

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

RATLARDA GLOKOM MODELİNDE SİSTEMİK VE/VEYA
İNTRAVİTREAL ROSUVASTATİN UYGULAMASININ RETİNAL
GANGLİON HÜCRELERİ ÜZERİNE NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Hazırlayan
Dr. METİN ÜNLÜ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. BERATİ HASANREİSOĞLU

ANKARA
EKİM 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

RATLARDA GLOKOM MODELİNDE SİSTEMİK VE/VEYA
İNTRAVİTREAL ROSUVASTATİN UYGULAMASININ RETİNAL
GANGLİON HÜCRELERİ ÜZERİNE NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Hazırlayan
Dr. METİN ÜNLÜ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. BERATİ HASANREİSOĞLU

ANKARA
EKİM 2012

ÖNSÖZ

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim boyunca desteğini ve ilgisini esirgemeyen, tez konumun seçimi, planlanması ve yürütülmesinde eşsiz katkıları olan hocam sayın Prof. Dr. Berati HASANREİSOĞLU ve Öğr. Gör. Dr. Zeynep AKTAŞ' a, bilgi/deneyimlerini aktarmaktan yorulmayan kıymetli hocalarım, Prof. Dr. Fikret AKATA, Prof. Dr. Mehmet ÜNAL, Prof. Dr. Merih ÖNOL, Prof. Dr. Meral OR, Prof. Dr. Kamil BİLGİHAN, Prof. Dr. Gökhan GÜRELİK, Prof. Dr. Şengül ÖZDEK, Doç. Dr. Onur KONUK, Yrd. Doç. Dr. Ahmet HONDUR, ve Öğr. Gör. Dr. Murat HASANREİSOĞLU' na, Tezin patolojik inceleme aşamasında emeğini esirgemeyen değerli hocam Yard. Doç. Dr. F. Pınar UYAR GÖÇÜN'e

Yaşamımın en önemli dönemlerinden biri olan bu zorlu süreçte bana eşlik eden asistan arkadaşlarıma,

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım teknisyen arkadaşlarım, servis ve ameliyathanemizin değerli hemşire ve personeline,

Hayat boyu sevgisini ve desteğini esirgemeyen biricik eşime

Sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım...

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	I
Kısaltmalar.....	II
Tabloların Listesi.....	III
Resimlerin Listesi.....	IV
Grafiklerin Listesi.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
4. BULGULAR.....	24
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ.....	41
7. KAYNAKLAR.....	42
8. ÖZET.....	54
9. SUMMARY.....	55
10. ÖZGEÇMİŞ.....	56

KISALTMALAR

RGH	: Retinal Ganglion Hücresi
GİB	: Göz İçi Basıncı
EVK	: Episkleral Ven Koterizasyonu
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
GA	: Glutamik Asit
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentetaz
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
MS	: Multiple Skleroz
iv	: İntra vitreal
HSP	: Heat Shock Protein
OSB	: Optik Sinir Başı

Tabloların Listesi

- Tablo 1.** Göz içi basınç (GİB) değerleri
- Tablo 2.** Rosuvastatin Uygulamasının Total Retinal Ganglion Hücre (RGH) Sayısı Üzerine Etkisi
- Tablo 3.** Retinal Ganglion Hücre (RGH)' de Apoptozis Oranları
- Tablo 4.** GİB değerleri, total RGH sayısı ve Apoptozis oranlarının karşılaştırılması. Grup 1 ve 5
- Tablo 5.** GİB değerleri, total RGH sayısı ve Apoptozis oranlarının karşılaştırılması. Grup 2 ve 5
- Tablo 6.** GİB değerleri, total RGH sayısı ve Apoptozis oranlarının karşılaştırılması. Grup 3 ve 5
- Tablo 7.** Gruplara göre GFAP immün reaktivitesi karşılaştırması (çalışma gözü)
- Tablo 8.** Gruplara göre GFAP immün reaktivitesi karşılaştırması (kontrol göz)

Resimlerin Listesi

Resim 1. Ratlarda superior ve medial episkleral venler.

Resim 2. Ratın sağ gözüne genel anestezi altında episkleral ven koterizasyon uygulaması.

Resim 3. Episkleral ven koterizasyonu sonrası vende beyazlaşma ve büzüşme.

Resim 4. Ratın sağ gözüne genel anestezi altında intravitreal rosuvastatin uygulaması.

Resim 5. Ratın sağ gözünün TonoPen ile göz içi basınç (GİB) ölçümü.

Resim 6. Oral ve/veya iv rosuvastatin uygulamasının Retinal Ganglion Hücre (RGH) Sayısı üzerine etkisi.

Resim 7. Oral ve/veya iv rosuvastatin uygulamasının retinadaki TUNEL-pozitif hücreler üzerine etkisi.

Resim 8. Oral ve/veya iv rosuvastatin uygulamasının retinadaki GFAP immün reaktivitesi üzerine etkisi.

Grafiklerin Listesi

Grafik 1. Ratlarda zamana göre Göz İçi Basıncı (GİB) değişimi

Grafik 2. Gruplara göre total Retinal Ganglion Hücre (RGH) sayıları

Grafik 3. Gruplara göre Retinal Ganglion Hücre (RGH)' de Apoptozis Oranları

1.GİRİŞ

Glokom geri dönüşü olmayan en önemli körlük nedenlerinden biridir. Glokom ilerleyici retinal gangliyon hücre (RGH) hasarına ikincil ilerleyici görme alanı kaybının eşlik ettiği nörodejeneratif bir hastalıktır. Artmış göz içi basıncı (GİB) RGH ölümüne neden olan en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Ancak bazı olgularda yeterli GİB düşüşü sağlanmasına rağmen, görme alanı kaybında ilerlemeler görülebilmektedir ve glokom progresyonunda GİB yüksekliğinden başka faktörlerin de etkili olduğunu düşündürmektedir.

Retinal gangliyon hücreleri ve optik sinir santral sinir sisteminin bir parçası olarak kabul edilmekte ve glokomdaki gangliyon hücre ölümleri parkinson, amiotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer hastalığı gibi nörodejenratif hastalıklarla benzerlik göstermektedir. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan nöroprotektif ajanların nöroprotektif etkileri; glokom tedavisinde hasarlanmış RGH' lerin iyileştirilmesinde ve ikincil sinir kayıplarının önlenmesi amaçlanarak birçok çalışmada araştırılmaktadır.

Glokomatöz nöropatinin yalnız retinayı etkilemeyip, santral sinir sistemi hasarı da oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. GİB yüksekliği sonrasında lateral genikulat nükleus (LGN) ve görsel kortekste nöron kaybı, azalmış metabolik aktivite ve sinaptik plastisite markerlarında değişiklikler meydana gelmektedir.

HMG-CoA redüktaz inhibitörü olarak hiperlipidemi tedavisinde kullanılan statinler, iskemik inme, Alzheimer hastalığı, inflamatuvar santral sinir sistemi hastalıkları gibi akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Ratlarda serebral arter tıkanıklığı ile oluşturulan akut inme modelinde simvastatin uygulaması ile nörolojik kayıplarda azalma gösterilmiştir. Statinler nöroprotektif etkilerini endotelial ENOS indüksiyonu, metalloproteinaz inhibisyonu, lokal anti-oksidan etki, anti-inflamatuvar etki, heat-shock protein aktivasyonu gibi farklı mekanizmalarla göstermektedir.

Çalışmamızda, ratlarda kronik glokom modelinde sistemik ve/veya intravitreal rosuvastatin uygulamasının RGH üzerine nöroprotektif etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glokomda Nöron Koruyucu Tedavi

Multifaktöryel nörodejeneratif bir hastalık olarak kabul edilen glokom, dünyada körlük nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır (1-4).

Kronik ve ilerleyici RGH ve aksonların kaybı ile karakterize olan glokomda, ciddi görme alanı ve görme keskinliği kayıpları gelişebilmektedir. Geçmiş zamanlarda GİB yüksekliğinin sebep olduğu düşünülen bu hastalıkta, günümüzde GİB' in sadece bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Tedavide tek silah GİB' i düşürmek gibi görünse de (5-6), GİB yeterince düşürülmesine rağmen, optik sinir hasarında ilerleme gözlenen olgulara rastlanabilmektedir (7-9).

Glokomun patogenezinde, GİB' in mekanik etkisi, genetik faktörler, nörotrofik faktörlerin eksikliği, eksitoksisite, artmış oksidatif stres, immünolojik faktörler, vasküler yetmezlik, otoregülasyon bozukluğu, nitrik oksit (NO) nörotoksitesisi, ekstraselüler matriks artmış rijiditesi gibi pek çok faktör rol oynamaktadır (10-14). Bu faktörlerin etkisi ile nöral hücrelerde mitokondriyal fonksiyon bozukluğu gelişmekte ve apoptozis yani programlanmış hücre ölümü neticesinde glokomatöz hasar meydana gelmektedir (15-16).

Nöron koruyucu ilaçlar, multiple skleroz (MS), Alzheimer hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Parkinson gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda kullanılmaktadır (17). Nöron koruyucu ilaçların glokom hastalığında kullanımı ise, son yıllarda yoğun bir biçimde gündeme gelmektedir (15,18). Bu ajanlar glokomatöz nöropati patogenezinde rol oynayan pek çok faktöre etki edebilmekle birlikte, çoğunun etkisi deneysel çalışmalarla gösterilmiş olup, klinik kullanımları bulunmamaktadır. Nöron koruyucu ilaç denilebilmesi için bu ajanların RGH ve optik sinirde spesifik hedefleri bulunmalı, ayrıca RGH yaşamına olumlu etkileri deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmelidir.

2.1.1.Eksitoksisite: Glutamik Asit ve Glutamik Asit Reseptörlerini Hedefleyen Ajanlar

Bir amino asit olan glutamik asit (GA), merkezi sinir sistemi (MSS) ve retinada, özellikle heyecan, stres gibi durumlarda hücreler arası iletişimi sağlayan önemli bir nörotransmitter olup, fizyolojik dozu aştığı durumlarda nörotoksik etkisi bulunmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada, glokom ile yüksek GA düzeyi ilişkisi gösterilmiştir (19-21). Glokom patogeneğinde tetikleyen ilk mekanizmanın GİB yüksekliği ve bazı vasküler faktörler olduğu ileri sürülmekte ve bu faktörlerin nöral ve glial hücrelerde fazla miktarda GA üretimine sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca metabolizmaları bozulmuş ve strese girmiş olan bu hücreler, fazla GA' yı sinaptik ortamdan uzaklaştıramamakta ve bu da kısır döngüyü artırarak eksitoksisiteye neden olmaktadır (15). GA' nın primer reseptörleri , N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleridir. Bu reseptörlerin GA ile uyarımı ile, hücre dışı kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) hücre içine girmekte ve eksitoksisite ve apoptozis ile sonuçlanan bir seri reaksiyon gelişmektedir.

Bir dopaminerjik amantadin derivativesi olan memantin, NMDA reseptörlerinin orta afinitede non-kompetatif antagonisti olup, açık kanal blokajı yapmaktadır. Normal nöronal fonksiyonları bozmazken, ancak GA' nın fizyolojik dozu aştığı durumlarda etkili olarak hücre içine Ca^{+2} girişine engel olmaktadır (22). Glokom deneysel hayvan çalışmalarında, memantin cilt altı ve intraperitoneal ve oral kullanımında, nöron koruyucu etkisi gösterilmiştir (23-24). Bu çalışmalar sonucunda GA' nın nöral hücrelerde, önce nükleus sonra diğer organeller ve en son hücre zarının tahrip olduğu sekonder dejenerasyonu önlediği bildirilmiştir. İnsanlar üzerinde faz 3 klinik çalışması halen devam etmekle birlikte, henüz yayınlanmamış sonuçlara göre, plasebodan etkinlik farkı bulunmamıştır. NMDA reseptörleri hem RGH hem de amakrin hücrelerde bulunmasına rağmen, glokomda sadece RGH'nin, glokom dışı nöropatilerde ise her iki hücre tipinin de tahrip olması, bu çelişkili sonucu doğrulamaktadır.

2.1.2. Nörotrofik Faktörlerin Eksikliğini Gidermeyi Hedefleyen Ajanlar

Nöronlar yaşamlarını sürdürebilmek için, retrograd aksoplazmik akım ile elde ettikleri nörotrofik büyüme faktörlerine gereksinim duymaktadır. Bu faktörler nöral hücrenin yaşam sinyallerini artırırken, apoptozisi inhibe etmektedir.

Glokomda, lamina kribrosa rijiditesinin artması ve vasküler yetersizlikten dolayı, aksoplazmik akım yavaşlamakta ve hatta durmaktadır (15,25). Bu büyüme faktörlerinden

başlıcaları; beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-3 (NT-3), ve nörotrofin-4 (NT-4)' tür. Bu faktörleri elde edemeyen RGH' de bir süre sonra ölüm gerçekleşmektedir. BDNF ve NGF' nin yüzey reseptörleri TrkA ve TrkB, ayrıca tüm nörotrofinlerin ortak reseptörü p75NTR retinada gösterilmiştir (15,25). Deneysel optik sinir yaralanmaları ve glokom hayvan çalışmalarında, nörotrofik faktörlerin intravitreal (iv) enjeksiyonu ve optik gliomlu bir olguda NGF' nin damla formunda kullanımı ile nöron koruyucu etkiler gösterilmiştir (26-28).

2.1.3. Nitrik Oksit Nörotoksitesini Hedefleyen Ajanlar

Nitrik oksit (NO), arjininden nitrik oksit sentetaz (NOS) ile üretilen bir serbest radikal olup, pek çok nörodejeneratif hastalık gibi glokom patogeneğinde de önemli rol oynadığı düşünülmektedir (15). Fizyolojik bir vazodilatör görevi görerek, optik sinir kanlanmasını artırıcı yani nöron koruyucu etkiye sahip olduğu gibi, yüksek dozlarda ise nörotoksite etkisi göstermektedir (15).

Üç tip NOS mevcuttur:

Tip 1 (NOS-1 ya da nNOS) nöronal tip olup, glokomlu gözlerde lamina kribrosada gösterilmiştir (30).

Tip 2 (NOS-2 ya da iNOS) indüklenen tip olup, GİB yüksekliği ve eksitotoksite gibi stres durumlarında aktive olmaktadır.

Tip 3 (NOS-3 ya da eNOS) ise endotelial tiptir.

Glokomda lamina kribrosa seviyesinde aksonal harabiyet sonucunda, optik sinir başındaki reaktif astrositler, mikrogial ve nöral hücrelerden, fazla miktarda NO sentezlendiği, en çok NOS-2 olmak üzere üç tip NOS' un da aktivasyonunu arttığı bildirilmiştir (15,31-32).

Yüksek NO düzeyi, serbest radikal oluşumu, NMDA reseptör aracılı hücre içi Ca^{+2} alımı ve Bad-Bax protein uyarımı ile apoptosis indüklemesi yolu ile nöral hasara sebep olmaktadır. Spesifik bir NOS inhibitörü halen bulunmamaktadır.

Genel bir glikolizasyon inhibitörü olan aminoguanidinin, esas NOS-2 ve kısmen NOS-1 inhibisyon etkisi olmakla beraber, deneysel glokom çalışmalarında plasebodan farkı gösterilememiştir (15,33).

2.1.4. Apoptosis İnhibisyonunu Hedefleyen Ajanlar

Programlanmış hücre ölümü olan apoptosis; hücrenin önce nükleer içeriği, ardından diğer organelleri ve en son zarının harap olduğu, yavaş gelişen sekonder dejenerasyonudur (15). Hücre zarının harabiyeti sonucunda hücrenin şişerek hızlı ölümü, yani primer dejenerasyondan farklılık göstermektedir. Apoptosisi intrinsik ve ekstrinsik bazı olaylar tetiklemektedir.

İntrinsik faktörler, NMDA aracılı hücre içi Ca^{+2} girişi ve eksitotoksitedir. Ekstrinsik faktörler ise TNF-alfa ve FasL gibi ölüm reseptörlerinin uyarılması ile gerçekleşmektedir (15).

Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal zara bağlı olan hücre içi apoptosis düzenleyicileridir. Bunlardan Bcl-2 ve Bcl-XL apoptosisi inhibe ederken, Bad, Bax ve Bid ise apoptosisi indüklemektedir.

Glokomda apoptosisi önlemeye yönelik tedavi, apoptosis karşıtı hücre dışı sinyaller ile düzenlenen özel kinazların (ERK ve Akt) aktivasyonu sonucunda, Bcl-2 ve Bcl-XL' i arttırmak yoluyla gerçekleşebilir. Daha sonraki bölümlerde daha detaylı anlatılacağı gibi, brimonidin ve bir keton cismi olan lityum asetoasetat, bu şekilde nöron koruyucu etki göstermektedir.

2.1.5. Oksidatif Stres İnhibisyonunu Hedefleyen Ajanlar

Hücrelerde hergün binlerce oksidatif reaksiyon meydana gelmekte ve bunun sonucunda serbest radikaller oluşmaktadır. Kuvvetli reaktanlar olan serbest radikaller, elektron kaybetmiş oksijen kaynaklı ürünler olup (Ör: H_2O_2 , O_2^- , OH^-), elektron açlığı çekmektedir.

Bundan dolayı başta hücre zarı olmak üzere pek çok yapı ile hızla reaksiyona girerek, protein yıkımı, lipid peroksidasyonu ve nükleik asit dejenerasyonuna sebep olmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bunlara ihtiyaç duydukları elektronu vererek hücrelere yapacağı zarara engel olabilecek antioksidanların varlığı, tüm hastalıklarda olduğu gibi glokomda da çok önemlidir. Süperoksit dismutaz, katalaz, askorbik asit ve redükte glutatyon vücudun doğal antioksidan sistemleridir (15, 34-35).

Glokomda, iskemi ve eksitotoksisite nedeniyle strese girmiş ve metabolizması artmış RGH ve reaktif glial hücrelerde serbest radikal oluşumu artar (15).

Ayrıca glokom ile ilgili yapılan pek çok çalışmada antioksidan eksikliği bildirilmiştir (34-35). Glokomda bir antioksidan olan alfa Tokoferol (Vitamin E) ile ilgili pek çok deneysel ve klinik çalışma bulunmaktadır (36-38). Diet ile vitamin E alımı az olan ratlarda daha fazla RGH harabiyeti (37), Vitamin E tedavisi alan glokom olgularında oküler kan akımlarının daha fazla olduğu gösterilmiştir (38). Egb 761 Ginkgo Biloba ağacının yapraklarından elde edilen potansiyel bir antioksidan maddedir (39-41). Sağlıklı bireylerde oküler kan akımını arttırdığı gösterilmiştir (39).

Normal basınçlı glokom olgularında kullanımının, görme alanı üzerinde olumlu etkileri bildirilirken, GİB üzerine etkisi gösterilememiştir (40).

2.1.6. İmmünite İle İlgili Mekanizmaları Hedefleyen Ajanlar

Glokomun bir otoimmün hastalık olup olmadığı sorusu, yıllardan beri gündeme gelmekte, antijen olarak da ısı şok proteinleri (HSP) ve miyelinizasyon ile ilgili proteinler düşünülmektedir (15). HSP stres proteinleri olup, pek çok hücre hücre tarafından özellikle ısı değişimi, anoksi, beslenme bozukluğu gibi durumlarda sentezlenmektedir. Bu proteinler vücudun savunma mekanizmalarından birini teşkil etmektedir.

Bu proteinlerin glokomlu olgularda ve deneysel çalışmalardaki hayvanlarda fazla salındığı bildirilmiştir. Ancak glokomda artmış düzeyleriyle, ters etki olarak antijenik uyarım yaptığı ileri sürülmektedir (42).

Glokomda, optik sinirde lokalize immün sistem aktivasyonu olduğu ve özellikle aktive T lenfositlerin hastalığın patogenezinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Bu da, glokom tedavisinde aşılama ve immünomodülasyon tedavilerini akla getirmektedir (15).

Myelin bazik proteine (MBP) spesifik T lenfositlerin pasif transferi ile, optik sinir bölgesindeki antijenik proteinlerin etkisiz hale getirilmesi bir tedavi yaklaşımıdır. Ayrıca bu şekilde, lokal immünite uyarılarak mikrogial hücrelerin aktivasyonu ve RGH yaşamı için bazı desteklerin sağlanması amaçlanmaktadır (42).

Aktif immünizasyon yani aşılama ise, glatiramer asetat proteini kullanılır. Lokal antijenik protein transferi ile bunun otoantijenleri taklit etmesi, otoimmünite kazanmış T

lenfositlerle çapraz reaksiyona girerek RGH harabiyetine engel olduğu düşünülmektedir. Bu aşılamanın MS hastalığı için FDA onayı mevcuttur (43).

2.1.7. Kalsiyum ve Diğer İyon Kanalları ve Renin Anjiyotensin Sistemini Hedefleyen Ajanlar

Vücutta reseptör aracılı (r: NMDA reseptörü), voltaj bağımlı ve depo kontrollü olmak üzere üç tip Ca^{+2} kanalı bulunmaktadır. Özellikle reseptör aracılı Ca^{+2} kanalları, glokom patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Glokomda kalsiyum kanal bloker' lerinin kullanımı, esas olarak kan dolaşımını arttırmaya yönelik olsa da, deneysel çalışmalarda eksitotoksisiteye engel olarak nöron koruyucu etkileri gösterilmiştir (44-46). Özellikle normal basıncılı glokom ile ilgili klinik çalışmalarda, dolaşımı arttırıcı etkileri bildirilmiştir (46). Ayrıca bu ilaçlar, bu etkilere ilaveten, endotelin-1 (ET-1) salınımını azaltarak, ET-1' in kan dolaşımını ve aksoplazmik akımı azaltıcı etkilerine de engel olmaktadır (44).

Voltaj bağımlı sodyum (Na^{+}) kanallarının blokajının da, nöron koruyucu etkileri gündeme gelmektedir (33,47). Bir antiepileptik olan ve Na kanal inhibisyonu yapan fenitoinin, deneysel çalışmalarda RGH yaşamı üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (47). Renin-anjiyotensin sistemi (RAS), sistemik kan basıncı kontrolü ve elektrolit dengesinde önemli bir yere sahiptir.

Anjiyotensin-1' i anjiyotensin-2' ye eviren anjiyotensinojen konverting enzim inhibitörlerinin (ACE) kan dolaşımını arttırıcı etkileri yanında, kininaz 2 enzim blokajı ile bradikinin düzeyini arttırıcı ve bu etkiyle prostaglandin sentezini arttırıcı, GA sentezini ise azaltıcı fonksiyonları bulunmaktadır (48). Bradikinin retinal nöral hücre kültürlerinde nöron koruyucu etkileri, ayrıca deneysel çalışmalarda, eksitotoksisiteye engel olarak nöron koruyucu etkinlikleri gösterilmiştir (49).

2.1.8. Biyoenerjik Tedavi Yaklaşımları

Glokomda, mitokondriyel fonksiyonların bozularak hücre için gerekli enerjinin yeterince üretilemediği ve bunun da RGH yaşamı üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir (15).

Biyoenerjik tedavi yaklaşımları, mitokondriyel fonksiyonlara etki ederek ATP üretimini arttırmaya yönelik yöntemlerdir. ALS ve Parkinson hastalığında, beyin travmaları ve deneysel glokom modellerinde nöron koruyucu etkileri gösterilmiştir (50-51).

2.2. Anti-Glokomatöz Ajanlar

2.2.1. Brimonidin Tartrat: Bir alfa-2 mimetik adrenerjik ajan olan brimonidin, GİB düşürme yanında nöron koruyucu etkisi, deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Nöron koruyucu etkinliği, esas olarak hücre dışı sinyaller ile düzenlenen özel kinazların (ERK ve Akt) aktivasyonu sonucunda, anti-apoptotik protein olan Bcl-2'yi arttırmak yoluyla gerçekleşmektedir.

Bunun yanında özel protein kinazları uyararak apoptotik yolları inhibisyon, nörotrofik faktör salınımı, GA salınım inhibisyonu ve doğrudan NMDA reseptör inhibisyonu gibi etkileri de bulunmaktadır (18,52-54).

Krupin ve arkadaşlarının düşük basınçlı glokom olgularında bromidin kullanan olgularda timolol maleata oranla görme alanında daha az progresyon bildirmişlerdir (55).

2.2.2. Beta-Blokerlar: Betaksolol ve daha az olarak diğer beta-bloker ajanların, glokom deneysel çalışmalarında, nöron koruyucu etkileri bildirilmiştir. Voltaj bağımlı Ca ve Na kanal blokajı ile eksitotoksisteye engel olarak bu etkilerini gerçekleştirmektedir (56-57). Ayrıca klinik çalışmalarda, glokomlu olgularda oküler kan akımını arttırıcı etkilerine ek olarak, görme alanı progresyonuna yönelik olumlu etkileri de saptanmıştır (58).

2.2.3. Prostaglandin (PG) Analogları: Glokomda güçlü GİB düşürücü etkileri nedeniyle en çok tercih edilen ilaçlardan olan PG analoglarının, deneysel çalışmalarda, mekanizması net olarak aydınlatılmamasına rağmen, nöron koruyucu etkileri bildirilmiştir. Bu etkinin siklooksijenaz-2 aktivasyonuna negatif feedback etkisi ile eksitotoksisteyi önlemek yoluyla olduğu düşünülmektedir (59).

2.2.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri (KAİ): KAİ' nin GİB düşürücü etkilerinden bağımsız olarak, koroid ve optik sinir kanlanmasını arttırdığı bilinmektedir (59).

2.2.5. Diğer Tedavi Yaklaşımları

2.2.5.1.Östrojen: Erken menapozun primer açık açılı glokom için bir risk

faktörü olduğu ve hormon replasmanı alan kadınlarda oküler kan akımının daha iyi olduğu bildirilmiştir (60-61).

Bu sonuçlar da glokom ile östrojen arasında bir ters ilişkiyi akla getirmektedir. Retina ve koroidde östrojen reseptörlerinin bulunduğu bilinmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda östrojenin, eksitotoksisteyi engelleyici etkileri gösterilmiştir (62)

2.2.5.2. Melatonin: Deneysel glokom çalışmalarında, antioksidan özelliği nedeniyle, nöron koruyucu etkisi gösterilmiştir (63).

2.2.5.3. Aspirin: Antiinflamatuvar, dolaşım arttırıcı ve hipotermi etkisi nedeniyle, nöron koruyucu etkisi ne sürülmektedir (64).

2.2.5.4. Eritropoetin: Bir hematopoetik sitokin olup, glokom deneysel çalışmalarında, memantin benzeri nöron koruyucu etkisi gösterilmiştir (65).

2.2.5.5. Magnezyum (Mg): Bir fizyolojik Ca kanal bloker olan Mg' un kan akımını arttırıcı etkisi bilinmektedir. Aydın ve arkadaşlarının normal basınçlı glokom olguları ile yaptıkları klinik çalışmada, 1 aylık oral Mg preparatı alımının oküler kan akımı üzerine etkileri saptanmazken, görme alanı üzerine olumlu etkileri bildirilmiştir (66).

2.3. Deneysel Glokom Modelleri

Glokom patogenezinde en önemli risk faktörlerinden biri artmış GİB' dir. Glokom gelişiminde etkili olan ve retina hasarına yol açan mekanizmaların ayrıntılı bir şekilde anlaşılabilmesi için hızlı, ucuz ve tekrarlanabilir hayvan glokom modellerinin ihtiyaç duyulmaktadır (67). Geçtiğimiz 10-15 yılda, glokom çalışmalarında rodentler popüler model hayvan olarak kullanılmaktadır; kolay erişilebilirlik, göreceli olarak düşük maliyet, kısa yaşam süresi ve genetik ve deneysel manipülasyonlara uygun olmaları nedeniyle birçok in vivo ve in vitro glokom modeli geliştirilmiştir.

Günümüzde uygulanan deneysel glokom modellerinde GİB' de kronik artış indüklenmesi amaçlanmaktadır. Bu artış akkz hmrn gözden dışa akımının azaltılması ile sağlanabilmektedir. Akkz hümör drenajı, iki veya üç episkleral vene uygulanan koterizasyon (68) ya da ratlarda episkleral venlere hipertonic tuzlu su enjeksiyonu (69) ile bloke edilebilmektedir.

Ayrıca, laser enerjisi kullanılarak direkt trabeküler ağda (70); ya da hem trabeküler ağda hem de episkleral venlerde yanık oluşturulabilmektedir (71). Trabeküler aę düzeyinde akkz hümör drenajını bloke eden diğer yöntemlerde, gözün vasküler yapılarına manipülasyondan kaçınılmaktadır. Böylece, hayalet kırmızı kan hücreleri (72) ya da lateks mikrosferler (73) gibi farklı maddelerin n kamaraya enjeksiyonu ile trabeküler aę drenajı bloke olmaktadır. Ayrıca, tavşanlarda n kamaraya viskoelastik madde enjeksiyonu sonrasında trabeküler ağda mekanik tıkanıklık sonucunda GİB' de artış sağlanmıştır (74-76).

2.3.1. Episkleral Ven Koterizasyonu (EVK)

Ratlarda iki veya daha fazla episkleral vene koterizasyon uygulanarak; schlem kanalının toplayıcı yollarından akküz hümör drenajını bozarak, kronik yükselmiş GİB elde edilebilmektedir (68). Bu modelde koterize edilen episkleral ven sayısı ile basınç artışı arasında korelasyon bulunmaktadır. Bir episkleral ven koterizasyonu GİB’ de belirgin bir artış sağlamazken; iki veya üç ven koterizasyonu sonrası kontrol gözlerde 10-15 mmHg olan GİB 20 mmHg’ li değerlere yükselmektedir. Dört ven koterizasyonu sonucu GİB 60 mmHg değerlerine ulaşmaktadır. Üç vene koterizasyon uygulaması ise GİB’ de 50 mmHg değerlerine kadar yükselip, sonrasında en az 2 ay süre ile 20-30 mmHg düzeylerinde devam etmektedir. Bu GİB yüksekliği ile RGH’ de haftalık % 4-10’ luk ortalama kayıp meydana gelmektedir (77) ve oküler hipertansiyonun indüklediği RGH ölümünde apoptozis aracılı gerçekleştiği gösterilmiştir (78).

Morrison ve arkadaşları, EVK modelindeki patofizyolojinin daha önce tanımlanmış iki oküler hipertansiyon modelinden farklılık gösterdiğini ileri sürmüşler (79-80). Koterizasyon sonrası GİB’ in hızlı yükselişinde, oküler venöz konjesyonun oküler hipertansiyona belirli bir oranda katkıda bulunduğu hipotezi ileri sürülmüştür (81). Bu oküler hipertansiyonda yegane mekanizma olmayıp, ESK uygulanan fare modellerinde akküz hümör dış akımında da tıkanıklık gösterilmiştir (82). Ayrıca, bu modelde indüklenmiş RGH ölümü paterni de farklılık göstermektedir. Diğer iki modelde aksonal dejenerasyon optik sinirin superior bölgesinde meydana gelirken, EVK ile retinanın tamamında yaygın RGH kaybı oluşmaktadır (83). Morrison kümülatif GİB maruziyeti normalize edildiğinde RGH kaybı ve yaygınlığının EVK da diğer iki modele göre daha düşük olduğunu retrospektif olarak gözlemiş ve göz içinde farklı stres faktörlerinin altta yatan neden olabileceğini ileri sürmüştür (79).

2.3.2. Rodentlerde GİB ölçümü

Farklı glokom modelleri ile elde edilen GİB yüksekliğinin süresi ve miktarının, RGH kaybı, optik sinir hasarı ve fonksiyonel görme kaybı ile aralarında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Oküler hipertansiyon modellerinden elde edilen verileri yorumlayabilmek için canlı hayvanlarda yapılan doğru ve kesin GİB ölçümü önemli yer tutmaktadır. Rodentlerde GİB ölçümünde kullanılan en iyi direkt ölçüm metodunda; ön kamara mikro iğne yardımıyla kanüle edildikten sonra, basınç probu ile sıvı manometre ile ölçüm yapılabilmektedir (84). Bu altın standart yüksek doğrulukta olan tekniğin invaziv metod olması nedeniyle bazı sınırlılıkları mevcuttur. Korneadaki kanülasyon bölgesinin ölçümler arasında iyileşmiş olması gerekmektedir. Ayrıca, genel anestezi altında yapılması gerekli bu yöntem ile bazı olgularda

GİB hızlı ve kademeli düşmektedir (85,86). Ancak anesteziğin etkisi uygun önlemler alınarak minimuma indirilebilmektedir.

İnvaziv yöntemlerin sınırlılıklarının üstesinden gelmek için rodentlerde invaziv olmayan tonometri yöntemleri uygulamaya geçmiştir. Goldmann tonometri ve pnömotonometrinde yapılan modifikasyonlar ile rodentlerde GİB ölçümü yapılabilmesine rağmen; bu yaklaşımlar kullanışlı değildir. Tonopen rodentlerde başarılı bir şekilde kullanılmaya başlamış ancak; insan için tasarlanan ve göreceli olarak geniş olan geniş uç nedeniyle farelerde daha az güvenilir sonuçlar elde edilmiştir (87). Son yıllarda bilinci açık rodentlerde daha yüksek güvenilirlikte GİB ölçümü yapan bir darbe-indüksiyon tonometre olan TonoLab geliştirilmiştir. TonoPen, TonoLab ve mikro iğne manometri karşılaştırıldığında, TonoLab' ın daha doğru ölçümler sağladığı görülmüştür (88-89). Ancak daha düşük GİB değerlerinin ölçümünde TonoLab değerlerinin doğruluğu konusunda çelişkili sonuçlar olmakla birlikte; ratlarda orta GİB değer değişikliklerinde TonoPen, TonoLab' ın tespit edemediği ölçümleri yapabilmektedir (83). Hem TonoPen hem TonoLab ile güvenilir ölçümler elde edebilmek için araştırmacıların kullanma eğitimi almaları gerekmektedir.

2.4. Glokomda Glial Cevap

Glial hücrelerin, sinir sisteminin bir parçası olan optik sinir ve retinada önemli yapısal ve fonksiyonel görevleri bulunmaktadır. İnsan göz dokularında farklı glial hücre çeşitleri mevcuttur. Optik sinir başındaki glial hücreler; astrositler, oligodendrositler ve mikrogial hücrelerden oluşmaktadır. Retina da ise esas glial hücreler, Müller hücreleri ve astrositlerdir. Müller hücreleri retinada ışınal yerleşmiş olup; ayaksız uç kısımları iç ve dış limitan membranı meydana getirmektedir. Astrositler ise foveal avasküler zon gibi vaskülarize olmayan alanlar haricinde retinanın tamamında dağılmışlardır. Uzun asosit uzantıları sinir lifi tabakasının içinde ganglion hücre aksonları ile birlikte paketlenmiş bandlar oluştururken; yıldız astrositler ganglion hücre tabakası seviyesinde bal peteğini andıran plexus meydana getirir (90-91).

Glokom nöropatolojisinde; retina ve OSB' deki glial hücreler "glial aktivasyon" olarak adlandırılan süreçte, protein ekspresyonu ve morfolojilerini değiştirir. Hücre lokalizasyonu ve tipine göre aktivasyon özellikleri farklılık göstermektedir. Deneysel olarak

GİB yüksekliği ile hasarlanmış retinadaki astrosit ve müller hücrelerinde glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonu artmaktadır. OSB’ deki glial nukleusların normal kolumnar dağılımı bozulur ve ekstraselüler matriks protein ekspresyonu artmaktadır. Sonunda aksonal debrisler fagosite edilir, nöral alan kontrakte olur ve yerini GFAP pozitif astrositik skara bırakır (92). Normal koşullar altında astrositler ve müller hücreleri; ekstraselüler iyonlar, glukoz ve diğer metabolitler, su, ph ve glutamat ve GABA gibi nörotransmitter maddelerin homostasisinin idame ettirilmesinde rol alır. Ayrıca kan-beyin bariyerine de katkıları bulunmaktadır (93). Hasarlanmamış nöral dokularda beynin immün hücresi olan mikroglialar, mikroçevrelerinde hareketli uzantıları sayesinde dolaşır. Travmayı takiben mikroglial hücreler hipertrofiye uğrar ve hasarlanmış alandaki debrisleri uzaklaştırarak proliferer olur, antijen sunucu hücre gibi davranarak sitokin salgılamaya başlar. Kan-beyin bariyerini bozan travmatik yaralanmaların aksine; glokomda inflamatuvar hücre invazyonunu destekleyen veri bulunmamaktadır (94).

Glial hücrelerin glokomatöz aktivasyonunda, bu süreçteki olayların etkilerinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi önemlidir. Kuramsal olarak, iskemik koşullarda daha önce gösterilmiş olduğu gibi, glial hücrelerin normal destekleyici fonksiyonlarının artması, RGH ve aksonları daha fazla hasardan koruyabilir (95). Bir başka seçenek ise; beyin iskemisi sonrası reperfüzyona bağlı glutamat eksitotoksitesinde gösterilmiş olduğu gibi, glial aktivasyon daha fazla hasara yol açacak yolları tetiklemesi olabilir (96-97).

Glokomatöz retinada glial aktivasyonu RGH üzerinde hem hasarlayıcı hem de koruyucu etkileri olduğu ileri sürülmüştür (98-100). Glokomlu gözlerin retinal kesitleri değerlendirildiğinde, glial hücrelerde mitojen aktive protein kinaz boyanmasında artış olduğu ve bu yolların glial aktivasyondan sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca bu yolların aktivasyonunun hücre surveyi ile ilişkili olduğu ve glokomatöz retinada RGH ile karşılaştırıldığında glial hücrelerde kinaz aktivasyonu olmadığı için glial hücreler göreceli olarak korunmaktadır (101). Hasarlanmış retinada glial hücrelerin yaşam süresinin artması, destekleyici fonksiyonlarının sürdürülmesine olumlu katkı sağlamaktadır. Artmış GİB maruziyeti sonrasında; müller hücrelerinde, anti-apoptotik bir protein olan, bcl-2 ekspresyonunun artmış olduğu gözlenmiş ve böylece müller hücre yaşam süresinin ve fonksiyonlarını iyileştirdiği ve dolaylı yollardan da RGH’ ni koruduğu ileri sürülmüştür (102). Glial hücreler nörotrofik maddeleri sağlayarak da RGH üzerinde koruyucu etkileri bulunmaktadır (103).

Deneyisel GİB artışı sonrasında, retinanın tamamında mikrogial hücre sayı ve boyutunda artış ile karakterize retinal mikrogial aktivasyon da olmaktadır (98,104). Genetik fare glokom modelinde iç retinada mikrogial hücre proliferasyonu gösterilmiştir. Bu cevapların, nöronal markerlarda azalma ile korelasyon gösterdiği ve müller hücre cevabında olduğu gibi glial cevabın glokomatöz glial dejenerasyonla kuvvetli ilişkili olduğu düşünülebilir. Ancak; glial cevaplar ya RGH ölümünde anahtar rol oynamakta ya da hücrel debrislerin uzaklaştırılması gibi nöronal hasara ikincil reaksiyon olarak rol oynamaktadır.

GFAP, sıklıkla astrosit markerı olarak kullanılmakta olan yalnızca müller hücrelerinde eksprese edilen filaman proteindir. Normal gözlerde retinal astrositler GFAP antikoru ile boyanma gösterirken, Müller hücrelerinde az miktarda boyanma olmaktadır (98). İskemi ve makula dejenarasyonu gibi çeşitli retina patolojilerinde artmış GFAP ekspresyonu olmakta ve glial aktivasyonun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Deneyisel ve genetik glokom modelleri ile birçok araştırmacı, GFAP ekspresyonu artışını hem müller hücrelerinde hem de retinal astrositlerde göstermiş olsa da (98,100-102); retinal astrositlerde azalmış ekspresyonu gösteren çalışma da mevcuttur (105). Glokomlu insan retinalarında GFAP ile boyanmış astrositlerin peripapiller bölgede damarlanma ile ilişkili olarak artmış hücre yoğunluğu gösterilmişken, sinir lifi tabakasındaki astrositlerde değişiklik gözlemlenmemiştir (106).

2.5. Statinler

2.5.1. Statinlerin Farmakolojisi

Statinler, 3-hidroksi-3-metilgluteral koenzim A (HMG-Koa) redüktaz inhibitörleri, kolesterol düşürücü ilaçlar olarak yaygın kullanılmakta ve klinik çalışmalarda primer ve sekonder kalp hastalıkları insidansında azalma sağladıkları gösterilmiştir (107-108).

Statinler, kolesterol sentezinde bir ara ürün olan L-mevalonat sentezinde görevli olan enzimi bloke ederek etki göstermektedir. Ancak son çalışmalarda kolesterol düşürücü etkinin sadece mevalonat yoluna bağlı olmadığı; hücre sinyalinde etkili mekanizmaların da önemi bildirilmiştir (109-110).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, statinlerin nöroprotektif etkinliği üzerinde durulmaktadır. Statin tedavisi alan hastalarda alzheimer hastalığı insidansında azalma

sağladığı bildirilmiştir. Bu ilişki hakkında farklı görüşler bildirilmiş olsa da, birçok çalışmada statinlerin amiloid peptid beta üretimini azalttığı in vitro gösterilmiştir (111-112). Ayrıca son çalışmalarda, statinlerin Parkinson hastalığı insidansı üzerine olan beklenilmedik etkileri de bildirilmiştir (112-114). Son çalışmalarla hayvan modellerinde statinlerin multiple skleroz hastalığı tedavisindeki (115-118) ve akut inme modellerindeki (119-121) olumlu etkileri gösterilmiştir.

Statinlerin birincil etkileri hücrel kolesterol sentezi inhibisyonu olmakla birlikte, kolesterol sentez yolağında üretilen non-sterol isoprenoidler gibi birçok ara ürünün hücrel fonksiyonlarda önemli etkileri bulunmaktadır. Ayrıca düşük kolesterol seviyeleri ile kolestrolde zengin hücre membran yapılarını azaltarak hücrel haberleşmeye etkileri olabilmektedir.

Statinler hem kolestrol bağımlı hem kolestrol bağımsız etki göstermekte ve farklı nöroproteksiyon yollarını aktive edebilmektedir: beyin kaynaklı nörofaktör (BDNF) üretimi ve PKB/Akt, Wnt ve ERK yolları aktivasyonu.

2.5.2. Statinlerin sistemik etkileri

Tüm statinlerin kan-beyin bariyerini geçebilme özelliği olmasa da, periferik etkileri ile nörolojik etki gösterebilmektedir. Statinlerin nöroproteksiyon sağlayan üç farklı periferik etkileri bulunmaktadır: 1) oksidatif hasarı azaltma 2) vasküler fonksiyonda iyileşme ve 3) periferik inflamatuvar cevabın modülasyonu

2.5.2.1. Oksidatif hasarı azaltma

Statinlerin hücre ve dokularda oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri doku kültürlerinde in vivo modellerde (122-125), ve bir klinik çalışmada (126) gösterilmiştir. Nöronlarda lipid peroksidasyonunu, reaktif oksijen radikal üretimini azaltarak ve NO üretimini düzenleyerek etkili oldukları gösterilmiştir.

2.5.2.2. Vasküler fonksiyonda iyileşme

2.5.2.2.1. Nitrik oksit üretimi regülasyonu

Bir oksijen radikali olan NO vasküler sistemde sinyal molekülü olarak fonksiyon göstermektedir. NO lokal etki göstererek vasodilatasyona neden olarak kan akımını artırmaktadır. NO üç enzim tarafından oluşturulmaktadır: endotelial NO sentetaz (eNOS),

nöronal NO sentetaz (nNOS) ve indüklenabilir ya da inflamatuvar NO sentetaz (iNOS). İskemik sürecin erken dönemlerinde eNOS aktive olarak vasodilatör etkisi ile koruyucu mekanizmayı oluşturmaktadır. İskemik uyarının devam etmesi halinde nNOS ve iNOS aktive olarak NO fazla üretimi oksidatif hasara neden olmaktadır (127,128).

Statinler erken dönemde eNOS ile yararlı NO sentezini artırırken, geç dönemde iNOS inhibisyonu ile NO fazla üretimini azaltarak etki göstermektedir.

2.5.2.2.2. Koagülasyon inhibisyonu

Statinler koagülasyon yolağını birçok noktada etkileyerek inme hasarından beyni korudukları bildirilmiştir. Plazminojenin plazmine dönüşümünü hızlandırarak fibrin pıhtının uzaklaştırılmasında etkilidir (129). Ayrıca statinler protrombin gibi koagülasyon yolağındaki proteazların aktivasyonunu inhibe ederek etkili olurlar (130).

2.5.2.2.3. Anjiogenesis üzerine etkileri

Statinler uzun dönemde neovaskülarizasyonu uyarak ve dolaşımdaki endotelial progenitor hücreleri uyarak kan akımında artışa neden olurlar (131,132).

2.5.2.3. İmmün cevabın düzenlemesi

İmmün cevap nörodejenerasyon patogeneğinde önemli rol almakta olup; Alzheimer, multiple skleroz ve Parkinson hastalığında önemli rol oynamaktadır (133). Statinlerin immün sistem üzerinde çeşitli etkileri olsa da; çalışmaların çoğunda statinlerin immün cevap aktivasyonunu ve dokulara hücre infiltrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Antijen sunma işleminin inhibe edilmesi, inflame dokulara lökosit migrasyonu ve infiltrasyonun azaltılması statinlerin etki noktalarıdır.

2.5.2.4. Statin tedavisinin davranışsal etkileri

Statinlerin nöroprotektif mekanizmalarını gözden geçirdikten sonra, statinlerin nörodejeneratif hastalıklarda fonksiyonel iyileşme sağlayıp sağlamadığı akıllara gelen sorulardan biridir. Çalışmaların büyük çoğunluğunda beyin hasarı öncesi ya da hemen sonrasında uygulanan statin tedavisinin öğrenme ve hafıza üzerinde olumlu etkileri bildirilmiştir (134-136).

2.5.2.5. Periferik inflamatuvar cevabın modülasyonu

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları

Long-Evans cinsi dişi ratlar, her birinin ağırlığı 290-330 gram, on iki saat aydınlık/ on iki saat karanlık döngüsünde, yem ve suya serbest ulaşım imkanı olan standart hayvan kafeslerinde bakımları yapıldı. Tüm cerrahi işlemler ve göz içi basınç (GİB) ölçümü intramusküler Ketamine HCl (20 mg/kg) ve Xylazine (2mg/kg) enjeksiyonu sonrası genel anestezi altında yapıldı. Hayvan bakımları ve tüm işlemler Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve Oftalmik ve Görsel Araştırmalarda Hayvanların Kullanımı protokollerindeki standart kılavuzlara uygun şekilde yapıldı. Oküler hipertansiyon modeli ratların sağ gözlerinde episkleral ven koterizasyonu (EVK) yolu ile oluşturuldu. Ratların diğer gözleri kontrol grubu olarak alındı. Ratlar her grupta 6 adet deney hayvanı olacak şekilde 5 gruba ayrıldı:

GRUP 1: Oral Statin

Herbir rata (6) **1mg/kg/gün** dozunda, **rosuvastatin** tabletler; havanda ezilerek serum fizyolojik (SF) içerisinde, gavaj yardımıyla 4 hafta boyunca verildi. Üçüncü haftada herbir ratın (6) sağ gözüne EVK ile glokom modeli oluşturuldu. Günde 4 defa topikal % 0,2 prednisolon disodyum asetat ve antibiyotikli damlalar uygulandı ve postoperatif 1. gün ve daha sonra haftada bir kere göz kontrolü yapılarak enfeksiyon varlığı değerlendirildi.

GRUP 2: İntravitreal (iv) Statin

Herbir ratın (6) sağ gözüne EVK ile glokom modeli oluşturuldu. DMSO ile çözünür hale getirilmiş 2 mikrolitre **rosuvastatin** (göz içerisinde 30µM konsantrasyonda) genel anestezi altında; 30G iğne yardımıyla ora serrata posteriorundan iv enjekte edildi. Günde 4 defa topikal % 0,2 prednisolon disodyum asetat ve antibiyotikli damlalar uygulandı ve postoperatif 1. gün ve daha sonra haftada bir kere göz kontrolü yapılarak enfeksiyon varlığı değerlendirildi.

GRUP 3: Oral Statin+İntravitreal (iv) Statin

Herbir rata (6) **1mg/kg/gün** dozunda, **rosuvastatin** tabletler; havanda ezilerek serum fizyolojik (SF) içerisinde, gavaj yardımıyla 4 hafta boyunca verildi. Üçüncü haftada herbir ratın (6) sağ gözüne EVK ile glokom modeli oluşturuldu. DMSO ile çözünür hale getirilmiş 2 mikrolitre **rosuvastatin** (göz içerisinde 30µM konsantrasyonda) genel anestezi altında; 30G iğne yardımıyla ora serrata posteriorundan intravitreal enjekte edildi. Günde 4 defa topikal %

0,2 prednisolon disodyum asetat ve antibiyotikli damlalar uygulandı ve postoperatif 1. gün ve daha sonra haftada bir kere göz kontrolü yapılarak enfeksiyon varlığı değerlendirildi.

GRUP 4: İntravitreal (iv) Sham (DMSO)

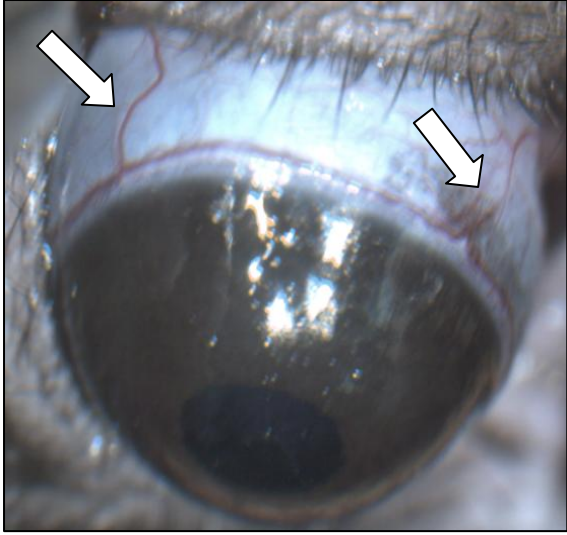
Herbir ratın (6) sağ gözüne 2 mikrolitre DMSO, 30G iğne yardımıyla ora serrata posteriorundan iv enjekte edildi. EVK ile glokom modeli oluşturulmadı. Günde 4 defa topikal % 0,2 prednisolon disodyum asetat ve antibiyotikli damlalar uygulandı ve postoperatif 1. gün ve daha sonra haftada bir kere göz kontrolü yapılarak ve enfeksiyon varlığı değerlendirildi.

GRUP 5: Kontrol

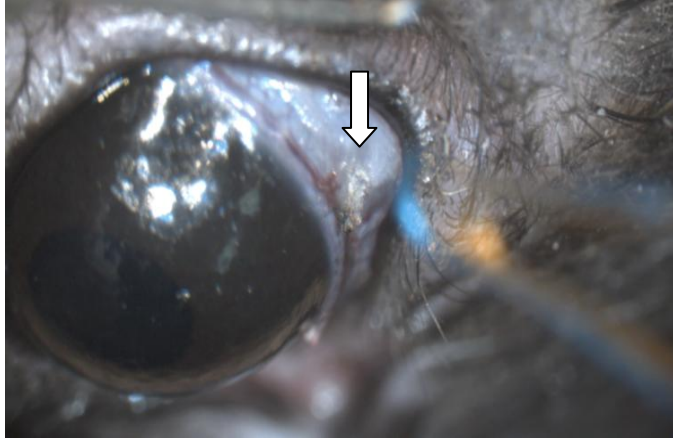
Herbir ratın (6) sağ gözüne EVK ile glokom modeli oluşturuldu. İv ya da sistemik ilaç verilmedi. Günde 4 defa topikal % 0,2 prednisolon disodyum asetat ve antibiyotikli damlalar uygulandı ve postoperatif 1. gün ve daha sonra haftada bir kere göz kontrolü yapılarak ve enfeksiyon varlığı değerlendirildi.

3.2. Ratlarda Glokom Modeli

Ratların sağ gözlerinde üç episkleral vene koterizasyon yapılarak glokom modeli oluşturuldu. Sol gözler kontrol grubu olarak belirlendi. Ketamin-xylazin karışımı (80:5 mg/kg) ile ratlarda derin anestezi sağlandı. Kapaklardan geçirilen traksiyon sütürleri ile gözün açık kalması sağlandı ve superior rektus altından geçirilen traksiyon sütürü ile glob manipülasyonu sağlandı. Konjonktiva insizyonunu takiben, künt diseksiyon ile limbus kaynaklı 4 ana venden 3 tanesi ekvator düzleminde açığa çıkarıldı. Herbir ven ince dişli penset yardımıyla kaldırıldıktan sonra, ven üzerine oftalmik cerrahi koter (Acuderm El Koterleri®, Leofarma Tıbbi Ürünler Ltd Şti.) ile direkt koterizasyon yapıldı. Başarılı koterizasyon işlemi; koterize edilen damar ucunda kanama görülmemesi ve hızlı bir şekilde retrakte olması şeklinde tanımlandı. Günde 4 defa topikal antibiyotikli damlalar enfeksiyon kontrolü için uygulandı.



Resim 1. Ratlarda superior ve medial episkleral venler



Resim 2. Episkleral ven koterizasyonu sonrası vende beyazlaşma ve büzüşme



Resim3.Ratın sağ gözüne genel anestezi altında episkleral ven koterizasyon uygulaması



Resim 4. Ratın sağ gözüne genel anestezi altında intravitreal rosuvastatin uygulaması

3.3. GİB Ölçümü

İntramuskuler Ketamine HCl (20 mg/kg) ve Xylazine (2mg/kg) enjeksiyonu sonrası yüzeysel genel anestezi altında, ratlarda elektronik el tonometresi (Tonopen Medtronic Solan, FL, USA) ile kornea yüzeyine dik olacak şekilde ardışık beş GİB ölçümü alındı. Değişkenlik katsayı değeri $< \% 5$ olarak belirlendi. Ortalama GİB değeri analiz için kullanıldı. İşlem öncesi 0.gün, 1.gün, 1.hafta ve 2 haftada bilateral GİB ölçümleri tekrarlandı.



Resim 5. Ratın sağ gözünün TonoPen ile göz içi basıncı (GİB) ölçümü

3.4.Doku Hazırlanması ve RGH Değerlendirilmesi

Ratlar yüksek doz pentobarbital verildikten sonra sakrifiye edildi. Retinanın tamamında RGH yoğunluğu değerlendirilmesi yapıldı. Rat gözlerine enükleasyon işlemi yapıldıktan sonra % 4' lük paraformaldehid içerisinde oda sıcaklığında fikse edildi. Ön segment yapılarının uzaklaştırılmasını takiben kalan posterior göz kasesi ayrıldı. Takiben göz kasesi periferine radyal dört kesi yapılarak dikkatli bir şekilde retina, retina pigment epitelinden ayrıldı. Düz kesitler elde edebilmek için, retina alttaki ilişkili yapılardan ayrıldı ve dört radyal kesi ile düzleştirildi. Formalinde fikse edilmiş parafine gömülü doku blokları kesilerek 4 mm' lik doku kesitleri elde edildi. Kesitler xylen ile deparafinize edilerek rehidrate edildi. Her örnek hematoksilin-eozin ile boyandı. RGH tabakasındaki hücreleri sayan patolog deney grupları açısından tek kör şekilde maskelendi. Posterior retinadan dört farklı alan 40x objektif (Olympus, BX51, Japan) ile değerlendirildi. RGH' deki hücre sayımı bu büyütmede 0.25 mm²' lik alanda değerlendirildi. RGH' deki hücre sayıları herbir alan için hesaplandı ve dört alandaki toplam hücre sayısı mm² olarak belirlendi. RGH tabakasındaki geniş yuvarlak hücre yapıları görüldüğünde, hücreler RGH olarak sınıflandı. OSB merkezinden retinanın uzak periferine uzanacak şekilde hücre sayımları horizontal düzlemde yapıldı. Hücre sayımı sırasında santral alanda kalmaya dikkat edildi. Sayım işlemi sırasında santral alanın altında ve üstündeki alanlar değerlendirilirken, en yüksek hücre yoğunluğunun sayım için seçildiğine dikkat edildi.

3.5. TUNEL boyama

Oküler hipertansiyon oluşturulmuş gözlerde ve kontrol grubu olan gözlerde ikinci hafta sonunda apoptotik hücreler TUNEL boyama ile değerlendirildi. Retina koroidden diseke edildikten sonra; superior ve nazal kadranın merkezi parçası optik diskten 1,5 mm uzaklıkta olacak şekilde, küçük parçalara ayrıldı; 50 µm' lik retina kesitleri alındıktan sonra % 4' lük paraformaldehidde fikse edilerek dengeli tuz çözeltisi ile yıkandı. Dokular TUNEL boyama ile üretici firma prokolündeki yöntemine uygun olarak boyandı (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7110, Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA). Bu yöntem, apoptotik kaskadın erken evrelerinde parçalanmış DNA' nın 3 hidroksi uçlarını tespit etmekte ve TUNEL boyamada hücre içi ayrılmış DNA' daki açığa çıkan 3 hidroksi uçlarına bağlanabilen diaminobenzidin kullanılmaktadır.

Metil yeşili (% 0,5) nükleer boyama için kullanıldı. Her bir kesitteki TUNEL pozitif hücrelerin yaygınlığı ve lokalizasyonu ışık mikroskobu (Olympus, BX51, Japan) altında

değerlendirildi. TUNEL-pozitif hücrelerin sayısının nicel analizi için, ganglion hücre tabakasındaki hücreler 3 veya daha fazla kesitte sayıldı. Her bir gruptaki farklı retinal kesitler için üç veya dört bağımsız test tekrarlandı. Her kesitteki ortalama hücre sayısı kullanılarak her bir tabakadaki apoptozise uğramış hücre oranları belirlendi.

3.6. GFAP İmmün reaktivitesi

Retinada GFAP immüno rektivitesi ikinci hafta sonunda oküler hipertansiyon oluşturulmuş gözlerde ve kontrol grubu olan gözlerde değerlendirildi. Retina koroidden diseke edildikten sonra; superior ve nazal kadranın merkezi parçası optik diskten 1,5 mm uzaklıkta olacak şekilde, küçük parçalara ayrıldı ve dengeli tuz çözeltisi ile herbiri on dakika olacak şekilde üç kez yıkandı. Yıkama sonrasında 50 µm' lik doku kesitleri elde edildi. Parafin kesitler deparafinize edilerek çeşme suyu ile yıkandı. Slaytlar % 3' lük H₂O₂ ile 10 dakika peroksidaz blokajı yapıldı. Distile sudan geçirildikten sonra ph 6.0 citrate buffer içinde mikrodalgada yüksek sıcaklıkta 20 dakika bekletilip sonra oda sıcaklığında 20 dakika daha bekletildi. PBS (fosfat buffer saline ph 7.6) ile 5 dakika yıkandı. Protein blok damlatılıp 10 dakika blokajı takiben bir gece oda sıcaklığında primer antikor (ABCAM GFAP antibody-Astrocyte Marker (ab4648) 100µl at mg/ml, United Kingdom) ile enkübe edildi. PBS ile 5 dakika yıkandıktan sonra Streptavidin/peroxidase complex damlatılıp 20 dakika bekleme süresinin ardından PBS ile 5 dakika yıkandı. Renkli tanımlama AEC kromojen damlatılıp 5 dakikalık beklenilerek tamamlandı. Slaytlar Mayer's Hematoksilen ile zıt boyandı ve çeşem suyu ile yıkama işlemini takiben lamalar su bazlı kapatıcı ile kapatılarak GFAP immünreaktivite değerlendirilmesi işlemine geçildi.

GFAP immüno reaktivitesi değerlendirmesinde yaygınlık ve şiddet için derecelendirme skalası kullanıldı. Yaygınlık için; 0 *boyanma yok*, 1 *fokal boyanma*, 2 *yaygın boyanma*; şiddet için; 0 *boyanma yok*, 1 *zayıf*, 2 *orta*, 3 *şiddetli* şeklinde derecelendirildi.

Gruplar arası ve kontrol gözlerdeki GFAP immüno reaktivitesi ***ki-kare testi*** ile karşılaştırıldı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

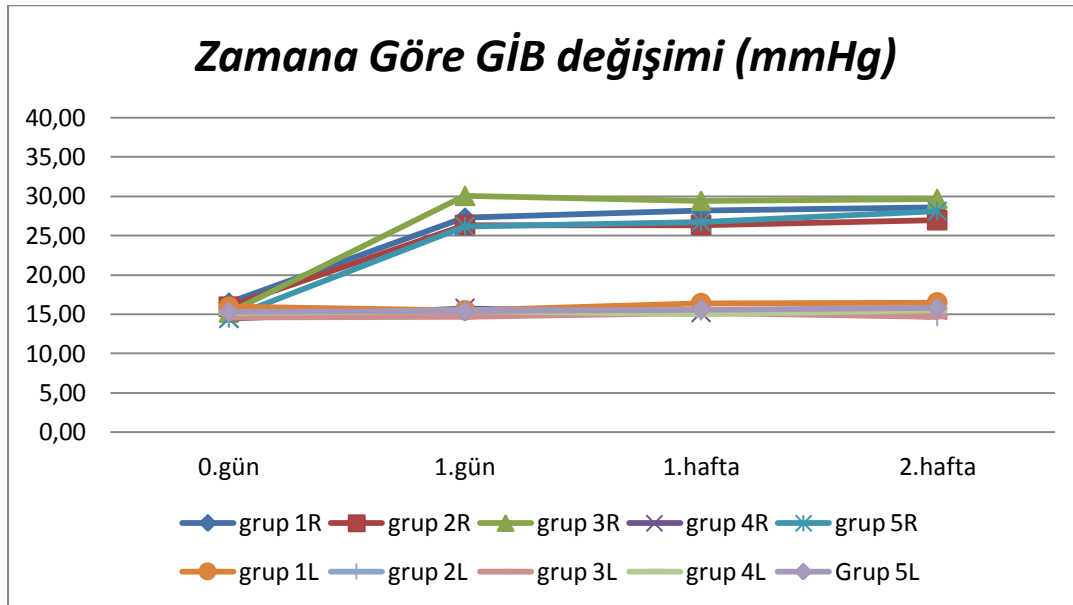
İstatistiksel analizde SPSS 15,0 (SPSS for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL) versiyonu kullanıldı. Gruplar arası RGH sayı farkları istatistiksel olarak Mann-Whitney-U testi ile analiz edildi. EVK öncesi ve sonrası GİB farkları ise Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı. Apotozise uğramış hücre oranlarını karşılaştırmada Mann-Whitney-U testi uygulandı. Gruplar arası ve kontrol gözlerdeki GFAP immüno reaktivitesi ***ki-kare testi*** ile karşılaştırıldı P<0,05 değeri

istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel veriler ortalama değeri±standart sapma şeklinde gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. Göz içi basınç (GİB) değerleri

Ratların çalışma gözleri ile kontrol gözleri karşılaştırıldığında, başlangıç GİB değerleri arasında fark bulunmadı ($p>0,05$). EVK uygulanan gözlerde yüksek GİB değerleri 2 hafta süresince korundu (**Grafik.1**). EVK işlemi sonrası Grup 1, 2, 3 ve 5' te 1.günde ortalama GİB değeri $28,73 \text{ mmHg} \pm 2,45$ (25,50-34,00) bulundu ve ratların kontrol grubu olan diğer gözleriyle karşılaştırıldığında ortalama 1,9 kat GİB değerleri elde edildi. Grup 1, 2, 3 ve 5' te artmış GİB değerleri kontrol sol gözlerine göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu (gruplara göre sırasıyla p değerleri 0.002, 0.002, 0.003, 0.002). Ratların tamamında GİB artışı başarılı bir şekilde sağlandı. Grup 1, 2, 3 ve 5' te 2. haftadaki artmış GİB değerleri başlangıç GİB değerlerine göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu (gruplara göre sırasıyla p değerleri 0.028, 0.027, 0.028, 0.028). Grup 4' teki ratların iv enjeksiyon sonrası GİB değerleri ile başlangıç GİB değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,95$)



Grafik.1. Ratlarda zamana göre göz içi basınç (GİB) değişimi

	TO 0.gün	TO 1.gün	TO 1.hafta	TO 2.hafta	P değeri
GRUP 1R	16,45±0,83 (15,0-17,25)	27,25±1,47 (25,50-29,25)	28,20±1,40 (27,00-30,50)	28,62±0,98 (27,50-30,0)	0,028*
GRUP 1L	15,95±0,64 (14,75-16,50)	15,50±0,75 (14,25-16,00)	16,40±0,98 (15,50-17,00)	16,50±1,27 (15,50-17,40)	0,002**
GRUP 2R	15,95±0,36 (15,50-16,25)	26,33±0,80 (25,50-27,75)	26,33±0,75 (25,00-27,00)	26,95±0,81 (26,00-28,25)	0,027*
GRUP 2L	14,95±1,82 (12,25-17,00)	15,60±1,32 (14,75-16,25)	15,40±1,60 (14,50-16,00)	14,70±1,45 (14,20-15,75)	0,002**
GRUP 3R	15,20±1,21 (13,50-16,75)	30,04±3,65 (26,00-35,50)	29,41±3,10 (26,50-34,00)	29,66±2,71 (27,00-33,00)	0,028*
GRUP 3L	14,58±1,50 (12,75-16,50)	14,70±1,40 (13,00-15,50)	15,20±1,60 (14,00-16,00)	14,70±1,30 (12,50-15,50)	0,003**
GRUP 4R	14,45±1,24 (12,50-16,00)	15,75±2,71 (13,00-16,00)	15,20±2,75 (13,50-15,50)	15,50±3,07 (13,00-16,50)	0,95*
GRUP 4L	15,20±0,78 (14,00-16,00)	15,40±0,90 (14,20-16,00)	15,00±1,2 (13,50-15,70)	15,50±1,1 (14,00-15,75)	0,90**
GRUP 5R	14,50±1,48 (12,75-16,25)	26,16±0,88 (25,25-27,50)	26,75±1,89 (24,50-30,00)	28,08±2,82 (25,50-32,75)	0,028*
GRUP 5L	15,29±1,29 (13,00-16,50)	15,40±1,60 (13,00-15,75)	15,60±2,00 (13,40-16,20)	15,80±2,50 (13,50-16,50)	0,002**

Tablo 1. Zamana göre Göz içi basınç (GİB) değerleri.

Değerler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmekte. * İstatistiksel fark değerlendirilmesinde Wilcoxon testi kullanıldı (n=6). EVK öncesi ve sonrası GİB farkları karşılaştırılması. ** İstatistiksel fark değerlendirilmesinde Mann-Whitney-U kullanıldı (n=6). GİB değerlerinin kontrol sol gözler ile karşılaştırılması.

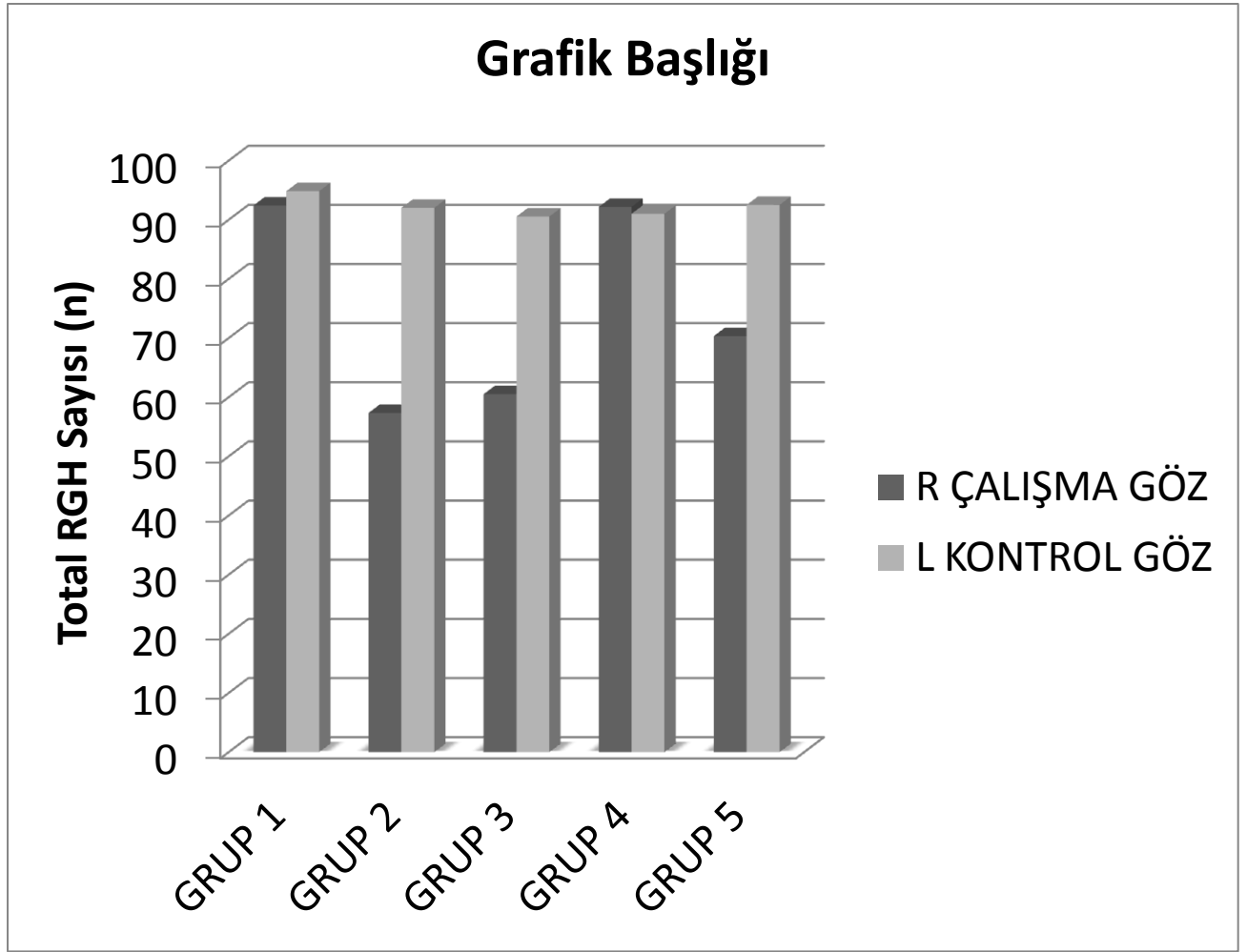
4.2. Total Retinal Ganglion Hücre Sayısı

EVK ile deneysel glokom modeli oluşturulduktan sonra, GİB yüksekliğinin neden olduğu retinal ganglion hücre hasarı ve farklı statin uygulama şekillerinin retinal ganglion hücre sayısına etkisi değerlendirildi. Kronik oküler hipertansiyon oluşturulduktan sonra, RGH sayısında, kontrol gözlerle karşılaştırıldığında, grup 5' te istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($70,33 \pm 18,30$ hücre, $p=0,03$). Oral rosuvastatin alan ratlarda (grup 1) RGH kaybının az olduğu ve grup 5 ile karşılaştırıldığında RGH sayısı anlamlı olarak yüksek bulundu ($92,40 \pm 7,30$ hücre, p değeri= 0,03). Iv rosuvastatin uygulaması sonrası (grup 2) RGH sayısı en düşük bulundu ($57,33 \pm 8,23$ hücre, p değeri= 0,002). Oral ve iv rosuvastatin uygulaması sonrasında (grup 3) RGH sayısı $60,50 \pm 12,90$ hücre olarak bulundu (p değeri= 0,004). Iv sham

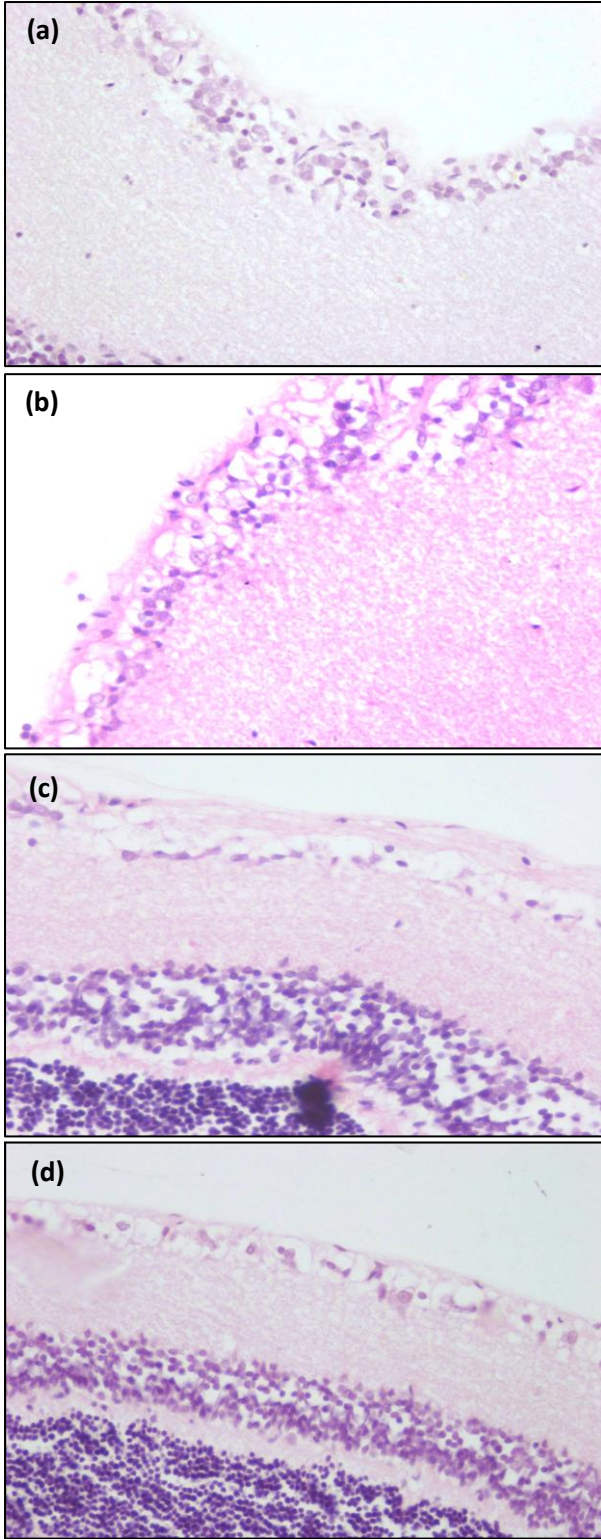
enjeksiyonu yapılan grup 4' te ise RGH sayısı $92,16 \pm 10,53$ hücre (p değeri= 0,95) olarak bulundu.

	Total RGH		P değeri
	ÇALIŞMA	KONTROL	
GRUP 1	$92,40 \pm 7,30$	$94,83 \pm 9,78$	0,90
GRUP 2	$57,33 \pm 8,23$	$92,00 \pm 17,27$	0,002*
GRUP 3	$60,50 \pm 12,90$	$90,54 \pm 15,43$	0,004*
GRUP 4	$92,16 \pm 10,53$	$91,00 \pm 21,89$	0,95
GRUP 5	$70,33 \pm 18,30$	$92,50 \pm 13,72$	0,03

Tablo 2. Rosuvastatin Uygulamasının Total Retinal Ganglion Hücre (RGH) Sayısı Üzerine Etkisi. RGH tabakasındaki ortalama RGH hücre sayıları görülmekte. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmekte. İstatistiksel fark değerlendirilmesinde *Student's t-test* kullanıldı (n=6).* $p < 0,05$ ratın işlem yapılmayan kontrol gözü ile karşılaştırılması.



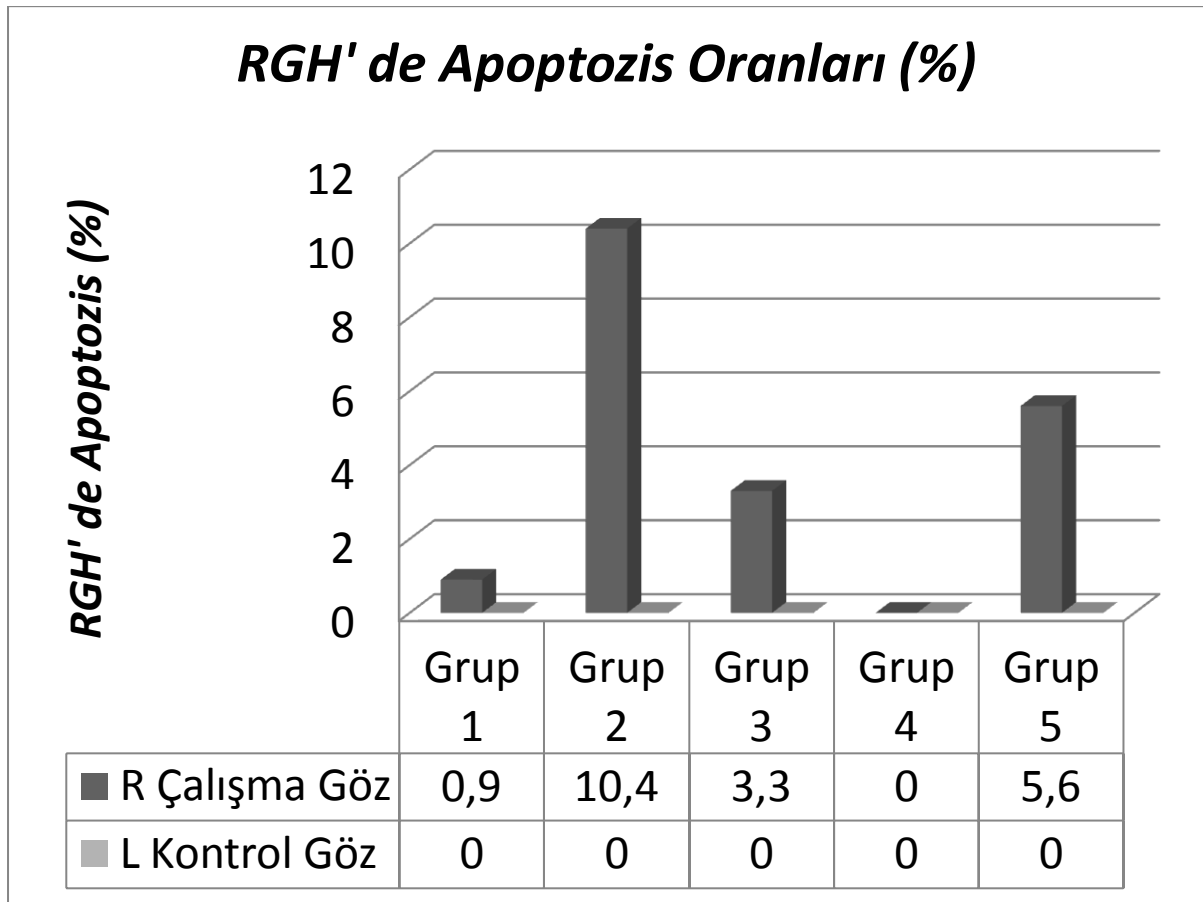
Grafik 2. Gruplara göre total Retinal Ganglion Hücre (RGH) sayıları



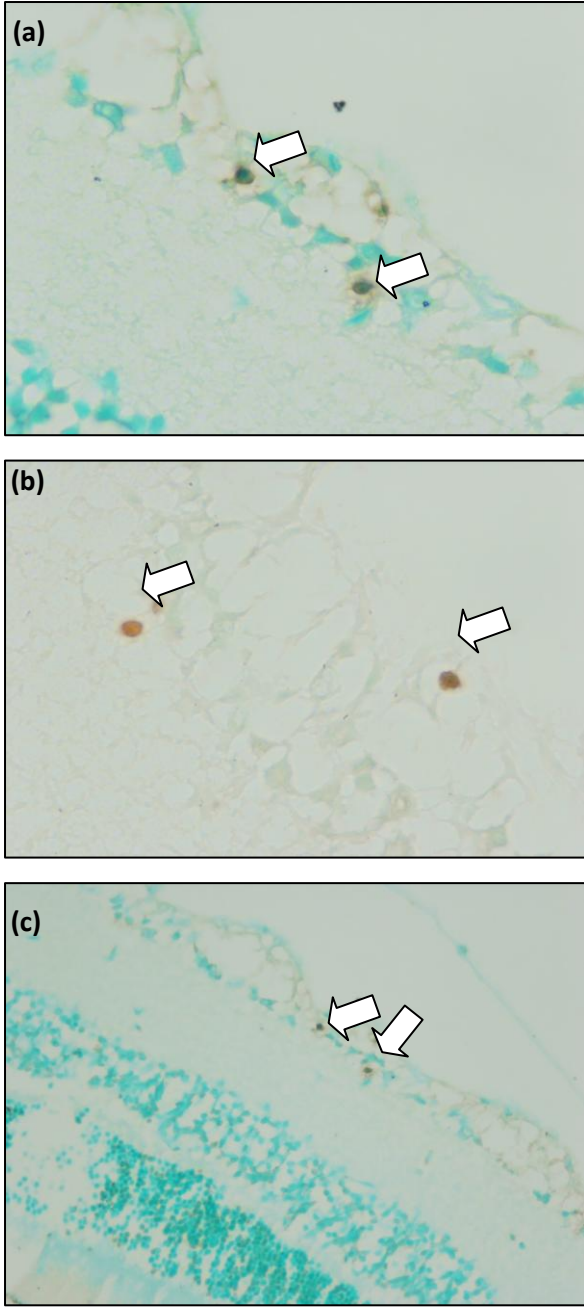
Resim 6. Oral ve/veya iv rosuvastatin uygulamasının Retinal Ganglion Hücre (RGH) Sayısı üzerine etkisi. Retinal ganglion hücre sayısı (H&E x400) **a)** Kontrol göz normal RGH sayısı **b)** grup 1 (oral rosuvastatin) normale yakın RGH **c)** grup 2 (iv rosuvastatin) azalmış RGH **d)** grup 5 (kontrol glokom) azalmış RGH.

4.3.TUNEL boyama

Apoptotik hücre ölümü değerlendirilmesinde TUNEL boyama kullanıldı. Kontrol gözlerde kesitlerde, TUNEL pozitif hücre görülmedi. Kronik oküler hipertansiyon oluşturulduktan sonra, TUNEL pozitif hücre oranı grup 5' te % 5,6 olarak görüldü (p değeri=0,001). TUNEL pozitif hücreler ganglion hücre tabakasında lokalize olduğu görüldü. Oral rosuvastatin uygulaması sonrası (Grup 1) TUNEL pozitif hücre oranının daha az olduğu görüldü (% 0,9 ve p değeri= 0,001). İv rosuvastatin uygulaması sonrası (Grup 2) TUNEL pozitif hücre oranı % 10,4 ile en fazla olduğu görüldü (p değeri=0,001). Oral ve iv rosuvastatin uygulaması sonrası (grup 3) ise TUNEL pozitif hücre oranı % 3,3 olarak bulundu (p değeri=0,001). İv sham enjeksiyonu yapılan grup 4' te ise TUNEL pozitif hücre görülmedi.



Grafik 3. Gruplara göre Retinal Ganglion Hücre (RGH)' de Apoptozis Oranları. GİB artışı sonrası 2. Haftada retinal kesitler analiz edildi. RGH tabakasındaki ortalama TUNEL-pozitif hücre sayıları görülmekte. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmekte. İstatistiksel fark değerlendirilmesinde *Student's t-test* kullanıldı (n=6).* p<0,05 tedavi almayan glokom grubu (grup 5) ile karşılaştırılması.



Resim 7. Oral ve/veya iv rosuvastatin uygulamasının retinadaki TUNEL-pozitif hücreler üzerine etkisi. Retinal ganglion hücre tabakasında apoptotik cisimcik(ler) (TUNNEL, Apoptag, x400)

(a) iv rosuvastatin, (b) kontrol glokom, (c) oral+iv rosuvastatin. Sham enjeksiyonu sonrasında retinal kesitlerde TUNEL-pozitif hücre görülmedi. Episkleral ven koterizasyonu ve GİB yüksekliği sonrasında, ganglion hücre tabakasında TUNEL-apoptotik cisimcik(ler) görülmekte (ok). Ratlarda kronik oküler hipertansiyonun indüklediği apoptozisi, oral rosuvastatin tedavisi azaltmaktadır.

	Grup 1 (oral rosuvastatin)	Grup 5 (kontrol)	P değeri*
GİB 0. Gün (mmHg)	16,45±0,83 (15,0-17,25)	14,50±1,48 (12,75-16,25)	0,09
GİB 1. Gün (mmHg)	27,25±1,47 (25,50-29,25)	26,16±0,88 (25,25-27,50)	0,31
GİB 1. Hafta (mmHg)	28,20±1,40 (27,00-30,50)	26,75±1,89 (24,50-30,00)	0,09
GİB 2. Hafta (mmHg)	28,62±0,98 (27,50-30,0)	28,08±2,82 (25,50-32,75)	0,39
Total RGH (n)	92,40±7,30	70,33±18,30	0,03
Apoptozis (%)	0,9	5,6	0,001
GFAP			0,339

Tablo 4. GİB değerleri, total RGH sayısı ve Apoptozis oranlarının karşılaştırılması. Grup 1 ve 5

	Grup 2 (iv rosuvastatin)	Grup 5 (kontrol)	P değeri
GİB 0. Gün (mmHg)	15,95±0,36 (15,50-16,25)	14,50±1,48 (12,75-16,25)	0,18
GİB 1. Gün (mmHg)	26,33±0,80 (25,50-27,75)	26,16±0,88 (25,25-27,50)	0,69
GİB 1. Hafta (mmHg)	26,33±0,75 (25,00-27,00)	26,75±1,89 (24,50-30,00)	0,69
GİB 2. Hafta (mmHg)	26,95±0,81 (26,00-28,25)	28,08±2,82 (25,50-32,75)	0,69
Total RGH (n)	57,33±8,23	70,33±18,30	0,18
Apoptozis (%)	10,4	5,6	0,001
GFAP			0,339

Tablo 5. GİB değerleri, total RGH sayısı ve Apoptozis oranlarının karşılaştırılması. Grup 2 ve 5

	Grup 3 (oral+iv rosuvastatin)	Grup 5 (kontrol)	P değeri*
GİB 0. Gün (mmHg)	15,20±1,21 (13,50-16,75)	14,50±1,48 (12,75-16,25)	0,39
GİB 1. Gün (mmHg)	30,04±3,65 (26,00-35,50)	26,16±0,88 (25,25-27,50)	0,01
GİB 1. Hafta (mmHg)	29,41±3,10 (26,50-34,00)	26,75±1,89 (24,50-30,00)	0,13
GİB 2. Hafta (mmHg)	29,66±2,71 (27,00-33,00)	28,08±2,82 (25,50-32,75)	0,24
Total RGH (n)	60,50±12,90	70,33±18,30	0,31
Apoptozis (%)	3,3	5,6	0,001
GFAP			0,639

Tablo 6. GİB değerleri, total RGH sayısı ve Apoptozis oranlarının karşılaştırılması. Grup 3 ve 5

4.4. GFAP Ekspresyonu

EVK ile deneysel glokom modeli oluşturulduktan sonra, GFAP immün boyama uygulanarak, GİB yüksekliğinin neden olduğu retinal stres ve hasara glial hücre aktivasyon cevabı değerlendirildi. Farklı statin uygulama şekillerinin glial aktivasyon cevabına etkisi değerlendirildi. Kontrol gözlerde GFAP immünreaktivitesi, iç limitan membrandaki astrositler ve müller hücrelerin ayaklı uçlarında sınırlı olarak gözlemlendi. Deneysel glokom modeli oluşturulan gözlerde (grup 5) dış nükleer tabakalara kadar uzanan artmış GFAP immün reaksiyonu görüldü ve kontrol göz ile karşılaştırıldığında artmış ve yaygın GFAP ekspresyonu görüldü (p değeri 0,035). Oral rosuvastatin uygulanan gözlerde (grup 1) kontrol glokom (grup 5) ile karşılaştırıldığında GFAP ekspresyonu şiddeti ve yaygınlığında azalma görüldü (p değeri=0,247). İv rosuvastatin uygulaması sonrası (Grup 2 ve grup 3) kendi kontrol gözleri ile karşılaştırıldığında GFAP ekspresyonu yaygınlığı ve şiddetinde artış olduğu görüldü, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değerleri sırasıyla; 0.504, 0.502). İv sham enjeksiyonu sonrasında (grup 4) GFAP ekspresyonunda kendi kontrol gözleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görülmedi (p değeri=0,721). Grupların sağ (çalışma) gözleri GFAP immün reaktivitesi yaygınlık ve şiddet

derecelendirilerek karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak fark görülmedi (p değeri=0,434) (Tablo.7).

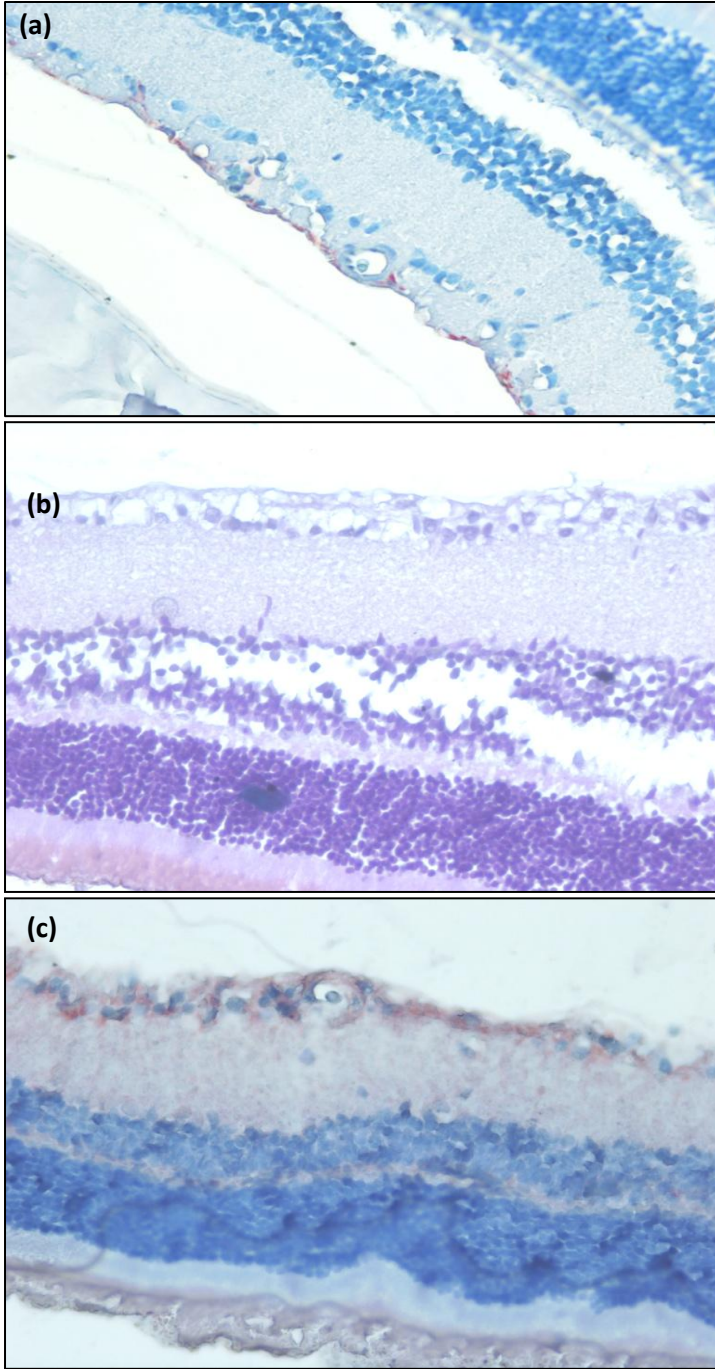
	Boyanma yok	Zayıf fokal	Zayıf yaygın	Orta fokal	Orta yaygın	Kuvvetli fokal	Kuvvetli yaygın
Grup 1 (n=6)	% 41,7	% 16,7	% 25	% 0	%16,7	% 0	% 0
Grup 2 (n=6)	% 16,7	% 33,3	% 0	%16,7	% 25	% 0	% 8,3
Grup 3 (n=6)	% 8,3	% 33,3	% 16,7	% 0	% 25	% 8,3	% 8,3
Grup 4 (n=6)	% 25	% 50	% 16,7	% 8,3	% 0	% 0	% 0
Grup 5 (n=6)	% 16,7	% 16,7	% 8,3	% 16,7	% 25	% 0	% 16,7

Tablo 7. Gruplara göre GFAP immün reaktivitesi karşılaştırması (çalışma gözü) GİB artışı sonrası 2. haftada retinal kesitler analiz edildi. Retinadaki GFAP immün reaktivitesi değerlendirmesinde yaygınlık ve şiddet derecelendirme oranları görülmekte. İstatistiksel fark değerlendirilmesinde “*Ki-Kare testi*” kullanıldı (n=6). (P değeri=0,434)

	Boyanma yok	Zayıf fokal	Zayıf yaygın	Orta fokal	Orta yaygın	Kuvvetli fokal	Kuvvetli yaygın
Grup 1 (n=6)	% 66,7	% 16,7	%16,7	% 0	% 0	% 0	% 0
Grup 2 (n=6)	% 33,3	% 33,3	% 0	%16,7	% 16,7	% 0	% 0
Grup 3 (n=6)	% 16,7	% 50	% 16,7	% 0	% 16,7	% 0	% 0
Grup 4 (n=6)	% 33,3	% 50	% 16,7	% 0	% 0	% 0	% 0
Grup 5 (n=6)	% 33,3	% 33,3	% 0	% 33,3	% 0	% 0	% 0

Tablo 8. Gruplara göre GFAP immün reaktivitesi karşılaştırması (kontrol göz)

(n=6) (p değeri= 0,615)



Resim 8. Oral ve/veya iv rosuvastatin uygulamasının retinadaki GFAP immünreaktivitesi üzerine etkisi. **a)** Retinal ganglion hücre tabakasında GFAP ile boyanma yok. **b)** Retinal ganglion hücre tabakasında GFAP ile fokal zayıf boyanma **c)** Retinal ganglion hücre tabakasında GFAP ile yaygın kuvvetli boyanma (İmmünperoksidaz, GFAP x400) Episkleral ven koterizasyonu ve GİB yüksekliği sonrasında, GFAP immünreaktivitesinde artış görüldü.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ratlarda kronik glokom modelinde HMG-CoA redüktaz inhibitörü olarak hiperlipidemi tedavisinde kullanılan rosuvastatinin oral ve/veya intravitreal uygulanması sonrasında, RGH üzerinde nöroprotektif etkisi değerlendirildi. Bu çalışma rosuvastatin uygulamasının ratlarda kronik glokom modelinde RGH sayısı, apoptozis ve glial cevabı değerlendiren ilk çalışma olması açısından önemlidir. Oral rosuvastatin uygulaması ile RGH kaybında ve apoptoziste azalma ile birlikte nöroprotektif etki görüldü.

Ratlar anatomik ve gelişimsel açıdan, ön kamara ve dış akım yolları bakımından insan ile benzer özellikler taşımaktadır. Ratlarda ideal glokom modelinin kolay uygulanabilir, ucuz, tekrarlanabilir ve insanlardaki glokomla benzer etki oluşturması gerekmektedir. Ratlarda EVK modeli ile bu kriterlerin birçoğunun sağlandığı düşüncesindeyiz. Çalışmamızda koterizasyon işlemi yapılan tüm gözlerde, GİB yüksekliği sağlanmış olduğu görüldü.

İki veya üç ven koterizasyonu sonrası kontrol gözlerde 10-15 mmHg olan GİB 20 mmHg' li değerlere yükselmektedir ve en az 2 ay süre ile 20-30 mmHg düzeylerinde devam etmektedir. Bu GİB yüksekliği ile RGH' de haftalık ortalama % 4-10 'luk kayıp meydana gelmektedir (77). Çalışmamızda, GİB değerleri işlem öncesi ortalama $15,31 \pm 1,30$ mmHg (12,50-17,75) ve EVK sonrası 2.haftada ortalama $28,73 \pm 2,45$ mmHg (25,50-34,00) olarak ölçüldü ($p=0,002$). İv rosuvastatin (grup 2 ve grup 3) enjeksiyonu yapılan gözlerde ortalama GİB değerleri sırasıyla; $26,33 \pm 0,80$ (25,50-27,75), $30,04 \pm 3,65$ (26,00-35,50) idi . İv DMSO enjeksiyonu (grup 4) öncesi ve sonrasında GİB değerleri sırasıyla $14,45 \pm 1,24$ (12,50-16,00) ve $15,50 \pm 3,07$ (13,00-16,50) idi ($p=0,95$) ve iv DMSO enjeksiyonuna bağlı erken ve geç dönemde GİB' de anlamlı değişiklik görülmedi. Oral rosuvastatin alan ratların çalışma gözlerinde işlem öncesi ortalama GİB değeri $16,45 \pm 0,83$ (15,0-17,25) ve işlem sonrası ortalama GİB değeri $27,25 \pm 1,47$ (25,50-29,25) idi ($p=0,028$), kontrol gözlerinde statin tedavisi öncesi $15,95 \pm 0,64$ (14,75-16,50) ve 2. hafta sonunda $15,40 \pm 1,20$ (14,60-16,00) ölçüldü ($p=0,93$). Oral rosuvastatin uygulamasının GİB değişikliğine neden olmadığı düşünüldü.

Çalışmamızda EVK sonrası ikinci haftada grup 5' te RGH kaybı % 23 olarak değerlendirildi. Total RGH sayısı grup 1 ($92,4 \pm 7,3$) 'de grup 5 ($70,33 \pm 8,2$) ile karşılaştırıldığında daha yüksek izlenirken, kendi kontrol grubu ($94,8 \pm 9,7$) ile benzer olduğu saptandı ($p:0.03$; $p:0.90$, sırasıyla). Grup 2 ($57,3 \pm 8,2$) ve grup 3 ($60,5 \pm 12,9$)' teki RGH

sayıları ise grup 5'e göre daha az olarak bulundu (sırasıyla, $p:0,004$, $p: 0,261$). Oral rosuvastatin alan ratlarda RGH kaybının daha az bulunması, nöroprotektif etkisini desteklemekte birlikte; intravitreal rosuvastatin uygulamasının RGH' yi koruyucu etkisi gösterilemedi.

Garcia-Valenzuela ve arkadaşları, oküler hipertansiyonun indüklediği RGH ölümünün apoptozis aracılı gerçekleştiğini göstermiştir (78). Diğer iki deneysel glokom modelinde aksonal dejenerasyon optik sinirin superior bölgesinde meydana gelirken, EVK ile retinanın tamamında yaygın RGH kaybı oluşmaktadır (83). Çalışmamızda deneysel glokom modelinde ganglion hücre tabakasında TUNEL pozitif hücreler retinada yaygın olarak gösterildi. Kontrol gözlerde TUNEL pozitif hücre gösterilmedi. Oral rosuvastatin alan ratlarda (grup 1) TUNEL pozitif hücre sayıları grup 5 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p= 0,001$). Iv rosuvastatin alan ratlarda (grup 2) ise en yüksek oranda TUNEL pozitif hücre gösterildi ($p=0,001$). Grup 4' te sham enjeksiyonu yapılan ratlarda ise TUNEL pozitif hücre görülmedi.

Oküler hipertansiyona bağlı retinal hasarın değerlendirilmesinde, GFAP ekspresyonu kullanıldı. GFAP, normal retinadaki müller hücreleri ve astrositlerde bulunan orta filaman proteindir. Retinal hasar meydana geldiğinde, müller hücreleri ve astrositlerde GFAP ekspresyonunda artış olmaktadır. Glial hücre aktivasyonunun klasik bulgusu artmış GFAP ekspresyonudur. Glokomlu gözlerde retinal müller hücreleri ve astrositlerde hipertrofik morfoloji ve artmış GFAP immün boyanması, glokomatöz retinada retinal makroglial hücre aktivasyonu olduğunu göstermektedir (98,106).

Glial hücrelerin glokomatöz aktivasyonunda, bu süreçteki olayların etkilerinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi önemlidir. Kuramsal olarak, iskemik koşullarda daha önce gösterilmiş olduğu gibi, glial hücrelerin normal destekleyici fonksiyonlarının artması, RGH ve aksonları daha fazla hasardan koruyabilir (95). Bir başka seçenek ise; beyin iskemisi sonrası reperfüzyona bağlı glutamat eksitotoksitesinde gösterilmiş olduğu gibi, glial aktivasyon daha fazla hasara yol açacak yolları tetiklemesi olabilir (96).

Çalışmamızda, EVK uygulanan gözlerde kronik GİB artışı sonrasında GFAP ekspresyonunda artış görüldü. Kontrol gözlerde, GFAP immün reaktivitesi iç limitan membrandaki astrositler ve müller hücrelerinin ayaksı çıkıntılarında lokalize iken; GİB artışı sonrasında dış nükleer tabakalara kadar yayılım göstermekteydi. Artmış GFAP ekspresyonu,

artmış GİB sonrası (grup 5) glial hücre aktivasyonunu göstermekteydi (p değeri=0,035). Oral rosuvastatin alan ratlarda (grup 1) grup 5 ile karşılaştırıldığında GFAP ekspresyonu şiddeti ve yaygınlığında azalma görüldü (p değeri=0,339). Oral rosuvastatin uygulaması glial hücre aktivasyonunda azalmaya neden olmakla birlikte istatistiksel olarak fark görülmedi. İv rosuvastatin uygulanan ratlarda (grup 2 ve grup 3) ise, GFAP ekspresyonu yaygınlığı ve şiddeti kendi kontrol gözleri ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak fark gösterilmese de artmış glial hücre aktivasyonunu desteklemekteydi (p değerleri sırasıyla; 0.504, 0.502). Sham enjeksiyonu uygulanan ratlarda (grup 4) kontrol gözleri ile karşılaştırıldığında GFAP ekspresyonunda anlamlı değişiklik görülmedi (p değeri=0,721). İv DMSO enjeksiyonunun glial cevabı etkisinin olmadığı düşünüldü.

Glokomatöz retinada glial aktivasyonu RGH üzerinde hem hasarlayıcı hem de koruyucu etkileri olduğu ileri sürülmüştür (98-100). Artmış GİB maruziyeti sonrasında; müller hücrelerinde, anti-apoptotik bir protein olan, bcl-2 ekspresyonunun artmış olduğu gözlenmiş ve böylece müller hücre yaşam süresinin ve fonksiyonlarını iyileştirdiği ve dolaylı yollardan da RGH' ni koruduğu ileri sürülmüştür (101). Glial hücreler nörotrofik maddeleri sağlayarak da RGH üzerinde koruyucu etkileri bulunmaktadır (102).

Retinal gangliyon hücreleri ve optik sinir santral sinir sisteminin bir parçası olarak kabul edilmekte ve glokomdaki gangliyon hücre ölümleri parkinson, amyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer hastalığı gibi nörodejenratif hastalıklarla benzerlik göstermektedir. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan nöroprotektif ajanların nöroprotektif etkileri; glokom tedavisinde hasarlanmış RGH' lerin iyileştirilmesinde ve ikincil sinir kayıplarının önlenmesi amaçlanarak birçok çalışmada araştırılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, statinlerin nöroprotektif etkinliği üzerinde durulmaktadır. Statin tedavisi alan hastalarda Alzheimer hastalığı insidansında azalma sağladığı bildirilmiştir. Bu ilişki hakkında farklı görüşler bildirilmiş olsa da, birçok çalışmada statinlerin amiloid peptid beta üretimini azalttığı in vitro gösterilmiştir (111-112). Ayrıca son çalışmalarda, statinlerin Parkinson hastalığı insidansı üzerine olan beklenilmedik etkileri de bildirilmiştir (112-114). Son çalışmalarla hayvan modellerinde statinlerin multiple skleroz hastalığı tedavisindeki (115-118) ve akut inme modellerindeki (119-121) olumlu etkileri gösterilmiştir.

Statinler hem kolesterol bağımlı hem kolesterol bağımsız etki göstermekte ve beyin kaynaklı nörofaktör (BDNF) üretimi ve PKB/Akt, Wnt ve ERK yolları aktivasyonu gibi farklı nöroproteksiyon yollarını aktive edebilmektedir. Tüm statinlerin kan-beyin bariyerini geçebilme özelliği olmasa da, periferik etkileri ile nörolojik etki gösterebilmektedir. Statinlerin nöroproteksiyon sağlayan üç farklı periferik etkileri bulunmaktadır: 1) oksidatif hasarı azaltma 2) vasküler fonksiyonda iyileşme ve 3) periferik inflamatuvar cevabın modülasyonu (137).

Günümüzde statin ailesinin birçok üyesi arasında, rosuvastatin en potent statin olması ve HMG-CoA redüktaz enzimine çoklu polar bağlar ile bağlanabilme özelliği nedeniyle araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (138). Rosuvastatinin göreceli olarak hidrofilik olması nedeniyle farelerde, serebral iskemi modeli oluşturulmadan 10 gün önce verildiğinde, potansiyel koruyucu etki göstermektedir (139). Ancak bu etkinin moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamış değildir.

Önceki çalışmalarda; statinlerin katarakt oluşumu (140), yaşa bağlı makula dejenerasyonu (141) ve diyabetik retinopati (142) gibi çeşitli göz hastalıklarında faydalı etkileri olabileceği gösterilmiştir. Sistemik uygulanan simvastatinin NO seviyelerini arttırarak, retinal arter ve venlerde kan akımı ve hızını arttırdığı gösterilmiştir (143-144). Ayrıca statinler rho-kinaz inhibisyonu ile akküz dışı akımda artışa neden olarak GİB 'de azalmaya neden olabilmektedir (144-145). McGwin ve arkadaşları vaka-kontrol çalışmasında, 24 aydan uzun süreli statin kullanan hastalarda, açık açılı glokom prevalansının daha düşük olduğunu göstermiştir (146). Yine yapılan retrospektif çalışmada; görme alanı kaybı olmayan, normal GİB' li açık açılı glokom şüphesi olan olguların optik sinir başı parametrelerindeki progresyonun yavaş olması statin kullanımı ile ilişkilendirilmiştir (147). Bizim çalışmamızda da oral rosuvastatin uygulanması sonrası ratlarda GİB' de azalmaya yol açmadan, farklı nöroprotektif yolların uyarılması ile nöron koruyucu etki elde edilmiştir.

Dexter ve arkadaşlarının 256 normotansif glokomlu gözü 36 ay incelediği prospektif kohort çalışmasında; simvastatin kullanımının görme alanı stabilizasyonuna olumlu katkı sağlayabildiği bildirilmiştir (148).

Kretz ve arkadaşları; ratlarda optik sinir aksotomi sonrasında, iv simvastatin (30 µM konsantrasyonda) enjeksiyonu ile heat shock protein (Hsp27) ekspresyonunda belirgin artış

sağladığı ve RGH yaşam sürelerine de olumlu katkı sağladığını göstermiştir. Simvastatin aracılı Hsp27 düzeylerinde artış, optik sinir hasarı sonrası erken ve geç dönemlerde apoptozise bağlı hücre ölümünü önlemede etkili olduğu ileri sürülmüştür (149). Çalışmamızda iv rosuvastatin (30 μ M) enjeksiyonu sonrasında RGH sayısında azalma, apoptozise uğrayan hücre oranlarında artış ve glial aktivasyonda artış görüldü. Bu etkiler birlikte değerlendirildiğinde aynı konsantrasyonda uygulanan iv rosuvastatinin RGH üzerine olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir. Rosuvastatinin yarılanma ömrünün simvastatin yarılanma süresinden daha uzun olması, vitreus içinde kalma süresini artırabilmekte ve suda çözünürlük açısından karşılaştırıldığında rosuvastatin daha fazla suda çözünmesi; iki molekülün farklı sonuçlarını etkileyebilmektedir. İv simvastatin ile aynı konsantrasyonda uygulanan iv rosuvastatinin uygun doz açısından ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Statinler deneysel hayvan modellerinde ve in vitro çalışmalarda açık bir şekilde nöron koruyucu etkileri gösterilmekle birlikte; yapılan klinik çalışmalarda insanlarda nörodejeneratif hastalıklarda faydalı etkileri de gösterilmiştir. Alzheimer hastalığı, statinlerin farklı nöropatolojik durumlarda koruyucu olabilen periferik ve santral etki göstermektedir. Özellikle kan akımını artırıcı etkileri, immün cevap modülasyonu ve oksidatif hasarı azaltıcı etkileri, nöron koruyucu etki oluşturmaktadır. Bazı statinler kan-beyin bariyerini geçebilse de; beyinde sinyal iletimi ve metabolizmayı hangi oranda etkiledikleri ve hangi doz aralığında izoprenoid üretimine etkilerinin başladığı tam olarak bilinmemektedir. Bu da deneysel in vivo çalışmalarla elde edilen umut verici verilerin klinik sonuçlarının yüz güldürücü olmadığını da açıklamaktadır. Hayvanlardaki nöroproteksiyonda azalmış izoprenoid seviyesine bağlıysa; statinlerin izoprenoid düzeylerini azaltmada klinik dozun yeterli olmadığı düşünülebilir. Statinlerin beyindeki farmakolojisinin araştırılması için çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ

Ratlarda ESV koterizasyonu ile oluşturulan glokom modelinde; oral rosuvastatin uygulaması sonrası RGH kaybı ve apoptozise uğrayan hücre sayısı daha az bulunarak nöroprotektif etkinliği gösterilmiştir. Bir nörodegeneratif hastalık olarak kabul edilen glokomda, nöroprotektif tedavi seçeneği olarak rosuvastatin uygulaması ile ilgili randomize kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İv rosuvastatin uygulaması sonrasında ratlarda nöroprotektif etki gösterilememiş olup, iv rosuvastatin uygulamasının RGH üzerine zararlı etkileri görülmüştür. İv rosuvastatin için güvenli doz ile ilgili hayvan çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Cedrone C, Mancino R, Cerulli A, et al. Epidemiology of primary glaucoma: prevalence, incidence, and blinding effects. *Prog Brain Res.* 2008;173:3-14.
2. Cook C. Glaucoma in Africa: size of the problem and possible solutions. *J Glaucoma.* 2009;18:124-128.
3. Sultan MB, Mansberger SL, Lee PP. Understanding the importance of IOP variables in glaucoma: a systematic review. *Surv Ophthalmol.* 2009;54:643-662.
4. Liu M, Duggan J, Salt TE, et al. Dendritic changes in visual pathways in glaucoma and other neurodegenerative conditions. *Exp Eye Res.* 2011;92:244-50.
5. Boland MV, Quigley HA, Lehmann HP. The impact of risk calculation on treatment recommendations made by glaucoma specialists in cases of ocular hypertension. *J Glaucoma.* 2008;17:631-638.
6. Manni G, Oddone F, Parisi V, et al. Intraocular pressure and central corneal thickness. *Prog Brain Res.* 2008;173:25-30.
7. Sommer A. Collaborative normal-tension glaucoma study. *Am J Ophthalmol.* 1999;128:776-777.
8. Lichter PR, Musch DC, Gillespie BW, et al. Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery. *Ophthalmology.* 2001;108:1943-1953.
9. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, et al.: Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: Results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol.* 2002;120:1268-1 279.
10. Quigley HA. Glaucoma. *Lancet.* 2011;377:1367-1377.
11. Salim S, Shields MB. Glaucoma and systemic diseases. *Surv Ophthalmol.* 2010;55:64-77.
12. Leske MC. Ocular perfusion pressure and glaucoma: clinical trial and epidemiologic findings. *Curr Opin Ophthalmol.* 2009;20:73-78.
13. Kong GY, Van Bergen NJ, Trounce IA, et al. Mitochondrial dysfunction and glaucoma. *J Glaucoma.* 2009;18:93-100.
14. Tektas OY, Lutjen-Drecoll E. Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Exp Eye Res.* 2009;88:769-775.
15. Baltmr A, Duggan J, Nizari S, et al. Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role? *Exp Eye Res.* 2010;91:554-566.
16. Qu J, Wang D, Grosskreutz CL. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in

- glaucoma. *Exp Eye Res.* 2010; 91:48-53.
17. Lauterbach EC, Shillcutt SD, Victoroff J, et al. Psychopharmacological neuroprotection in neurodegenerative disease: heuristic clinical applications. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2010; 22:130-154.
 18. Danesh-Meyer HV. Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions. *Curr Opin Ophthalmol.* 2011;22:78-86.
 19. Brandt SK, Weatherly ME, Ware L, et al. Calcium preconditioning triggers neuroprotection in retinal ganglion cells. *Neuroscience.* 2011;172:387-397.
 20. Bunting H, Still R, Williams DR, et al. Evaluation of plasma glutamate levels in normal tension glaucoma. *Ophthalmic Res.* 2010;43:197-200.
 21. Guo L, Salt TE, Maass A, et al. Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:626-633.
 22. Ju WK, Lindsey JD, Angert M, et al. Glutamate receptor activation triggers OPA1 release and induces apoptotic cell death in ischemic rat retina. *Mol Vis.* 2008; 14:2629-2638.
 23. Chidlow G, Wood JP, Casson RJ. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs.* 2007; 67:725-759.
 24. Kavirajan H. Memantine: a comprehensive review of safety and efficacy. *Expert Opin Drug Saf.* 2009;8:89-109.
 25. Bessero AC, Clarke PG. Neuroprotection for optic nerve disorders. *Curr Opin Neurol.* 2010;23:10-15.
 26. Bai Y, Xu J, Brahimi F, et al. An agonistic TrkB mAb causes sustained TrkB activation, delays RGC death, and protects the retinal structure in optic nerve axotomy and in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:4722-4731.
 27. Bai Y, Shi Z, Zhuo Y, et al. In glaucoma the upregulated truncated TrkC.Tl receptor isoform in glia causes increased TNF-alpha production, leading to retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:6639-6651.
 28. Chiaretti A, Falsini B, Servidei S, et al. Nerve Growth Factor Eye Drop Administration Improves Visual Function in a Patient With Optic Glioma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:13469-13474.
 29. Joe AW, Gregory-Evans K. Mesenchymal stem cells and potential applications in treating ocular disease. *Curr Eye Res.* 2010;35:941-952.
 30. Neufeld AH, Hernandez MR, Gonzalez M. Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol.* 1997;115:497-503.

31. Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol*. 2008;2:879-889.
32. Pang IH, Johnson EC, Jia L, et al. Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:1313-1321.
33. Chidlow G, Wood JR, Casson RJ. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs*. 2007;67:725-759.
34. Oshida E, Matsumoto Y, Arai K. Free radicals in the aqueous humor of patients with glaucoma. *Clin Ophthalmol*. 2010;4:653-660.
35. Tezel G, Yang X, Luo C, et al. Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:5071-5082.
36. Engin KN. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol Vis*. 2009;15:855-860.
37. Ko ML, Peng PH, Hsu SY, et al. Dietary deficiency of vitamin E aggravates retinal ganglion cell death in experimental glaucoma of rats. *Curr Eye Res*. 2010;35:842-849.
38. Engin KN, Engin G, Kucuksahin H, et al. Clinical evaluation of the neuroprotective effect of alpha-tocopherol against glaucomatous damage. *Eur J Ophthalmol*. 2007;17:528-533.
39. Lesk MR, Wajszilber M, Deschenes MC. The effects of systemic medications on ocular blood flow. *Can J Ophthalmol*. 2008;43:351-355.
40. Quaranta L, Bettelli S, Uva MG, et al. Effect of Ginkgo biloba extract on preexisting visual field damage in normal tension glaucoma. *Ophthalmology*. 2003; 110:359-362.
41. Khoury R, Cross JM, Girkin CA, et al. The association between self-reported glaucoma and ginkgo biloba use. *J Glaucoma*. 2009;18:543-545.
42. Joachim SC, Wax MB, Seidel P, et al. Enhanced characterization of serum autoantibody reactivity following HSP 60 immunization in a rat model of experimental autoimmune glaucoma. *Curr Eye Res*. 2010;35:900-908.
43. Schwartz M. Modulating the immune system: a vaccine for glaucoma? *Can J Ophthalmol*. 2007;42:439-441.
44. Araie M, Mayama C. Use of calcium channel blockers for glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30:54-71.
45. Fitzgerald M, Payne SC, Bartlett CA, et al. Secondary retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of the calcium channel blocker lomerizine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5456-5462.
46. Luksch A, Rainer G, Koyuncu D, et al. Effect of nimodipine on ocular blood flow and colour contrast sensitivity in patients with normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol*.

2005;89:21-25.

47. Hains BC, Waxman SG. Neuroprotection by sodium channel blockade with phenytoin in an experimental model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4164-4169.
48. Hirooka K, Shiraga F. Potential role for angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of glaucoma. *Clin Ophthalmol.* 2007;1:217-223.
49. Yang H, Hirooka K, Fukuda K, et al. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor blocker in a rat model of chronic glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:5800-5804.
50. Russo R, Cavaliere F, Rombolà L, et al. Rational basis for the development of coenzyme Q10 as a neurotherapeutic agent for retinal protection. *Prog Brain Res.* 2008;173:575-582.
51. Schober MS, Chidlow G, Wood JP, et al. Bioenergetic-based neuroprotection and glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2008;36:377-385.
52. Aktaş Z, Gürel G, Akyürek N, et al. Neuroprotective effect of topically applied brimonidine tartrate 0.2% in endothelin-1 -induced optic nerve ischaemia model. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007;35:527-534.
53. Dong CJ, Guo Y, Agey P, et al. Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:4515-4522.
54. Arthur S, Cantor LB. Update on the role of alpha-agonists in glaucoma management. *Exp Eye Res.* 2011;93(3):271-83.
55. Krupin T, Liebmann JM, Greenfield DS, et al. Low-Pressure Glaucoma Study Group. A randomized trial of brimonidine versus timolol in preserving visual function: results from the Low-Pressure Glaucoma Treatment Study. *Am J Ophthalmol.* 2011;151:671 -681.
56. Hollo G. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs.* 2007;67:2291.
57. Wood JP, Schmidt KG, Melena J, et al. The beta-adrenoceptor antagonists metipranolol and timolol are retinal neuroprotectants: comparison with betaxolol. *Exp Eye Res.* 2003;76:505-516.
58. Elgin U, İlhan B, Batman A, et al. Oküler hipertansiyonlu olgularda betaksolol kullanımının, glokomatöz görme alanı defektlerini önlemedeki etkisi. *Med Net Oftalmol.* 2002;9:24-25.
59. Hernandez M, Urcola JH, Vecino E. Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments. *Exp Eye Res.* 2008;86:798-806.

60. Lee AJ, Mitchell P, Rochtchina E, et al. Blue Mountains Eye Study. Female reproductive factors and open angle glaucoma: the Blue Mountains Eye Study. *Br J Ophthalmol.* 2003;87:1324-1328.
61. Battaglia C, Mancini F, Regnani G, et al. Hormone therapy and ophthalmic artery blood flow changes in women with primary open-angle glaucoma. *Menopause.* 2004;11:69-77.
62. Russo R, Cavaliere F, Watanabe C, et al. 17 Beta-estradiol prevents retinal ganglion cell loss induced by acute rise of intraocular pressure in rat. *Prog Brain Res.* 2008;173:583-590.
63. Belforte NA, Moreno MC, de Zavalia N, et al. Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma. *J Pineal Res.* 2010;48:353-364.
64. Attarzadeh A, Hosseini H, Nowroozizadeh S. Therapeutic potentials of aspirin in glaucomatous optic neuropathy. *Med Hypotheses.* 2006;67:375-377.
65. Zhong L, Bradley J, Schubert W, et al. Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:1 212-1218.
66. Aydin B, Onol M, Hondur A, et al. The effect of oral magnesium therapy on visual field and ocular blood flow in normotensive glaucoma. *Eur J Ophthalmol.* 2010;20:131-135.
67. Chew SJ. 1996. Animal models of glaucoma. In: Ritch, R., Shields, M.B., Krupin, T. (Eds.), *The Glaucomas: Basic Sciences, Anatomy and Pathology.* Mosby, New York, pp. 55-70.
68. Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno, et al. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res* 1995;61:379-382.
69. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier L, et al. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve. *Exp Eye Res* 1997;64:85-96.
70. Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn. J. Ophthalmol.* 1998;42:337-344.
71. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, et al. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:402-410.
72. Quigley HA, Addicks EM. Chronic experimental glaucoma in primates. I. Production of elevated intraocular pressure by anterior chamber injection of autologous ghost red blood cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19:126-136.
73. Weber AJ, Zelenak D. Experimental glaucoma in the primate induced by latex

- microspheres. *J Neurosci Methods* 2001;111:39-48.
74. Benson FG, Patterson MM, Epstein DL, et al. Obstruction of aqueous outflow by sodium hyaluronate in enucleated human eyes. *Am J Ophthalmol* 1983;95:668-672.
 75. Manni G, Lambiase A, Centofanti M, et al. Histopathological evaluation of retinal damage during intraocular hypertension in rabbit: involvement of ganglion cells and nerve fiber layer. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234:209-213.
 76. Tornngren L, Lundgren B, Madsen K. Intraocular pressure development in the rabbit eye after aqueous exchange with ophthalmic viscosurgical devices. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:1247-1252.
 77. Laquis S, Chaudhary P, Sharma SC. The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res* 1998;784:100–104.
 78. Garcia-Valenzuela E, Shareef SR, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 1995;61:33–44.
 79. Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, et al. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:217–240.
 80. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, et al. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 1997;64:85–96.
 81. Goldblum D, Mittag T. Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye. *Vis Res* 2002;42:471–478.
 82. Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp Eye Res* 2006;82:879–884.
 83. Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO. Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res* 2008;173:285–301.
 84. John SW, Hagaman JR, MacTaggart TE, et al. Intraocular pressure in inbred mouse strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:249–253.
 85. Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, et al. Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3415–3419.
 86. Johnson TV, Fan S, Toris CB. Rebound tonometry in conscious, conditioned mice avoids the acute and profound effects of anesthesia on intraocular pressure. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008;24:175–185.
 87. Moore CG, Milne ST, Morrison JC. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:363–369.
 88. Pease ME, Hammond JC, Quigley HA. Manometric calibration and comparison of

- TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice. *J Glaucoma* 2006;15:512–519
89. Saeki T, Aihara M, Ohashi M, et al. The efficacy of TonoLab in detecting physiological and pharmacological changes of mouse intraocular pressure– comparison with TonoPen and microneedle manometry. *Curr Eye Res* 2008;33:247–252.
 90. Ogden TE. Nerve fiber layer astrocytes of the primate retina: morphology, distribution, and density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17:499–510.
 91. Ramirez JM, Trivino A, Ramirez AI, et al. Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res* 1996;36:2029–2036.
 92. Johnson EC, Deppmeier LM, Wentzien SK, et al. Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:431–442.
 93. Ransom B, Behar T, Nedergaard M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* 2003;26:520–522.
 94. Hernandez MR. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:297–321.
 95. Trendelenburg G, Dirnagl U. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 2005;50:307–320.
 96. Vesce S, Rossi D, Brambilla L, et al. Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol* 2007;82:57–71.
 97. Yi JH, Hazell AS. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int* 2006;48:394–403.
 98. Wang X, Tay SS, Ng YK. An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res* 2000;132:476–484.
 99. Tezel G, Wax MB. Glial modulation of retinal ganglion cell death in glaucoma. *J Glaucoma* 2003;12:63–68.
 100. Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, et al. Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:977–985.
 101. Tezel G, Chauhan BC, LeBlanc RP, et al. Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3025–3033.
 102. Woldemussie E, Wijono M, Ruiz G. Muller cell response to laser-induced increase in

- intraocular pressure in rats. *Glia* 2004;47:109–119.
103. Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, et al. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3978–3983.
104. Naskar R, Wissing M, Thanos S. Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2962–2968.
105. Kanamori A, Nakamura M, Nakanishi Y, et al. Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 2005;81:48–56.
106. Wang L, Cioffi GA, Cull G, et al. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1088–1094.
107. Castilla GL, Del Carmen Fernandez MM, Lopez Chozas, et al. Statins in stroke prevention: what an internist should know. *Eur J Intern Med* 2008;19:8–14.
108. Nassief A, Marsh JD. Statin therapy for stroke prevention. *Stroke* 2008;39: 1042–1048
109. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89–118.
110. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A. The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther* 2003;99:95–112.
111. Hoglund K, Blennow K. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on betaamyloid peptide levels: implications for Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 2007;21:449–462
112. Wolozin B, Manger J, Bryant R, et al. Reassessing the relationship between cholesterol, statins and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 2006;185: 63–70.
113. Huang X, Chen H, Miller WC, et al. Lower low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22:377–381.
114. Wahner AD, Bronstein JM, Bordelon YM, et al. Statin use and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2008;70:1418–1422.
115. Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, et al. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J Exp Med* 2003;197:725–733.
116. Floris S, Blezer EL, Schreibelt G, et al. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain* 2004;127:616–627.
117. Greenwood J, Walters CE, Pryce G, et al. Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune

encephalomyelitis. *FASEB J* 2003;17:905–907.

118. Paintlia AS, Paintlia MK, Singh AK, et al. Regulation of gene expression associated with acute experimental autoimmune encephalomyelitis by Lovastatin. *J Neurosci Res* 2004;77:63–81.
119. Berger C, Xia F, Maurer MH, et al. Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats. *Brain Res Rev* 2008;58:48–56.
120. Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25:281–290.
121. Sironi L, Cimino M, Guerrini U, et al. Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:322–327.
122. Chen L, Haught WH, Yang B, et al. Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:569–575.
123. Hussein O, Schlezinger S, Rosenblat M, et al. Reduced susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to lipid peroxidation after fluvastatin therapy is associated with the hypocholesterolemic effect of the drug and its binding to the LDL. *Atherosclerosis* 1997;128:11–18.
124. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, et al. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20: 61–69.
125. Wassmann S, Laufs U, Baumer, AT, et al. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001;59:646–654.
126. Guasti L, Marino F, Cosentino M, et al. Prolonged statin-associated reduction in neutrophil reactive oxygen species and angiotensin II type 1 receptor expression: 1-year follow-up. *Eur Heart J* 2008;29:1118– 1126.
127. Endres M, Laufs U, Liao JK, et al. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* 2004;27:283–289.
128. Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, et al. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 2004;36:265–275.
129. Asahi M, Huang Z, Thomas S, et al. Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25: 722–729.

130. Undas A, Brummel KE, Musial J, et al. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. *Circulation* 2001;103:2248–2253.
131. Chen J, Zhang ZG, Li Y, et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 2003;53:743–751.
132. Skaletz-Rorowski A, Walsh K. Statin therapy and angiogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:599–603.
133. Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21:383–421.
134. Balduini W, De A, V Mazzoni E, et al. Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal hypoxic/ ischemic brain injury. *Stroke* 2001;32:2185–2191.
135. Baytan SH, Alkanat M, Ozeren M, et al. Fluvastatin alters psychomotor performance and daily activity but not the spatial memory in rats. *Tohoku J Exp Med* 2006;209:311–320.
136. Van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2009;88(1):64-75.
137. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 2001;292(5519):1160-4.
138. Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Böhm M, et al. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 2002;942(1-2):23-30.
139. Laufs U, Gertz K, Tan JS, Mitchell P, Rohtchina E, Wang JJ. Statin use and the long-term risk of incident cataract: the Blue Mountains Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2007;143:687–9.
140. Tan JS, Mitchell P, Rohtchina E, Wang JJ. Statin use and the long-term risk of incident cataract: the Blue Mountains Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2007;143:687–9.
141. Tan JS, Mitchell P, Rohtchina E, Wang JJ. Statins and the long-term risk of incident age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2007;143: 685–7.
142. Gordon B, Chang S, Kavanagh M, et al. The effects of lipid lowering on diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1991;112:385–91.
143. Cimino M, Gelosa P, Gianella A, et al. Statins: multiple mechanisms of action in the ischemic brain. *Neuroscientist* 2007;13:208 –13.
144. Nagaoka T, Takahashi A, Sato E, et al. Effect of systemic administration of simvastatin

- on retinal circulation. Arch Ophthalmol 2006;124:665–70.
145. Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase specific inhibitor, Y-27632. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:1029–37.
146. McGwin G Jr, McNeal S, Owsley C, et al. Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. Arch Ophthalmol 2004;122:822–6.
147. De Castro DK, Punjabi OS, Bostrom AG, et al. Effect of statin drugs and aspirin on progression in open-angle glaucoma suspects using confocal scanning laser ophthalmoscopy. Clin Experiment Ophthalmol 2007;35:506–13.
148. Leung DY, Li FC, Kwong YY, et al. Simvastatin and Disease Stabilization in Normal Tension Glaucoma: A Cohort Study. Ophthalmology 2010; 117(3):471-6.
149. Kretz A, Schmeer C, Tausch S, et al. Simvastatin promotes heat shock protein 27 expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells in vivo. Neurobiol Dis 2006;21(2):421-30.

8. ÖZET

Ratlarda Glokom Modelinde Sistemik ve/veya İntravitreal Rosuvastatin Uygulamasının Retinal Ganglion Hücreleri Üzerine Nöroprotektif Etkisinin Değerlendirilmesi

Amaç: Ratlarda glokom modelinde sistemik ve/veya intravitreal rosuvastatin uygulamasının nöroprotektif etkisinin değerlendirilmesi.

Metod: 30 adet Long-Evans cinsi ratın 60 gözü çalışmaya dahil edildi. Kronik oküler hipertansiyon modeli ratların sağ gözlerinde episkleral ven koterizasyonu (EVK) yolu ile oluşturuldu (30 göz). Ratların diğer gözleri kontrol grubu olarak alındı. Ratlar; grup 1 (1mg/kg/gün oral rosuvastatin), grup 2 (intravitreal rosuvastatin), grup 3 (oral+intravitreal rosuvastatin), grup 4 (intravitreal sham) ve grup 5 (sadece glokom modeli) olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Tüm gruplarda EVK öncesi ve sonrası Tonopen (Medtronic Solan, FL, USA) ile göz içi basınç (GİB) değerleri ölçüldü. RGH morfoloji ve sayısı Hematoksilen-Eosin, apoptozise uğrayan RGH oranları TUNEL boyama ile değerlendirildi. Gruplar arası RGH sayı farkları istatistiksel olarak Mann-Whitney-U testi ile analiz edildi. EVK öncesi ve sonrası GİB farkları ise Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı.

Bulgular: EVK öncesi Tonopen (Medtronic Solan, FL, USA) ile ölçülen GİB değeri tüm gruplarda ortalama $15,31 \pm 1,30$ mmHg (12,50-17,75) ve EVK sonrası 2.hafta $28,73 \pm 2,45$ mmHg (25,50-34,00) olarak ölçüldü ($p < 0,0001$). Total RGH sayısı grup 1 ($92,4 \pm 7,3$) 'de grup 5 ($70,33 \pm 8,2$) ile karşılaştırıldığında daha yüksek izlenirken, kendi kontrol grubu ($94,8 \pm 9,7$) ile benzer olduğu saptandı ($p:0.03$; $p:0.90$, sırasıyla). Grup 2 ($57,3 \pm 8,2$) ve grup 3 ($60,5 \pm 12,9$)' teki RGH sayıları ise grup 5'e göre daha az olarak bulundu (sırasıyla, $p:0,004$, $p:$

0,261). TUNEL boyamada apoptozise uğrayan hücre oranları ise RGH sayıları ile paraleldi ve gruplara göre sırasıyla; %0.9, %10.4, %3.3, %0,0 %5.6 olarak bulundu.

Sonuç: Oral rosuvastatin alan ratlarda RGH kaybının daha az bulunması, nöroprotektif etkisini desteklemekte birlikte; intravitreal rosuvastatin uygulamasının RGH' leri koruyucu etkisi gösterilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Rat glokom modeli, rosuvastatin, nöroproteksiyon

9. SUMMARY

The Evaluation Of Neuroprotective Effect Of Systemic and/or Intravitreal Rosuvastatin Administration in Rat Glaucoma Model

Purpose: The purpose of the study was to evaluate the neuroprotective effect of rosuvastatin, in a rat experimental glaucoma model.

Methods: Chronic ocular hypertension was induced in right eyes of Long Evans rats (n=60) by cauterization of three episcleral veins. Left eyes were defined as control group. Rats were divided into five groups; group 1 (1mg/kg/day oral rosuvastatin), group 2 (intravitreal rosuvastatin), group 3 (oral+intravitreal rosuvastatin), group 4 (intravitreal sham) and group 5 (only glaucoma model). Animals were examined for changes in IOP by a TonoPen(Medtronic Solan, FL, USA). Rats were sacrificed at day 14. Total cell number was assessed by histopathological analysis. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick end-labeling (TUNEL) staining was performed and the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was examined to evaluate changes of retinal ganglion cell (RGC) apoptosis and glial cell activation.

Results: A significant IOP elevation was seen as early as one day, and maintained for up to 2 weeks, after surgery ($p<0.0001$). Elevated IOP resulted in a significant decrease in number of RGCs in group 5 (70.33 ± 8.2 cells) when compared with control eyes (94.8 ± 9.7 cells; $p=0.03$). The number of RGC in group 1 ($92,4\pm 7,3$ cells) was significantly higher than group 5 ($p=0.03$). The number of RGC in group 2 ($57,3\pm 8,2$ cells) and group 3 ($60,5\pm 12,9$ cells) was significantly reduced compared with group 5 ($p=0,004$ and $p=0.261$ respectively). The apoptosis rates with TUNEL staining were parallel to RGC number (0.9%, 10.4%, 3.3%,

0.0% and 5.6% respectively). GFAP expression and TUNEL staining revealed significant decreases in RGC apoptosis and glial cell activation after oral rosuvastatin administration.

Conclusion: Decrease in RGC loss and apoptosis suggest the neuroprotective potential of oral rosuvastatin in an animal model of chronic ocular hypertension, but further studies are required.

Key words: Rat glaucoma model, rosuvastatin, neuroprotection

10. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kayseri' de doğmuştur. İlk ve Orta Öğretimimi Ahmet Paşa İlkokulu, N.M. Küçükçalık Anadolu Lisesi ve Kayseri Fen Lisesi'nde, Yüksek Öğrenimini ise 2001-2007 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tamamlamıştır.

2007 yılında girmiş olduğu Tıpta Uzmanlık Sınavında on ikinci olup, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalını kazanarak Ekim 2007'de göreve başlamıştır. İhtisas süresi boyunca çeşitli yurt içi ve yurt dışı bilimsel toplantılara katılarak Göz Hastalıkları ile ilgili çalışmalarını sunmuştur.

2 yıllık evlidir. Türk Oftalmoloji Derneği üyesi olup, iyi derecede İngilizce ve başlangıç seviyesinde Almanca bilmektedir.