde gerçekleşir (53).

Glokomun saptanmasının temel dayanağı, optik sinir başı ve RNFL'nin incelenmesidir. Optik sinir başındaki glokomatöz değişiklikler arasında nöroretinal çerçeve kaybı, optik çanağın genişlemesi, optik kabin derinleşmesi (GİB normal veya normal altı seviyelere düşürülürse kısmen geri döndürülebilir), RNFL'nin incilmesi ve hastalığın ilerlemesinin belirtileri olan OD kanamaları, parapapiller beta bölgesinin gelişimi ve genişlemesi yer alır (52). Bu değişiklikler, basit oftalmoskopi veya özellikle takip muayeneleri için yararlı olan spektral alanlı optik koherens tomografi gibi görüntüleme

teknikleriyle değerlendirilebilir (53, 54).

Tonometri, glokom tanı ve takibinin önemli bir parçasıdır, ancak göz içi basıncı, hastalığın tanısında ana kriter olarak alınamamaktadır, çünkü birçok glokomlu hasta normal GİB ile başvurabilmektedir. GİB, değiştirilebilir birincil risk faktörüdür ve modülasyonu, glokom yönetiminin merkezinde yer alır, ancak oldukça zayıf bir tanı kriteridir. Tonometrik ölçümlerin merkezi kornea kalınlığına ve eğriliğine bağımlılığı dikkate alınmalıdır. Anormal derecede kalın korneası olan gözlerde, tonometri hatalı yüksek okumalar verir ve potansiyel olarak yanlış tanı konulmasına yol açar. Anormal derecede ince kornealı gözlerde, tonometrik ölçümler yanlış şekilde düşük ölçülmektedir. Bu sebeple daha az tanı konur. Santral kornea kalınlığı ve kornea eğriliği bu nedenle, tonometrik okumaların buna göre düzeltilmesi için bir kez ölçülmelidir.

Perimetrik görme alanı muayenesi, glokomatöz optik sinir hasarının tanı ve takibinde ikinci tekniktir. Birçok optik sinir lifi, perimetrik kusurlar tespit edilmeden önce kaybedilebilir; bu nedenle, bu tekniğin tanısallık kesinliği glokom evresiyle birlikte artar. Perimetri, psikofiziksel kusuru hasta tarafından yaşandığı şekliyle subjektif tanımlar, bu nedenle görme alanı bozulmasını güvenilir bir şekilde tespit etmek için en az üç perimetrik inceleme gerekli olabilir. Diğer psikofiziksel testler- glokoma bağlı renk görme yetersizliğinin değerlendirilmesi, bozulmuş karanlık adaptasyonu, artan fotofobi ve azalmış kontrast duyarlılığı- hastanın görme kalitesi için önemlidir. Ancak bu yöntemler, bireyler arası yüksek değişkenlik nedeniyle rutin olarak ölçülmez. Güncel yöntem, yüzeysel ve derin retinalvasküler ağı ve özellikle peripapiller radyal vasküler ağı görselleştirmek için optik koherens tomografi anjiyografisinin uygulanmasıdır. Peripapiller radyal vasküler ağın değerlendirilmesi, diğer tanı yöntemlerinin çoğunun başarısız olduğu yüksek miyopik gözlerde GON'nun tanı ve takibinde yardımcı olabilir.

Açık açılı glokom, anterior kamara açısının gonyoskopik muayenesi ile açı kapanması glokomdan ayrılır. Kronik biçimindeki açı kapanması glokomu, görme alanı kusurları fark edilene kadar asemptomatik olabilir. Açı kapanması glokomunun akut formunda, akut pupiller blok mevcuttur ve konjonktivada belirgin hiperemisi olan iltihaplı bir göz, korneal ödem, ortada reaktif olmayan bir pupilla, sık bir ön kamara ve yüksek göz içi basıncı ile karakterizedir. Akut açı kapanması glokomuna genellikle şiddetli göz ağrısı ve bulanık görme, ışıkların etrafında görülen haleler, bulantı ve kusma eşlik eder (52).

## 2.5. Glokom Tedavisi

Tedavinin temelinde göz içi basıncın düşürülmesi yer almaktadır. Göz içi basıncını düşürmenin tıbbi tedavi, lazer ve cerrahi yöntemler olmak üzere üç temel yöntemi vardır: Genel olarak, erken ve orta dereceli glokomun tedavisinde, medikal tedavi ve lazer tedavisinin bir kombinasyonu yer almaktadır Cerrahi yöntem ise daha önce daha az invaziv olan diğer tedavi yöntemlerine yanıt vermeyen glokom vakalarında kullanılmaktadır (55).

Glokom, geleneksel olarak, hücre gövdeleri retinanın iç yüzeyinde bulunan ve aksonlarını optik sinir boyunca lateral genikülat çekirdeğe yansıtan progresif RGC'lerin kaybı ile karakterize edilen kronik bir optik nöropati olarak tanımlanır. Yüksek GİB ana risk faktörü olarak kabul edilir ve artık hastalığı teşhis etmek için kullanılsa da yine de glokom tedavisi için tek hedeftir (56). Glokom için kullanılan mevcut tedaviler GİB'i düşürmeyi hedeflemektedir. Yüksek kaliteli randomize kontrollü çalışmalar, GİB'i düşürmenin glokomda GA hasarının ilerleme oranını azaltabileceğini göstermiştir.

Erken Manifest Glokom Tria ve Birleşik Krallık Glokom Tedavisi Çalışması gibi çalışmaların analizi, GİB'i düşürmenin etkilerinin, yüksek basıncı olan hastalar için olduğu kadar "normal" aralıkta GİB'i olanlar için de faydalı olduğunu göstermiştir. Başka bir deyişle, glokom için GİB'in düşürülmesi, başlangıçtaki basınç seviyesinden bağımsız olarak yararlıdır. Son olarak, yüksek göz içi basıncı olan ancak glokom kanıtı olmayanlarda göz içi basıncının düşürülmesi, glokoma dönüşme olasılığını azaltmada da başarılıdır (42).

Bununla birlikte, GİB'i düşürmeyi amaçlayan farmakolojik stratejiler, hastalığın ilerlemesini önlemede her zaman etkili değildir. Aslında, klinik çalışmalar, GİB'in etkin bir şekilde kontrol edildiğinde bile, optik sinir hasarının önemli sayıda hastada yine de ilerleyebileceğini bildirmiştir. Ayrıca, normal aralıkta olan GİB değerlerinin varlığında optik atrofi meydana gelebilmektedir. Bu gözlemler, GİB'ten bağımsız olan ve glokomun çok faktörlü etiyojisine işaret eden glokom belirleyicilerin varlığını vurgulamaktadır (1). Bu aynı zamanda, RGC hasarının ve kaybının altında yatan mekanizmaların, yeni terapötik yaklaşımlar getirme olasılığını sınırlandırarak, hala tam olarak açıklanmış olmaktan uzak olduğunu göstermektedir.

Patolojik özelliklerle birlikte hastalıktan etkilenen yapılar (retina ve optik sinir) ve glokomatöz yaralanmanın sadece RGC'lerle sınırlı olmadığına dair daha yeni bulgular, aynı zamanda görme sisteminin merkezi alanlarına da uzanarak, glokomu nörodejeneratif bozukluk olarak tanımlanmasına neden olmaktadır (1, 48). RGC'lerin sağkalımını korumayı ve sürdürmeyi veya RGC'lerin fonksiyonunu geliştirmeyi amaçlayan nöroprotektif stratejiler, glokom tedavisi için olası bir yaklaşım olarak araştırılmaya başlanmıştır. Dahası, glokomun nörodejeneratif doğasını tanımak, bu göz hastalığının merkezi sinir sistemi bozuklukları ile ortak dejenerasyon mekanizmalarını paylaşabileceği anlamına gelmektedir (56).

Nörodejeneratif hastalıklar gibi, glokom da özellikle glial ve mikrogial hücrelerin aktivasyonu ile ilgili olarak nöroinflamatuvar reaksiyonlar üretir. Dahası, lateral geniculat nucleus ve superior colliculus seviyesinde pro-inflamatuar sitokinlerin (IL1, IL6, TNF $\alpha$ ) ve kemokinlerin (CCL2, CX3, CL1) salınımının arttığı tespit edilmiştir. Bu durum, patolojinin şiddetlenmesine ve daha üst görsel yollara yayılmasına yol açar. Birkaç çalışma, retinal ganglion hücrelerinin apoptozunun ikincil nöronların nörodejenerasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Daha da önemlisi, sadece hipertansif gözlerde meydana gelmeyip, aynı zamanda karşı taraftaki sağlıklı gözleri de etkileyen mikrogia aktivasyonu, glokomun patogeneğinde rol alan karmaşık antegrad ve retrograd nöroinflamatuvar mekanizmaların varlığını kanıtlamaktadır (1).

Glokomatöz hasarın mekanizmalarının incelenmesi, RGC'lerin aksonal dejenerasyonu ve büyümesiyle ilgili sinyal yollarını çözmek için büyük bir fırsat olmuştur. Artmış GİB, glokomun ana risk faktörüdür ve diğer faktörlerle birlikte, RGC'lerin dejenerasyonu ve apoptozu ile ilişkilendirilmiştir. Birkaç in vitro model geliştirilmiş ve RGC'lerin aksonlarının ve nöritlerinin uzunluğunda basınca bağlı değişikliklerin olduğunu göstermeye imkân sağlamıştır. RGC kültürleri yüksek basınca maruz kaldığında, hücre gövdesi alanına müdahale etmeden, zayıflatılmış bir nörit uzantısı ile akson uzunluğunda ve toplam nörit uzunluğu üzerinde ciddi bir etkisi vardır. Glokomda, artan göz içi basıncı, beyin hedefleri tarafından üretilen nörotrofik faktörlerin RGC'lerin yoksunluğuna yol açan anterograd ve retrograd aksonal nakilleri bozar. Aslında, BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor)'nin retrograd taşınması göz içi basıncının yükselmesinden sonra bozulur ve bu durum RGC'lerin kaybına katkıda bulunabilmektedir (5).

Günümüzde, glokom tedavilerinin çoğu topikal olarak göz damlası şeklinde uygulanmaktadır. Bununla birlikte, topikal olarak uygulanan ilaçların arka oküler segmente zayıf penetrasyonu ile birlikte hastaların uyumundaki değişkenlikler bu yaklaşımın faydasını sınırlamaktadır. Göz içi enjeksiyon bu iki dezavantajın da üstesinden gelmektedir. Ancak göz içi enjeksiyonun invaziv bir girişim olması, pahalı olması, uygulamadaki güçlükler ve az da olsa komplikasyon riski nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. Dahası, vitrözdeki aktif maddelerin kısa yarı ömür değerleri, tekrarlanan intravitreal enjeksiyonların kullanımını gerekli kılar.

Göz içi ilaç iletim sistemleri (IODDS), boyutuna bağlı olarak nano taşıyıcılar (1-1000 nm), mikro taşıyıcılar (1–1000 µm) ve implantlar (> 1 mm) olarak sınıflandırılır. En uygun IODDS'nin seçimi, hedef bölgeye, oftalmik hastalığa ve tedavi süresine bağlıdır. İmplantlar ve mikro taşıyıcılar, aktif maddenin uzun süreli verilmesini sağlayabildikleri için çok ilgi görürken, nano taşıyıcılar, gen terapisi için oldukça faydalı olan hücreler tarafından içselleştirilme avantajına sahiptir. Biyolojik olarak parçalanabilir partikül taşıyıcı sistemlerine dayanan IODDS, bu problemleri ele almak için terapilerin sürekli salınımı için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Polilaktitkoglikolid asit (PLGA), FDA ve Avrupa Tıp Kurumu tarafından göz içi cihazlarda kullanım için onaylanmıştır. Farklı IODDS'ler arasında, mikrosferler son zamanlarda oküler uygulamalar için önemli ilgi odağı olmuştur. Bu kontrollü salımlı ilaç mikrosistemleri, geleneksel 25G – 32G iğneleri kullanılarak, süspansiyon şeklinde uygulanabilir. Dahası, IODSS uzun süreler boyunca hedef dokularda terapötik ilaç konsantrasyonlarını sürdürebildiği için tekrarlanan uygulama sayısı azalmaktadır. IODDS ayrıca, uygulanan mikrosferlerin miktarını bireysel ihtiyaçlara göre titre ederek tedaviyi kişiselleştirmek için kullanılabilir. Araştırmacılar, farklı ilaç yüklü mikrosferlerin fiziksel karışımlarının kullanılmasının aynı anda birden fazla terapötik hedefin tedavisine olanak sağlayacağını varsaymaktadır (57).

### **2.5.1. Nöroproteksiyon ve Eritropoetin**

Glokom hastalarının GİB'in iyi kontrol edilmesi durumuna rağmen ilerlemeye devam edebileceğinin kabul edilmesiyle, bu durumun tedavisi için yeni terapötik paradigmlar aranmaktadır. Böyle bir yaklaşım, nöronal hücre hasarını doğrudan önlemeyi, engellemeyi ve bazı durumlarda tersine çevirmeyi amaçlayan “terapötik yaklaşım” olarak tanımlanan nöroproteksiyondur. Bugüne kadar, aşağıdakiler de dahil olmak üzere, birden fazla nörodejeneratif süreç, glokomatöz RGC kaybında rol oynamıştır. Bunlar glutamat

eksitotoksitesisi , inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, hatalı katlanmış proteinlerin agregasyonu , nörotrofik yoksunluk, iskemi ve aksonal transport düzensizliğidir. Ayrıca, bu olayların etkileşime girebileceği ve birleşebileceği de netlik kazanmaktadır, bu da glokomun en etkili tedavisinin kombinasyon tedavi yaklaşımını gerektirebileceğini düşündürmektedir (57).

Eritropoetin , çoğunlukla fetal karaciğerde ve erişkin böbreklerde üretilen 30.4 kDa'lık bir hematopoietik glikoproteindir ve klinik uygulamada rutin olarak aneminin tedavisinde kullanılan, kemik iliğinde kırmızı kan hücresi üretiminin uyarılmasında anahtar bir role sahiptir. EPO ayrıca merkezi sinir sistemi dokusunda düşük seviyelerde üretilir ve EPO reseptörü (EPOR) homodimeri , nöronlar, astrositler ve mikroglia dahil olmak üzere çoğu santral sinir sistemi hücre tipinde eksprese edilir . Aslında, kan dolaşımında bulunan EPO'nun yaklaşık %10'u böbrek dışı kökenlidir (58). EPO, beyinde, kalpte, iç kulakta ve retinada, optik sinir ve glokomda, optik sinir transeksiyonu, retina dejenerasyonu ve optik nörit gibi retina hastalıkları da dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların çeşitli hayvan modellerinde önemli nöroprotektif özelliklere sahip doku koruyucu özellikleri olduğunu ortaya çıkardı.

EPO'nun etkileri deneysel modellerle glutamat ve nitrik oksit toksisitesinde (59), diyabetik retinopatide (60, 61), oksijenle uyarılmış retinopatide (62), glokomda (63), retina dekolmanında (64), aksonotomide (65), prematür retinopatisinde (66), yaşa bağlı makula dejenerasyonunda (67), ışıkla uyarılmış retinal apoptoziste (68), optik nöritte (69), korneal epitelial erozyonda (70) gösterilmiştir.

Bazı modellerde, EPO ayrıca anti-apoptotik etkilere bağlı nöro-rejeneratif özellikler sunmuş ve sistemik, intravitreal ve retrobulber yollarla RGC'lerin apoptozunun önlenmesinde değerli bir ilaç olarak kabul edilmiştir (58, 71, 72).

Lokal olarak uygulanan ilaçlar göz içi dokulara korneal veya korneal olmayan yollardan ulaşabilir. EPO'nun topikal damlatılması şimdiye kadar hiç test edilmemiştir ve noninvaziv yapısı, yönetim kolaylığı ve günlük evde uygulama imkânı nedeniyle, EPO'nun oküler uygulama için değerli bir alternatif olabilir. EPO olası sistemik etkilerinden dolayı intravitreal uygulamaktadır ve ayrıca bazı çalışmalarda 1000 IU insan rekombinant eritropoietin (rHuEPO) dozu kullanıldığında tespit edilebilir sistemik yan etkilere sahip

olmaksızın, subkonjonktival uygulamadan sonra EPO'nun birkaç retina hücre katmanına ulaştığı gösterilmiştir (71, 73).

Eritropoetinin artık oküler dokudaki hücelere koruma sağlamak için birçok mekanizma aracılığıyla hareket ettiği kabul edilmektedir (6). Episkleral damarların koterizasyonu ile indüklenen bir sıçan glokom modelinde, tek bir intravitreal 200 ng eritropoetin dozu, RGC'lerin yüksek basınçtan kaynaklanan kaybının en azından bir kısmını önlemek için etkili olduğu bildirilmiştir. RhEPO'nun, intraoküler basınçtaki artışın neden olduğu retinal iskemiden önce veya hemen sonra sistemik olarak uygulanmasının, histopatolojik retina hasarını azalttığı ve elektroretinografi ile değerlendirildiğinde fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığı saptanmıştır. Eksojen EPO ayrıca bir anti-apoptotik etki mekanizması göstererek iskemik retinadaki terminal apoptotik olayları önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (58).

Eritropoetin, eritropoezi indüklemesinin yanı sıra reaktif oksijen/nitrojen türlerinin seviyelerini azaltarak, apoptozisi önleyerek, glial hücre aktivitesini düzenleyerek hücre koruyucu etki göstermektedir. Ayrıca makrofajlarda bir transkripsiyon faktörü olan NF-kappa B'yi inhibe ederek TNF-alfa ve NO seviyelerinde azalma sağlamaktadır (74). Mikroglial fagositozda esas basamak mikroglial hücrenin apoptozise uğrayacak nöronu tanımasıdır. Apoptozise uğrayacak nöron hücrelerinin plazma membranının dış zarında fosfatidilserin seviyesi yüksektir. Invitro EPO uygulaması ile mikroglia yüzeyindeki fosfatidilserin reseptör düzeyinde azalma meydana gelir ve mikroglia hücrelerinin fagositoz fonksiyonunda sınırlanma meydana gelir. Invivo EPO uygulamasının nörodejeneratif hastalıklarda proinflamatuvar sitokinleri azalttığı bildirilmiş olup bu etkisini reaktif mikroglia hücre düzeyini azaltarak oluşturduğu düşünülmektedir (75, 76).

Eritropoetinin oküler progenitör hücrelerde bulunan homodimerik EPOR'a bağlanmasıyla etkileri başlar. Bağlanmanın ardından, Janus kinaz-2 , reseptör üzerindeki birkaç tirozin kalıntısını aktive eder ve mitojenle aktive olan protein kinaz , nükleer faktör-kappa hafif zincir güçlendirici-aktifleştirilmiş B hücreleri dahil olmak üzere çeşitli moleküller için bağlanma yerleri oluşturur. Bu moleküllerin aktivasyonu hücre apoptozunun baskılanmasına yol açar (77).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Deney Hayvanları**

Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Deneysel Hayvan Merkeziden 12 adet erkek ve 12 adet dişi Albino-Wistar cinsi sıçanlar (altı haftalık; 220±40 gram) kullanılmıştır. Tüm hayvanlar günde 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde sabitlenmiş bir odada tutulmuş ve gıda ve su ad libitumu sağlanmıştır. Tüm hayvanlar Görme ve Oftalmoloji Araştırma Derneği (ARVO) bildirisine ve Avrupa Birliği düzenlemelerine göre tedavi edilmiştir.

#### **3.2. Deney Gurupları**

Sıçanlar her bir grupta altı denek (üç erkek- üç dişi) olacak şekilde randomize 4 gruba ayrılmıştır.

##### **3.2.1. Grup 1- Kontrol Gurubu**

Altı denek herhangi bir işlem yapılmamış ve ek tedavi verilmemiştir. Altı hafta sonra analjezi ve anestezi verilerek gözler enükle edilmiştir.

##### **3.2.2. Grup 2- Glokom Grubu**

Altı denek glokom indüksiyonu için sağ göz ön kamaralarına 30 G iğne ile Hyaluronik asit (Viscoat, Alcon) enjeksiyonu uygulanmıştır. İndüksiyondan 6 hafta sonra analjezi ve anestezi verilerek gözler enükle edilmiştir.

##### **3.2.3. Grup 3- Subkonjonktival Eritropoetin Tedavi Grubu (SUBEPO)**

Altı denek glokom indüksiyonu için sağ göz ön kamaralarına 30 G iğne ile Hyaluronik asit (Viscoat, Alcon) enjeksiyonu uygulanmış ve eş zamanlı subkonjonktival 1000 IU rHuEPO (Eporon 4000 IU/0.4 mL Kullanıma Hazır Enjektör) uygulanmıştır. İndüksiyondan altı hafta sonra analjezi ve anestezi verilerek gözler enükle edilmiştir.

### **3.2.4. Grup 4-Topikal Eritropoetin Tedavi Grubu (TEPO):**

Altı denek glokom indüksiyonu için sağ göz ön kamaralarına 30 G iğne ile Hyaluronik asit (Viskoat, Alcon) enjeksiyonu uygulanmış ve indüksiyondan sonra hazırlanan 2x1 damla/gün toplamda 1000 IU rHuEPO (Eporon 4000 IU/0.4 mL Kullanıma Hazır Enjektör) uygulanacak şekilde topikal damla ile 6 hafta süre ile tedavi verilmiştir. İndüksiyondan 6 hafta sonra analjezi ve anestezi verilerek gözler enükle edilmiştir.

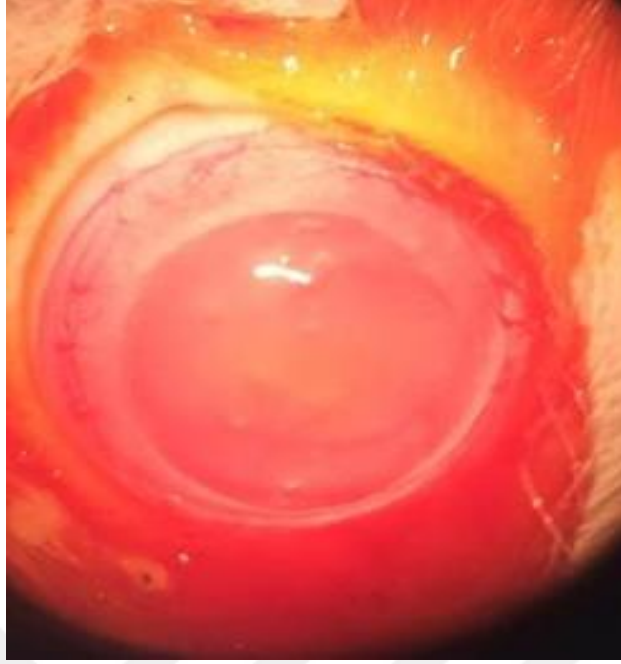
### **3.3. Anestezi Tekniği**

Anestezi ve analjezi uygulamasında intramüsküler 50 mg/kg ketamin hcl (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hcl (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanılmış ve derin anestezi olması için intramüsküler enjeksiyondan 8 dakika sonra tüm hayvanların sağ gözlerine topikal %0,5'lik proparakain hcl (Alcain, Alcon, Türkiye) damlatılmıştır.

### **3.4. Subkonjonktival -Topikal EPO Uygulamaları ve Glokom İndüksiyonu**

Hayvanların sağ gözlerine 3 dakika %5'lik povidoneiodide uygulandıktan sonra 2, 3 ve 4. gruptaki 18 adet sıçanın, sağ göz ön kamaralarına 30 G iğne ile hyaluronik asit enjeksiyonu uygulanmıştır. Grup 3 glokom indüksiyonuna eş zamanlı olarak subkonjonktival 1000 IU rHuEPO enjeksiyonu uygulanmıştır. Grup 4 glokom indüksiyonuna eş zamanlı olarak topikal damla formu olarak hazırlanan 1000 IU rHuEPO (Eporon 4000 IU/0.4 mL Kullanıma Hazır Enjektör) 2x1, altı hafta alacak şekilde başlanmıştır. Topikal damla, sodyum hyaluronat içeren (Refresh tears, Allergan) suni gözyaşı damlası ile hazırlanmış olup uygun konsantrasyon ile tedavi verilmiştir.

Anestezi uygulamasını takiben, sıçanların ön kamaralarına 30 G iğne ile Hyaluronik asit (Viskoat, Alcon) enjekte edildi (Şekil 1-2-3). Cerrahi mikroskop olarak (LEICA S8APO) kullanıldı. 30 G iğne ile hyaluronik asit enjeksiyonu korneoskleral limbustan ön kamaraya self-sealing giriş yapılarak, iğne ucunun iris ve lens ile teması engellenerek ve deney süresince her hafta limbusta saat 12'den saat 6'ya doğru ilerleyerek uygulanmıştır. Glokom indüksiyonu yapılan gruplara birer hafta arayla 6 hafta süresince enjeksiyonlar tekrarlanmıştır. Operasyon sonrasında gözler serum fizyolojik ile yıkanıp, antibiyotikli damla tatbik edilmiştir. Hayvanların sol gözüne herhangi bir işlem yapılmamıştır.



*İris damarlanması belirgin izlenmekte*

**Resim 1.** Glokom indüksiyonundan önce



*İris damarlarında solma izlenmekle beraber hava ve viskoelastik madde seçilmekte*

**Resim 2.** Glokom indüksiyonundan sonra



*Steril koşullarda (LEICA S8APO) stereo mikroskop ile yapılmakta*

**Resim 3.** Deney aşaması

### **3.5. Göz İçi Basıncı Ölçümleri**

Göz içi basıncı sağ gözün GİB değerini 4 ile 7 dakika arasında altı kez ölçmek için bir ribaund tonometre (Tono-Pen AVIA, REF:230590, USA) kullanılmıştır.

Tono-Pen probunun ucu kornea ile temas ettiğinde, cihazın içindeki mikroişlemci tarafından yapılan ardışık 5 otomatik ölçümün ortalama değeri GİB değeri olarak kaydedilmiştir. Her enjeksiyondan hemen önce ve sonra GİB'leri ölçülmüştür. Enjeksiyonlar ve ölçümler günün aynı saatinde (10:00-12:00) yapılmıştır.

### **3.6. Ötenazi ve Enükleasyon**

Glokom indüksiyonundan 6 hafta sonra hayvanlara ötenazi öncesi GİB değeri tekrar ölçölüp kaydedilmiştir. Ötenazi ve enükleasyondan önce dorsal, ventral ve lateral noktalar doku işaretleme boyaı ile koronal düzlem boyunca dikkatlice boyanmıştır. Sıçanlardan alınan sıçan gözler %10'luk formalin ile 48 saat fikse edildi. Formalini uzaklaştırmak amacıyla dokular su ile yıkandı ve otomatik doku takip cihazında (TP1020, Leica, Germany) rutin takip yöntemleri kullanılarak takip edildi. Parafin içeresine gömülen sıçan dokularından

mikrotomla (RM2235, Leica, Germany) 5 µm'lik kesitler alınarak H-E boyama ve immunohistokimya boyama için lamlara alındı.

### 3.7. İmmunohistokimyasal İnceleme

Parafin bloklardan göz enine 5 µm kalınlığında enine kesitler BAX ve BCL-2 ekspresyonları immünhistokimyasal olarak uygulandı. İmmünhistokimya Avidin-Biotin kompleks sistemi kullanılarak yapıldı. İmmünhistokimyasal yöntem için bloklardan hazırlanan kesitler (+) yüklü (MicrSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) lamlara alınarak bir gece 37 °C'lik etüvde bekletildi. Seçilen kesitlere immünhistokimyasal BAX ve BCL-2 boyaları uygulandı.

Kullanılan Antiserumlar:

BAX: A Monoclonal Mouse, Kod no: bsm-33279M, 1/200-500 dilüsyon, Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, U.S.A

BCL-2: Polyclonal Rabbit, Kod: bs-4563R, 1/100-500 dilüsyon, Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, U.S.A

### 3.8. İmmünhistokimya Cihazındaki Aşamaların Listesi

- 1) Her bloktan ikişer tane olmak üzere (+) yüklü lama alınan kesitler bir gece 37 °C'lik etüvde bekletildi.
- 2) DAKO PTlink cihazında retrieval solüsyonu kullanılarak (Dako Envision Flex Target retrieval solution High ph 50x) 95 °C'lik 20 dakika inkübe edildi. Böylece antijenin açığa çıkarılması sağlandı.
- 3) Bu işlemde sonra uygulanan kaynatmanın ardından kesitler oda ısısında distile su içinde soğumaya bırakıldı.
- 4) Endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilebilmesi için, kesitlere süper blok (Envision FLEX Peroxidase blocking reagent, 40 ml, K8000, DAKO) damlatılarak 5 dk bekletildi.
- 5) Tüm kesitler soğumayı takiben 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.

- 6) Her dokuya ait iki kesitten bir kesitin üzerine primer antikor olan BAX solüsyonu diğer kesitin üzerine primer antikor olan BCL-2 solüsyonu dokuyu tamamen örtecek şekilde damlatıldı ve bir saat bekletildi.
- 7) Bağlanmamış antikorlar 5 dk PBS solüsyonunda yıkanarak kesitlerden uzaklaştırıldı.
- 8) Sekonder antikor (DAKO, Envision FLEX/HRP) eklenerek 10 dk bekletildi.
- 9) Ardından kesitler tekrar 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı.
- 10) Renk verecek görüntüyü sağlamak amacı ile diaminobenzidin tetraklorid (DAB, DAKO 20 ml, K8000) damlatıldı.
- 11) Renk oluşunca çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
- 12) Zemin boyanması için kesitlere hematoksilin ile zıt boyanma yapıldı.
- 13) Çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
- 14) Yıkama sonrası dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balsam ile kapatıldı.

İmmunohistokimya ile boyanan doku örnekleri Olympus marka BX51 TF model (Tokyo, Japonya) ışık mikroskobunda incelendi ve DP72 kamera (Olympus, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı antikor pozitifliği retinanın bir rastgele alanının seçilmesiyle nicelendirilmiştir.

### **3.9. Histoloji ve Retina Kalınlığı Değerlendirilmesi**

Parafin bloklardan lam üzerine alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece etüvde bekletildikten sonra ksilol uygulanarak parafini uzaklaştırıldı. Dokular azalan alkol serilerinden geçirilerek distile su ile yıkandı. Sırasıyla “Harris hematoksilin ve eozin (H-E) boyalarıyla boyanan dokular artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilole batırılan dokular entellan damlatılarak kapatıldı.

H-E boyama aşamaları aşağıdaki çizelgede verildi.

**Tablo I.** Hematoksilen eozin boyama prosedürleri

| İşlem                | Süre            |
|----------------------|-----------------|
| Etüv (60°C )         | 1 gece          |
| Ksilol               | 10 dakika (x 2) |
| Alkol (% 100''lük)   | 2 dakika        |
| Alkol (% 96''lık)    | 2 dakika        |
| Alkol (% 90''lık)    | 2 dakika        |
| Alkol (% 80''lik)    | 2 dakika        |
| Alkol (% 70''lik)    | 2 dakika        |
| Distile Su           | 5 dakika        |
| Harris Hematoksilen  | 5 dakika        |
| Akarsu               | 5 dakika        |
| Eozin                | 5 dakika        |
| Alkol (% 70''lik)    | 2 dakika        |
| Alkol (% 80''lik)    | 2 dakika        |
| Alkol (% 96''lık)    | 2 dakika        |
| Alkol (% 100''lük)   | 2 dakika        |
| Ksilol               | 5 dakika (x 2)  |
| Entellan ile kapatma |                 |

Hematoksilen-eozin ile boyanan doku örnekleri Olympus marka BX51 TF model (Tokyo, Japonya) ışık mikroskobunda incelendi ve DP72 kamera (Olympus, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı.

Total retina kalınlığı, Ganglion hücre kompleksi (GCC), İç pleksiform tabaka, Ganglion hücre tabakası kalınlık ölçümleri, Image J programı (NIH, USA) kullanılarak her göz için belirlenmiştir.

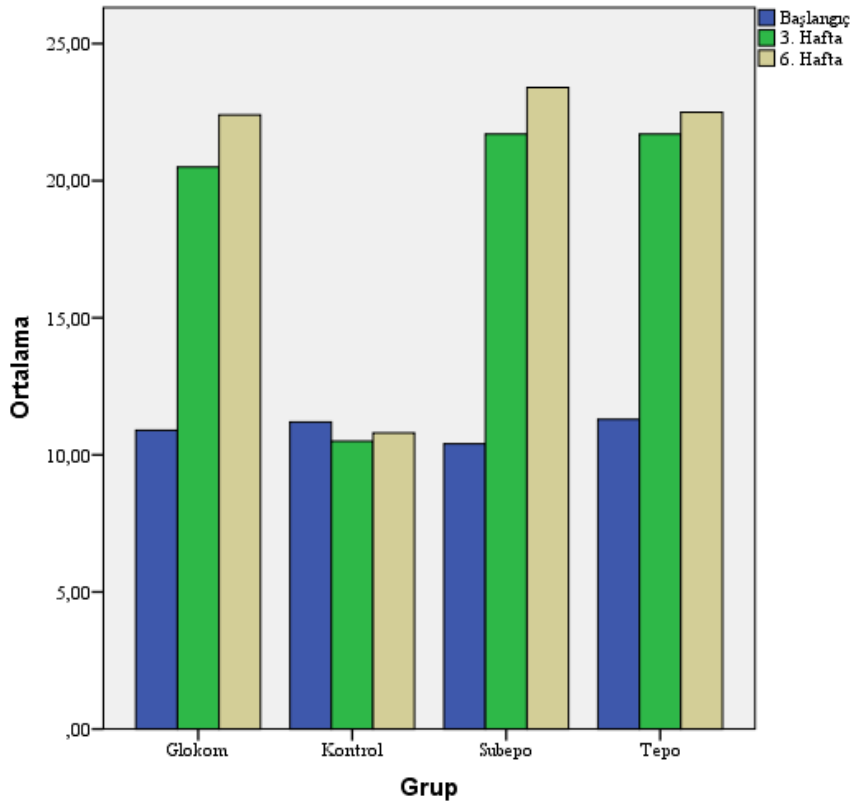
### 3.10. İstatiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS programı kullanılmıştır. Kategorik veriler sayı ve yüzde olarak numerik veriler ortanca ve minimum-maksimum olarak verilmiştir. Grupların karşılaştırmasında Kruskal-Wallis Testi kullanılmış ve ikili karşılaştırmalarda Kruskal Wallis 1-way Anova testi kullanılmıştır ve istatistiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  kabul edilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Çalışma 24 adet sıçan, her grupta altı adet olacak şekilde randomize başlamıştır. Deney sürecinde üç adet sıçan anestezi sırasında, üç adet sıçan katarakt vb komplikasyon nedeniyle çalışma dışında bırakılmıştır. Her grupta 4'er adet sıçan ile çalışma sonlandırılmıştır.

Göz İçi Basınç değerleri glokom gurubu, subkonjonktival EPO tedavi gurubu ve topikal EPO tedavi gurubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GİB değerleri ortalama değerleri dikkate alındığında aralarında anlamlı fark mevcuttu. 6 hafta süresince glokom ve tedavi gruplarında yeterli GİB değerlerine ulaşıldı. Grupların deney süresince haftalık GİB seyirleri Şekilde gösterilmiştir. Glokom indüksiyonu yapılan bütün denekler (n=18) GİB de yükselme göstermiştir. Ortalama GİB glokomatöz gözlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek idi.



Şekil 5. Başlangıç, 3. ve 6. haftada göz içi basınç karşılaştırması

Gruplara göre retina kalınlığı karşılaştırması için yapılan analize göre kontrol grubunun retina kalınlığı ortancası (minimum-maksimum) 152,3 (148,9-155,1)  $\mu\text{m}$ , glokom grubunun 101,2 (92,8-108,4)  $\mu\text{m}$ , subkonjonktival EPO grubunun 138,1 (134,3-143,0)  $\mu\text{m}$  ve topikal EPO grubunun ise 117,8 (114,1-124,2)  $\mu\text{m}$  olarak ölçüldü. Buna analiz sonuçlarına gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo I, Şekil 5,  $p=0,003$ ).

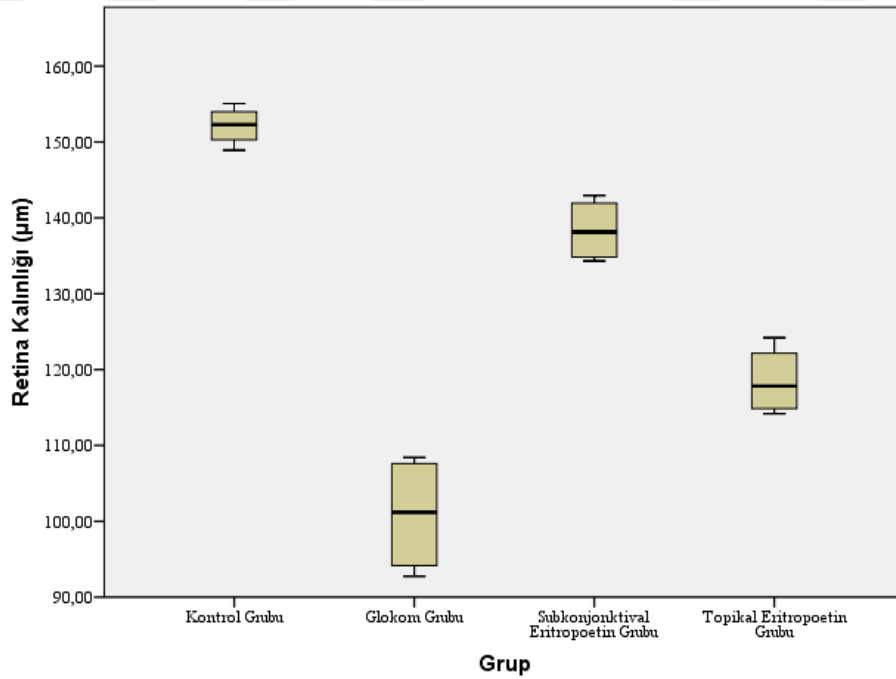
**Tablo II.** Gruplara Göre Retina Kalınlığı Karşılaştırması

| Grup    | Sayı(n) | Ortanca | Minimum-Maksimum | $\chi^2$ | p*    |
|---------|---------|---------|------------------|----------|-------|
| Kontrol | 4       | 152,3   | 148,9-155,1      | 14,1     | 0,003 |
| Glokom  |         | 101,2   | 92,8-108,4       |          |       |
| SUBEPO  |         | 138,1   | 134,3-143,0      |          |       |
| TEPO    |         | 117,8   | 114,1-124,2      |          |       |

\*Kruskal Wallis Testi

SUBEPO: Subkonjonktival Eritropoetin

TEPO: Topikal Eritropoetin



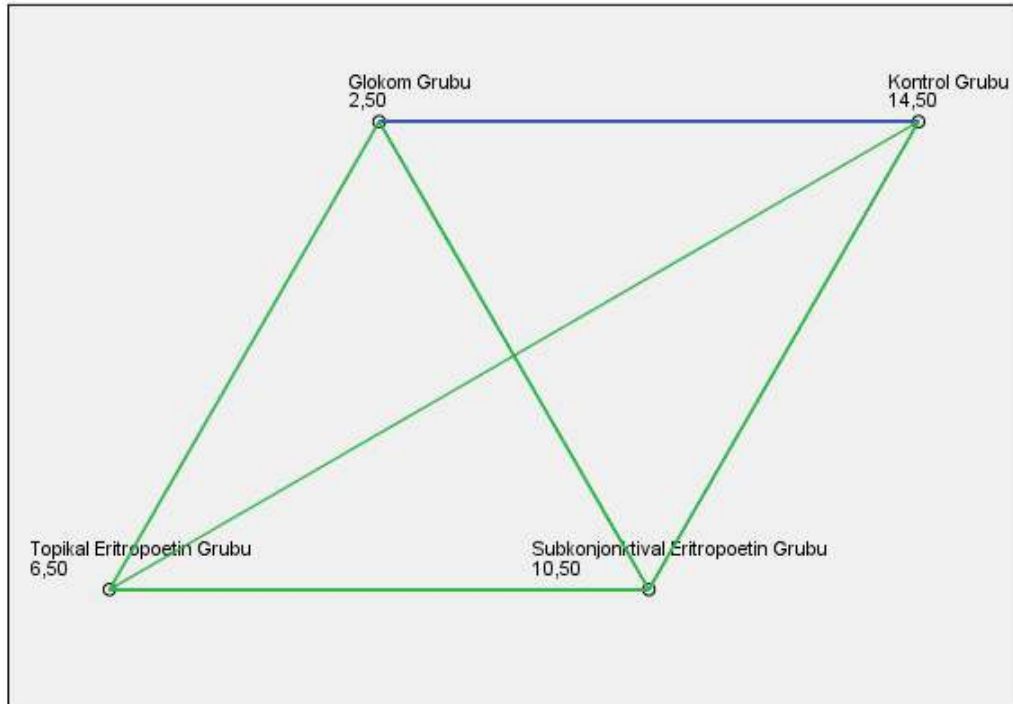
**Şekil 6.** Gruplara Göre Retina Kalınlığı Karşılaştırması

Grupların ikili karşılaştırmalarına göre kontrol grubu ile glokom grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,002$ ). Subkonjonktival EPO grubu ve topikal EPO grubu ortanca değerleri glokom grubundan daha yüksek olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo II, Şekil 6).

**Tablo III.** Gruplara Göre Retina Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları

| Gruplar                                                       | Test İstatistiği | p*    |
|---------------------------------------------------------------|------------------|-------|
| Glokom Grubu-Topikal Eritropoetin Grubu                       | -1,188           | 1,000 |
| Glokom Grubu-Subkonjonktival Eritropoetin Grubu               | -2,376           | 0,105 |
| Glokom Grubu-Kontrol Grubu                                    | 3,565            | 0,002 |
| Topikal Eritropoetin Grubu-Subkonjonktival Eritropoetin Grubu | 1,188            | 1,000 |
| Topikal Eritropoetin Grubu-Kontrol Grubu                      | 2,376            | 0,105 |
| Subkonjonktival Eritropoetin Grubu-Kontrol Grubu              | 1,188            | 1,000 |

\*Kruskal-Wallis 1-way Anova



**Şekil 7.** Gruplara Göre Retina Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları

Gruplara göre iç pleksiform tabaka kalınlığı karşılaştırması için yapılan analize göre kontrol grubunun iç pleksiform tabaka kalınlığı ortancası (minimum-maksimum) 29,9 (28,1-31,5)  $\mu\text{m}$ , glokom grubunun 21,0 (19,9-23,0)  $\mu\text{m}$ , subkonjonktival eritropoetin grubunun 29,2 (27,5-30,9)  $\mu\text{m}$  ve topikal eritropoetin grubunun ise 25,0 (23,5-28,4)  $\mu\text{m}$  olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo III, Şekil 7,  $p=0,008$ ).

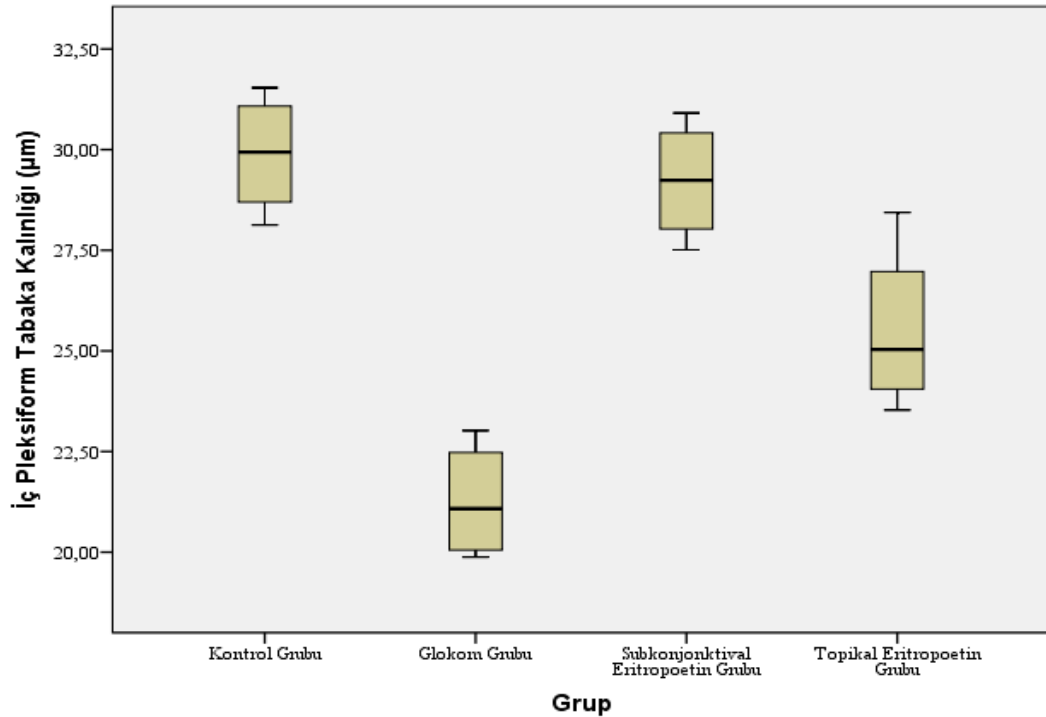
**Tablo IV.** Gruplara Göre İç Pleksiform Tabaka Kalınlığı Karşılaştırması

| Grup    | Sayı(n) | Ortanca | Minimum-Maksimum | $\chi^2$ | p*    |
|---------|---------|---------|------------------|----------|-------|
| Kontrol | 4       | 29,9    | 28,1-31,5        | 11,8     | 0,008 |
| Glokom  |         | 21,0    | 19,9-23,0        |          |       |
| SUBEPO  |         | 29,2    | 27,5-30,9        |          |       |
| TEPO    |         | 25,0    | 23,5-28,4        |          |       |

\*Kruskal Wallis Testi

SUBEPO: Subkonjonktival Eritropoetin

TEPO: Topikal Eritropoetin



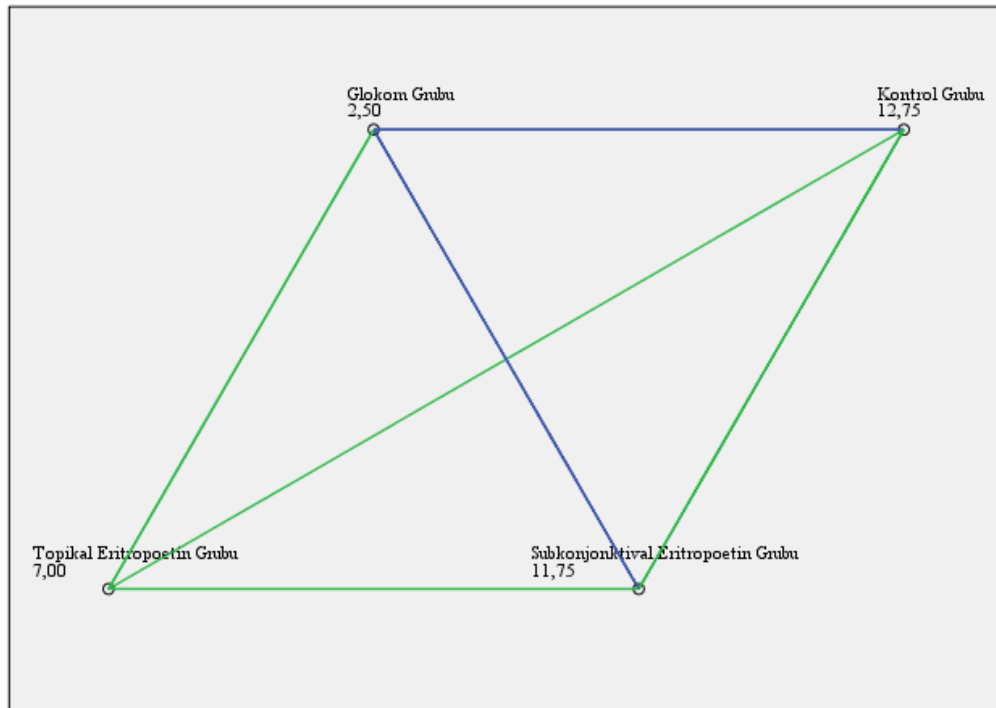
**Şekil 8.** Gruplara Göre İç Pleksiform Tabaka Kalınlığı Karşılaştırması

Grupların ikili karşılaştırmalarına göre kontrol grubu ile glokom grubu arasındaki ve glokom grubu ile subkonjonktival eritropoetin grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,014$ ,  $p=0,036$ ). Topikal eritropoetin grubu ortanca değerleri glokom grubundan daha yüksek olmaklar birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo IV, Şekil 8).

**Tablo V.** Gruplara Göre İç Pleksiform Tabaka Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları

| Gruplar                                                       | Test İstatistiği | p*    |
|---------------------------------------------------------------|------------------|-------|
| Glokom Grubu-Topikal Eritropoetin Grubu                       | -1,337           | 1,000 |
| Glokom Grubu-Subkonjonktival Eritropoetin Grubu               | -2,748           | 0,036 |
| Glokom Grubu-Kontrol Grubu                                    | 3,045            | 0,014 |
| Topikal Eritropoetin Grubu-Subkonjonktival Eritropoetin Grubu | 1,411            | 0,950 |
| Topikal Eritropoetin Grubu-Kontrol Grubu                      | 1,708            | 0,526 |
| Subkonjonktival Eritropoetin Grubu-Kontrol Grubu              | 0,297            | 1,000 |

\*Kruskal-Wallis 1-way Anova



**Şekil 9.** Gruplara Göre İç Pleksiform Tabaka Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları

Gruplara göre ganglion hücre tabakası kalınlığı karşılaştırması için yapılan analize göre kontrol grubunun ganglion hücre tabakası kalınlığı ortancası (minimum-maksimum) 16,3 (11,7-20,6)  $\mu\text{m}$ , glokom grubunun 9,3 (8,8-10,5)  $\mu\text{m}$ , subkonjonktival eritropoetin grubunun 12,8 (11,8-13,7)  $\mu\text{m}$  ve topikal eritropoetin grubunun ise 12,0 (10,2-13,1)  $\mu\text{m}$  olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo V, Şekil 9,  $p=0,017$ ).

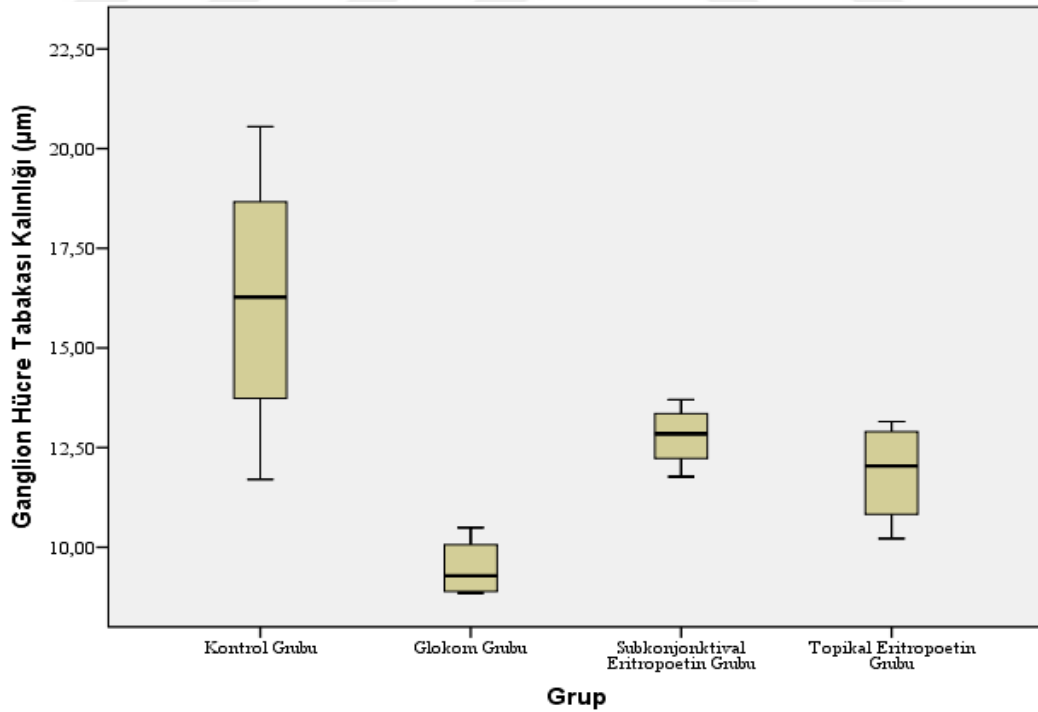
**Tablo VI.** Gruplara Göre Ganglion Hücre Tabakası Kalınlığı Karşılaştırması

| Grup    | Sayı(n) | Ortanca | Minimum-Maksimum | $\chi^2$ | p*    |
|---------|---------|---------|------------------|----------|-------|
| Kontrol | 4       | 16,3    | 11,7-20,6        | 10,2     | 0,017 |
| Glokom  |         | 9,3     | 8,8-10,5         |          |       |
| SUBEPO  |         | 12,8    | 11,8-13,7        |          |       |
| TEPO    |         | 12,0    | 10,2-13,1        |          |       |

\*Kruskal Wallis Testi

SUBEPO: Subkonjonktival Eritropoetin

TEPO: Topikal Eritropoetin



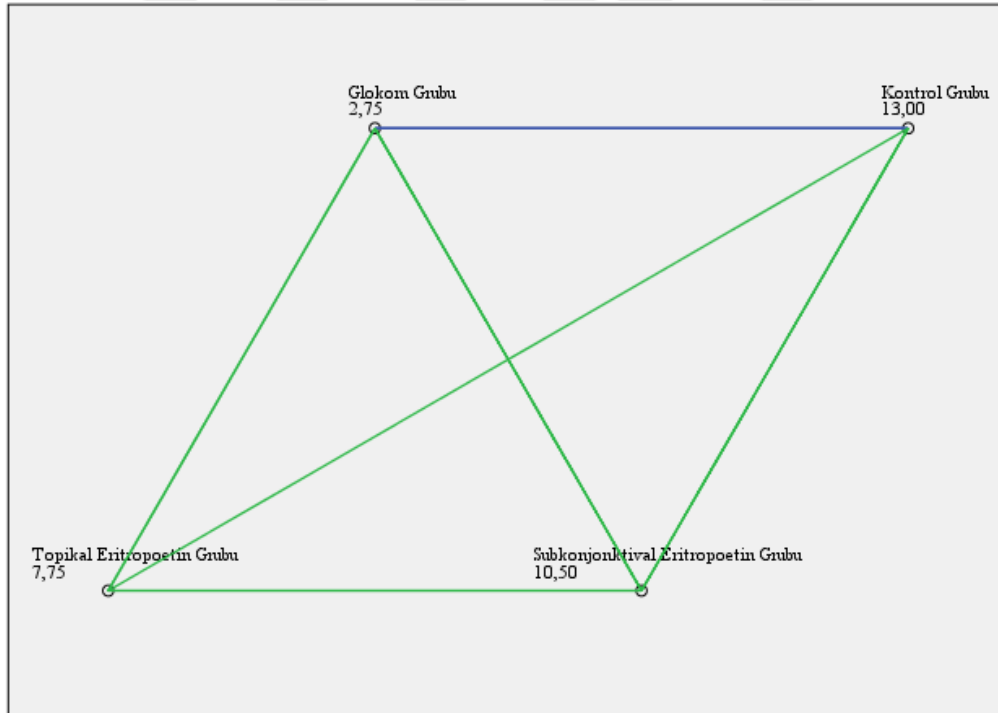
**Şekil 10.** Gruplara Göre Ganglion Hücre Tabakası Kalınlığı Karşılaştırması

Grupların ikili karşılaştırmalarına göre kontrol grubu ile glokom grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,014$ ). Subkonjonktival eritropoetin grubu ve topikal eritropoetin grubu ortanca değerleri glokom grubundan daha yüksek olmaklar birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo VI, Şekil 10).

**Tablo VII.** Gruplara Göre Ganglion Hücre Tabakası Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları

| Gruplar                                                       | Test İstatistiği | p*    |
|---------------------------------------------------------------|------------------|-------|
| Glokom Grubu-Topikal Eritropoetin Grubu                       | -1,485           | 0,825 |
| Glokom Grubu-Subkonjonktival Eritropoetin Grubu               | -2,302           | 0,128 |
| Glokom Grubu-Kontrol Grubu                                    | 3,045            | 0,014 |
| Topikal Eritropoetin Grubu-Subkonjonktival Eritropoetin Grubu | 0,817            | 1,000 |
| Topikal Eritropoetin Grubu-Kontrol Grubu                      | 1,559            | 0,713 |
| Subkonjonktival Eritropoetin Grubu-Kontrol Grubu              | 0,743            | 1,000 |

\*Kruskal-Wallis 1-way Anova



**Şekil 11.** Gruplara Göre Ganglion Hücre Tabakası Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları

Gruplara göre ganglion hücre kompleksi karşılaştırması için yapılan analize göre kontrol grubunun ortancası (minimum-maksimum) 44,9 (42,3-52,0)  $\mu\text{m}$ , glokom grubunun 30,9 (29,0-31,9)  $\mu\text{m}$ , subkonjonktival eritropoetin grubunun 41,5 (40,3-44,6)  $\mu\text{m}$  ve topikal eritropoetin grubunun ise 36,7 (34,9-41,0)  $\mu\text{m}$  olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo VII, Şekil 11,  $p=0,006$ ).

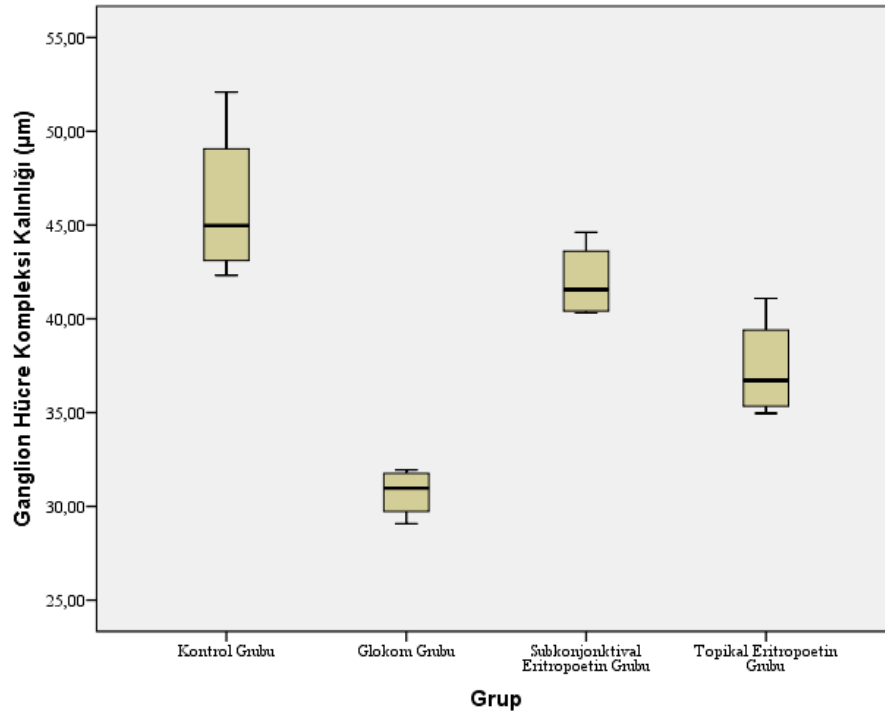
**Tablo VIII.** Gruplara Göre Ganglion Hücre Kompleksi Kalınlığı Karşılaştırması

| Grup    | Sayı(n) | Ortanca | Minimum-Maksimum | $\chi^2$ | p*    |
|---------|---------|---------|------------------|----------|-------|
| Kontrol | 4       | 44,9    | 42,3-52,0        | 12,5     | 0,006 |
| Glokom  |         | 30,9    | 29,0-31,9        |          |       |
| SUBEPO  |         | 41,5    | 40,3-44,6        |          |       |
| TEPO    |         | 36,7    | 34,9-41,0        |          |       |

\*Kruskal Wallis Testi

SUBEPO: Subkonjonktival Eritropoetin

TEPO: Topikal Eritropoetin



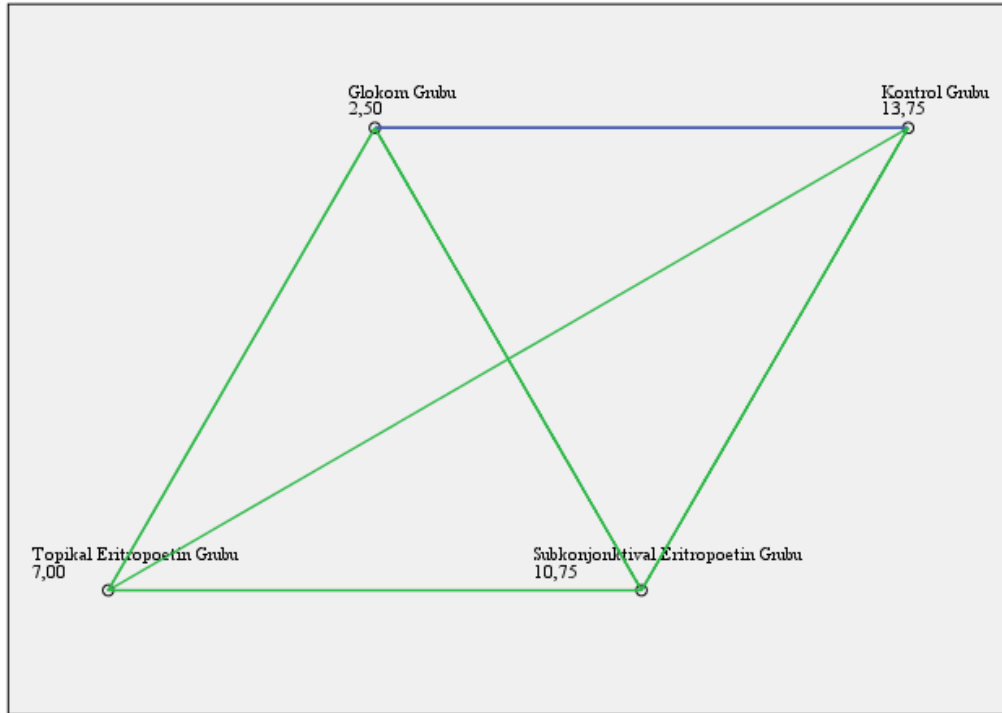
**Şekil 12.** Gruplara Göre Ganglion Hücre Kompleksi Kalınlığı Karşılaştırması

Grupların ikili karşılaştırmalarına göre kontrol grubu ile glokom grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,005$ ). Subkonjonktival eritropoetin grubu ve topikal eritropoetin grubu ortanca değerleri glokom grubundan daha yüksek olmaklar birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo VIII, Şekil 12).

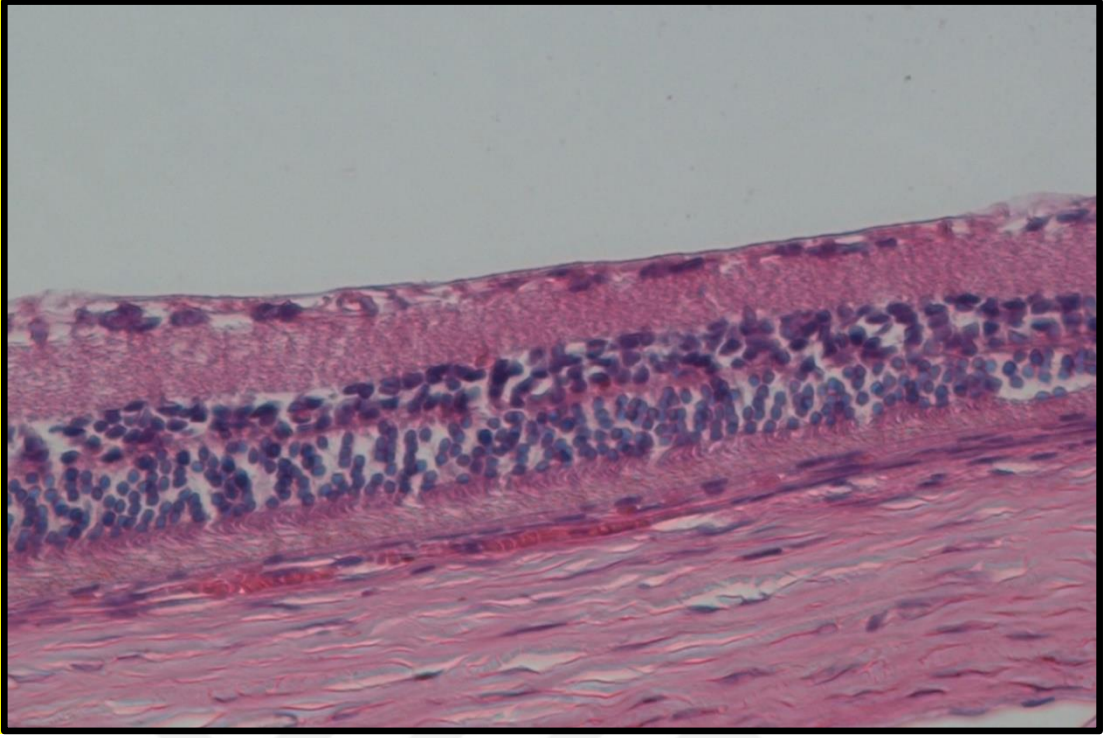
**Tablo IX.** Gruplara Göre Ganglion Hücre Kompleksi Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları

| Gruplar                                                       | Test İstatistiği | p*    |
|---------------------------------------------------------------|------------------|-------|
| Glokom Grubu-Topikal Eritropoetin Grubu                       | -1,337           | 1,000 |
| Glokom Grubu-Subkonjonktival Eritropoetin Grubu               | -2,451           | 0,086 |
| Glokom Grubu-Kontrol Grubu                                    | 3,342            | 0,005 |
| Topikal Eritropoetin Grubu-Subkonjonktival Eritropoetin Grubu | 1,114            | 1,000 |
| Topikal Eritropoetin Grubu-Kontrol Grubu                      | 2,005            | 0,270 |
| Subkonjonktival Eritropoetin Grubu-Kontrol Grubu              | 0,891            | 1,000 |

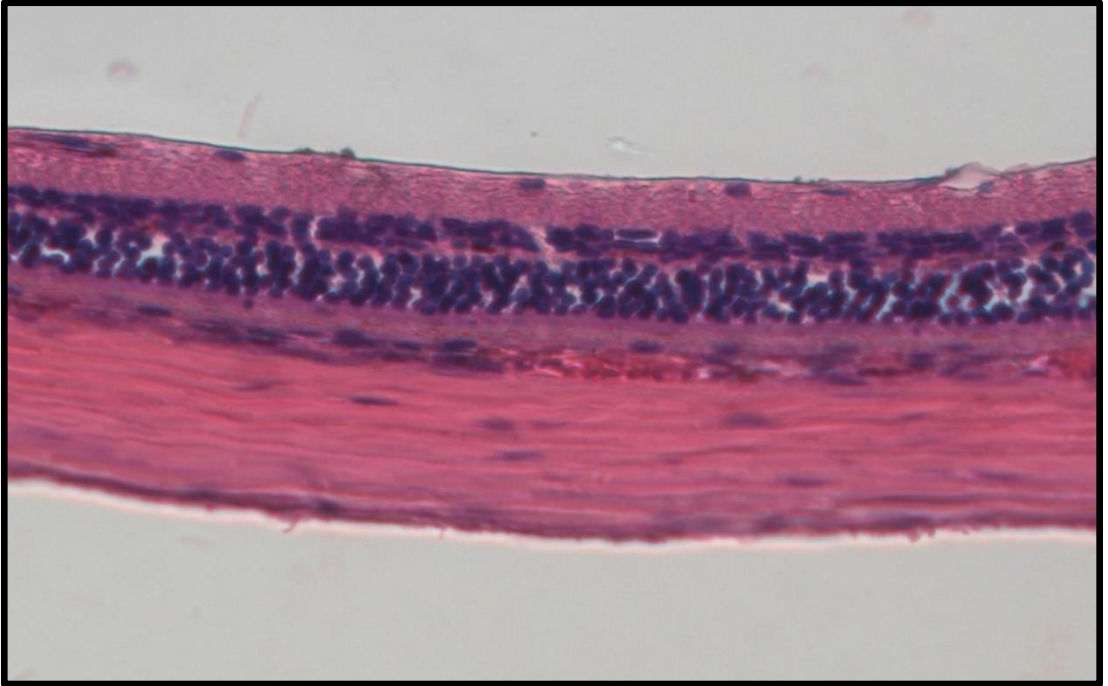
\*Kruskal-Wallis 1-way Anova



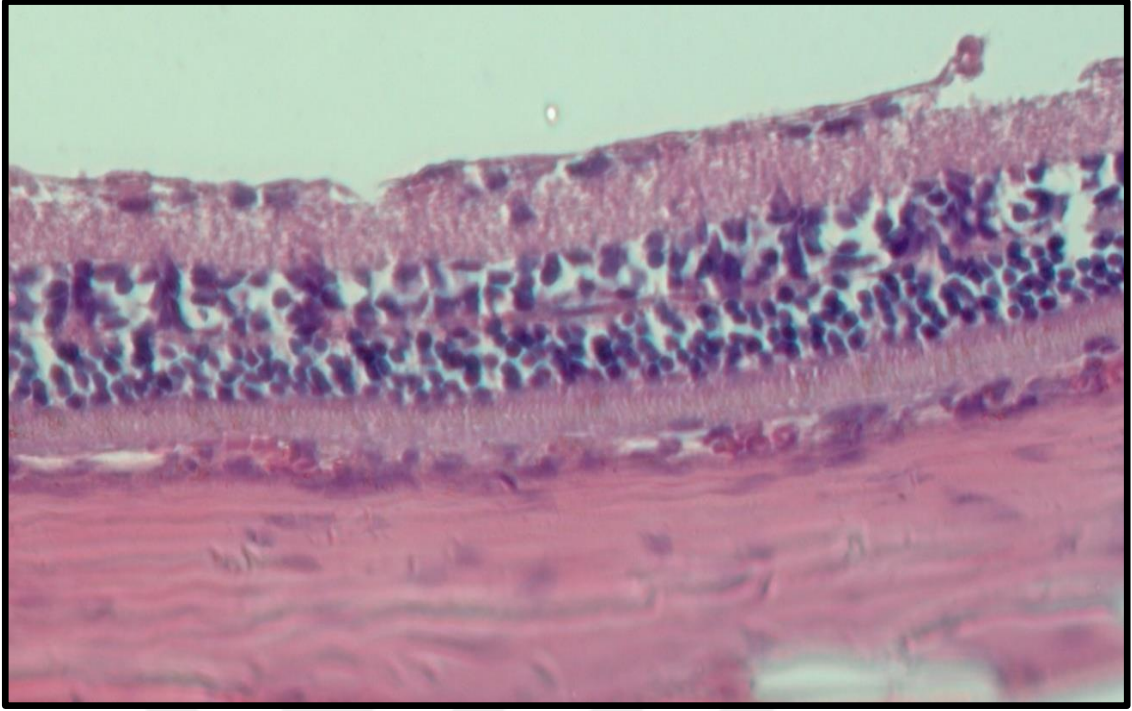
**Şekil 13.** Gruplara Göre Ganglion Hücre Kompleksi Kalınlığı İkili Karşılaştırmaları



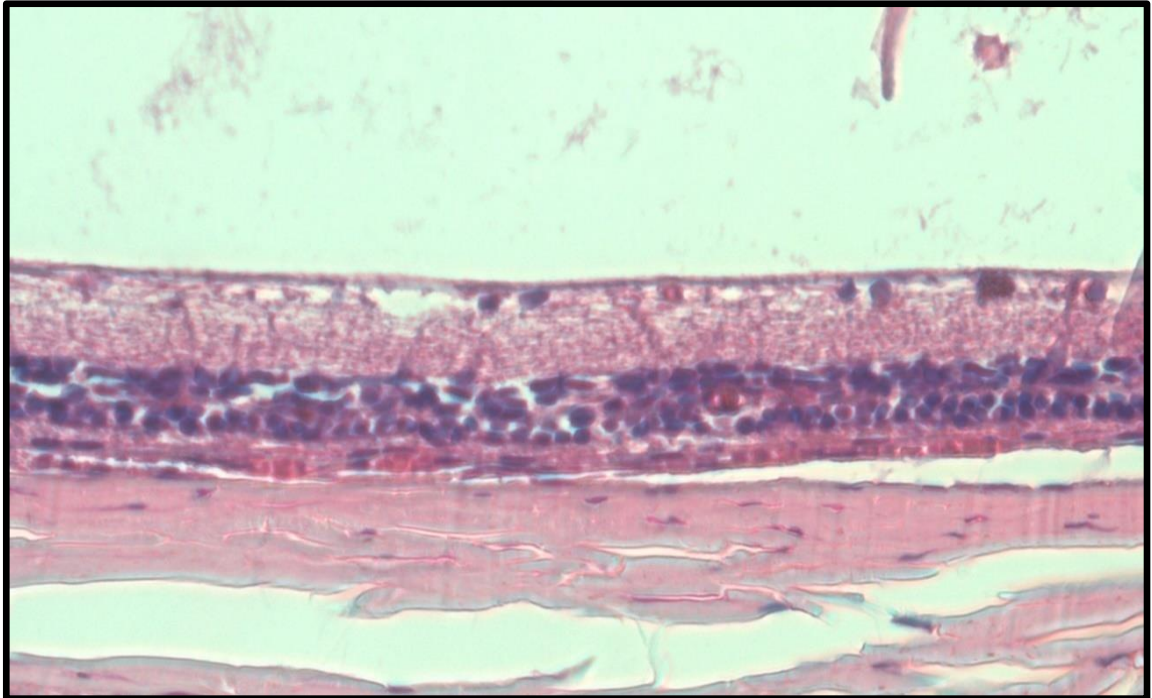
**Resim 4** Kontrol Grubu H-E boyama 40X büyütme



**Resim 5.** Glokom H-E boyama 40X büyütme

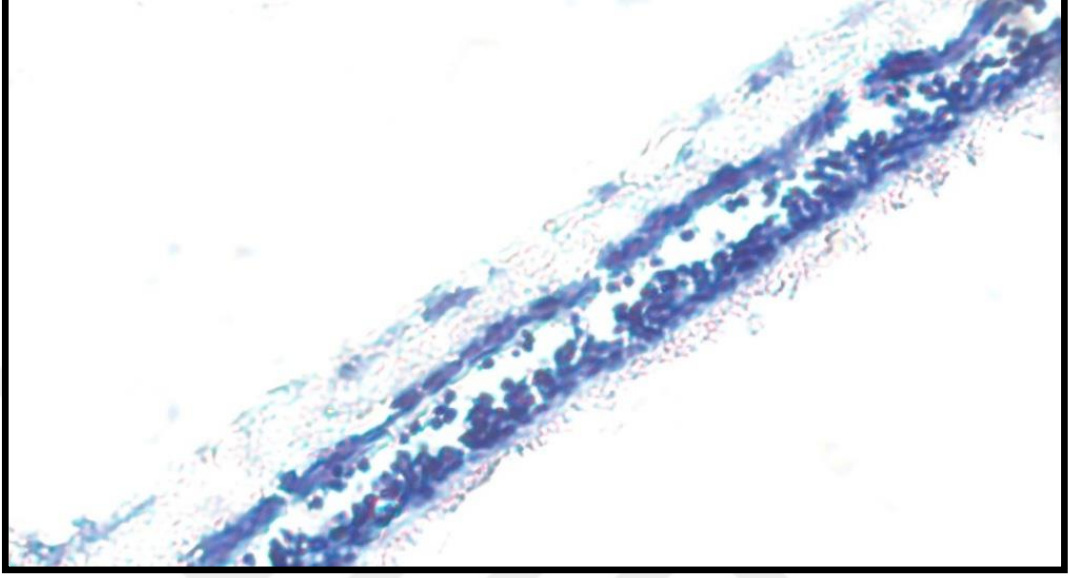


**Resim 6.** Subkonjonktival Eritropoetin Grubu H-E boyama 40X büyütme

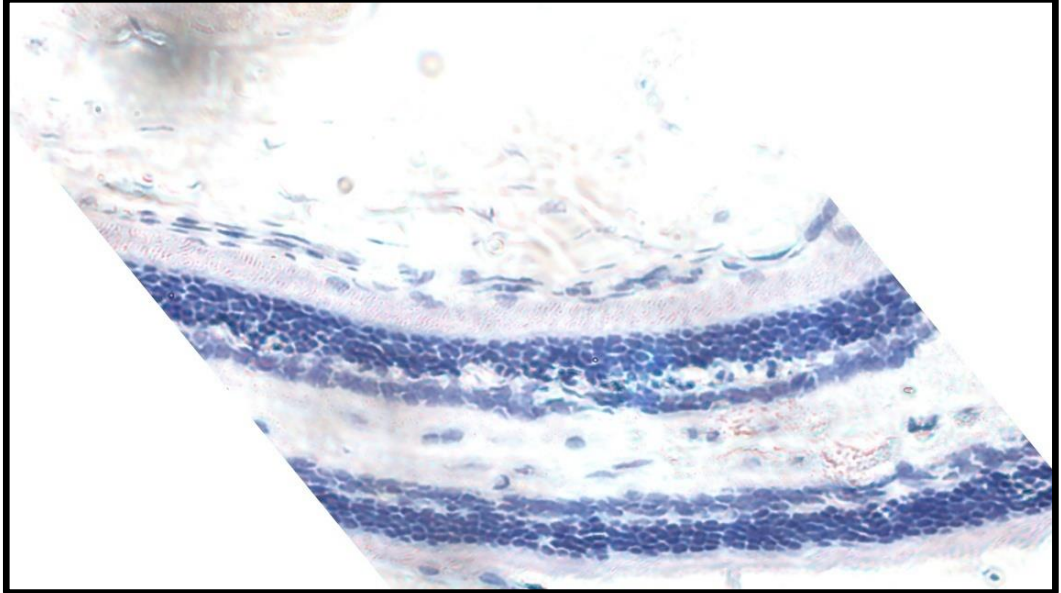


**Resim 7.** Topikal Eritropoetin Grubu H-E boyama 40X büyütme

İmmunohistokimyasal boyama (IHC) boyamada ile her bir gruptaki hücre tabakaları kalınlıkları teyit edilmiş olmasıyla birlikte bax ya da bcl-2 boyama ile apoptotik hücreler saptanamamıştır.



**Resim 8.** Bcl-2 immunohistokimyasal boyama 40X büyütme



**Resim 9.** Bax antikoru immunohistokimyasal boyama 40X büyütme

## 5. TARTIŞMA

Glokomun kemirgen modelleri, glokomun patofizyolojisine ilişkin anlayışımızı büyük ölçüde geliştirmiştir ve nöroprotektif ajanları araştırmak için yararlı bir araç olarak hizmet etmektedir. İdeal bir glokom hayvan modelinin uyarılması kolay, tekrarlanabilir, biyolojik olarak makul ve öngörülebilir olmalıdır. Mevcut glokom hayvan modellerinden kemirgenler, nispeten kısa bir ömre sahip oldukları ve genetik olarak değiştirilebildikleri için yaygın olarak görünmektedirler. Ayrıca kemirgenler, oküler anatomik yapılar açısından insanlarla birkaç benzerliği paylaşmaktadır (78).

Hyaluronik asit, AH dışı akım yolunun temel bir bileşeni olan TA yapısının hücre dışı matrisin önemli bir bileşenidir. HA, iris veya lens teması önlenerek kornea-skleral limbus yoluyla ön kamaraya enjekte edilebilir. Ön kamera derinliğini kademeli olarak artırır ve tekrarlanan enjeksiyonlar farklı limbal lokasyonlarda yapılabilir, bu da GİB'de artışa yol açar (79-83).

Tek bir enjeksiyonla 25 $\mu$ l HA (10 mg / ml tuzlu su) 7-8 gün sıçanlarda %80 (9.4 mm Hg) ile GİB artmıştır. Tekrarlanan enjeksiyonlarla bu 10 haftaya kadar uzatılabilir ve %40 RGC kaybı ile sonuçlanabilir (79, 80, 82, 84). Ancak bu çalışmalar, enjeksiyondan sonra sıçanların %6-12.5'inin kornea veya lentiküler komplikasyonlar geliştirdiğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer oranlar görülmüştür. HA enjeksiyonu üzerine bildirilen bu çalışmalar, şu anda oftalmik viskoelastik cihazlarda kullanılan konsantrasyona benzer şekilde, diğer modellere kıyasla GİB'de benzer artışlar bildirmiştir. Bununla birlikte, GİB'deki günlük değişim önemli ölçüde daha yüksektir ve GİB yükselme süresi daha kısaydı, bu da tekrarlayan enjeksiyonu glokomu tetiklemek için en büyük gereklilik haline getirmiştir.

Bu tekniğin dezavantajı, yüksek GİB'yi sürdürmek için tekrarlanan enjeksiyonlara ihtiyaç duyulmasıdır, bu da hayvan gözlerinde fitizis bulbi, katarakt ve geçici korneal ödemle sonuçlanabilir (82, 84)

Deneyisel glokom modelimiz daha önce yukarıda bahsedildiği gibi kullanılmış ve güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmamızda tekrarlayan enjeksiyonlar gerektiren bu model, şüphesiz komplikasyon geliştirme riskini artırmıştır. Ayrıca glokom oluşturulan deneklerden 3\18 oranında katarakt, endoftalmi ve perforasyon gibi

komplasyonlar, 3\18 oranında ise tekrarlayan anestezi indüksiyonlara bağı ölüm görülmüştür. Mevcut sınırlamaların üstesinden gelmek için modellerde daha fazla iyileştirme veya yeni bir uyarlanabilir mekanizmanın geliştirilmesi, gelecekte glokomun daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Glokom 2020 yılında 80 milyon kişi etkilemesi beklenen geri döndürülemez körlüğe yol açan bir görme sistemi hastalığıdır (25). 2040 yılında yaklaşık 112 milyona ulaşması beklenmektedir (85). 40 yaşın üzerindeki kişilerin yüzde biri bu patolojiden etkilenir iken bu oran, 70 yaşın üzerindeki kişilerde %5'e ve 80 yaşın üzerindekiilerin %10'una kadar yükselir.

Primer Açık Açılı Glokom (PAAG), glokomun en yaygın şeklidir. PAAG, GİB artıran AH'ün gözün ön kamaradan boşaltılmasından sorumlu TA'ın dejenerasyonu ile karakterizedir. Buna bağı oluşan oküler hipertansiyon, optik siniri oluşturan RGC'lerin aksonlarının bozulmasına ve ardından RGC'lerin giderek artan konsantrik kaybına neden olur. Glokom, uzun süre asemptomatik kalan sinsi bir hastalıktır ve zaten kalıcı hasar olduğunda görsel belirtiler meydana gelir. Görsel belirtiler önce çevresel ve sonra merkezidir. Mevcut tedaviler temel olarak GİB'yi düşürmeyi amaçlamaktadır. Bununla birlikte, bu dejeneratif hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde artmış GİB dışındaki ek mekanizmalar rol oynamaktadır. Gerçekten de, uygun GİB kontrolüne rağmen hastaların % 15-25'inde glokom progresyonu görülebilir (86, 87) ve normal tansiyonlu glokom, yüksek GİB'nin nörodejenerasyonu açıklayamadığı glokom vakalarının önemli bir bölümünü oluşturur (88).

Göz içi basıncın yüksek olması optik sinir hasarı ve RGC kaybı için risk faktörü olmakla birlikte tek başına GİB'in düşürülmesi görme fonksiyonunu korumada yeterli olmamaktadır (89). Bu sebeple GİB'i düşürmek glokom tedavisinin temelini oluştururken aynı zamanda nöroproteksiyonu hedefleyen tedavi modelleri gerekmektedir (90).

Geçmişte yapılan çalışmalarda normal retinal doku hücrelerinin ölüm sırası incelendiğinde RGC tabakasından başlayıp içten dışa doğru doğru ilerlediği görülmüştür (91-93). Glokomun sebep olduğu retinal hasara bağı kayıpla benzer şekilde; aksonal dejenerasyon, mikrogliyal dokunun aktivasyonu, TNF- $\alpha$  ve sitokinlerin salınımını takiben kompleman yolunun aktivasyonu sonucunda RGC'nin apoptozisi ile sonuçlanmaktadır (94, 95).

Bizde çalışmamızda retinal ganglion hücre tabakası kalınlığı incelendiğinde beklenildiği gibi en az kalınlığa sahip olan glokom grubunda iken en fazla kontrol grubundaydı. Eritropoetin uygulanan gruplarda uygulama yolundan bağımsız olarak retinal hücre kalınlığı glokom grubuna göre daha fazlaydı. Subkonjonktival yolla eritropoetin uygulanan grupta her ne kadar retinal hücre kalınlığı daha fazla olsa da uygulama yolları arasında anlamlı fark saptanmadı.

EPO, yaklaşık 30,4 kDa bir hematopoetik büyüme faktörüdür (58). Ayrıca klinik pratikte kullanılabilir olduğundan, ilginç bir nöroprotektif ilaç olarak kabul edilir ve bir çok çalışma ile nöroprotektif etkisini desteklemektedir (96). EPO çoğunlukla yetişkin böbreklerde üretilir, ancak merkezi sinir sistemi de onu düşük seviyelerde üretir (58). Yetişkin insanlarda, beyinde ve retinada otokrin veya parakrin eylemleri düşündüren geniş bir EPO ve EPO reseptör dağılımı bildirilmiştir (6, 72, 97).

Oftalmik ve oftalmik olmayan nörodejeneratif hastalıkların çeşitli modelleri, EPO'nun apoptozu, enflamasyonu, oksidasyonu ve eksitotoksisiteyi azaltma kabiliyeti nedeniyle önemli nöro-koruyucu ve nöro-rejeneratif özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (98-102) ve ayrıca progenitor hücre proliferasyonunu artırmak gibi etkileri de gösterilmiştir (58). Bu nedenle EPO, RGC'lerin apoptozunu önlemek için değerli bir ilaç gibi görünmektedir ve sistemik, intravitreal ve retrobulbar yollarla uygulanabilir (63, 103)

İlaç araştırmaları ve farmakokinetik, mevcut retina terapötiklerinde ve yeni ilaçların geliştirilmesinde önemli roller oynamaktadır (104). EPO oküler uygulama için subkonjonktival yol, minimum riskleri olan ve hematopoez gibi önemli istenmeyen yan etkiler olmaksızın kolay ve güvenli bir prosedürdür. Subkonjonktival ve topikal uygulamaların önündeki ana oküler engeller, akış bariyerleri olan (kan akışı ve lenfatik akış) ve dokuya penetrasyon zorlaştıran bariyerleridir (104) Burada skleral doku dikkate alınması gereken en önemli bariyerdir. Bununla birlikte, immünoglobulinlerin ve diğer büyük bileşiklerin koroid ve retinaya transskleral verilmesinin mümkün olduğu kanıtlanmıştır (105) Glokom kronik bir hastalık olduğundan, RGC'leri korumak için birden fazla tedavi gereklidir ve daha az riski barındıran topikal , subkonjonktival yolların kullanılması daha uygun görünmektedir.

Resende ve ark (101, 106, 107) son çalışmalarında, EPO (rekombinant insan eritropoietin) 'nin subkonjonktival yol ile uygulanmasının retinanın RGC hücreleri üzerinde olumlu etkileri olduğu ve nöron koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bu uygulama yolu, hematopoez uyarımı (sistemik uygulama) ile ilgili potansiyel yan etkileri ve endoftalmi, retina dekolmanı, üveit veya katarakt (intravitreal ve retrobulbar uygulama) gibi komplikasyonları önler (73, 96, 108).

Ayrıca topikal EPO ile ilgili yapılan bir çalışmada, Resende ve ark. (71), EPO  $\beta$  ex vivo olarak topikal uygulandığında sonra domuz konjonktiva, kornea ve sklerasına nüfuz edebileceği gösterilmiş. Subkonjunktival uygulamaya göre, EPO'nun topikal oküler uygulanması, sedasyon veya lokal anestezi gerektirmeyen invazif olmayan bir yol olma avantajı ile test edilen dozda zararsız kabul edilebilir. Bu çekici özelliklere rağmen açılması gereken önemli oküler engellerin dikkate alınması zorunludur.

Resende ve ark. yakın zamanda yaptıkları bir başka çalışmada kitosan ve hyaluronik asit moleküllerini kullanarak topikal EPO'nun oluşturulan (CS / HA6-EPO) nanoformlasyonu ile, domuz göz dokuları immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde, sırasıyla en hızlı nüfuzun konjonktivadan , ardından sklera ve üçüncü olarak korneadan olduğu gzlemlenişler (109). Bizde alışmamızda ex vivo olarak yapılan bu çalışmaları refreans alarak bu iki uygulama yolunu in vivo glokom oluşturulan sıçanlarda karşılaştırmayı amaçladık.

Deneyssel bir fare glokom modelinde, tek doz intravitreal 200 ngEPO uygulamasının RGC'lerin yüksek basına bağlı kaybının en azından bir kısmını önlemekte etkili olduğu grlmştir (63). GİB'deki artışın neden olduğu retinal iskemiden önce veya hemen sonra rhEPO'nun sistemik uygulanmasının, histopatolojik retina harını azalttığı ve elektroretinografi ile değerlendirildiğinde ise fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığı saptanmıştır. Eksojen EPO ayrıca iskemik retinadaki terminal apoptotik olayları önemli ölçüde azaltarak bir anti-apoptotik etki mekanizması göstermektedir (110).

Carvalho ve ark. (111) oligemik iskemik zeminde meydana gelen glokom modelinde EPO verilen grupta RGC sayısı kontrol grubuna göre daha düşük olmasına rağmen EPO uygulanmayan glokom oluşturulmuş sıçanlara göre daha fazla saptanmıştır.

Loeliger ve ark. (112) fetal koyunlar üzerinde yaptıkları EPO'nun, endotoksinlerin meydana getirdiği retinal hasar üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada RGC sayısının EPO uygulanan fetüslerde, uygulanmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Chu ve ark. (113) deneysel olarak diyabet oluşturarak diyabetik retinopati geliştirdikleri çalışmada intravitreal olarak EPO enjekte edilen sıçanların retinasında proapoptotik ve inflamatuvar yanıtlardan sorumlu gen ekspresyonu normal sınırlarda kaldığı gözlemlendiği bildirilmiştir.

Hernandez ve ark. (114), nöral retinada ve RPE'de EPO ekspresyonunu yüksek seviyelerde saptamıştır. Tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, EPO'nun retinada nöroprotektif , anti-apoptotik , anti-inflamatuvar, anti-oksidatif, anti-geçirgenlik ve anjiyojenik fonksiyonlara sahip olabileceği görülmektedir (6, 115-117).

Retina dokusunda çok sayıda EPO ve EPOR varlığı, EPO'nun gözde önemli fizyolojik rollere sahip olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda göz gelişimi sırasında EPO'nun katılımının, hücre apoptozunu önlemedeki koruyucu rolüne katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır (118, 119).

Çalışmamızda retinal ganglion hücre tabakası kalınlığı incelendiğinde beklenildiği gibi en az kalınlığa sahip olan glokom grubunda iken en fazla kontrol grubundaydı. EPO tedavisi alan uygulanan gruplarda uygulama yolundan bağımsız olarak retinal hücre kalınlığı glokom grubuna göre daha fazlaydı. Subkonjonktival EPO grubunda her ne kadar retinal hücre kalınlığı daha fazla olsa da uygulama yolları arasında anlamlı fark saptanmadı. Bu durum deney gruplarındaki denek sayısının az olmasından kaynaklanmış olabilir. Çalışmanın daha fazla denek ile tekrarlanması durumunda EPO uygulama yolları arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlı sonuçlanabilir.

Çalışmamızda retina kalınlığı en fazla kontrol grubunda en az glokom grubundaydı. Subkonjonktival eritropoetin uygulamasında retina kalınlığı topikal eritropoetin uygulananlara göre daha yüksek retina kalınlığı saptanmış olmasına rağmen tedavi grupları arasındaki farkın anlamsız saptanmış olması gruplardaki denek sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir.

İç pleksiform tabakanın (IPL) kaybı, genel görme alanı kaybı ile oldukça ilişkilidir ve bu nedenle hastalarda glokom ilerlemesini değerlendirmek için potansiyel bir biyobelirteçtir (120). Nöroproteksiyon, GİB'den bağımsız RGC kaybını önlemek için kullanılabilir (121). İç plaksiform tabaka kalınlığı incelendiğinde subkonjonktival eritropoetin uygulaması ile glokom grubu arasında anlamlı ilişki saptanmış olup, tedavi gurupları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. İç pleksiform tabaka kalınlığı subkonjonktival uygulamada topikal damla uygulamaya göre daha fazla olup daha büyük çalışma gruplarıyla çalışmanın tekrarlanması durumunda anlamlı fark saptanabilir. Cheng ve ark. (120) yaptığı çalışmada retina hasarı meydana getirilen sıçanlarda EPO uygulaması sonrası iç pleksiform hücre tabakasında mevcut hasarın gerilediği bildirilmiştir.

Çalışmamızda gruplar arasında ganglion hücre kompleksi kalınlığı incelendiğinde de benzer şekilde en az glokom grubunda en fazla kontrol grubunda izlenmiştir. Subkonjonktival eritropoetin uygulananlar topikal uygulamaya göre kalınlık daha fazla olmasına rağmen uygulama yolları arasında fark saptanmamış olması denek sayısının azlığından kaynaklanmış olabilir.

Ayrıca çalışmamızın sınırlamalarından biri, tekli EPO enjeksiyonlarının kullanılmasıdır. Hem lokal hem de sistemik potansiyel yan etkileri değerlendirmek için tekrarlanan EPO subkonjonktival enjeksiyonlar uygulanmalıdır. Kullanılan glokom modeli, bir başka sınırlama olarak görülmektedir. Bu glokom deneysel modeli daha önce kullanılmış ve güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiş olmasına rağmen glokom çok faktörlü ve çok karmaşık bir hastalıktır. Bu nedenle, birkaç farklı glokom modeli kullanan çalışmalardan elde edilen verileri birleştirmek, glokom hastalığında EPO oküler nöroproteksiyonun tam resmini anlamak için önemlidir. Yukarıda belirtilen sınırlamalara rağmen, bu çalışmalar hem klinik öncesi hem de klinik senaryolarda oküler nöroproteksiyonu hedefleyen gelecekteki çalışmalar için EPO uygulamasıyla ilgili yeni perspektifler açmaktadır.

Sonuç olarak, glokom indüksiyonundan sonra subkonjunktival ve topikal uygulanan rHuEPO, RGC'ler, başta GCC tabakası ve İPL tabakası ve total retina katmaı üzerinde faydalı etkileri gösterildi. Bununla birlikte, glokom koşullarında subkonjonktival ve topikal EPO kinetiğini değerlendirmek için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Glokom geri dönüşümsüz körlüğün önde gelen sebeplerindendir. Bu sebeple erken tanısı ve tedavisi son derece önemlidir. Çalışmamızda ganglion hücre tabakası, iç pleksiform tabaka, retina kalınlığı, ganglion hücre kompleksi (iç pleksiform tabaka + ganglion hücre tabakası) kalınlığı en az glokom grubunda, en fazla kontrol grubunda izlenmiştir.

2. Glokom sıklıkla GİB artışıyla seyretse de GİB regülasyonu sağlanan hastalarda kliniğin düzelmemesi tedavide tek başına göz içi basıncın düşürülmesinin yetersiz kaldığını göstermektedir. Bu sebeple tedavide nöroprotektif ajanlar yer edinmeye başlamıştır. Eritropoetin bizim çalışmamızın sonuçlarında da nöroprotektif sonuçları gözlenmiş olup uygulama yolları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Çalışmanın daha büyük çalışma gruplarında tekrarlanması faydalı olabilir.

3. Glokomun körlüğe ilerleme riski yüksektir. Bu sebeple erken dönemde tanınması ve tedavisinin düzenlenmesi önemlidir. Sosyal devlet politikaları dahilinde glokom tanısı hakkında halk eğitimleri, radyo televizyon programları gibi farkındalık faaliyetleri yapılmalıdır. Konu hakkında gerekli yasal düzenlemeler ve politikalar oluşturulmalıdır.

## ÖZET

### DENEYSEL GLOKOM MODELİNDE ERİTROPOETİNİN NÖROPROTEKSİYON ÜZERİNE ETKİLERİ

**Amaç:** Glokom, dünya genelinde körlüğün başlıca sebeplerinden olup, progresif, irreversible optik nöropatidir. Çalışmamızda Eritropoetinin glokom üzerindeki nöroprotektif etkisinin göstermek amacıyla yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Deneysel Hayvan Merkeziden on ikişer adet erkek ve dişi Albino Wistar cinsi rat (6 haftalık; 220±40 gram) kullanılmıştır. Ratlar kontrol, glokom, subkonjonktival eritropoetin tedavi, topikal eritropoetin grubu olmak üzere 4 grup olarak ayrılmış olup her grupta 6 adet rat bulunmaktadır. Anestezi ve analjezi uygulamasında intramüsküler 50 mg/kg ketaminhidroklorür ve 5 mg/kg ksilazinhidroklorid kombinasyonu kullanılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmamızda ganglion hücre tabakası, iç pleksiform tabaka, retina kalınlığı, ganglion hücre kompleksi kalınlığı en az glokom grubunda, en fazla kontrol grubunda izlenmiştir. Eritropoetin uygulama yolları arasındaysa fark izlenmemiştir.

**Sonuç:** Eritropoetinin nöroprotektif etkisi gösterilmiş olup daha geniş çalışma gruplarıyla çalışmanın tekrarlanmasına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Eritropoietin, Glokom, Nöroproteksiyon,

## ABSTRACT

### EFFECTS OF ERYTHROPOETIN ON NEUROPROTECTION IN EXPERIMENTAL GLOCOMAL MODEL

**Objective:** Glaucoma is one of the major causes of blindness worldwide and is progressive, irreversible optic neuropathy. Our study was conducted to show the neuroprotective effect of erythropoietin on glaucoma.

**Method:** Twelve male and female Albino Wistar rats (6 weeks old;  $220 \pm 40$  grams) from Adnan Menderes University Experimental Animal Center were used in this study. Rats were divided into 4 groups as control, glaucoma, subconjunctival erythropoietin treatment, topical erythropoietin group, and each group has 6 rats. Intramuscular 50 mg / kg ketamine hydrochloride and 5 mg / kg xylazine hydrochloride combination was used for anesthesia and analgesia.

**Results:** In our study, ganglion cell layer, inner plexiform layer, retinal thickness, and ganglion cell complex thickness were observed at least in the glaucoma group and mostly in the control group. No difference was observed between the routes of administration of erythropoietin.

**Conclusion:** The neuroprotective effect of erythropoietin has been demonstrated, and there is a need to repeat the study with larger study groups.

**Key Words:** Erythropoietin, Glaucoma, Neuroprotection

## KAYNAKLAR

1. Mélik Parsadaniantz S, Réaux-le Goazigo A, Sapienza A, Habas C, Baudouin C. Glaucoma: A degenerative optic neuropathy related to neuroinflammation? *Cells*. 2020;9(3):535.
2. Kimura A, Namekata K, Guo X, Noro T, Harada C, Harada T. Targeting Oxidative Stress for Treatment of Glaucoma and Optic Neuritis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:2817252.
3. Levin LAJOcoNA. Neuroprotection and regeneration in glaucoma. 2005;18(4):585.
4. Marangoz D, Yalvaç I. Glokomda Nöroproteksiyon Tedavisinde Yenilikler. *Glokom-Katarakt/Journal of Glaucoma-Cataract*. 2015;10(3).
5. Boia R, Ruzafa N, Aires ID, Pereiro X, Ambrósio AF, Vecino E, et al. Neuroprotective strategies for retinal ganglion cell degeneration: current status and challenges ahead. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2262.
6. Ding SS, Leow S, Munisvaradass R, Koh E, Bastion M, Then K, et al. Revisiting the role of erythropoietin for treatment of ocular disorders. *Eye*. 2016;30(10):1293-309.
7. Sibel İ. Retina anatomisi. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 2014;15(3):355-9.
8. Lumi X, Hawlina M, Glavač D, Facskó A, Moe MC, Kaarniranta K, et al. Ageing of the vitreous: from acute onset floaters and flashes to retinal detachment. *Ageing research reviews*. 2015;21:71-7.
9. Sebag J. Posterior Vitreous Detachment. *Ophthalmology*. 2018;125(9):1384-5.
10. Milam AH, Smith J, John SK. Anatomy and Cell Biology of the Human Retina. In: Duane's Clinical Ophthalmology. ; 2006.
11. Gupta MP, Herzlich AA, Sauer T, Chan CC. Retinal anatomy and pathology. *DevOphthalmol*. 2015;55:7-17.

12. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong RO. Functional architecture of the retina: development and disease. *Progress in retinal and eye research*. 2014;42:44-84.
13. Khatib TZ, Martin KR. Protecting retinal ganglion cells. *Eye*. 2017;31(2):218-24.
14. Quigley HA, Brown AE, Morrison JD, Drance SM. The size and shape of the optic disc in normal human eyes. *Archives of ophthalmology*. 1990;108(1):51-7.
15. Aydın P, Akova YA. Temel göz hastalıkları: Güneş; 2001.
16. Reyes-Resina I, Awad Alkozi H, Del Ser-Badia A, Sánchez-Naves J, Lillo J, Jiménez J, et al. Expression of Melatonin and Dopamine D(3) Receptor Heteromers in Eye Ciliary Body Epithelial Cells and Negative Correlation with Ocular Hypertension. *Cells*. 2020;9(1).
17. Delamere NA. Ciliary Body and Ciliary Epithelium. *Adv Organ Biol*. 2005;10:127-48.
18. Buffault J, Labbé A, Hamard P, Brignole-Baudouin F, Baudouin C. The trabecular meshwork: Structure, function and clinical implications. A review of the literature. *J Fr Ophtalmol*. 2020;43(7):e217-e30.
19. Marangoz D. Deneysel Sıçan Glokom Modelinde Brimonidin Tartrat Ve Melatoninin Retina Ganglion Hücreleri Üzerindeki Nöroprotektif Etkilerinin Karşılaştırılması. İstanbul: Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2014.
20. Machiele R, Motlagh M, Patel BC. Intraocular Pressure. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
21. Balendra SI, Shah PA, Jain M, Grzybowski A, Cordeiro MF. Glaucoma: Hot Topics in Pharmacology. *Curr Pharm Des*. 2017;23(4):596-607.
22. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama*. 2014;311(18):1901-11.
23. Soto I, Howell GR. The complex role of neuroinflammation in glaucoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(8).

24. Schuster AK, Erb C, Hoffmann EM, Dietlein T, Pfeiffer N. The Diagnosis and Treatment of Glaucoma. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2020;117(13):225.
25. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British journal of ophthalmology*. 2006;90(3):262-7.
26. Conlon R, Saheb H, Ahmed IIK. Glaucoma treatment trends: a review. *Canadian Journal of Ophthalmology*. 2017;52(1):114-24.
27. Supuran CT. The management of glaucoma and macular degeneration. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2019;29(10):745-7.
28. McMonnies CW. Glaucoma history and risk factors. *Journal of Optometry*. 2017;10(2):71-8.
29. Awadalla MS, Fingert JH, Roos BE, Chen S, Holmes R, Graham SL, et al. Copy number variations of TBK1 in Australian patients with primary open-angle glaucoma. *American journal of ophthalmology*. 2015;159(1):124-30. e1.
30. Landers J, Goldberg I, Graham SL. Analysis of risk factors that may be associated with progression from ocular hypertension to primary open angle glaucoma. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2002;30(4):242-7.
31. Kim MJ, Kim MJ, Kim HS, Jeoung JW, Park KH. Risk factors for open-angle glaucoma with normal baseline intraocular pressure in a young population: the K orea N ational H ealth and N utrition E xamination S urvey. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2014;42(9):825-32.
32. He S, Stankowska DL, Ellis DZ, Krishnamoorthy RR, Yorio T. Targets of neuroprotection in glaucoma. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2018;34(1-2):85-106.
33. Şatana BS, Paşaoğlu IB. Glokomda Nöroproteksiyon. *Türkiye Klinikleri Oftalmoloji-Özel Konular*. 2018;11(1):97-104.

34. Kaushik S, Pandav S, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. *Journal of postgraduate medicine*. 2003;49(1):90.
35. Levin LAJSoo. Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma. 2003;48(2):S21-S4.
36. Lipton SA. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. *Current drug targets*. 2007;8(5):621-32.
37. Dong C-J, Guo Y, Agey P, Wheeler L, Hare WA.  $\alpha$ 2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(10):4515-22.
38. Ethier CR, Morrison JC, Clark AF. Introduction to special issue on glaucomatous optic neuropathy: In vivo models and techniques. *Exp Eye Res*. 2015;141:1-2.
39. Nakamura M. [New insights into the pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy and refinement of the objective assessment of its functional damage]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2012;116(3):298-344; discussion 5-6.
40. Quigley HA. Understanding Glaucomatous Optic Neuropathy: The Synergy Between Clinical Observation and Investigation. *Annu Rev Vis Sci*. 2016;2:235-54.
41. Jonas JB, Wang N, Yang D. Translamina Cribrosa Pressure Difference as Potential Element in the Pathogenesis of Glaucomatous Optic Neuropathy. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2016;5(1):5-10.
42. Almasieh M, Levin LA. Neuroprotection in Glaucoma: Animal Models and Clinical Trials. *Annu Rev Vis Sci*. 2017;3:91-120.
43. Gupta D, Chen PP. Glaucoma. *Am Fam Physician*. 2016;93(8):668-74.
44. Weinreb RN, Leung CK, Crowston JG, Medeiros FA, Friedman DS, Wiggs JL, et al. Primary open-angle glaucoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1):1-19.

45. Nuschke AC, Farrell SR, Levesque JM, Chauhan BC. Assessment of retinal ganglion cell damage in glaucomatous optic neuropathy: Axon transport, injury and soma loss. *Exp Eye Res.* 2015;141:111-24.
46. Osborne NN, Núñez-Álvarez C, Joglar B, Del Olmo-Aguado S. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur J Pharmacol.* 2016;787:127-33.
47. Wiggs JL, Pasquale LR. Genetics of glaucoma. *Hum Mol Genet.* 2017;26(R1):R21-r7.
48. Ramdas WD, Rizopoulos D, Wolfs RC, Hofman A, de Jong PT, Vingerling JR, et al. Defining glaucomatous optic neuropathy from a continuous measure of optic nerve damage - the optimal cut-off point for risk-factor analysis in population-based epidemiology. *Ophthalmic Epidemiol.* 2011;18(5):211-6.
49. Green CM, Kearns LS, Wu J, Barbour JM, Wilkinson RM, Ring MA, et al. How significant is a family history of glaucoma? Experience from the Glaucoma Inheritance Study in Tasmania. *Clin Exp Ophthalmol.* 2007;35(9):793-9.
50. Song BJ, Aiello LP, Pasquale LR. Presence and Risk Factors for Glaucoma in Patients with Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2016;16(12):124.
51. Lai J, Choy BN, Shum JW. Management of Primary Angle-Closure Glaucoma. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2016;5(1):59-62.
52. Jonas JB, Aung T, Bourne RR, Bron AM, Ritch R, Panda-Jonas S. Glaucoma. *Lancet.* 2017;390(10108):2183-93.
53. de Moraes CG, Liebmann JM, Medeiros FA, Weinreb RN. Management of advanced glaucoma: Characterization and monitoring. *Surv Ophthalmol.* 2016;61(5):597-615.
54. McMonnies CW. Glaucoma history and risk factors. *J Optom.* 2017;10(2):71-8.
55. Mantravadi AV, Vadhar N. Glaucoma. *Prim Care.* 2015;42(3):437-49.

56. Russo R, Nucci C, Corasaniti MT, Bagetta G, Morrone LA. Autophagy dysregulation and the fate of retinal ganglion cells in glaucomatous optic neuropathy. *Prog Brain Res*. 2015;220:87-105.
57. Arranz-Romera A, Davis BM, Bravo-Osuna I, Esteban-Pérez S, Molina-Martínez IT, Shamsheer E, et al. Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma. *Journal of Controlled Release*. 2019;297:26-38.
58. Aghdam KA, Sanjari MS, Falavarjani KG. Erythropoietin in ophthalmology: a literature review. *Journal of Current Ophthalmology*. 2016;28(1):5-11.
59. Yamasaki M, Mishima HK, Yamashita H, Kashiwagi K, Murata K, Minamoto A, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain research*. 2005;1050(1-2):15-26.
60. Zhu B, Wang W, Gu Q, Xu X. Erythropoietin protects retinal neurons and glial cells in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental eye research*. 2008;86(2):375-82.
61. Zhang J, Wu Y, Jin Y, Ji F, Sinclair SH, Luo Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008;49(2):732-42.
62. Mowat FM, Gonzalez F, Luhmann UF, Lange CA, Duran Y, Smith AJ, et al. Endogenous erythropoietin protects neuroretinal function in ischemic retinopathy. *The American journal of pathology*. 2012;180(4):1726-39.
63. Tsai JC, Wu L, Worgul B, Forbes M, Cao J. Intravitreal administration of erythropoietin and preservation of retinal ganglion cells in an experimental rat model of glaucoma. *Current eye research*. 2005;30(11):1025-31.
64. Xie Z, Chen F, Wu X, Zhuang C, Zhu J, Wang J, et al. Safety and efficacy of intravitreal injection of recombinant erythropoietin for protection of photoreceptor cells in a rat model of retinal detachment. *Eye*. 2012;26(1):144-52.

65. Kilic Ü, Kilic E, Soliz J, Bassetti CL, Gassmann M, Hermann DM. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *The FASEB journal*. 2005;19(2):1-14.
66. Morita M, Ohneda O, Yamashita T, Takahashi S, Suzuki N, Nakajima O, et al. HLF/HIF-2 $\alpha$  is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *The EMBO journal*. 2003;22(5):1134-46.
67. Gawad A, Schlichting L, Strauss O, Zeitz O. Antiapoptotic properties of erythropoietin: novel strategies for protection of retinal pigment epithelial cells. *Eye*. 2009;23(12):2245-50.
68. Gong Y, Qiu Y, Song Z, Gu Q, Wu X, Sun X. Effects of single intravitreal rhEPO injection on light-induced retinal injury in rats. *Current eye research*. 2011;36(8):739-46.
69. Diem R, Sättler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C, et al. Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(2):375-85.
70. Livny E, Livnat T, Yakimov M, Masoud M, Weinberger D, Bahar I. Effect of erythropoietin on healing of corneal epithelial defects in rabbits. *Ophthalmic research*. 2013;50(2):129-33.
71. Resende AP, Silva B, São Braz B, Nunes T, Gonçalves L, Delgado E. Ex vivo permeation of erythropoietin through porcine conjunctiva, cornea, and sclera. *Drug delivery and translational research*. 2017;7(5):625-31.
72. Luo W, Hu L, Wang F. The protective effect of erythropoietin on the retina. *Ophthalmic research*. 2015;53(2):74-81.
73. Jordán J, Ruíz-Moreno JM. Advances in the understanding of retinal drug disposition and the role of blood–ocular barrier transporters. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2013;9(9):1181-92.

74. Nairz M, Schroll A, Moschen AR, Sonnweber T, Theurl M, Theurl I, et al. Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B-inducible immune pathways. *Immunity*. 2011;34(1):61-74.
75. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *British journal of pharmacology*. 2003;138(6):1107-18.
76. Hellewell SC, Yan EB, Alwis DS, Bye N, Morganti-Kossmann MC. Erythropoietin improves motor and cognitive deficit, axonal pathology, and neuroinflammation in a combined model of diffuse traumatic brain injury and hypoxia, in association with upregulation of the erythropoietin receptor. *Journal of neuroinflammation*. 2013;10(1):1-21.
77. Shirley Ding SL, Leow SN, Munisvaradass R, Koh EH, Bastion MLC, Then KY, et al. Revisiting the role of erythropoietin for treatment of ocular disorders. *Eye*. 2016;30(10):1293-309.
78. McKinnon SJ, Schlamp CL, Nickells RW. Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. *Experimental eye research*. 2009;88(4):816-24.
79. Belforte N, Moreno MC, Cymeryng C, Bordone M, Sarmiento MIK, Rosenstein RE. Effect of ocular hypertension on retinal nitridergic pathway activity. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(5):2127-33.
80. Emre E, Yüksel N, Duruksu G, Pirhan D, Subaşı C, Erman G, et al. Neuroprotective effects of intravitreally transplanted adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an experimental ocular hypertension model. *Cytotherapy*. 2015;17(5):543-59.
81. Mayordomo-Febrer A, Lopez-Murcia M, Morales-Tatay J, Monleon-Salvado D, Pinazo-Durán M. Metabolomics of the aqueous humor in the rat glaucoma model induced by a series of intracameral sodium hyaluronate injection. *Experimental eye research*. 2015;131:84-92.

82. Moreno MC, de Zavalía N, Sande P, Jaliffa CO, Fernandez DC, Sarmiento MIK, et al. Effect of ocular hypertension on retinal GABAergic activity. *Neurochemistry international*. 2008;52(4-5):675-82.
83. Shmulevich A, Beit-Yannai E. Differential modulation of MAPKs in relation to increased intraocular pressure in the aqueous humor of rat eye injected with hyaluronic acid. *Current eye research*. 2009;34(6):466-75.
84. Benozzi J, Nahum LP, Campanelli JL, Rosenstein RE. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(7):2196-200.
85. Tham Y-C, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng C-Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014;121(11):2081-90.
86. Soto I, Howell GR. The complex role of neuroinflammation in glaucoma. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(8):a017269.
87. Tezel G. Immune regulation toward immunomodulation for neuroprotection in glaucoma. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13(1):23-31.
88. Wax MB, Tezel G, Yang J, Peng G, Patil RV, Agarwal N, et al. Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(46):12085-96.
89. Zhang K, Zhang L, Weinreb RN. Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(7):541-59.
90. Tsai JC, Song BJ, Wu L, Forbes M. Erythropoietin: a candidate neuroprotective agent in the treatment of glaucoma. *Journal of glaucoma*. 2007;16(6):567-71.
91. Beazley L, Perry V, Baker B, Darby J. An investigation into the role of ganglion cells in the regulation of division and death of other retinal cells. *Developmental Brain Research*. 1987;33(2):169-84.

92. Tekeli O. Glokomda Gangliyon Hücre Kompleksi. Glokom-Katarakt. 2015;10(4).
93. Mead B, Tomarev S. Evaluating retinal ganglion cell loss and dysfunction. *Exp Eye Res.* 2016;151:96-106.
94. Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31(2):152-81.
95. Boia R, Ruzafa N, Aires ID, Pereiro X, Ambrósio AF, Vecino E, et al. Neuroprotective Strategies for Retinal Ganglion Cell Degeneration: Current Status and Challenges Ahead. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7).
96. Lagrèze WA, Feltgen N, Bach M, Jehle T. Feasibility of intravitreal erythropoietin injections in humans. *British journal of ophthalmology.* 2009;93(12):1667-71.
97. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common  $\beta$ -subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004;101(41):14907-12.
98. Bartesaghi S, Marinovich M, Corsini E, Galli CL, Viviani B. Erythropoietin: a novel neuroprotective cytokine. *Neurotoxicology.* 2005;26(5):923-8.
99. Bond WS, Rex TS. Evidence that erythropoietin modulates neuroinflammation through differential action on neurons, astrocytes, and microglia. *Frontiers in immunology.* 2014;5:523.
100. Grasso G, Sfacteria A, Meli F, Passalacqua M, Fodale V, Buemi M, et al. The role of erythropoietin in neuroprotection: therapeutic perspectives. *Drug news & perspectives.* 2007;20(5):315-20.
101. Resende AP, Rosolen SG, Nunes T, São Braz B, Delgado E. Functional and structural effects of erythropoietin subconjunctival administration in glaucomatous animals. *Biomedicine hub.* 2018;3(2):1-11.

102. Zhong L, Bradley J, Schubert W, Ahmed E, Adamis AP, Shima DT, et al. Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(3):1212-8.
103. Zhong Y-s, Liu X-h, Cheng Y, Min Y-j. Erythropoietin with retrobulbar administration protects retinal ganglion cells from acute elevated intraocular pressure in rats. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. 2008;24(5):453-60.
104. Del Amo EM, Rimpelä A-K, Heikkinen E, Kari OK, Ramsay E, Lajunen T, et al. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. *Progress in retinal and eye research*. 2017;57:134-85.
105. Ambati J, Canakis CS, Miller JW, Gragoudas ES, Edwards A, Weissgold DJ, et al. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(5):1181-5.
106. Resende AP, São-Braz B, Delgado E. Alternative route for erythropoietin ocular administration. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2013;251(8):2051-6.
107. Resende AP, São Braz B, Delgado E. Ocular erythropoietin penetration after subconjunctival administration in glaucomatous rats. *Ophthalmic research*. 2016;56(2):104-10.
108. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug discovery today*. 2008;13(3-4):144-51.
109. Silva B, Marto J, São Braz B, Delgado E, Almeida AJ, Gonçalves L. New nanoparticles for topical ocular delivery of erythropoietin. *International journal of pharmaceutics*. 2020;576:119020.
110. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(16):10659-64.

111. Carvalho LAd, Fleming R, Sant'Anna M, Guimarães R, Dantas AM, Morizot-Leite E, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin on rat retinas subjected to oligemia. *Clinics*. 2018;73.
112. Loeliger MM, Mackintosh A, De Matteo R, Harding R, Rees SM. Erythropoietin protects the developing retina in an ovine model of endotoxin-induced retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):2656-61.
113. Chu Q, Zhang J, Wu Y, Zhang Y, Xu G, Li W, et al. Differential gene expression pattern of diabetic rat retinas after intravitreal injection of erythropoietin. *Clin Exp Ophthalmol*. 2011;39(2):142-51.
114. Hernández C, Fonollosa A, García-Ramírez M, Higuera M, Catalán R, Miralles A, et al. Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes care*. 2006;29(9):2028-33.
115. Garcia-Ramírez M, Hernández C, Ruiz-Meana M, Villarroel M, Corraliza L, García-Dorado D, et al. Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells against the increase of permeability induced by diabetic conditions: essential role of JAK2/PI3K signaling. *Cellular signalling*. 2011;23(10):1596-602.
116. Wang H, Byfield G, Jiang Y, Smith GW, McCloskey M, Hartnett ME. VEGF-mediated STAT3 activation inhibits retinal vascularization by down-regulating local erythropoietin expression. *The American journal of pathology*. 2012;180(3):1243-53.
117. Reid G, Lois N. Erythropoietin in diabetic retinopathy. *Vision Res*. 2017;139:237-42.
118. Patel S, Rowe MJ, Winters SA, Ohls RK. Elevated erythropoietin mRNA and protein concentrations in the developing human eye. *Pediatric research*. 2008;63(4):394-7.
119. Wu L, Chang S, Chen Y, Xia Q, Forbes M, Tsai J. Erythropoietin receptor plays a role in the cell differentiation of retina and lens during eye development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008;49(13):3078-.

120. Cheng WS, Lin IH, Feng KM, Chang ZY, Huang YC, Lu DW. Neuroprotective effects of exogenous erythropoietin in Wistar rats by downregulating apoptotic factors to attenuate N-methyl-D-aspartate-mediated retinal ganglion cells death. PLoS One. 2020;15(4):e0223208.
121. Zivkovic M, Dayanir V, Zlatanovic M, Zlatanovic G, Jaksic V, Jovanovic P, et al. Ganglion Cell-Inner Plexiform Layer Thickness in Different Glaucoma Stages Measured by Optical Coherence Tomography. Ophthalmic Res. 2018;59(3):148-54.

