



**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ  
SİNİRBİLİM DOKTORA  
PROGRAMI**

**SIÇAN RETİNAL VEN OKLÜZYONU MODELİNDE  
RESVERATROLÜN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ  
Ebru Nevin ÇETİN**

**Temmuz 2023  
DENİZLİ**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN RETİNAL VEN OKLÜZYONU MODELİNDE  
RESVERATROLÜN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

SİNİRBİLİM DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ

Ebru Nevin ÇETİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL

Denizli, 2023

## YAYIN BEYAN SAYFASI

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar" gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Tam metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1. Akbulut S, Pekel G, Pekel E, **Cetin EN**. Alterations in retinal and choroidal thickness following nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Int Ophthalmol* 2021; 41(8): 2723-2728.

## BİLİMSEL ETİK SAYFASI

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı:

Ebru Nevin Çetin

İmza :

## ÖZET

### SIÇAN RETİNAL VEN OKLÜZYONU MODELİNDE RESVERATROLÜN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

Ebru Nevin ÇETİN

Doktora Tezi, Sinirbilim AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL

Temmuz 2023, 51 sayfa

**Amaç:** Retinal ven oklüzyonu ile ilişkili retina hasarında nörodejenerasyonun rol oynadığı gösterilmiştir. Resveratrol nöroprotektif etkileri dokümente edilmiş olan bir polifenoldür. Bu çalışmada sıçan retinal ven oklüzyonu modelinde resveratrolün nöroprotektif etkisinin araştırılması planlanmıştır.

**Metod:** Çalışmada Wistar albino sıçanların gözleri kullanıldı. Sıçanların sağ gözlerinde lazer (532nm yeşil lazer, Iridex IQ532, Iridex corp., Mountain View, CA, USA) ile retinal ven oklüzyonu oluşturuldu. Lazerden önce 20mg/kg fotosensitizan Rose-Bengal boyası intraperitoneal uygulandı. Sol gözlere lazer yapılmadı ve lazer uygulanan sağ gözlerin kontrol grubu olarak kullanıldı. Sıçanların yarısına nöroprotektif ajan olarak 14 gün boyunca %3 etanol içinde çözündürülerek 40mg/kg resveratrol gavaj ile verildi.

Sıçanların gözleri 4 gruba ayrılarak değerlendirildi: Resveratrol verilen grupta sağ gözler lazer+resveratrol grubunu, lazer uygulanmamış sol gözleri resveratrol grubunu oluşturdu. Resveratrol verilmeyen grupta sağ gözler lazer grubunu, sol gözler kontrol grubunu meydana getirdi. On dört gün sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek retina izolasyonu yapıldı. Retina örneklerinde gangliyon hücre sağkalımının değerlendirilmesi için Brn3a mRNA seviyesi gerçek-zamanlı PCR ile ölçüldü. Brn3a ekspresyonunun protein düzeyinde gösterilmesi için Western-Blot analizi yapıldı.

**Bulgular:** Kontrol, resveratrol, lazer ve lazer+resveratrol gruplarına ait retina doku örneklerinde Brn3a ekspresyon düzeyleri sırasıyla  $1.062968647 \pm 0.355429593$ ,  $0.683676202 \pm 0.238218336$ ,  $1.098342833 \pm 0.322410268$  ve  $0.954085 \pm 0.431687$  saptandı. Kontrol ile lazer, kontrol ile lazer+resveratrol ve lazer ile lazer+resveratrol gruplarında p değerleri sırası ile  $p=0.46$ ,  $p=0.26$  ve  $p=0.37$  olarak bulundu. Western-Blot analizlerinde internal kontrol olarak kullanılan  $\beta$ - aktin proteinine ait bant gözlemlendi ancak Brn3a proteinine ait bant izlenmedi.

**Sonuç:** Çalışmada gruplar arasında Brn3a mRNA ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık görülmedi. Resveratrol verilen grupta lazer yapılmayan gözlerde Brn3a mRNA ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir düşüş izlendi. Retina örneklerinde Western-Blot analizi ile Brn3a ekspresyonu saptanamadı.

**Anahtar kelimeler:** retina, resveratrol, retinal ven oklüzyonu, nöroproteksiyon, Brn3a

**Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021SABE002).**

## ABSTRACT

### THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF RESVERATROL IN THE RAT RETINAL VEIN OCCLUSION MODEL

CETIN, Ebru Nevin  
PhD Thesis in Neuroscience  
Supervisor: Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL  
July 2023, 51 Pages

**Objective:** Neurodegeneration has been shown to play a role in retinal damage associated with retinal vein occlusion. Resveratrol is a polyphenol with documented neuroprotective effects. In this study, it was planned to investigate the neuroprotective effect of resveratrol in the rat retinal vein occlusion model.

**Method:** The eyes of Wistar albino rats were used in the study. Retinal vein occlusion was created in the right eyes of rats with laser (532nm green laser, Iridex IQ532, Iridex corp., Mountain View, CA, USA). Before the laser, 20mg/kg photosensitizing Rose-Bengal dye was applied intraperitoneally. The left eyes were not lasered, and the lasered right eyes were used as the control group. Half of the rats were given 40mg/kg resveratrol by gavage, dissolved in 3% ethanol for 14 days as a neuroprotective agent. The eyes of the rats were divided into 4 groups: In the resveratrol group, the right eyes formed the laser + resveratrol group, and the left eyes that did not receive the laser formed the resveratrol group. In the group without resveratrol, the right eyes formed the laser group, and the left eyes formed the control group.

At the end of fourteen days, the rats were sacrificed and retinal isolation was performed. To assess ganglion cell survival in retinal samples, the level of Brn3a mRNA was measured by real-time PCR. Western-Blot analysis was performed to show the expression of Brn3a at the protein level.

**Results:** Brn3a expression levels in retinal tissue samples of control, resveratrol, laser and laser+resveratrol groups were  $1.062968647 \pm 0.355429593$ ,  $0.683676202 \pm 0.238218336$ ,  $1.098342833 \pm 0.322410268$  and  $0.954085 \pm 0.431687$ , respectively. P values were found as  $p=0.46$ ,  $p=0.26$  and  $p=0.37$  in control and laser, control and laser+ resveratrol, and laser and laser+resveratrol groups, respectively. In Western-blot analyses, a band of  $\beta$ -actin protein used as internal control was observed, but no band of Brn3a protein was observed.

**Conclusion:** There was no significant difference in Brn3a mRNA expression level between the groups in the study. A non-significant decrease was observed in the expression level of Brn3a mRNA in the resveratrol-treated group in the eyes that did not undergo laser treatment compared to the control group. Brn3a expression could not be detected in retinal samples by Western-Blot analysis.

**Key words:** retina, resveratrol, retinal vein occlusion, neuroprotection, Brn3a

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number: 2021SABE002).**

## TEŞEKKÜR

Eğitimimde emeği olan t¼m hocalarıma, bir¼ok ilki birlikte öğrenmeye ¼alıőtıđımız bu projede desteklerini esirgemeyen sevgili ekip arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Cansu Barıő, Dr. İbrahim C¼neyit, Dr. Őevval Özt¼rk'e ve elbette bu zorlu yolculuğun en baőtından en sonuna kadar her an yanımda olan, bilgi ve birikimleri ile bana yol g¼steren, bilimsel donanımları ve bitmek bilmeyen ¼alıőtma azimleri ile bana s¼rekli ilham kaynağı olan ¼ok sevgili ve saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Esat Adıg¼zel ve Prof. Dr. Vildan Caner'e sonsuz teőekk¼rlerimi sunarım.

Ebru Nevin ¼ETİN

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	iv, v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vi,vii
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1 Amaç.....	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	3
2.1.Retina Anatomisi.....	3
2.2. Sıçan Retinası.....	4
2.3. Retinal Ven Oklüzyonunda Klinik Bulgular.....	5
2.4. Retinal Ven Oklüzyonunda Patogenez.....	6
2.4.1. Retinal ven oklüzyonunda iskemi ve inflamasyon.....	6
2.4.2. Retinal ven oklüzyonunda nörodejenerasyon.....	7
2.5. Brain-specific homeobox/POU Domain Protein 3A.....	7
2.6. Retinal Ven Oklüzyonunda Tedavi.....	8
2.7. Karşılanmamış İhtiyaçlar.....	8
2.8. Resveratrol.....	9
2.9. Çalışmanın Hipotezi.....	9
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	11
3.1. Deney Protokolü.....	11
3.2. Çalışma Grubunda Retinal Venlerde Lazer İle Tıkanıklık Oluşturulması....	11
3.3. Resveratrol Uygulaması.....	12
3.4. Fundus görüntüleme ve Anjiyografi.....	12
3.5. Sakrifikasyon, Enükleasyon ve Retina izolasyonu.....	12
3.6. Retinal Kesitlerin Hazırlanması ve Işık Mikroskobu ile İncelenmesi.....	13
3.6.1. Retinal kesitlerin alınması.....	13
3.6.2. Hematoksilen ve Eosin boyama basamakları.....	13



3.7. Vitreus-Aköz Alınması.....	14
3.8. Western-Blot Protokolü İle Brn3a Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Gösterilmesi.....	14
3.8.1. Retina dokusundan izole edilen proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	15
3.8.2. Western-Blot Analizi.....	15
3.9. <i>Brn3a</i> Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi.....	16
3.9.1. Retina örneklerinden total RNA izolasyonu.....	16
3.9.2. Total RNA örneklerinden cDNA sentezi.....	17
3.9.3. Hedef gen <i>Brn3a</i> ekspresyonunun real-time PCR ile relatif kantitasyonu.....	18
3.10. İmmunohistokimyasal Boyama-Apoptozisin Değerlendirilmesi.....	19
3.11 İstatistiksel Analizler.....	19
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>20</b>
4.1 Fundus Görüntüleme ve Anjiyografi.....	20
4.2 Retina İzolasyonu Yöntemleri.....	25
4.3 Retinal Kesitlerin Hazırlanması.....	25
4.4 Western-Blot analizi ile <i>Brn3a</i> ekspresyonunun protein düzeyinde gösterilmesi.....	28
4.5. <i>Brn3a</i> Gen Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi.....	30
4.6 Apoptozisin Değerlendirilmesi.....	33
4.7 Komplikasyonlar.....	34
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>35</b>
5.1 Çalışmanın Zayıf Ve Güçlü Yönleri.....	42
<b>6. SONUÇLAR.....</b>	<b>43</b>
6.1 Çalışmada Elde Edilen Ve Gelecekte Planlanacak Çalışmalar İçin Yol Gösterici Olabilecek Teknik Sonuçlar.....	43
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>44</b>
<b>8.ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>49</b>

## 9. EKLER

Ek-1. Akbulut S, Pekel G, Pekel E, **Cetin EN**. Alterations in retinal and choroidal thickness following nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Int Ophthalmol* 2021; 41(8): 2723-2728.

Ek-2. Etik kurul onay belgesi.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

<b>Şekil 1</b> Sıçan retinasının optik koherens tomografi kesit görüntüsü.....	5
<b>Şekil 2.1</b> İndirek oftalmoskopi lensleri ile akıllı telefon kamerası kullanılarak retinal görüntüleme.....	21
<b>Şekil 2.2.</b> İndirek oftalmoskopi lensleri ile akıllı telefon kamerası kullanılarak retinal görüntüleme (büyütülmüş görüntü).....	21
<b>Şekil 3.1.</b> Kontakt makula lensi ile retinal görüntüleme.....	22
<b>Şekil 3.2.</b> Kontakt makula lensi ile retinal görüntüleme (büyütülmüş görüntü).....	23
<b>Şekil 4.1</b> Lazer ile retinal ven oklüzyonu oluşturulmasından sonraki retinal görüntü.....	24
<b>Şekil 4.2</b> Lazer ile retinal ven oklüzyonu oluşturulmasından sonraki optik koherens tomografi görüntüsü.....	24
<b>Şekil 4.3</b> Lazer ile retinal ven oklüzyonu oluşturulmasından 36 saat sonra optik koherens tomografi görüntüsü. ....	24
<b>Şekil 5.1</b> Retinal tabakalarda kopma ve segmentasyon (X4 büyütme, 20µm kalınlık)...	25
<b>Şekil 5.2</b> Retinal tabakalarda kopma ve segmentasyon (X10 büyütme, 20µm kalınlık)...	26
<b>Şekil 6.</b> Dört yapraklı yonca modelinde hazırlanan bütün retina.....	26
<b>Şekil 7.1</b> Retinal tabakalarda bozulma (X10 büyütme, 10µm kalınlık).....	27
<b>Şekil 7.2</b> Retinal tabakalarda bozulma (X40 büyütme, 10µm kalınlık).....	28
<b>Şekil 8.1</b> Lazer uygulanmış sıçan retina örneğinde Western-Blot analizi. <b>A.</b> β-Aktin için yapılan Western-Blot analizi. 1 numaralı kuyu: 10-250 kDa'luk protein moleküler ağırlık marker'ı (Santa Cruse Biotech), 2 numaralı kuyu: Örnekte 41 kDa ağırlığında β-Aktinin varlığını gösteren bant profili. <b>B.</b> Brn3a için yapılan Western-Blot analizi. 1 numaralı kuyu: 10-250 kDa'luk protein moleküler ağırlık marker'ı (Santa Cruse Biotech), 2 numaralı kuyu: Örnekte 43 kDa ağırlığında Brn3a'nın varlığını gösteren bant profili saptanmadı.....	29
<b>Şekil 8.2</b> Lazer uygulanmamış sıçan retina örneğinde Western-Blot analizi <b>A.</b> β-Aktin için yapılan Western-Blot analizi. 1 numaralı kuyu: 10-250 kDa'luk protein moleküler ağırlık marker'ı (Santa Cruse Biotech), 2 numaralı kuyu: Örnekte 41 kDa ağırlığında β-Aktinin varlığını gösteren bant profili. <b>B.</b> Brn3a için yapılan Western-Blot analizi. 1 numaralı kuyu: 10-250 kDa'luk protein moleküler ağırlık marker'ı (Santa Cruse Biotech), 2 numaralı kuyu: Örnekte 43 kDa ağırlığında Brn3a'nın varlığını gösteren bant profili saptanmadı.....	30
<b>Şekil 9.1</b> Kontrol grubunda yer alan retina örneklerinde <i>Brn3a</i> ve <i>Gapdh</i> 'e özgün amplifikasyon eğrileri. Grafikte (a-e) <i>Brn3a</i> , (f-j) <i>Gapdh</i> 'e ve (k) negatif kontrol örneğine özgün amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.....	31
<b>Şekil 9.2</b> Lazer grubunda yer alan retina örneklerinde <i>Brn3a</i> ve <i>Gapdh</i> 'e özgün amplifikasyon eğrileri. Grafikte (a-e) <i>Brn3a</i> , (f-j) <i>Gapdh</i> 'e ve (k) negatif kontrol örneğine özgün amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.....	31
<b>Şekil 9.3</b> Resveratrol grubunda yer alan retina örneklerinde <i>Brn3a</i> ve <i>Gapdh</i> 'e özgün amplifikasyon eğrileri. Grafikte (a-e) <i>Brn3a</i> , (f-j) <i>Gapdh</i> 'e ve (k) negatif kontrol örneğine özgün amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.....	32

- Şekil 9.4** Lazer+resveratrol grubunda yer alan retina örneklerinde *Brn3a* ve *Gapdh*'e özgün amplifikasyon eğrileri. Grafikte (a-e) *Brn3a*, (f-j) *Gapdh*'e ve (k) negatif kontrol örneğine özgün amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.....32
- Şekil 10.** Kontrol, resveratrol, lazer ve lazer+resveratrol gruplarına ait retina doku örneklerinde *Brn3a* ekspresyon düzeyleri.....33
- Şekil 11.** Apoptozisin değerlendirilmesi için TUNEL yöntemi ile yapılan incelemede retinal hücrelerde pozitif boyanma olmadığı izlenmektedir.....34

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BDNF.....	Beyin kökenli nörotrofik faktör
Brn3a.....	Beyin-spesifik homeobox/POU domain protein
cDNA.....	Komplementer deoksiribonükleik asit
COX-2.....	Siklo-oksijenaz-2
DAB.....	Diaminobenzidin
DNA.....	Deoksiribonükleik asid
dNTP.....	Deoksiribonükleotid trifosfat
FG.....	Fluorogold
Gapdh.....	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
HRP.....	Horseradish peroksidaz
IgG.....	İmmunglobulin G
IL.....	İnterlökin
iNOS.....	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
MCP-1.....	Monosit kemoatraktan protein-1
mRNA.....	Mesajcı ribonükleik asit
PCR.....	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF-AA.....	Platelet derive büyüme faktörü-AA
PVDF.....	Poliviniliden diflorid
RGH.....	Retinal gangliyon hücresi
RIPA.....	Radioimmunopresipitasyon assay tamponu
RBPMs.....	Çoklu splicing içeren RNA-bağlayıcı protein
RNA.....	Ribonükleik asid
RSV.....	Resveratrol
RVDO.....	Retinal ven dal oklüzyonu
RVO.....	Retinal ven oklüzyonu
SDS-PAGE.....	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez
SRVO.....	Santral retinal ven tıkanıklığı
TBST.....	<u>Tris-tamponlu salin /Polisorbat 20</u>
TdT.....	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TrkB.....	Tropomyozin reseptör kinaz B
TUNEL.....	Terminal deoksinükleotidil transferaz <u>dUTP nick end labeling</u>
VEBF.....	Vasküler endotelial büyüme faktörü

## 1. GİRİŞ

Göz organı anatomik olarak ön ve arka segment olarak iki başlıkta incelenebilir. Ön segment duvarını tek başına kornea oluştururken, arka segment duvarı ise birbiri ile yakın temasta olan ve içten dışa retina, koroid ve sklera olarak isimlendirilen üç tabakanın toplamından oluşmaktadır. Retina, gözün arka segmentinde yer alan sinir tabakasıdır. Kanlanması arterler (atardamar) ve venler (toplardamar) ile sağlanmaktadır (İnan 2014).

Retinal venlerin tıkanması durumunda retinal ven oklüzyonu (RVO) isimli bir hastalık tablosu oluşmaktadır. RVO, kalıcı görme kaybı ile sonuçlanabilen bir retinal damar hastalığı olup, %0.1-2 arasında değişen bir insidansa sahiptir (Laouri vd 2011). RVO'nun, santral retinal ven oklüzyonu (SRVO) veya retinal ven dal oklüzyonu (RVDO) adlı alt tipleri mevcuttur.

RVO ilişkili hasar patogenezinde temel bulgulardan biri iskemidir. Retinal iskemiden sonra retinal pigment epiteli, glial hücreler, vasküler endotelial hücre gibi birçok hücreden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) ekspresyonu olduğu ve bunun endotelial proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (Aiello vd 1995). RVO olgularının aköz ve vitreus örneklerinde VEBF ve VEBF dışı bazı sitokinlerin de kontrol gruplarına göre daha yüksek seviyede olduğu saptanmıştır (Lim 2011, Noma vd 2013, Pfister vd 2013).

Tüm bu patolojik süreçler, RVO'unda görme bozukluğunun başlıca sebepleri olan, makular ödem, hemorajiler ve neovaskülarizasyonun gelişmesine yol açmaktadır. RVO tedavisine amaç bu ikincil komplikasyonlarla mücadele etmektir. RVO olgularında artmış VEBF ekspresyonunun gösterilmesinden sonra intravitreal (göziçi/vitreus içi) anti-VEBF ajanların tedavide kullanımı başlamıştır ve günümüzde RVO'nun altın standart tedavisi olarak kabul edilmektedir (Schmidt-Erfurth vd 2019).

Bir başka tedavi modalitesi de intravitreal deksametazon steroid implantıdır. Steroidler VEBF ekspresyonunu, yolaklarını ve sitokinleri azaltarak, vasküler permeabilitede ve sonuçta maküler ödemde gerileme sağlamaktadır (Schmidt-Erfurth vd 2019).

Elde edilen tüm gelişmelere rağmen, RVO olgularında intravitreal anti-VEBF ve steroid implant tedaviler tüm beklentileri karşılamamaktadır. Tedavi ile ödemi regrese olan hastalarda dahi nöronal kayıp ve nörodejeneratif değişiklikler görülmektedir (Brar vd 2019). Bu hastalarda tedaviden sonra devam eden görme kayıpları, RVO ile ilişkili patolojik süreçlerin daha iyi incelenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Güncel tedavide sürekli enjeksiyon ve izlem ihtiyacı, tekrarlayan enjeksiyon uygulamasının getirdiği tıbbi riskler, düzenli tedaviye rağmen görme kazanımlarının sınırlı olması RVO olgularında destekleyici ek tedavi ihtiyaçlarını ortaya çıkarmaktadır (Fekrat vd 2010). Tüm bu karşılanmamış ihtiyaçlar nedeniyle RVO'nda anti-VEBF ve steroid implantları dışında bir alternatif ya da adjuvan tedavi arayışları sürmektedir.

Resveratrol (RSV) fıstık, yaban mersini ve üzüm gibi birçok gıdada doğal olarak bulunan bir polifenoldür (Meng vd 2020). RSV'un anti-oksidan, anti-inflamatuar, nöroprotektif özellikleri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Pirhan vd 2016, Luo vd 2018, Chen vd 2019, Dou vd 2019, Galiniak vd 2019, Cao vd 2020, Deng vd 2020, Meng vd 2020). RSV'un iskemi-reperfüzyon ile ilişkili retinal gangliyon hücresi (RGH) hasarındaki nöroprotektif etkisi birçok çalışmada ele alınmıştır. Deneysel glokom modellerinde intraperitoneal ve intravitreal uygulamasının RGH kaybını azalttığı ve retinal bütünlüğü koruduğunu gösterilmiştir (Pirhan vd 2016, Luo vd 2018, Cao vd 2020). Deneysel diyabet (şeker hastalığı) modelinde, intravitreal RSV tedavisi ile retinal vasküler geçirgenlikte yaklaşık %50 azalma, anjiyojenik faktör olan VEBF değerlerinde ve apoptotik gösterge olan retinal terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling (TUNEL) pozitif hücrelerde azalma gösterilmiştir (Chen vd 2019).

## 1.1 Amaç

Literatürde deneysel RVO modellerinde ya da RVO saptanmış olgularda RSV'un etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızdaki amacımız sıçan RVO modelinde RSV'un nöroprotektif etkisinin araştırılmasıdır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1.Retina Anatomisi

Retina, embriyolojik olarak nöroektodermden gelişmektedir. Göz duvar tabakalarının en iç kısmı olan retina, sinir tabakasını oluşturmaktadır. Retinanın dışında yoğun damarsal yapısı ile koroid, onun da dışında fibröz koruyucu tabaka olan sklera yer alır. Retinanın tabakaları dıştan içe doğru 10 tabaka olarak ifade edilebilir (İnan 2014, Salmon 2019):

1. Retina pigment epiteli
2. Fotoreseptör tabakası
3. Dış limitan membran
4. Dış nükleer tabaka
5. Dış pleksiform tabaka
6. İç nükleer tabaka
7. İç pleksiform tabaka
8. Gangliyon hücre tabakası
9. Sinir lifi tabakası
10. İç limitan membran

Makula, arka kutupta, retinal temporal damar arkaları arasında kalan yaklaşık 5-6mm çapında olan alandır. Görme alanının santral 15-20 derecelik alanını karşılamaktadır ve retinanın en yüksek görme keskinliğine sahip bölgesidir. Makula, sarı renkli ksantofil pigmentleri olan lutein ve ksantofilden zengindir ve makula lutea adını buradan almaktadır (Salmon 2019).

Makulanın santraline fovea adı verilen 1.5mm çapında bir alan bulunmaktadır. Bu alanın santralinde de foveola adlı 0.35mm çapında bir çöküntü mevcuttur. Foveola retinanın en ince kısmıdır ve burada sadece kon fotoreseptör hücreleri ve Müller hücreleri bulunur. Retinal gangliyon hücreleri retinanın iç kısmında bulunurlar ve görme

yolunun 2. nöronlarıdır. Periferden makulaya doğru gangliyon tabaka sayısı artar, foveaya doğru tekrar azalır ve foveada tamamen kaybolur. Gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir. Bipolar hücreler ile sinaps yapar (İnan 2014, Salmon 2019).

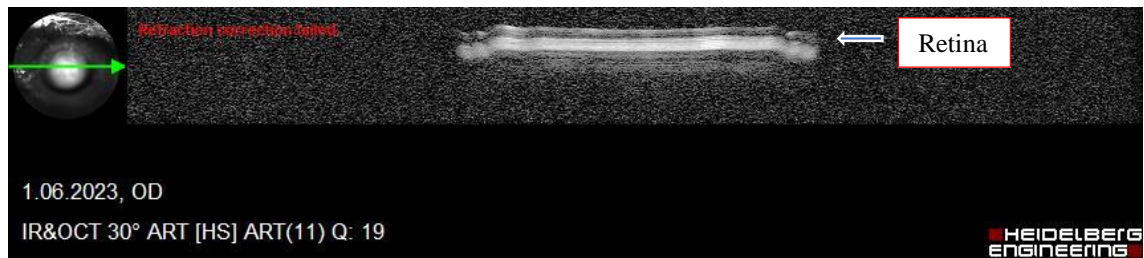
Retinal perfüzyon santral retinal arter, kapillerler, santral retinal ven ve koryokapillaris ile sağlanır. Santral retinal arter globun yaklaşık 1cm arkasından optik sinire girer ve retina içerisinde periferde doğru arteriollere dönüşür. Arterin en iç tabakası intimadır. Kollajen üzerinde tek tabaka endotelden oluşmaktadır. İçten dışa doğru intima, internal elastik lamina, düz kas içeren media ve gevşek bağ doku içeren adventisya bulunmaktadır. Arteriol duvarında ise arterden farklı olarak, internal elastik lamina devamlılık göstermemektedir. Arterioller kapiller damarlar olarak devam etmektedir. Retinanın iç 2/3 kısmı kapiller damarlardan, dış 1/3 kısmı ise koryokapillaristen perfüze olmaktadır. Retinal kapiller damarların iç tarafta gangliyon tabakasında, dışta ise iç nükleer tabakada bir damar ağı oluşturmaktadır. Fovea ve arteriollerin etrafı ise kapillerden yoksun (capillary-free) alanlardır. Kapiller damarlarda elastik lif ve düz kas bulunmaz. İçte endotel hücresi, ortada bazal membran ve en dışta da kontraktile özelliği olan perisitler yer alır. Kapiller damarlardaki kan retinal venüllere drene olur. Venüller santrale gittikçe vene dönüşürler. Büyük venüller düz kas içerirler, küçük venüllerin yapısı ise kapillerler benzer ancak daha genişler. Venler ise az miktarda düz kas ve elastik doku içerirler ve santral retinal vene dönüşerek optik disk içerisinde globdan ayrılır (Salmon 2019).

## 2.2. Sıçan Retinası

Sıçan retinası da insan retinasına benzer şekilde 10 tabakadan oluşur. Bu tabakalar, içten dışa doğru, iç limitan membran, sinir lifi tabakası, gangliyon hücre tabakası, iç pleksiform tabaka, iç nükleer tabaka, dış pleksiform tabaka, dış nükleer tabaka, dış limitan membran fotoreseptör tabakası ve pigment epiteli olarak sıralanmaktadır (Maynard ve Downes 2019). Sıçan retinasında insan retinasına nazaran daha az koni hücresi tipi mevcuttur (Levere 1978). Gangliyon hücre aksonlarından oluşan optik sinir, sıçanda yaklaşık 0.11 milyon akson içerirken insanda ise yaklaşık 1.2 milyon akson içermektedir (Pazos vd 2015). Sıçanda optik sinir, göz küresinin arka kısmında sklera açıklığından çıktıktan sonra intraorbital alandan geçip kiazmaya ulaşmaktadır. Kiazmada her iki gözden gelen optik sinir aksonlarının yaklaşık %90'ı çaprazlaşır ve %10'u da ipsilateral olarak optik traktus içinde seyreder (Levere 1978).



Optik traktustaki aksonların bir kısmı pretektal alanda, bir kısmı da talamusun lateral genikülat nukleusunda sonlanır (Levere 1978).



**Şekil 1** Sıçan retinasının optik koherens tomografi kesit görüntüsü

### 2.3. Retinal Ven Oklüzyonunda Klinik Bulgular

RVO sık görülen bir retinal damar hastalığı olup, %0.1-2 arasında değişen bir insidansı mevcuttur. Görme seviyesi genellikle 0.1 ile 0.5 arasında değişmektedir (Laouri vd 2011). En önemli risk faktörleri ileri yaş ve hipertansiyondur. Hastaların yarısından fazlası 65 yaş üstüdür. Hipertansiyon ise genç yaş RVO hastalarında da yaklaşık %25 oranında bulunmaktadır, özellikle RVDO için önemli bir risk faktörüdür. Hiperlipidemi, diabetes mellitus, glokom, oral kontraseptif kullanımı, sigara ve hematolojik protrombotik hastalıklar RVO ile ilişkili diğer risk faktörleridir (Salmon 2019).

SRVO'nın, aynı bağ dokuyu paylaştığı komşu arterdeki sklerotik değişiklikler sonucunda santral retinal vene bası olması nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bası nedeniyle hemodinamik denge değişmekte ve trombus ortaya çıkmaktadır. RVDO'nda ise arteriovenöz çaprazlaşma bölgelerinde üstten geçen arterin vene yaptığı bası sorumlu tutulmaktadır (Salmon 2019, Schmidt-Erfurth vd 2019).

Hematolojik protrombotik faktörlerin varlığı, aterosklerotik yapının etkilerini güçlendirmektedir. RVO klinik bulguları içerisinde makular ödem, hemorajiler ve neovaskülarizasyon bulunmaktadır. Bu bulgular, RVO ile ilişkili görme bozukluğunun başlıca sebepleridir.

## 2.4. Retinal Ven Oklüzyonunda Patogenez

### 2.4.1. Retinal ven oklüzyonunda iskemi ve inflamasyon

RVO ilişkili hasar patogenezinde temel bulgulardan biri iskemidir. Retinal iskemiden sonra retinal pigment epiteli, glial hücreler, vasküler endotelial hücre gibi birçok hücreden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) ekspresyonu olduğu ve bunun endotelial proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (Aiello vd 1995). RVO olgularının aköz ve vitreus örneklerinde VEBF ve VEBF dışı bazı sitokinlerin de kontrol gruplarına göre daha yüksek seviyede olduğu saptanmıştır (Lim 2011, Noma vd 2013, Pfister vd 2013).

Lim vd (2011) RVDO olgularının aköz örneklerinde interlökin (IL) analizi yapmışlar, IL-6, IL-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) seviyesini kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. Funk vd (2009) SRVO olan hastalarının aköz örneklerinde VEGF, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, ve PDGF-AA konsantrasyonlarında, RVDO'da ise IL-1alfa da kontrol grubuna göre anlamlı artış saptamışlardır. Noma vd (2008) ise RVO'nda aköz ve vitreus IL-6 ve VEBF düzeylerinin, retinal non-perfüzyon alanları ve makuler ödem miktarı ile korele olduğunu göstermiştir. Kaneda vd (2011) RVDO ile başta IL-8 olmak üzere birçok interlökin seviyesi arasında anlamlı bir ilişki saptamış, özellikle IL-8 seviyesi, görme keskinliği, makula ödem miktarı ve non-perfüze alan ile ilişkili bulunmuştur.

RVDO'unda inflamasyonu değerlendiren birkaç çalışmada da IL-6, MCP-1 ve VEBF'in anlamlı yüksekliği dikkat çekmektedir (Koss vd 2012, Noma vd 2013, Pfister vd 2013, Shchuko vd 2015). RVO olgularında sitokinlerin değerlendirildiği 4644 göz verisini içeren bir metaanalizde, aköz ve vitreus örneklerinde IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır (Minaker vd 2020).

Tüm bu bulgular, RVO olgularında intraoküler inflamasyonun patogenezde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

#### **2.4.2. Retinal ven oklüzyonunda nörodejenerasyon**

RVO, temelde iskemik bir tablodur. Deneysel çalışmalarda, retinal venin 2-3 gün içinde çoğunlukla rekanalize olduğu ancak rekanalizasyona rağmen mikrovasküler değişikliklerin ve kapiller tıkanıklığın sebat ettiği bildirilmiştir (Genevois vd 2004, Zhang vd 2008, Sun vd 2013). İskemi nedeniyle nöronlara akut/kronik veri girişinin azalmasının apoptotik bir mekanizmayı tetikleyebileceği de ileri sürülmektedir (Alshareef ve Chhablani 2016). Sıçan RVDO modelinde apoptozis değerlendirilmesinde nöronal hücrelerde TUNEL pozitifliği saptanmıştır (Avrutsky vd 2020). Benzer şekilde, domuz gözünde yapılan deneysel RVDO modelinde, gangliyon hücre ve iç nükleer tabakadaki TUNEL pozitif hücrelerin özellikle RVO sonrası 2. günde daha fazla olduğu izlenmiştir (McAllister vd 2018). RVO doğal seyrinin değerlendirildiği bir deneysel çalışmada, 14. günden itibaren ciddi RGH kaybı olduğu gösterilmiştir (Alshareef vd 2016).

Tedavi almamış RVDO olgularına bakıldığında, makuler gangliyon hücre-iç pleksiform ve retina sinir lifi tabakalarında hastaların diğer gözlerine ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı azalma izlenmiştir (Alshareef vd 2016). Makuler ödem rezolüsyonu sonrasında optik koherens tomografi anjiyografi ile değerlendirilen RVDO olgularında, foveal avasküler zonda irregülerite ve genişleme, gangliyon hücre tabakasında incelme, damar dansitesinde azalma saptanmış, retinal incelmanın RVO'nun nörodejeneratif sekeli olduğu ileri sürülmüştür (Brar vd 2019). Bütün bu bulgular, RVO'nda nörodejeneratif değişiklikleri göstermektedir.

#### **2.5. Brain-specific homeobox/POU Domain Protein 3A**

Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A (Brn3a), POU alanı transkripsiyon faktörlerinden olan Brn3 ailesinin bir üyesidir. Brn3 ailesinin, rodent RGH gelişimi sırasında farklılaşma, hayatta kalma ve aksonal elongasyonda önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Özellikle Brn3a, in vitro sıçan retina kültüründe RGH'ni tanımlamak için kullanılmıştır ve RGH sağkalımını göstermek için sık kullanılan indikatörlerden biridir (Nadal-Nicolás vd 2009). Öte yandan melanopsin eksprese eden RGH işaretlemeye kullanılmadığı ve kabaca RGH popülasyonun %80'ini göstermede başarılı olduğu kaydedilmiştir (Nadal-Nicolás vd 2009, Masin vd 2021).

## 2.6. Retinal Ven Oklüzyonunda Tedavi

RVO olgularında artmış VEBF ekspresyonunun gösterilmesinden sonra intravitreal (göziçi/vitreus içi) anti-VEBF ajanlar tedavide kullanılmıştır ve günümüzde RVO'nın altın standart tedavisi olarak kabul edilmektedir (Schmidt-Erfurth vd 2019). Bir başka tedavi modalitesi de intravitreal deksametazon steroid implantıdır. Steroidler VEBF ekspresyonunu, yolaklarını ve sitokinleri azaltarak, vasküler permeabilitede ve sonuçta makuler ödemde gerileme sağlamaktadır (Schmidt-Erfurth vd 2019).

Intravitreal anti-VEBF ve steroid implant tedaviler, RVO olgularında tüm beklentileri karşılamamaktadır. Tedavi ile ödemi regrese olan hastalarda dahi nöronal kayıp ve nörodejeneratif değişiklikler görülmektedir (Brar vd 2019). Anti-VEBF tedavinin prensipleri gereği önce 3 ay boyunca aylık göz içi enjeksiyon, sonra tedavi protokollerine göre değişmekle birlikte her ay, ihtiyaç oldukça ya da tedavi et uzat rejimi kapsamında enjeksiyon araları açılarak enjeksiyonlara yıllarca devam edilmektedir. RVO için anti-VEBF uygulanan hastaların 5 yıllık izleminin değerlendirildiği bir gerçek yaşam çalışmasında 0.5 ve üstü görmeye ulaşan hasta oranı %65, görme keskinliğinde 3 sıra artış kazanan hasta oranı ise %22'dir. Enjeksiyon sayısında 2 yıl ile 5 yıl izlem arasında bir azalma olmadığı, enjeksiyona devam edildikçe görmenin ancak korunabildiği gösterilmiştir (Spooner vd 2019). Çoğunlukla aylık izlem ihtiyacı ve yılda 4 ile 12 arası değişebilen enjeksiyon gereksinimi, bu hastalarda anksiyete başta olmak üzere sekonder tıbbi problemlere ve ekonomik sonuçlara yol açmaktadır (Fekrat vd 2010, Suñer vd 2014, Kayıkçıoğlu vd 2017, Berger vd 2019). Steroid implantların uygulama aralıkları daha geniştir ancak bu tedavinin de artmış göz içi basıncı, katarakt ve göz içi enfeksiyon riskleri bulunmaktadır (Schmidt-Erfurth vd 2019).

## 2.7. Karşılanmamış İhtiyaçlar

Elde edilen tüm gelişmelere rağmen, intravitreal anti-VEBF ve steroid implant tedaviler, RVO olgularında tüm beklentileri karşılamamaktadır. Tedavi ile ödemi regrese olan hastalarda dahi nöronal kayıp ve nörodejeneratif değişiklikler görülmektedir. Bu hastalarda tedaviden sonra devam eden görme kayıpları, RVO ile ilişkili patolojik süreçlerin daha iyi incelenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Güncel tedavide sürekli enjeksiyon ve izlem ihtiyacı, tekrarlayan enjeksiyon uygulamasının getirdiği tıbbi riskler, düzenli tedaviye rağmen görme kazanımlarının sınırlı olması RVO olgularında destekleyici ek tedavi ihtiyaçlarını ortaya çıkarmaktadır. Sürekli tedavi ve izlem

gereksinimi, hekimler ve sağlık kuruluşları için ağır bir iç yükünü beraberinde getirmekte, ayrıca sağlık harcamaları anlamında ciddi bir bte ihtiyaını işaret etmektedir (Fekrat vd 2010). Tüm bu karşılanmamış ihtiyaçlar nedeniyle RVO'nda anti-VEBF ve steroid implantları dışında bir alternatif ya da adjuvan tedavi arayışları sürmektedir. Alternatif ya da adjuvan tedavi arayışında, RVO patogenezinde rolü gösterilmiş olan belli faktörler terapötik hedef olarak önem kazanmaktadır. Bu faktörlerin nde gelenleri inflamasyon ve nrodejenerasyondur.

## 2.8. Resveratrol

Resveratrol (RSV) fıstık, yaban mersini ve üzüm gibi birçok gıdada doğal olarak bulunan bir polifenoldür (Meng vd 2020). RSV'un anti-oksidan, anti-inflamatuar, nöroprotektif özellikleri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Pirhan vd 2016, Luo vd 2018, Chen vd 2019, Dou vd 2019, Galiniak vd 2019, Cao vd 2020, Deng vd 2020, Meng vd 2020). RSV'un özellikle gözde iskemi-reperfüzyon ile ilişkili RGH hasarındaki nöroprotektif etkisi birçok çalışmada ele alınmıştır (Pirhan vd 2016, Luo vd 2018, Cao vd 2020). Deneysel glokom modellerinde intraperitoneal ve intravitreal uygulamasının RGH kaybını azalttığı, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu azalttığını, retinal bütünlüğü koruduğunu ve RGH kaybını azalttığı gösterilmiştir (Pirhan vd 2016, Luo vd 2018, Cao vd 2020, Deng vd 2020). Bu durumun RGH'nde Sirt-1 ekspresyonunun artması, reaktif oksijen molekülü ve asetil-p53 ekspresyonunun azalması; Müller hücrelerinde beyin kökenli nörotrofik faktör (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), RGH'nde tropomyozin reseptör kinaz B (TrkB) ekspresyonunun artması sonucu ortaya çıkan güçlü sitoprotektif etki ile gerçekleştiği ileri sürülmüştür (Cao vd 2020). Deneysel diyabet modelinde, intravitreal RSV tedavisi ile retinal vasküler geçirgenlikte yaklaşık %50 azalma, anjiyogenik faktör olan VEBF ve apoptotik gösterge olan retinal TUNEL-pozitif hücrelerde azalma gösterilmiştir (Chen vd 2019).

## 2.9. Çalışmanın Hipotezi

Literatürdeki veriler RVO'nda retinada inflamatuvar, apoptotik, anjiyogenik ve nörodejeneratif değişikliklerin olduğunu göstermektedir. RSV, anti-oksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özellikleri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan bir

polifenoldür. Çalışmadaki hipotezimiz, deneysel sıçan RVO modelinde RSV'un RGH koruyucu etkisi olduğudur.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Deney Protokolü**

Girişimsel ve prospektif özellikte olan bu çalışmaya deneysel araştırmalar etik kurul izni (PAUHDEK-2020/28 no'lu çalışma, 10/09/2020 tarih ve 05 sayılı toplantı) alınmasını takiben başlandı. Deneysel çalışmada Wistar albino, 250-350g aralığında 6-9 aylık dişi sıçanlar kullanıldı. Her sıçana standart ad libitum olarak su ve pelet tipte yemlenme (hayvanın önünde sürekli su ve yem bulundurulup ihtiyacı kadar ve istediği zaman beslenme) sağlandı. Hayvanlar ortalama 21°C ısı ve % 55 nem ortamında, ılık ve temiz hava bulunan barınaklarda tutuldu. Barınaklarda normal gece ve gündüz döngüsü (12 saat gece, 12 saat gündüz) oluşturuldu.

#### **3.2. Çalışma Grubunda Retinal Venlerde Lazer İle Tıkanıklık Oluşturulması**

Sağ ve sol gözler ayrı grup gibi değerlendirilerek hayvan sayısı düşük tutulmaya çalışıldı. Çalışmada sıçanların sadece sağ gözünde lazer ile RVDO meydana getirildi, sol gözler ise o grubun kontrolü olarak kabul edildi.

Pupil dilatasyonu %1 tropikamid ve %2.5 fenilefrin ile sağlandı. Anestezi 100mg/kg intramüsküler ketamin ve 5mg/kg intramüsküler ksilazin ile sağlandı. Lazerden önce 20mg/kg olacak şekilde serum fizyolojik ile hazırlanan Rose-Bengal (Sigma-Aldrich) boyası intraperitoneal uygulandı. Lazer ile RVDO oluştururken 78D mercek (Volk lens, USA) ile 532nm yeşil lazer (Iridex IQ532, Iridex corp., Mountain View, CA, USA) kullanıldı. Sıçanların sadece sağ gözlerine üst kadradaki venler üzerine, diskten yaklaşık 1 disk mesafesi uzaklıkta güç 100-150mw, spot büyüklüğü 100-200µm, maruziyet süresi 750msn-1sn olacak şekilde, kan akımını engelleyecek beyazlaşma görölmüncesine kadar lazer atış yapıldı. Tüm venlerde damar distalinde genişleme izlendi. Sol gözlere lazer uygulanmadı.

RSV verilmeyen grupta lazerli sağ gözler L grubunu oluşturdu. Lazer yapılmayan sol gözler kontrol grubunu (K grubu) meydana getirdi. RSV verilen grupta lazerli sağ gözler LR grubunu oluşturdu. Lazer yapılmayan sol gözler ise R grubunu meydana getirdi.

### **3.3. Resveratrol Uygulaması**

RSV uygulamasına lazer ile ven oklüzyonu gerçekleştirilmesinden hemen sonra başlandı. Olası bir problemle karşılaşma durumunda sıçan kaybını engellemek ve çözüm üretebilmek için ilk uygulama 3 sıçana yapıldı. Uygulamada RVDO oluşturulduktan hemen sonra, anestezi etkisi devam ederken, %25 etanol içinde 30 mg/kg RSV (Resveratrol, Sigma-Aldrich) intraperitoneal olarak verildi. Uygulama sonrası sıçanların ölmesi üzerine metodolojide değişiklik yapıldı (sıçanların ölümüne ilişkin detaylı bilgi bulgular kısmında verildi).

Çalışmanın devamında ikinci gruba 14 gün boyunca RSV %3 etanol içinde çözündürülerek 40mg/kg olacak şekilde, anestezi etkisinin bitmesini takiben gavaj ile verildi. RSV her gün taze olarak hazırlandı ve gavaj ile verileceği lokasyona ışıktan korunarak taşındı.

### **3.4. Fundus görüntüleme ve Anjiyografi**

Fundus görüntüleme 20D ve 30D lens ile indirekt oftalmoskopi kullanılarak gerçekleştirildi. Görüntü kaydı 30D lens yardımıyla akıllı telefon kamerası ve kornea üzerine viskoelastik jel uygulanarak kontakt makula lensi ile görüntü alındı. Anjiyografi için %10 floresein maddesi 0.2cc intraperitoneal olarak verildi. Uygulama sonrası 15.dk'da görüntü alındı.

### **3.5. Sakrifikasyon, Enükleasyon ve Retina izolasyonu**

Derin anestezi altında servikal dislokasyonla sakrifikasyon gerçekleştirilmesini takiben penset ve makas yardımı ile enükleasyon yapıldı. Bulbus okuli (veya göz küresi) histolojik kesit için %4 paraformaldehid solüsyonunda bir gece bekletildi. Dehidratasyon için bir hafta +4°C'de %30 sükröz solüsyonuna konulduktan sonra kriyostat yardımı ile kesitler alındı.



Retina izolasyonunda iki yöntem kullanıldı: 1) Limbustan 360 derece kesi yapılarak kornea ayrıldı. Lens çıkarıldı. Skleraya 4 kadranda çentik atılarak ve optik sinir ile bağlantısı kesilerek retina çıkarıldı. 2) Limbustan korneal kesi yapılarak globa girildikten sonra limbusa dik 1-2mm periferde doğru skleral kesi oluşturulup limbusa paralel devam edecek şekilde kesi 360 derece ilerletildi. Kesi tamamlanıp kornea ve limbus globdan ayrıldı. Sklera forseps ile sabitlenerek künt bir enstrüman ile sklera önünden künt disseksiyon yapıldı. Retinanın optik sinir ile bağlantısı kesilip retina bir bütün olarak çıkarıldı.

### **3.6. Retinal Kesitlerin Hazırlanması ve Işık Mikroskobu ile İncelenmesi**

#### **3.6.1.1. Retinal kesitlerin alınması**

Retinal kesitler 1) glob kesitleri içerisinde, 2) globdan izole edildikten sonra incelendi.

1) Enükleasyon sonrası glob kesitleri içerisinde retinayı incelemek için, glob %4'lük paraformadehit çözeltisinde 24 saat, sonra %30'luk sükröz çözeltisinde 24 saat bekletilerek dehidratasyon sağlandı. Sükrözden çıkartılan globlar kriyostat mediyumu yardımı ile -30°C'de donduruldu. Globlardan kriyostat cihazı (Leica CM3050 S) ile 10, 20 ve 30µm kesitler alındı. Kesitler standart protokole göre hematoksilin-eozin ile boyandı (protokol altta yer almaktadır). Kesitler ışık mikroskobu ile incelendi.

2) Enükleasyon yapılmadan, yukarıda anlatılmış olan teknikle ön segment çıkartılarak retina izole edildi. Bütün olarak çıkarılmış olan retinanın transvers (cross-section) kesitleri alındı. Kriyostat taşıyıcısına dik olacak şekilde doku örneği yerleştirilerek donduruldu. Retinal kesit medyum üzerine yerleştirildiğinde soğuk metal obje teması ile medyum hızla soğutuldu. Zemindeki medyum donunca üzerinde yeni medyum ilave edilip sürekli soğutma yapılarak dokunun medyum sütünü içinde stabilize olması sağlandı. Kriyostat ile 10µm kesitler alındı. Retinal kesitler standart protokole göre hematoksilin-eozin ile boyandı. Kesitler ışık mikroskobu ile incelendi.

#### **3.6.1.2. Hematoksilin ve Eosin boyama basamakları**

Ksilende bekletme: 5 dakika

%95 Alkolde bekletme: 3 dakika

%70 Alkol bekletme: 3 dakika  
 Distile suda yıkama: 3 dakika  
 Hematoksilen boyama: 5 dakika  
 Distile suda yıkama: 3 dakika  
 Eosin boyama: 3-5 kere daldırma  
 Distile suda yıkama: 3 dakika  
 %70 Alkolde bekletme: 3 dakika  
 %95 Alkolde bekletme: 2 dakika  
 %100 Alkolde bekletme: 1 kere daldırma  
 Ksilende bekletme:5 dakika sonra entellan ve lamel ile kapatma

### **3.7. Vitreus-Aköz Alınması**

Sakrifikasyonu takiben korneaya keskin enstrüman ile penetrasyon yapıldı. Drenaj alanından aköz örneği alınarak 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne koyuldu. Kornea ve lens çıkarıldı. Sıvışık olarak gelen vitreus alınabildiği ölçüde pipet ile çekilip 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne koyuldu.

### **3.8. Western-Blot Protokolü İle Brn3a Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Gösterilmesi**

Retina dokusunun küçük olması nedeni ile protein izolasyonu zor olduğundan, bu amaçla radioimmünopresipitasyon assay tamponu (RIPA) tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli içeren güçlü bir lizis tamponu kullanıldı (Kişisel görüşmelerimiz sonrasında, bireysel retina örneklerinde (pool edilmeksizin) Western-Blot çalışmaları olan Amerika Birleşik Devletleri Drexel Üniversitesi'nden Dr.Lanfranco Leo'nun paylaştığı protokole uygun olarak bu lizis tamponu hazırlandı ve kullanıldı).

Aşağıda belirtilen protokole göre protein izolasyonu gerçekleştirildi:

- Retina örneği başına 100 µl lizis tamponu eklendi ve buz üzerinde 40 dk inkübasyona bırakıldı. Her 5 dk'da örnek vorteks yardımı ile homojenize edildi.
- İnkübasyon sonrası, örnek 14.000 xg'de 20 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant ayrı bir tüpe alınarak, protein konsantrasyonunun belirlenmesi ve Western-Blot analizleri için ayrıldı.

### 3.8.1. Retina dokusundan izole edilen proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi

Yukarıda belirtilen protokolle izole edilen protein örneklerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi amacı ile ticari kit (DC Protein Assay, Bio-Rad) kullanıldı. Tüm aşamalar üretici firmanın belirlediği protokole uygun olarak gerçekleştirildi:

- Kitle birlikte sağlanan ve 0.2 mg/ml -1.5 mg/ml protein içeren standartlar kullanılarak 7 farklı konsantrasyonda protein içeren standart örnekleri hazırlandı.
- 96 kuyulu pleytlerin her bir kuyusuna hazırlanan standart örneklerinden ve retina dokusundan izole edilen protein örneğinden 5 µl eklendi.
- Her bir kuyuya kitle birlikte sağlanan Reagent A'dan 25 µl ve sonrasında 200 µl Reagent B eklendi.
- ELISA okuyucusunda (Multiskan G0, Thermo Sci.) 750 nm'de örneklerin OD değerleri belirlendi.
- OD değerlerine göre bir standart eğri oluşturuldu ve retina dokusundan izole edilen protein konsantrasyonu bu standart eğri yardımı ile hesaplandı.

Lazer uygulanan ve uygulanmayan sıçanların retina örneklerinden izole edilen protein konsantrasyonları sırası ile 0.40 mg/ml ve 0.43 mg/ml olarak belirlendi. İzole edilen protein konsantrasyonunun Western Blot için yeterli miktarda protein içerdiğini öngörerek Western Blot analizi yapıldı.

### 3.8.2. Western-Blot Analizi

Western Blot analizleri için ayrılan protein lizat örneklerine 10 µl Western Blot Yükleme Boyası eklendi ve 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Sonrasında anti-Brn3a (ab81213, Abcam), anti- β aktin (Abcam) primer antikorları ve goat anti-rabbit IgG (Cell Signalling) sekonder antikoru kullanılarak Western Blot analizleri tamamlandı. Bu amaçla uygulanan protokol aşağıda özetlendi:

- %10'luk SDS-PAGE jeli hazırlandı. Jelin kuyularına 20 µl olacak şekilde retina protein lizat örnekleri ve protein moleküler ağırlık standardı (Prestained Protein Ladder, Santa Cruz Biotech.) yüklendi.
- Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) jeller, 1 x SDS running tamponunda yaklaşık 1 saat yürütüldü (BioRad).

- Elektroforez işlemini takiben, jel ve blot membranı (poliviniliden diflorid (PVDF) membran, Immobilon-P, Sigma) içerecek şekilde yeni bir jel kaseti hazırlandı ve 1x transfer tamponunda 100 V'da 90 dk bekletilerek jelde bulunan proteinlerin membrana transferi gerçekleştirildi.
- Membranlar, yağsız süt tozu içeren tris-tamponlu salin /Polisorbat 20 (TBST) solüsyonunda yaklaşık 1 saat bekletilerek, bloklandı.
- Üretici firmanın belirttiği şekilde her bir hedef yüzey belirteci için primer antikolar hazırlandı ve membranlar 4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası membranlar TBST'de 10 dk (x4) rotatorda yıkandı.
- Yıkama sonrası membranlara sekonder antikor solusyonu (1:10.000) eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası membranlar TBST'de 10 dk (x4) rotatorda yıkandı.
- Membranlar, sekonder antikorun taşıdığı Horseradish peroksidaz (HRP)'in kromojenik substratını (Diaminobenzidin (DAB)) içeren boyama solüsyonunda görüntülendi.

### 3.9. *Brn3a* Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

Deney grubunu oluşturan sıçanlardan elde edilen retina örnekleri, RNA moleküllerinin frajil yapısı nedeni ile hızlıca RNAlater (Thermo Scientific) içeren 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine koyularak -80°C'de saklandı.

#### 3.9.1. Retina örneklerinden total RNA izolasyonu

Retina örneklerinden total RNA izolasyonu Trizol (AppliChem) kullanılarak yapıldı. Aşağıda Trizol ile total RNA izolasyon protokolü yer almaktadır:

- 1-Tüplerin her birine 500 µl Trizol eklendi.
- 2-Doku örnekleri RNAlater'dan uzaklaştırılarak Trizollü tüplere alındı.
- 3- Buz üzerinde ince uçlu makas ile mekanik olarak parçalandı ve vorteklenerek homojenize edildi (Doku miktarı çok az olduğu için bu yöntem tercih edildi).
- 4-Örnekler buzda 4 dk inkübe edildi.
- 5-Her örneğe 100 µl kloroform (Sigma) eklendi. Yüksek devirde vortekslendi.
- 6-Örnekler buzda 3 dk inkübe edildi.
- 7-İnkübasyon sonrası 12.000xg, +4 C'de 15dk santrifüj yapıldı.
- 8-En üstteki aköz faz, mikropipet yardımı ile yeni ependorf tüpüne aktarıldı.
- 9-Üzerine 250 µl İzopropanol (Sigma) eklendi ve +4°C'de 10dk inkübe edildi.

- 10-İnkübasyon sonrası, 12.000xg, +4° C'de 10dk santrifüj yapıldı.
- 11-Supernatan atıldı.
- 12-Üzerine 500 µl %75 etil alkol (Sigma) eklendi
- 13-Kısa vortex yapıldı.
- 14-7500xg, +4°C'de 5dk santrifüj yapıldı.
- 15-Süpernatant atıldı.
- 16-Pellet havada kurutuldu.
- 17-Üzerine 20 µl RNaz-free su (Qiagen) eklendi.

### 3.9.2. Total RNA örneklerinden cDNA sentezi

Total RNA izolasyonundan hemen sonra, ticari kit (Sensiscript RT Kit, Qiagen) yardımı ile üretici firmanın belirttiği protokol uygulanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Aşağıda cDNA sentez protokolü yer almaktadır:

- 1- RNA denatürasyon basamağı: Total RNA örnekleri 65°C'de 5dk inkübasyona bırakıldı ve sonrasında direkt buza alındı.
- 2-Total RNA örneklerinin konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü (Nanodrop, Thermo) ve kaydedildi.
- 3-Enzim kitindeki reagentler, oda sıcaklığında çözündürüldü ve buza alındı.
- 4-Tüm reagentler 5 sn vortekslendi ve kısa spin yapıldı.
- 5-RNaz inhibitörü kitten çıkan buffer ile 10U/mikrolitre olacak şekilde dilüe edildi.
- 5-Üretici firmanın belirttiği protokolü uyararak, her bir örnek için aşağıda belirtilen reaksiyon karışımları hazırlandı ve sonrasında 37°C'de 60 dk inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi.

#### Reaksiyon karışımı

- |   |       |      |
|---|-------|------|
| • 10xBuffer   | 2 µl  |      |
| • Deoksiribonükleotid trifosfat ( <i>dNTP</i> ) mix |       | 2 µl |
| • Oligo dT primer                                   | 2 µl  |      |
| • RNaz inhibitor                                    | 1 µl  |      |
| • RNaz-free su*                                     | -     |      |
| • Template ribonükleik asit (RNA) (50ng)*           |       | -    |
| Total hacim   | 20 µl |      |

\*: Her bir örneğin total RNA konsantrasyonu farklılık içerdiğinden, RNaz-free su ve template RNA miktarları ayrı ayrı hesaplandı.

### 3.9.3. Hedef gen *Brn3a* ekspresyonunun real-time polimeraz zincir reaksiyonu ile relatif kantitasyonu

*Brn3a* (hedef gen) ve *Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (Gapdh)*, referans gen) için relatif kantitasyon analizi, real-time **polimeraz zincir reaksiyonu** (PCR) sistemi (LightCycler 480, Roche Diagnostics) kullanılarak yapıldı. Her iki genin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılacak primer setleri sentezletildi (Li vd 2008). *Brn3a*'nın mRNA (mesajcı ribonükleik asit) düzeyinde ekspresyonunu kantite etmek için aşağıda belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve protokol uygulandı:

*Brn3a* (hedef gen) ve *Gapdh* (referans gen)'in mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı:

Enzim (FastStart Essential DNA Green Master, Roche) (2x) ----10 µl

Primer seti (10x) ----- 2 µl

PCR-grade su ----- 3 µl

Komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA)----- 5 µl

*Brn3a* (hedef gen) ve *Gapdh* (referans gen)'in mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile uygulanan reaksiyon prokolü:

Pre-inkübasyon : 95°C – 10 dk (Ramp: 4.4) (Kazanım modu: None)

Amplifikasyon (45 döngü) : 95°C – 10 sn (Ramp: 4.4) (Kazanım modu: None)

56°C – 10 sn (Ramp: 2.2) (Kazanım modu: None)

72°C – 10 sn (Ramp: 4.4) (Kazanım modu: Single)

Soğuma : 40°C – 30 sn (Ramp: 4.4) (Kazanım modu: None)

Hedef transkriptlerin katlı değişimleri, universal kabul edilen  $\Delta\Delta\text{Ct}$  metodu ile belirlenmiştir. Özetle, önce Brn3a ve GAPDH'in real-time PCR analizi sonrası elde edilen Ct (cycle treshold) (eşik değeri geçen fluoresan sinyali için gerekli döngü sayısı) kullanılarak  $\Delta\text{Ct}$  (Brn3A Ct-GAPDH Ct) (GAPDH'e göre normalizasyon aşaması) değeri ve sonrasında  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (rnek Ct-kontrol grubu ortalama $\Delta\text{Ct}$ ) hesaplanmıştır. Ardından, her bir rneğin  $\Delta\Delta\text{Ct}$  değerleri kullanılarak  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  formülü ile katlı değişimleri belirlenmiştir.

### 3.10. İmmunohistokimyasal Boyama-Apoptozisin Değerlendirilmesi

RVDO sonrası 2, 7 ve 14. günlerde "TdT-dUTP nick-end-labelling" (TUNEL) yöntemi ile retina hücrelerinde apoptozis değerlendirildi. TdT (terminal deoksinukleotidil-transferaz)-aracılı in-situ işaretleme tekniği için ticari kit kullanıldı. Ticari kitin çalışma prensibi kriyostat kesitlerine uygun olarak fiksasyon, dehidrasyon, endojen peroksidaz aktivitesinin bloklanması, proteinaz K uygulaması, TUNEL reaksiyon karışımının eklenmesini takiben konverter-peroksidaz ve DAB substratının eklenmesi basamaklarından oluşmakta idi. Zıt boyama için Harris'in hemotoksilen boyası kullanıldı. Her boyamada pozitif kontrol (reaktif lenf nodülleri) ve negatif kontrol (Terminal deoksinukleotidil transferazsız (TdT) kesitler kullanıldı.

Morfolojik olarak apoptoz kriterlerine sahip hücreler (yogun, hiperkromatik, halka-benzeri, yarım ay veya boncuk şekilli nüklear kromatin ve kromatin-içeren sitoplazmik artıklar) TUNEL-pozitif hücreler olarak değerlendirildi. Apoptotik hücre oranı için x40 büyütmede apoptotik hücreleri içeren en az 10 alanın değerlendirilmek kaydıyla řu formül dikkate alındı (Garrity vd 2003):

Apoptotik hücre oranı (%) = Pozitif apoptoz hücre sayısı / Toplam hücre sayısı X %100

### 3.11 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analiz için SPSS 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, ABD) programı kullanıldı. Sayısal veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. İki grup verilerinin kıyaslaması t-test ile yapıldı. 'P<0.05' istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmada toplam 31 adet sıçan kullanıldı. Retinal görüntüleme, anjiyografi ve tomografi tetkiki için 3, retinal disseksiyon ve kesit alınma çalışmaları için 3, Western-Blot analizi ön çalışması için 2, Western-Blot ve Brn3a-mRNA PCR analizi için 20 sıçan kullanıldı. Çalışma süreci boyunca 3 sıçan planlanan sakrifikasyon tarihinden önce eksitus ile kaybedildi.

İlk etapta iki ayrı günde 300-368 g ağırlığında toplam 12 sıçanın sağ gözüne lazer yapıldı. İlk gün 4 sıçana, ikinci deney gününde 8 sıçana lazer uygulandı. Hipotezimiz doğrultusunda deney gruplarına göre hedef gen ekspresyon düzeyindeki farklılıklar uyumlu bulunmadığından (detaylar bulgular kısmında verildi) ikinci etap planlandı. İkinci etapta aynı gün 8 sıçanın sağ gözüne lazer yapıldı.

Çalışma sırasındaki basamaklarda elde edilen bulgular alt başlıklarla aşağıda özetlenmiştir.

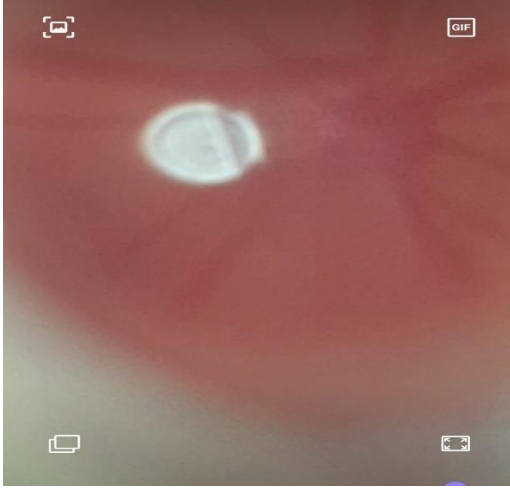
### 4.1 Fundus Görüntüleme ve Anjiyografi

Fundoskopik 20D ve 30D lens yardımıyla akıllı telefon kamerası ile elde edilen retina görüntülerinin kalitesinin düşük olduğu, görüntülerin büyütülmesi esnasında detayların kaybolduğu izlendi (Şekil 2.1, 2.2).





**Şekil 2.1** İndirek oftalmoskopi lensleri ile akıllı telefon kamerası kullanılarak retinal görüntüleme.

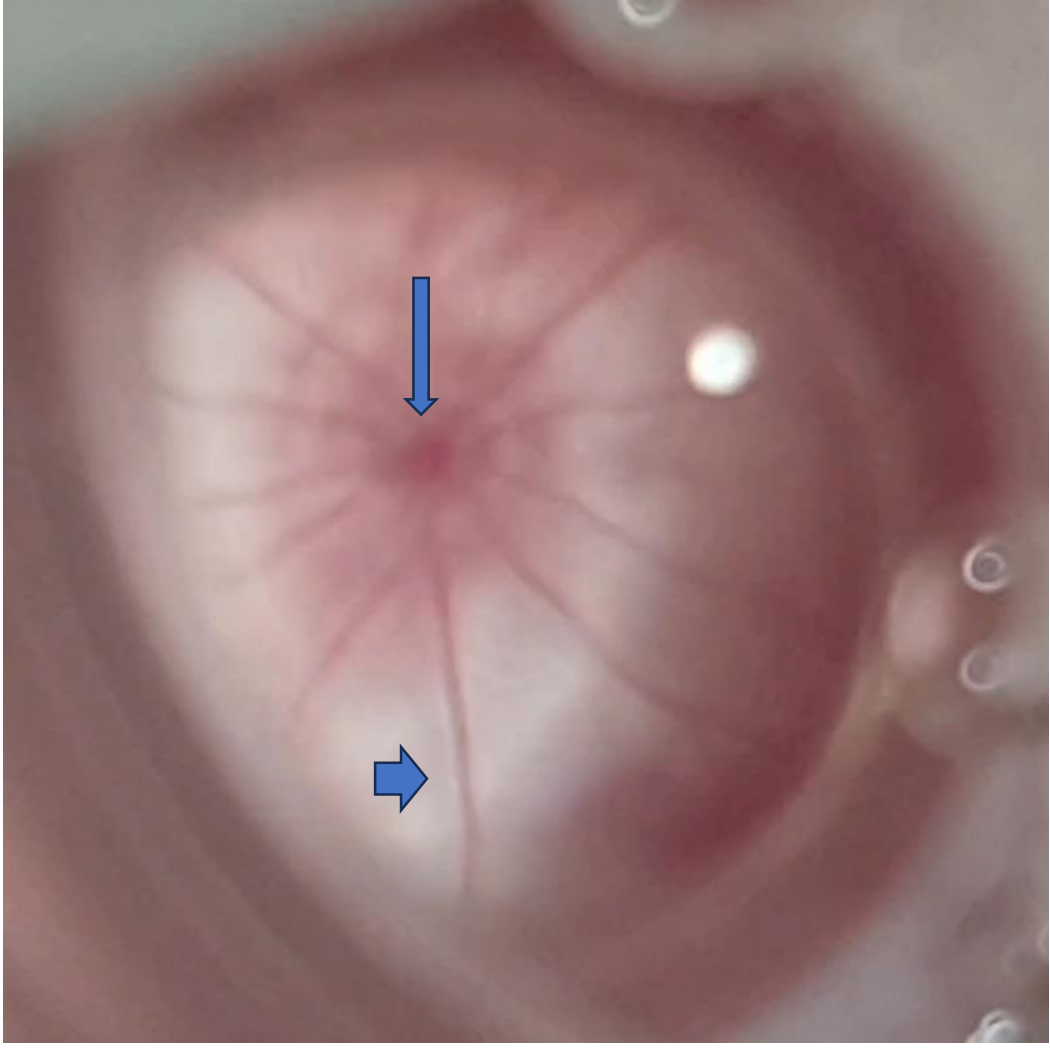


**Şekil 2.2.** İndirek oftalmoskopi lensleri ile akıllı telefon kamerası kullanılarak retinal görüntüleme (büyütülmüş görüntü).

Kornea üzerine viskoelastik jel uygulanarak kontakt makula lensi yerleştirildi. Ardından akıllı telefon kamerası ile flaş açık pozisyonda retinanın video kaydı yapıldı. Görüntü kalitesinin net olduğu, görüntü büyütüldüğünde de retinal yapıların net olarak izlendiği kaydedildi (Şekil 3.1, 3.2).

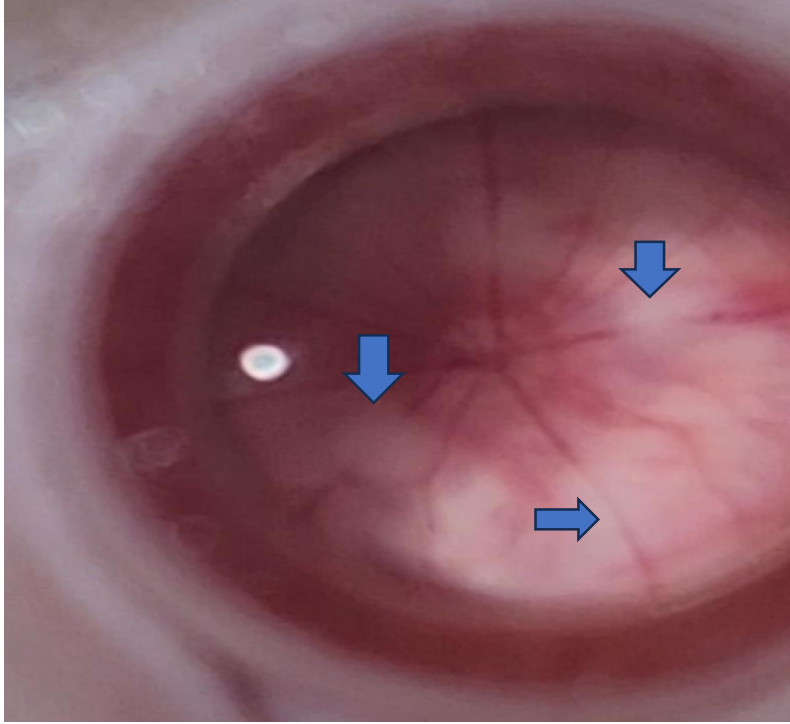


**Şekil 3.1.** Kontakt makula lense ile retinal görüntüleme.

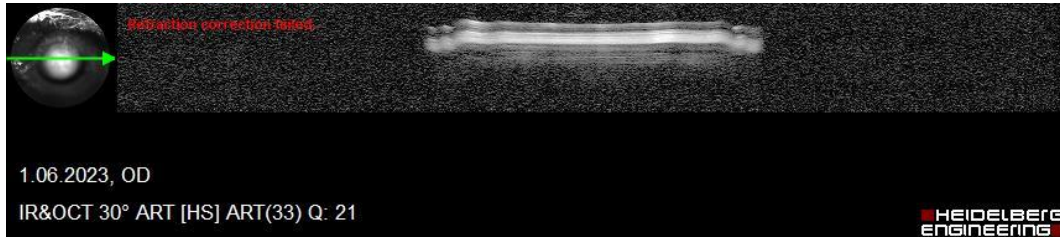


**Şekil 3.2.** Kontakt makula lensi ile retinal görüntüleme, optik sinir uzun okla, retinal ven kısa okla gösterilmiştir (büyütülmüş görüntü).

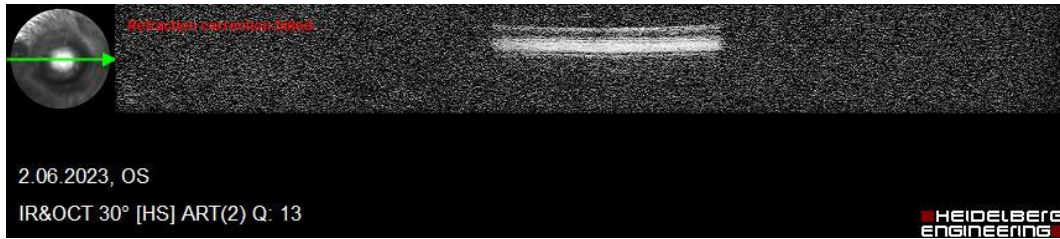
Fundus kamerası ile edilen görüntülerde ışık yansımaları olduğu görüldü. Işık yansımaları albinoid retina ile ilişkilendirildi. Şekil 4.1’de lazer ile retinal ven oklüzyonu oluşturulmasından sonraki retinal görüntü, Şekil 4.2’de lazer uygulamasından hemen sonraki optik koherens tomografi görüntüsü, Şekil 4.3’te lazer ile retinal ven oklüzyonu oluşturulmasından 36st. sonra optik koherens tomografi görüntüsü izlenmektedir.



**Şekil 4.1** Lazer ile retinal ven oklüzyonu oluşturulmasından sonraki retinal görüntü. Ok uçları lazerlenmiş damar alanını göstermektedir.



**Şekil 4.2** Lazer ile retinal ven oklüzyonu oluşturulmasından sonraki optik koherens tomografi görüntüsü.



**Şekil 4.3.** Lazer ile retinal ven oklüzyonu oluşturulmasından 36saat sonra optik koherens tomografi görüntüsü.

Anjiyografi için %10 floresein maddesi 0.2cc intraperitoneal olarak verildi, 15.dk'da görüntü alındı. Görüntülerin net olmadığı izlendi. Kontrast madde kullanılmadan çekilen

bir anjiografik tetkik olan optik koherens tomografi anjiografi ile vasküler yapı görüntülemesi yapılamadı.

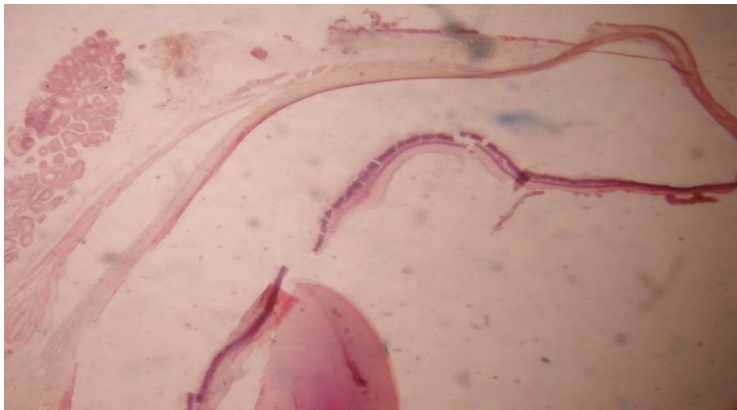
#### 4.2 Retina İzolasyonu Yöntemleri

Retina izolasyonunda metodoloji bölümünde belirtilen ilk yöntemde limbustan yapılan kesilerde retinanın alttaki sklera/koroidden serbestleşmediği, limbusa yakın bölgede yapıların birbiriyle sıkı yapışıklık içerisinde olduğu ve çıkartılma esnasında retinanın parçalandığı izlendi. İkinci yöntemde ise limbustan daha posterior alanda sirküler kesi yapıldığında, üstte belirtilen sıkı yapışık alanın aşıldığı ve retinanın künt bir enstrüman ile kolaylıkla sklera/koroidden serbestleştiği saptandı.

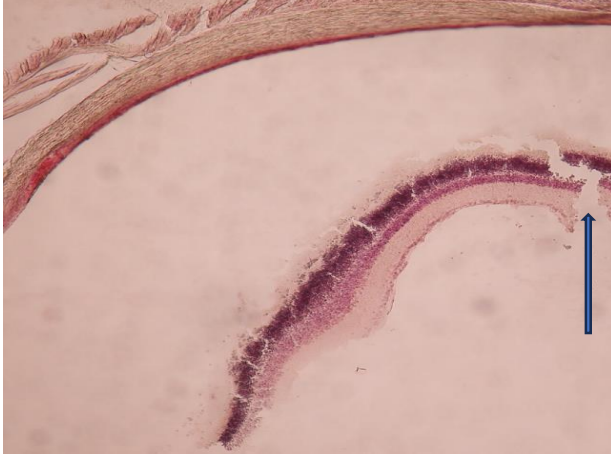
#### 4.3 Retinal Kesitlerin Hazırlanması

Kriyostat ile alınan 20 ve 30µm kesitlerde ksilen aşamasında doku örneklerinin lamdan ayrıldığı, 10µm kesitlerde ise lama tutunma problemi olmadığı izlendi. Hematoksilen-eozin ile boyanmış olan retinal kesitler ışık mikroskobu ile 1) globun bir parçası olarak, 2) globdan izole edildikten sonra değerlendirildi.

Glob kesitleri alındığında glob duvarının vitreye doğru kollabe olduğu ve retinal tabakalarda kopma ve segmentasyon olduğu izlendi (Şekil 5.1, 5.2).



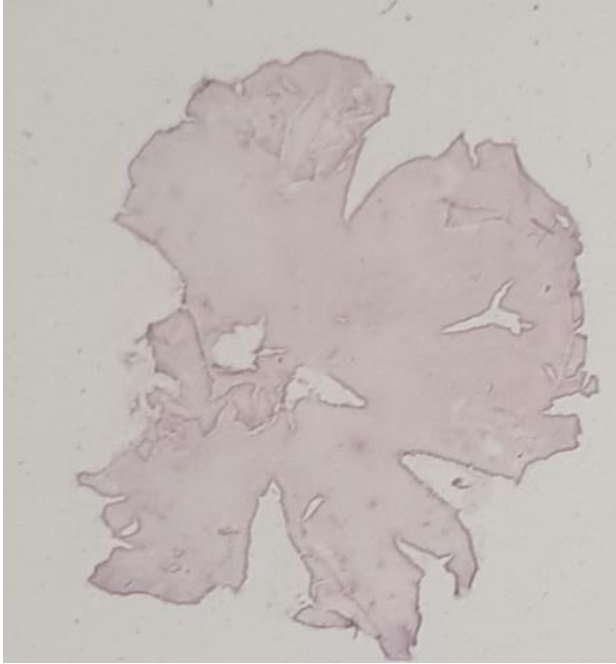
**Şekil 5.1** Retinal tabakalarda kopma ve segmentasyon (X4 büyütme, 20µm kalınlık).



**Şekil 5.2** Retinal tabakalarda kopma ve segmentasyon okla gösterilmiştir (X10 büyütme, 20µm kalınlık).

Retinal kesitlerde tabakaların düzenli olmadığı izlendi. Bu durum kesim sırasında globun kollabe olması ve retinal tabakaların düzeninin bozulması ile ilişkilendirildi.

Globdan izole edildikten sonra retinanın bütün olarak çıkartıldığı, 4 yanına periferden çentik atılarak düzleme düzgün yerleştirilecek forma getirildiği 4 yapraklı yonca formu Şekil 6'da görülmektedir (Şekil 6).

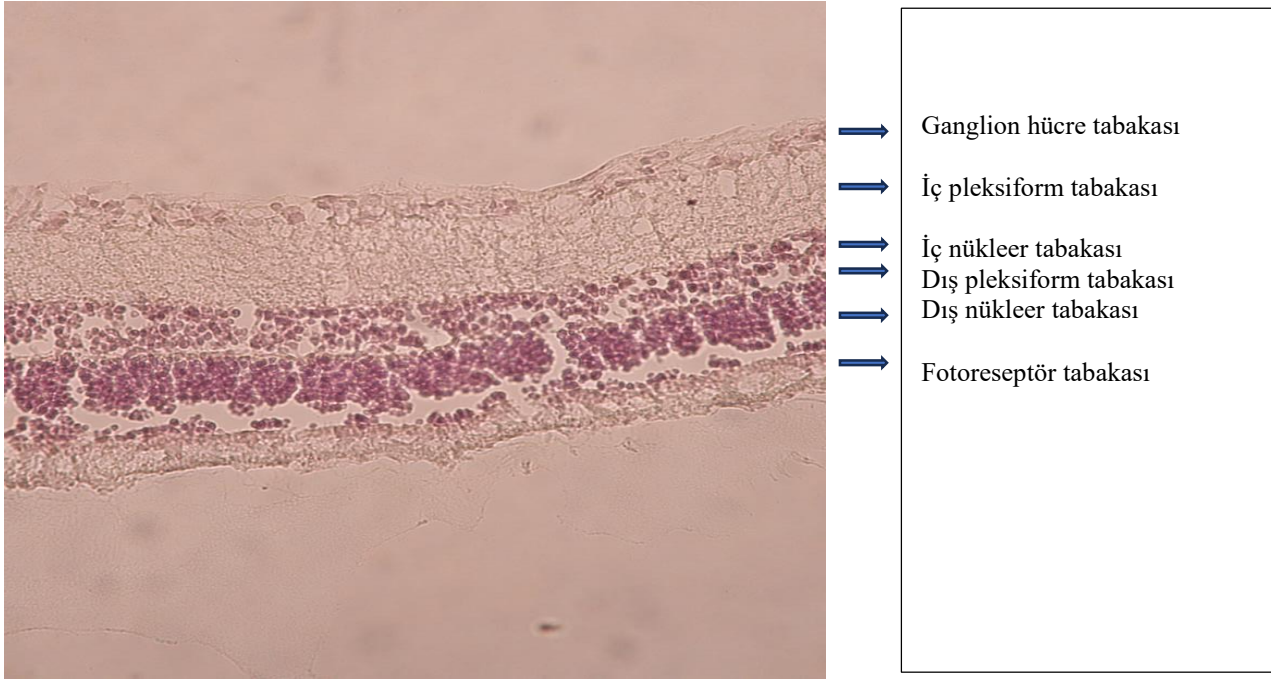


**Şekil 6.** Dört yapraklı yonca modelinde hazırlanan bütün retina.

Globdan izole edildikten sonra retinanın bütün olarak çıkartılmasını takiben, retinanın transvers (cross-section) kesitlerini almak için kriyostat taşıyıcısına dik olacak şekilde doku örneği yerleştirildiğinde, dokunun donma tamamlanmadan önce pozisyonunun bozulduğu ve eğildiği saptandı. Retinal dokunun kriyostat medyumu içinde pozisyonunu hızlı stabilize etmek için, retinal kesit medyum üzerine yerleştirildiğinde soğuk metal obje teması ile medyum hızla soğutuldu. Zemindeki medyum donunca üzerinde yeni medyum ilave edilip sürekli soğutma yapılarak dokunun medyum sütunu içinde stabilize olması sağlandı. Kriyostat ile alınan 10 $\mu$ m kesitler incelendiğinde, retinal kesitlerde doku bütünlüğünün yer yer bozulduğu, çatlak görünümü olduğu kaydedildi. Bu durum soğutma amaçlı kullanılan metalin ağırlığı ile ilişkilendirildi (Şekil 7.1, 7.2).



**Şekil 7.1** Retinal tabakalarda bozulma (X10 büyütme, 10 $\mu$ m kalınlık).



**Şekil 7.2** Retinal tabakalarda bozulma (X40 büyütme, 10µm kalınlık).

Enükle edilmiş olan globdan retina izolasyonu yapılırken globun sabitlenememesi ve mobil olması nedeniyle retinal disseksiyon sırasında zorluk yaşandı. Globun stabil durması açısından, anestezi altında enükleasyon yapılmadan ve glob orbitadan ayrılmadan retinal disseksiyon gerçekleştirildi.

Metodolojide belirtildiği gibi, servikal dislokasyondan önce ve servikal dislokasyondan sonra olacak şekilde 2 ayrı zamanlama ile retina izolasyonu yapılarak iki yöntem karşılaştırıldı. Servikal dislokasyondan önce yapılan izolasyonda, kesi sonrası oküler damarlardan kaynaklanan yoğun hemoraji nedeniyle retina net bir şekilde görülemedi ve retinal disseksiyon sağlıklı şekilde gerçekleşmedi. Aynı sıçanın diğer retinası, servikal dislokasyondan sonra kanama komplikasyonu olmadan çıkarıldı. Elde edilen bulgular doğrultusunda çalışmadaki diğer sıçanların retinası servikal dislokasyondan hemen sonra, glob orbitadan ayrılmadan yapıldı.

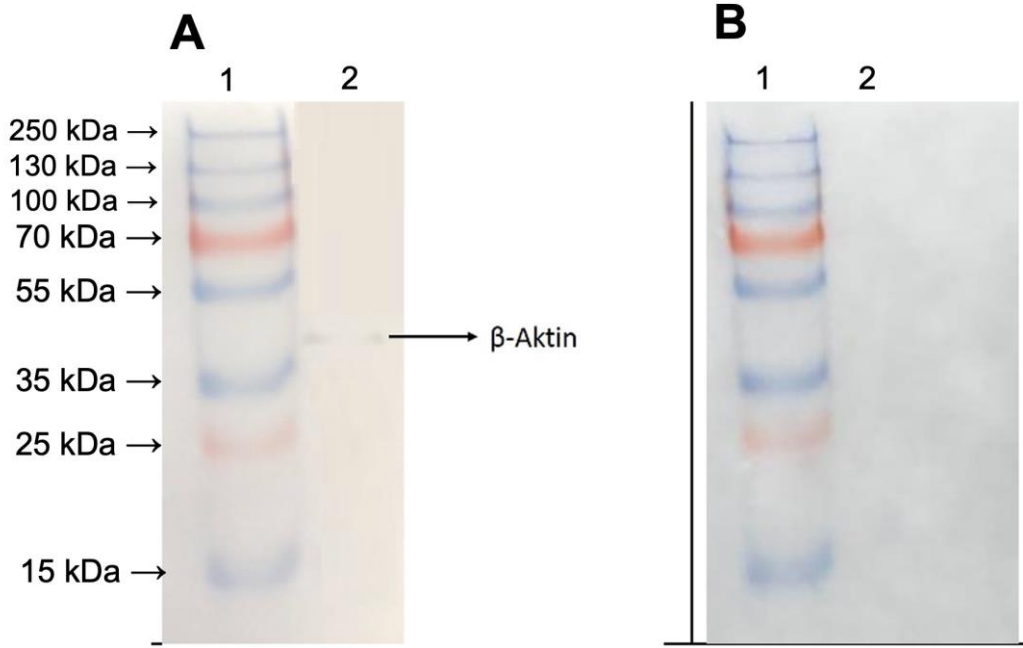
#### **4.4 Western-Blot analizi ile Brn3a ekspresyonunun protein düzeyinde gösterilmesi**

Metodolojide belirtilen protokolle, lazer uygulanan ve uygulanmayan sıçanların retina örneklerinden izole edilen protein konsantrasyonları sırası ile 0.40 mg/ml ve 0.43

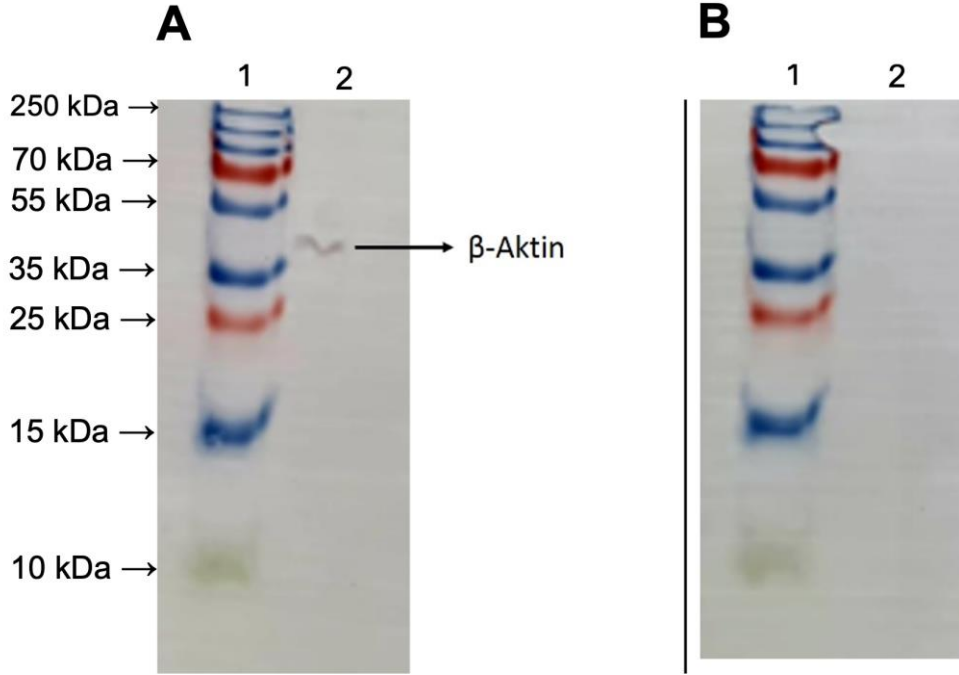


mg/ml olarak belirlendi. Bu protein konsantrasyonlarının Western-Blot analiz için yeterli miktarda olduğu belirlendi.

Western-Blot analizleri metodolojide belirtilen protokolle yapıldı. Membranlar, sekonder antikorun taşıdığı HRP'nin kromojenik substratını (DAB) içeren boyama solüsyonunda görüntüledi (Şekil 8.1, 8.2).



**Şekil 8.1** Lazer uygulanmış sıçan retina örneğinde Western-Blot analizi. **A.**  $\beta$ -Aktin için yapılan Western-Blot analizi. 1 numaralı kuyu: 10-250 kDa'luk protein moleküler ağırlık marker'ı (Santa Cruse Biotech), 2 numaralı kuyu: Örnekte 41 kDa ağırlığında  $\beta$ -Aktinin varlığını gösteren bant profili. **B.** Brn3a için yapılan Western-Blot analizi. 1 numaralı kuyu: 10-250 kDa'luk protein moleküler ağırlık marker'ı (Santa Cruse Biotech), 2 numaralı kuyu: Örnekte 43 kDa ağırlığında Brn3a'nın varlığını gösteren bant profili saptanmadı.

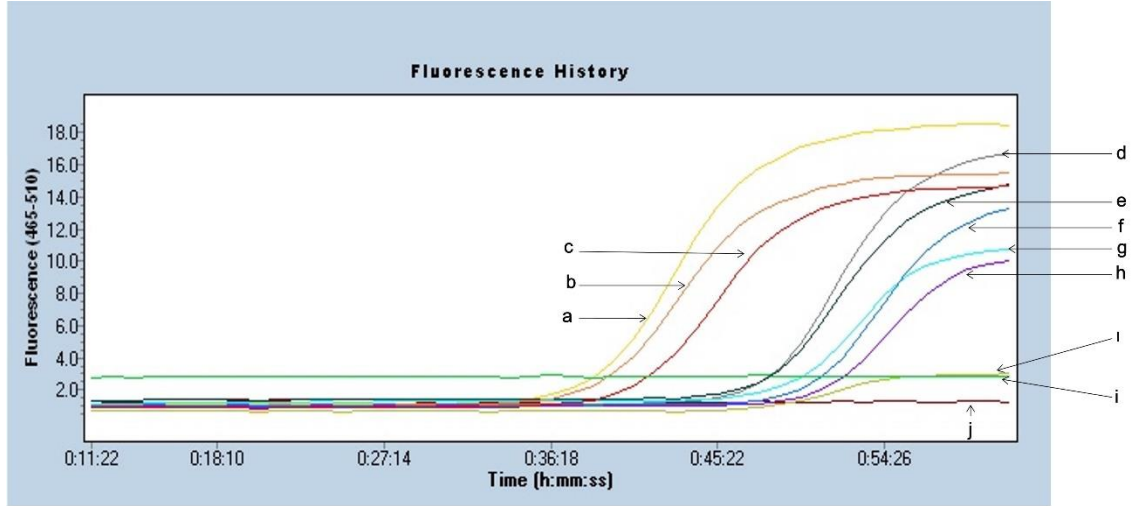


**Şekil 8.2** Lazer uygulanmamış sıçan retina örneğinde Western-Blot analizi **A.**  $\beta$ -Aktin için yapılan Western-Blot analizi. 1 numaralı kuyu: 10-250 kDa'luk protein moleküler ağırlık marker'ı (Santa Cruse Biotech), 2 numaralı kuyu: Örnekte 41 kDa ağırlığında  $\beta$ -Aktinin varlığını gösteren bant profili. **B.** Brn3a için yapılan Western-Blot analizi. 1 numaralı kuyu: 10-250 kDa'luk protein moleküler ağırlık marker'ı (Santa Cruse Biotech), 2 numaralı kuyu: Örnekte 43 kDa ağırlığında Brn3a'nın varlığını gösteren bant profili saptanmadı.

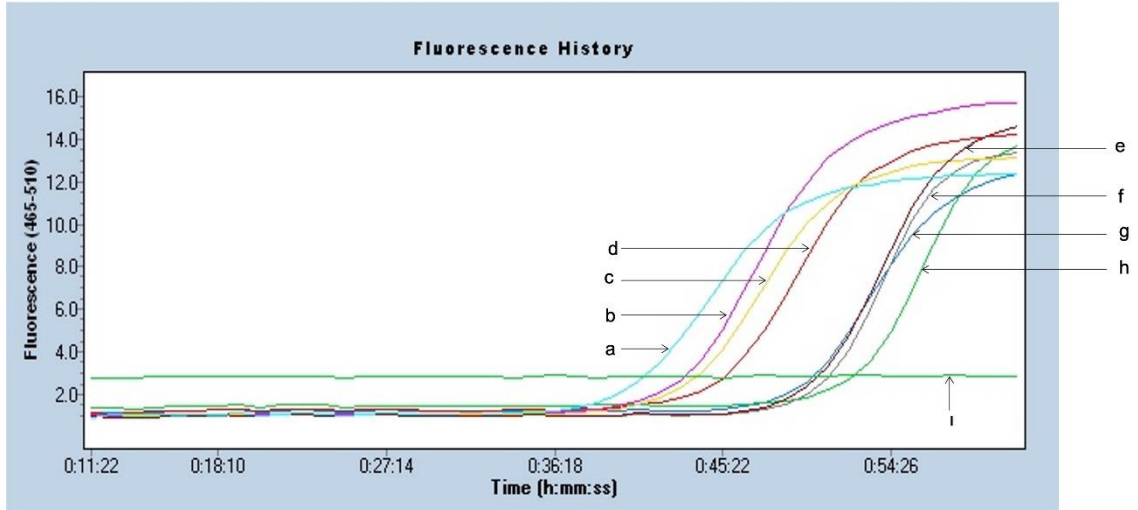
Şekil 8.1 ve 8.2'de görüldüğü üzere, lazer uygulanmış ve lazer uygulanmamış retina örneklerine Western-Blot analizlerinde internal kontrol olarak kullanılan ve 41 kDA büyüklüğünde  $\beta$ -aktin proteinine ait bant gözlemlendi ancak bu örneklerde 43 kDA büyüklüğünde Brn3a proteinine ait bant izlenmedi.

#### 4.5. Brn3a Gen Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

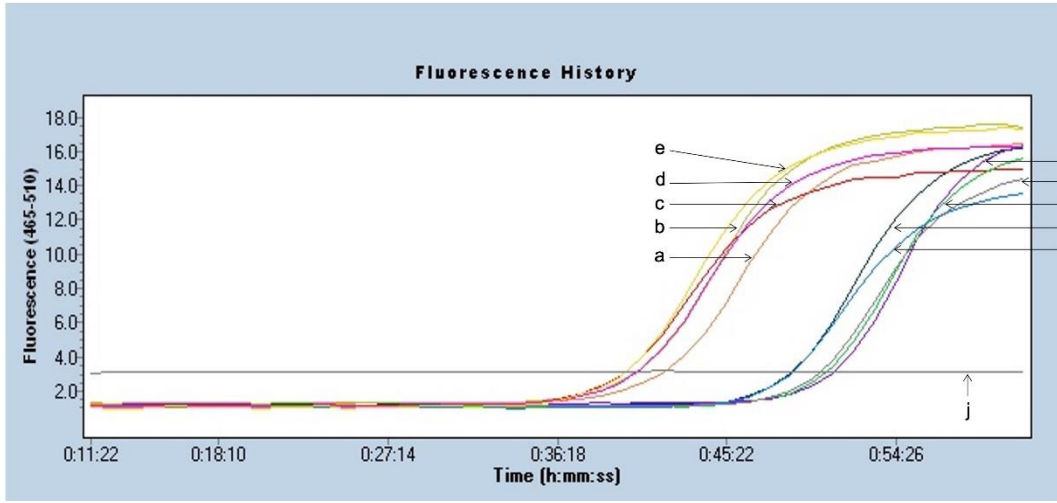
Western-Blot analiz sonuçlarına göre, retina dokusu örneklerinde Brn3a ekspresyonunun protein düzeyinde belirlenememesi nedeni ile, hedef genin mRNA (transkript) düzeyinde ekspresyonunun belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla, literatürde daha önce yer aldığı üzere sıçanlarda *Brn3a* gen ekspresyonu için uygulanan protokol kullanıldı ve referans gen olarak *Gapdh* seçildi. Şekil 9'da çalışma gruplarına ait gerçek-zamanlı PCR amplifikasyon eğrileri yer almaktadır.



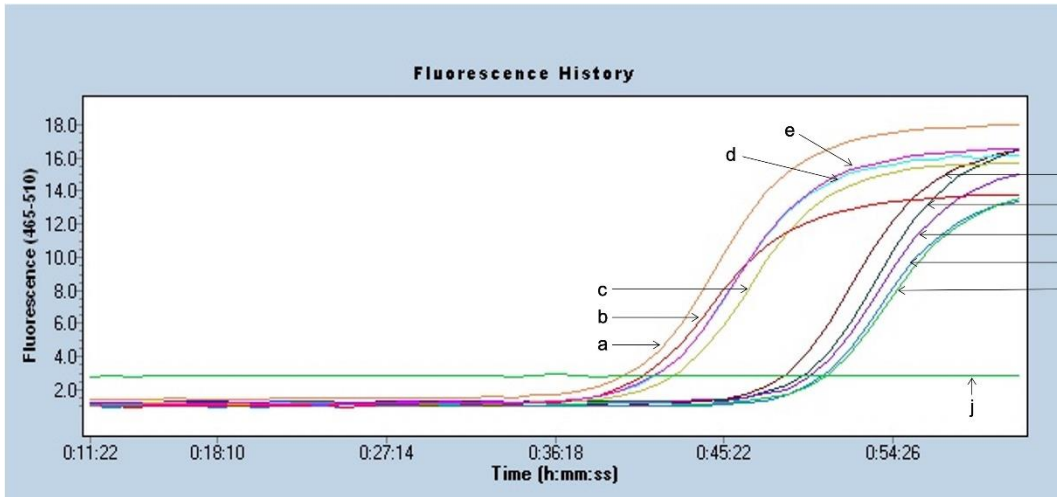
**Şekil 9.1** Kontrol grubunda yer alan retina örneklerinde *Brn3a* ve *Gapdh*'e özgün amplifikasyon eğrileri. Grafikte (a-e) *Brn3a*, (f-i) *Gapdh*'e ve (j) negatif kontrol örneğine özgün amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.



**Şekil 9.2** Lazer grubunda yer alan retina örneklerinde *Brn3a* ve *Gapdh*'e özgün amplifikasyon eğrileri. Grafikte (a-d) *Brn3a*, (e-h) *Gapdh*'e ve (i) negatif kontrol örneğine özgün amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.

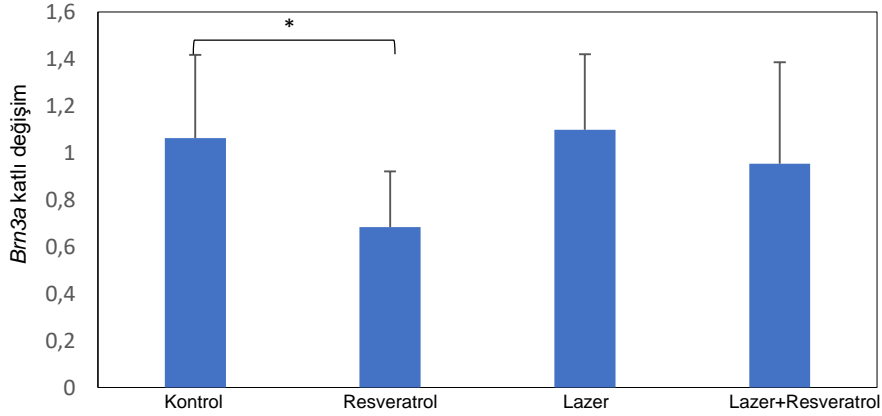


**Şekil 9.3** Resveratrol grubunda yer alan retina örneklerinde *Brn3a* ve *Gapdh*'e özgün amplifikasyon eğrileri. Grafikte (a-e) *Brn3a*, (f-i) *Gapdh*'e ve (j) negatif kontrol örneğine özgün amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.



**Şekil 9.4** Lazer+resveratrol grubunda yer alan retina örneklerinde *Brn3a* ve *Gapdh*'e özgün amplifikasyon eğrileri. Grafikte (a-e) *Brn3a*, (f-i) *Gapdh*'e ve (j) negatif kontrol örneğine özgün amplifikasyon eğrilerini göstermektedir.

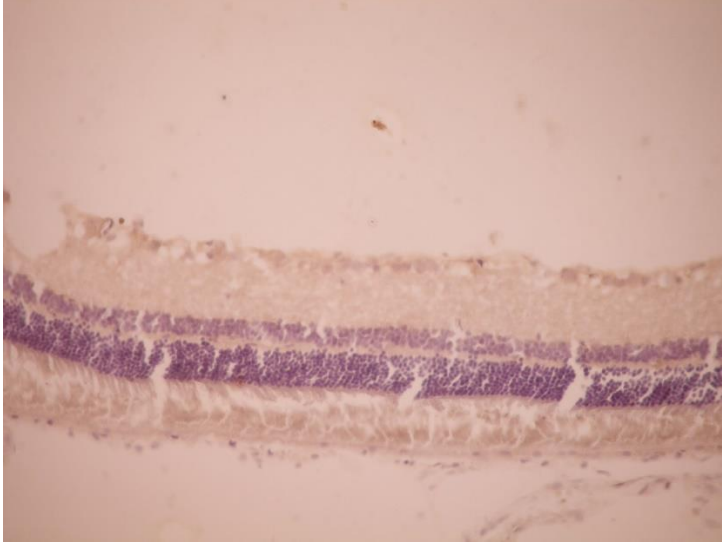
Dört farklı deney grubuna ait retina dokusunda Brn3a ekspresyon düzeyleri Şekil 5'te yer almaktadır. Gruplar arasında istatistiksel anlamlılık sadece kontrol grubu ve RSV grubu arasında gözlemlendi ( $p=0.03$ ). Kontrol ile lazer, kontrol ile lazer+RSV ve lazer ile lazer+RSV gruplarında istatistiksel anlamlılık değerleri sırası ile  $p=0.46$ ,  $p=0.26$  ve  $p=0.37$  olarak bulundu.



**Şekil 10.** Kontrol, resveratrol, lazer ve lazer+resveratrol gruplarına ait retina doku örneklerinde *Brn3a* ekspresyon düzeyleri.

#### 4.6 Apoptozisin değerlendirilmesi

TUNEL yöntemi ile apoptozin saptanması için alınan kesitlerde herhangi bir pozitif boyanma görülmedi (Şekil 11). Sorunun tespiti için süre ve bütçe kısıtlı olduğundan değerlendirmeye alınmadı.



**Şekil 11.** Apoptozisin değerlendirilmesi için TUNEL yöntemi ile yapılan incelemede retinal hücrelerde pozitif boyanma olmadığı izlenmektedir (X40 büyütme, 10µm kalınlık).

#### 4.7 Komplikasyonlar

İlk etapta 3 sıçana RVDO oluşturulduktan hemen sonra 30mg/kg intraperitoneal RSV verildi. Sıçanların ikisinde solunum sıkıntısı oluştu. Uygulamadan sonraki 24 saat içinde eksitus ortaya çıktı. Üçüncü sıçanda 24 saat sonra solunum sıkıntısı görüldü. Bu ön sonuçlar neticesinde deneyin geri kalanında metodoloji değiştirildi ve RSV uygulamasına gavaj ile devam edildi.

Bir sıçanda anestezi altında retina izole edilirken ortaya çıkan yoğun hemoraji nedeniyle retina dokusu ayırt edilemedi ve izolasyon sağlıklı bir şekilde gerçekleşemedi. Sonraki uygulamalarda retina izolasyonu servikal dislokasyon yapıldıktan sonra, hemoraji gelişmeden gerçekleştirildi.

## 5. TARTIŞMA

Deneysel retinal nöroproteksiyon çalışmalarında RGH sağkalım oranı sık kullanılan bir parametredir. RGH sağkalımını göstermek için çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında RGH-spesifik belirteçler ile immunoışaretleme (*immunolabeling*), retrograd işaretleme (*Fluorogold vs.*) ve nöronal işaretleme ( *$\beta$ III-tubulin, Neurotrace, NeuN vs.*) sayılabilir (Guymer vd 2020). RGH-spesifik belirteçler arasında Brn3a, gamma ( $\gamma$ )-synuclein ve çoklu kesicili RNA-bağlayıcı protein (*RNA-binding protein with multiple splicing (RBPMS)*) yer almaktadır (Guymer vd 2020).

RGH sayımı geleneksel olarak semi-otomatize veya manuel yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntemde optik diske belli mesafede retinal alanlar seçilmekte ve bu alanlarda RGH sayılmaktadır. Bu yöntem zaman almakta ve hem sayımı gerçekleştiren kişi, hem de seçilen alanlar açısından bir yönelim (*bias*) yaratabilmektedir. Sefton'a göre RGH dansitesi santral alanda en çok iken, periferik retinada en az sayıdadır (Guymer vd 2020). Öte yandan aynı türdeki sıçanların arasında, hatta aynı sıçanın sağ ve sol gözlerinde RGH spatial dağılımında farklılıklar görülebilmektedir (Danias vd 2002). Bu nedenle, sektörel değerlendirmelerde variabilite artabilmekte, bundan kaçınmak için tüm retinanın değerlendirilmesi gerekebilmektedir (Guymer vd 2020, Danias vd 2002). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda hem Western-Blot analizinde hem de gerçek zamanlı PCR analizinde her bir sıçanın tüm retinası alınmış, sektörel değerlendirme yapılmamıştır.

Brn3a, yüksek spesifitesi ve nükleer yerleşimi nedeniyle, RGH sağkalımını değerlendiren çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. RGH'de akut stres durumunda, hücre canlı kaldığı halde Brn3a ekspresyonunda azalma ortaya çıkabilmekte, bu da RGH ölümü konusunda hatalı değerlendirmelere sebep olabilmektedir. (Nadal-Nicolás vd 2009, Masin vd 2021). Ayrıca, Brn3a'nın melanopsin eksprese eden RGH gibi bazı spesifik RGH tiplerini işaretlemediği, genel anlamda RGH popülasyonunun %80'ini belirlemede faydalı olduğu gösterilmiştir (Nadal-Nicolás vd 2012, Masin vd 2021). Optik sinir hasarı ve kronik oküler hipertansiyon rodent modellerini

inceleyen bazı çalışmalarda melanopsin eksprese eden geniş RGH'nin, küçük RGH'ne göre dejenerasyona daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Li vd 2006, Pérez de Sevilla Müller vd 2014, Davis vd 2020). Hücre boyutundaki bu artış ile ilgili çeşitli açıklamalar ileri sürülmüştür. Biri, hasara cevap olarak artmış gen ekspresyonudur. Bir diğeri ise, dendrit sayısını arttırarak komşu RGH kaybını kompanse etme çabasıdır (Ahmed vd 2001, Davis vd 2020).

Çalışmamızda lazer uygulaması sonrası, istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte, *Brn3a* ekspresyonunda artış gözlemledik. Uygulanan lazerin dozu yanısıra uygulama süresi ve hasarın oluşturulduğu ortamdaki hücre kompozisyonlarının detaylı analizlerini içerecek geniş kapsamlı çalışmalar ile hasara yanıt olarak *Brn3a* ekspresyonunun değişimi hakkında daha net sonuçlara ulaşılabilecektir.

Retina ve optik sinir hasarını çeşitli yollarla oluşturmak mümkündür. Farklı mekanizmalarla, farklı şiddette sinir hasarı ortaya çıkabilmektedir (Nadal-Nicolás vd 2009). Nadal-Nicolas vd (2009) sıçanlarda kesi (transeksiyon) ve ezilme (crush) ile ilişkili optik sinir hasarı sonrası RGH sağkalımını değerlendirmişlerdir. RGH değerlendirmesi hem FG ile işaretleme, hem de *Brn3a* immundeteksiyon ile olmak üzere 2 ayrı yöntemle yapılmıştır.

Çalışmada optik sinir kesisi sonrası 14. günde her iki yöntemle de başlangıca göre anlamlı RGH kaybı saptanmıştır. Öte yandan *Brn3a*+RGH sayısı ( $4,778 \pm 1,332$ ), FG+RGH sayısına ( $10,598 \pm 2,785$ ) göre anlamlı düşüktür. Optik sinirde ezilme sonrası 14. günde yine başlangıca göre anlamlı RGH kaybı mevcuttur. RGH değerlendirme yöntemlerine göre bakıldığında; *Brn3a*+RGH sayısı ( $10,176 \pm 2,940$ ), FG+RGH sayısına ( $21,117 \pm 5,824$ ) göre yine anlamlı düşüktür. Çalışmadaki bulgular, her iki işaretleme yöntemiyle de 14.günde anlamlı RHG kaybı oluştuğunu göstermektedir ancak yöntemle göre sağ kaldığı öngörülen RGH sayısında anlamlı farklılık vardır. Bizim çalışmamızda RGH direkt olarak değerlendirilmemiş, *Brn3a* mRNA ekspresyonu üzerinden indirekt veri elde edilmesi planlanmıştır. Çalışmamızda lazer uygulaması sonrası, *Brn3a* ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

Travmanın farklı retinal hücrelerde *Brn3a*'nın ekspresyonunu upregüle etmesi hipotezine ilişkin olarak, hem hasar öncesi, hem de hasar sonrasında *Brn3a* sinyallerinin FG işaretli RGH ile kolokalize olduğu gösterilmiş, bu nedenle *Brn3a*'nın RGH tarafından eksprese edildiği ve bu konuda etkin bir belirteç olduğu görüşüne varılmıştır. *Brn3a* ekspresyonunun optik kesisi sonrası 48st.'te %25 oranında, 9. Günde ise %80 oranında



azaldığı ve ekspresyonunun kesi sonrası akut dönemde sona ermediği izlenmiştir. RGH kaybının, kesi sonrasında ezilme sonrasına göre daha erken dönemde olduğu görülmüştür (Nadal-Nicolás vd 2009). Çalışmamızda 14. günde lazer grubu ile kontrol grubu arasında Brn3a eksprese eden mRNA seviyeleri arasında anlamlı fark çıkmamıştır. Çalışma bulguları arasındaki fark, optik sinirin direkt kesilmesi/ezilmesi ile RGH'nde oluşan hasarın, RVDO ile oluşan iskeminin verdiği hasara göre fazla olmasından kaynaklanabilir.

Nadal-Nicolas vd'nin (2009) çalışmasında optik sinire uygulanan travma yöntemi ile ortaya çıkan RGH kaybının farklılık gösterdiği, ayrıca travma yöntemi aynı olduğunda bile farklı indikatörlerin gösterdiği RGH kaybı oranının da farklı olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda iskemi ile ortaya çıkan RGH hasarının, optik sinir kesi/ezilmesine göre az olduğu, ayrıca Brn3a eksprese eden mRNA seviyesinin, RGH sağkalımını gösterme açısından diğer indikatörlere göre olasılıkla daha zayıf olduğu ileri sürülebilir.

Sun vd'nin (2023) çalışmasında optik siniri çekme (pulling) yoluyla sinir hasarı oluşturulmuş ve 7. Günde RGH sayısında azalma saptanmıştır. Optik sinir çekme gücü arttıkça, RGH sayısında azalma görülmüştür. Gücün 0.1N olduğu grup TUNEL ile gösterilen apoptotik hücre açısından kontrol grubuyla fark göstermezken, 0.3N ve 0.5N güç gruplarına göre anlamlı düşük saptanmıştır. Brn3a ile işaretli RGH sayısı, 0.5N grubunda 0.1N ve 0.3N grubuna göre anlamlı şekilde düşüktür, benzer şekilde 0.3N grubundaki sayı 0.1N grubuna göre anlamlı düşüklük göstermiştir. Bu çalışmadaki bulgular irdelendiğinde, RGH üzerindeki stresin derecesi ile hasar oranının ilişkili olduğu görülmektedir. Çalışmamızda tüm sıçanlara benzer sayı, süre ve güçte lazer uygulaması yapılmıştır ancak Brn3a eksprese eden mRNA seviyesinde lazer grubu ile kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır. Bu sonuçlar, RGH üzerinde yeterli stres oluşturacak şiddette iskemi oluşmadığı şeklinde yorumlanabilir. Domuz gözünde yapılan anjiyografik çalışmalarda tek bir retinal venin oklüzyonunun kolaylıkla kompanse edildiği gösterilmiştir (Mæng vd 2023).

DeneySEL sıçan RVO modelinde lazer uygulamasından 1-2 gün sonra anjiyografik olarak venlerde reperfüzyon olabildiği gösterilmiştir (Zhang vd 2008). Perfüzyona rağmen 4. günde retinal hemorajiler pik yapmış, 14. günde retinada solukluk ortaya çıkmıştır. Tüm retina (whole retina) incelemesinde, SRVO olan grupta RHG sayısında 14. günde %30 azalma olurken, RVDO grubunda ise anlamlı azalma daha geç ortaya çıkmış, 21. günde %9.5 RHG azalması izlenmiştir. SRVO oluşturulmuş olan sıçan

retinasında 4. günde yapılan incelemede santral retinada dış nükleer ve fotoreseptör tabakalarında sırasıyla %33.3 ve %59 oranında incelmeye saptanmıştır. Fuma vd'nin (2017) RVO oluşturulan fare gözlerinde yaptıkları çalışmada ise iç nükleer tabakada 1. günde kalınlaşma, dış nükleer tabakada ise 7. günde anlamlı incelmeye saptanmıştır. Kistoid ödem 1 ve 3. günlerde görülmüştür.

RGH, retinal hücre popülasyonunun %1'inden azını oluşturmakta ve bu da Western-Blot analizlerinde zayıf sinyale veya sinyal gözlenmemesine sebep olmaktadır. (Nadal-Nicolás vd 2009). RVO çalışmalarında kullanılan fotosensitizan boya, lazeri absorbe etmekte ve ihtiyaç duyulan lazer sayısını ve gücünü azaltmaktadır. Öte yandan, boyanın sebep olduğu radyasyon, protein modifikasyonlarına sebep olarak sonuçların değerlendirilmesini etkileyebilmektedir (Cehofski vd 2015, Maeng vd 2023). Çalışmamızda lazer uygulanmış ve lazer uygulanmamış retina örneklerinde Western-Blot analizlerinde internal kontrol olarak kullanılan ve 41 kDA büyüklüğünde  $\beta$ - aktin proteinine ait bant gözlenmiş, ancak 43kDA büyüklüğünde Brn3a proteinine ait bant gözlenmemiştir. Literatürde retina örneklerinden protein analizlerinde örneklerin pool edilerek çalışıldığı görülmektedir (Nadal-Nicolás vd 2009, Rocha-Martins vd 2012, Wang ve Li 2017). Proje tez çalışmamızda oluşturulacak deney gruplarının sayısının azlığı nedeni ile örneklerin pool edilerek çalışılması tercih edilmemiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, her ne kadar bireysel retina dokusundan izole edilen total protein konsantrasyonu Western-Blot analizi için yeterli olsa da, total protein içinde hedef protein olan Brn3a'nın söz konusu analiz için yeterli düzeyde/konsantrasyonda olmadığı değerlendirilmiştir.

RVO sonrası apoptozisin değerlendirildiği bir çalışmada TUNEL yöntemiyle tüm kontrol günlerinde (4, 7, 14 ve 21. günler) *gangliyon* hücre ve iç nükleer tabakalarda %5'ten az hücrede boyanma görülmüştür (Zhang vd 2008). Yazarlar bunun retinadaki apoptotik hücrelerin temizlenme (clearance) süresi ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşler ve retinada bu sürenin bilinmediğini, karaciğerde ise 3 saate inebildiğini belirtmişlerdir (Bursch vd 1990).

Bizim çalışmamızda retina dokusunun RVO oluşumundan 48st. sonra yapılan TUNEL incelemesinde pozitif hücre saptanmamıştır. Üstte ileri sürülen, retinal apoptotik hücrelerdeki clearance hızı, çalışmamızda retinada TUNEL pozitif hücre bulunamayışı ile ilişkili olabilir. Bu konuya açıklık getirmek için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda lazer grubu ile kontrol grubu arasında, Brn3a mRNA ekspresyon düzeyinde farklılık görülmemiştir. Bunun için çeşitli hipotezler ile sürülebilir:

1-Lazerin uygulama dozu ve sayısı, Brn3a ekspresyonunda azalma yaratacak şiddette iskemi oluşturmamış olabilir. Öte yandan, çalışmamızda retinal venler üzerine, diskten yaklaşık 1 disk mesafesi uzaklıkta güç 100-150mw, spot büyüklüğü 50-100µm, maruziyet süresi 1sn olacak şekilde, kan akımını engelleyecek beyazlaşma görülünceye kadar lazer atış yapılmış ve tüm venlerde damar distalinde genişleme izlenmiştir. Uygulama şekli ve lazer parametreleri literatürle uyum içerisindedir (Sun vd 2013).

2- Lazerle oluşmuş olan vasküler oklüzyon, sıçanlarda sık görülen rekanalizasyon meydana gelmesi sonucunda etkisini kaybetmiş olabilir. Zhang vd (2008) tarafından oluşturulan deneysel sıçan RVO modelinde, hastalığın doğal seyrini inceleyen bir çalışmada, lazer uygulamasından 1-2 gün sonra anjiyografik olarak venlerde reperfüzyon gösterilmiştir. RVO sonrası 4. günde retinal hemorajiler pik yapmış, 14. günde retinada solukluk ortaya çıkmıştır (Zhang vd 2008). Genevois vd (2004) ise RVO oluşturulan sıçan retinalarında, rekanalizasyondan sonra da mikrovasküler değişiklikler ve kapiller non- perfüzyonun devam ettiğini, dolayısıyla total oklüzyon süresi birkaç günle sınırlı kalsa da, süreçte ortaya çıkan değişikliklerin oklüzyondan kısmen bağımsız olarak gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmalardaki bulgular, sıçan retinasında RVO sonrası rekanalizasyon ve reperfüzyonun sık görüldüğünü göstermekte, öte yandan reperfüzyon gelişse de retinal hasarın devam ettiğini işaret etmektedir. Fuma vd (2017), çalışmalarında fotosensitizan ajan olarak Rose bengal (8 mg/mL IV) kullanmışlar ve daha önceki deneyimlerinde Rose-Bengal dozu düşük olduğunda spontan retinal vasküler rekanalizasyonun görüldüğünü (makalenin ekinde) belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda Rose-Bengal intravenöz değil, intraperitoneal olarak 20mg/kg dozunda verilmiştir.

3-RVDO oluşumu ile etkilenen RGH grubu, Brn3a ile işaretlenen %80'lik dilim içerisinde olmayabilir veya Davis ve ark.'nın ileri sürdüğü gibi, sağ kalan RGH popülasyonunda iskemi sonucunda gen ekspresyonunda bir artış ortaya çıkmış olabilir. Bu durumu kanıtlamak için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

4-Çalışmamızda değerlendirilmiş olan, Brn3a'yı eksprese eden mRNA seviyesi, RGH için direkt bir indikatör olmayabilir. Western-Blot analizi ile protein düzeyinde ekspresyonunu belirleyemediğimiz *Brn3a*'nın, daha hassas bir yöntem olan gerçek-zamanlı PCR ile mRNA düzeyinde ekspresyonunu belirledik. Bu amaçla referans gen

olarak *GAPDH* kullandık ve Brn3a'nın *GAPDH*'e göre relatif kantitasyonu yaptık ve her bir çalışma grubumuz için katlı değişimlerini hesapladık. Gerçek zamanlı PCR, oldukça duyarlı ve özgün bir yöntem olması yanı sıra amplifikasyon sonrası analiz aşamalarının aynı ortamda gerçekleştirilebilmesi nedeni ile de kontaminasyon riskini ortadan kaldıran bir yöntemdir. Kullanılan protokole bağlı olmakla birlikte, hedef transkriptin 1 kopyasını belirleyebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca, bu yöntem örnekler arasındaki %23 kadar az bir orandaki gen ekspresyon farklılıklarını dahi belirleyebilmektedir (Wong and Medrano 2005). Western-Blot analizi ilgilendiğimiz hedef proteinin nanogram konsantrasyonlarda varlığını belirleyen bir yöntemdir. Western-Blot'ın belirleme limitini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır ve daha hassas analizler farklı versiyonları bulunmaktadır (Mishra vd 2019). Çalışmamızda, Western-Blot analizinde yaygın olarak kullanılan ve laboratuvarımız olanaklarına uygun enzimatik belirleme yöntemini uyguladık, ancak Brn3a'nın bireysel retina dokusunda protein düzeyinde ekspresyonunu göstermedik. Bu sonuç bize, bireysel retina dokusunda var olan Brn3a protein konsantrasyonunun, uyguladığımız Western-Blot analizinin belirleme limitinin altında olduğunu göstermektedir.

Deneysel çalışmalarda mRNA ile protein ekspresyon profilleri arasında uyumsuzluklar olabildiği bilinmektedir (Gygi vd 1999, Pascal vd 2008, Mehra vd 2003). Söz konusu uyumsuzluk kinetik parametrelerden olduğu kadar, ribozom konsantrasyonundan da kaynaklanabilmektedir. Perturbasyona yanıtta serbest ve total ribozom konsantrasyon değişiklikleri, aminoasit tRNA için kompetisyon sırasında başlatma ve elongasyona ilişkin kinetik değişiklikler, terminasyon kinetiğindeki değişiklikler, perturbasyona yanıtta mRNA seviyesindeki değişiklikler ve protein stabilitesindeki değişiklikler gibi pek çok faktör, mRNA ve protein ekspresyon profilleri arasındaki ilişkiyi etkiler (Mehra vd 2003)-

Gygi vd (1999) mRNA ve protein seviyeleri arasındaki korelasyonun, kantitatif mRNA verisine bakarak protein ekspresyon seviyesini tahmin etmek için yeterli olmadığını göstermiştir. Bazı genlerde, mRNA seviyeleri benzer iken, protein seviyelerinde 20 kata kadar fark olabildiği izlenmiştir.

Çalışmamızda RSV grubunda mRNA seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı görülmektedir. Nöroprotektif özellikte olduğuna dair literatür verisi olan RSV'un, çalışmamızda Brn3a eksprese eden mRNA seviyesinde azalmaya sebep olması ile ilgili çeşitli hipotezler ileri sürülebilir:

-RSV'un nöroprotektif etkisi doz bağımlı olabilir ve düşük dozlarda bu etkinin ortaya çıkmadığı, hatta olumsuz etki yaptığı ileri sürülebilir.

Literatürde RSV doz ve yaş ilişkili bifazik etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Yüksek dozlarda sağlıklı hücrelerde apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir. (Salehi vd 2018). Bir yaşından sonra RSV başlanan farelerde, genç farelere kıyasla sağkalımın artmadığı, RSV'nin sağkalımı arttıran etkilerinin, yaşla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Pearson vd 2008). Wilson vd (1996) çalışmasında 1mg/kg RSV alan tavşanlarda plazma kolesterol seviyesi, karaciğer fonksiyonu ve genel sağlık durumundan bağımsız olarak aortta aterosklerotik yüzey alanında anlamlı artış saptanmıştır. Gueguen vd (2015) RSV anti-ve pro-oksidan etkilerinin doz kadar yaşa da bağlı olduğuna dikkat çekmiş, RSV'nin mitokondriyal kompleks I üzerine olan etkilerinin, genç ve yaşlı farelerin beyin mitokondrilerinde farklı etkilerle sonuçlandığını, yaşlı farelerde oksidatif stres durumunu arttırdığını belirtmişlerdir.

Gadacha vd (2009), sıçanlara aydınlık ve karanlıkta intraperitoneal RSV uygulayarak tiobarbiturik acit reaktif ürünleri değerlendirmişlerdir. RSV'un karanlıkta antioksidan, aydınlıkta ise pro-oksidan olarak davrandığını saptamışlar ve bazal lipoperoksidasyon ve RSV ile ilişkili anti-oksidan etkide bir gündüz/gece ritminin söz konusu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

--RSV'un nöroprotektif etkisi uygulama yoluyla ilişkili olabilir ve oral yolla alındığında bu etki ortaya çıkmıyor olabilir. Çalışmamızda RSV'nin literatürde belirtildiği dozda intraperitoneal uygulandığı 3 sıçanda 24 saat içinde eksitus ortaya çıkmıştır ve bunun üzerinde oral uygulamaya geçilmiştir. Oral uygulama altında, 14 gün boyunca RSV alan hiçbir sıçanda eksitus görülmemiştir.

Walle (2004), oral uygulama ile RSV'un emilim oranının %75 civarında olduğunu ve karaciğer/barsaklarda metabolize olduktan sonra 25mg RSV için serum RSV değerinin 5ng/ml altına düştüğünü belirtmiştir. Gambini vd (2015) özellikle karaciğer eliminasyonundan sonra serbest RSV'nin az olduğunu ileri sürmüş ve oral 25mg RSV alımından 30dk sonra RSV konsantrasyon pikinin <10 ng/ml olduğunu ifade etmişlerdir. Öte yandan literatürde oral RSV sonrası oküler bulgular açısından etkin sonuçlar bildirilmiştir. Zeng vd'nin (2016) çalışmasında diabetik sıçanlara RSV (5 and 10 mg/kg/gün) günde 1 kez gavaj ile gavaj ile verilmiş ve glutamat geri alımı, müller hücre metabolizması üzerine etkiler ile diabetik retinopattadaki nöral disfonksiyonun düzeldiği gösterilmiştir.

-RSV, RGH sağkalımından/canlılığından bağımsız olarak mRNA düzeyinde bir baskılamaya sebep oluyor olabilir. Bu hipotezi doğrulamak için literatür desteğine ihtiyaç vardır.

### **5.1 Çalışmanın Zayıf Ve Güçlü Yönleri**

Çalışmamız, kurumumuzda yapılan ilk deneysel retina çalışmasıdır. Bu durum çalışmamızın zayıf yönü olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızın temel basamakları olan sıçan retinasının görüntülenmesi, sıçan retinal damarlarına lazer yapılması, sıçanda retina izolasyonu, retinanın histolojik incelemesi, retinadan protein izolasyonu ve retinadan mRNA izolasyonu farklı disiplinlerde çalışan araştırmacıların desteği ile kurum çatımız altında ilk defa gerçekleşmiş ve bu konuda multidisipliner bir ekip oluşturulmuştur. Oluşan ekip, gelecekte oftalmoloji bazlı sinirbilim çalışmaları ve özellikle retinal nöroproteksiyon konusunda yeni çalışmaların başlaması için gerekli deneyimi kazanmıştır. Bu durum, çalışmanın güçlü yönü olarak yorumlanmıştır.

Çalışma süresi içerisinde döviz kurunda ortaya çıkan değişikliklerin sonucunda çalışma maliyeti artmış ve proje bütçesinin dışına taşmıştır. Bu nedenle çalışmanın başında planlanan bazı aşamalar gerçekleştirilememiş ve tekrarlanması istenen bazı deney aşamaları tekrarlanamamıştır.

## 6. SONUÇLAR

- 1-Retina kesitlerinde Western-Blot analizi ile Brn3a ekspresyonu protein seviyesinde saptanmıştır.
- 2-Gerçek zamanlı PCR ile retina kesitlerinde Brn3a mRNA ekspresyon analizi yapılmıştır.
- 3-Gerçek zamanlı PCR analizi ile lazer yapılan ve yapılmayan retina örnekleri arasında Brn3a mRNA ekspresyonu açısından anlamlı fark çıkmamıştır.
- 4-Gerçek zamanlı PCR analizi ile lazer yapılan gözlerde RSV uygulaması ile Brn3a mRNA ekspresyonu açısından anlamlı fark çıkmamıştır.
- 5-Gerçek zamanlı PCR analizi ile lazer yapılmayan ve RSV uygulanan sıçanlarda Brn3a mRNA ekspresyonu düzeyinde, RSV verilmeyen kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma saptanmıştır.

### 6.1 Çalışmada Elde Edilen Ve Gelecekte Planlanacak Çalışmalar İçin Yol Gösterici Olabilecek Teknik Sonuçlar

- 1-Sıçan retinası biyomikroskop ve 78D mercek; indirekt oftalmoskop ve 20-30D mercekler ile görüntülenebilmektedir.
- 2-Sıçan retinasında kontakt makula merceği ile görüntü kaydı başarıyla alınabilmektedir.
- 3-Diod lazer fotokoagülasyon ile sıçan retinasında ven oklüzyonu oluşturulabilmektedir.
- 4-Önerilen disseksiyon teknikleri uygulanarak, retina zedelenmeden bütün olarak çıkarılabilmektedir.
- 5-Globun orbitadaki pozisyonu korunduğunda retinal disseksiyon daha kolay gerçekleşmektedir.
- 6-Kriyostat ile alınmış olan 20 ve 30mikron kalınlığındaki retinal kesitler Hematoksiler/Eozin boyama sırasında lamdan ayrıldığı için 10mikron ve altında kesit alınması uygun bulunmuştur.
- 7-Eş zamanlı intraperitoneal Rose-Bengal ve RSV verilen sıçanlarda eksitus görülmüştür.
- 8-Gavaj ile oral RSV verilen sıçanlarda eksitus görülmemiştir.

## 7. KAYNAKLAR

Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. **Arch Ophthalmol** 1995;113(12):1538-1544.

Ahmed FA, Chaudhary P, Sharma SC. Effects of increased intraocular pressure on rat retinal ganglion cells. **Int J Dev Neurosci** 2001 Apr;19(2):209-18.

Alshareef RA, Chhablani J. Neurodegeneration in branch retinal vein occlusion. **Neural Regen Res** 2016;11(9):1414.

Alshareef RA, Barteselli G, You Q, Goud A, Jabeen A, Rao HL, Jabeen A, Chhablani J. In vivo evaluation of retinal ganglion cells degeneration in eyes with branch retinal vein occlusion. **Br J Ophthalmol** 2016;100(11):1506-1510.

Altinisik M, Koytak A, Elbay A, Toklu E, Sezer T, Kocyigit A. Oxidant-Antioxidant Balance in the Aqueous Humor of Patients with Retinal Vein Occlusion. **Semin Ophthalmol** 2018;33(5):675-682.

Avrutsky MI, Ortiz CC, Johnson KV, Potenski AM, Chen CW, Lawson JM, White AJ, Yuen SK, Morales FN, Canepa E, Snipas S, Salvesen GS, Jean YY, Troy CM. Endothelial activation of caspase-9 promotes neurovascular injury in retinal vein occlusion. **Nat Commun** 2020;23;11(1):3173.

Berger V, Munk MR, Lersch F, Wolf S, Ebnetter A, Zinkernagel MS. Association of Intravitreal Injections With Blood Pressure Increase: The Following Excitement and Anxiety Response Under Intravitreal Injection Study. **JAMA Ophthalmol** 2019;137(1):87-90.

Brar M, Sharma M, Grewal SPS, Grewal DS. Quantification of retinal microvasculature and neurodegeneration changes in branch retinal vein occlusion after resolution of cystoid macular edema on optical coherence tomography angiography. **Indian J Ophthalmol** 2019;67(11):1864-1869.

Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. **Carcinogenesis** 1990;11:847-853.

Cao K, Ishida T, Fang Y, Shinohara K, Li X, Nagaoka N, Ohno-Matsui K, Yoshida T. Protection of the Retinal Ganglion Cells: Intravitreal Injection of Resveratrol in Mouse Model of Ocular Hypertension. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2020;61(3):13.

Cehofski LJ, Kruse A, Kjærgaard B, Stensballe A, Honoré B, Vorum H. Dye-Free Porcine Model of Experimental Branch Retinal Vein Occlusion: A Suitable Approach for Retinal Proteomics. **J Ophthalmol** 2015;2015:839137.

Chen Y, Meng J, Li H, Wei H, Bi F, Liu S, Tang K, Guo H, Liu W. Resveratrol exhibits an effect on attenuating retina inflammatory condition and damage of diabetic retinopathy via PON1. **Exp Eye Res** 2019;181:356-366.



Chen KH, Hsiang EL, Hsu MY, Chou YC, Lin TC, Chang YL, Tsai CY, Li TH, Woung LC, Chen SJ, Peng CH, Hwang DK. Elevation of serum oxidative stress in patients with retina vein occlusions. *Acta Ophthalmol* 2019;97(2):e290-e295.

Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos-Esteban J, Podos SM, Mittag T. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):587-94.

Davis BM, Guo L, Ravindran N, Shamsheer E, Baekelandt V, Mitchell H, Bharath AA, De Groef L, Cordeiro MF. Dynamic changes in cell size and corresponding cell fate after optic nerve injury. *Sci Rep* 2020;10;10(1):21683.

Deng C, Chen S, Li X, Luo H, Zhang Q, Hu P, Wang F, Xiong C, Sun T, Zhang X. Role of the PGE2 receptor in ischemia-reperfusion injury of the rat retina. *Mol Vis* 2020;26:36-47.

Dou Z, Rong X, Zhao E, Zhang L, Lv Y. Neuroprotection of Resveratrol Against Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice Through a Mechanism Targeting Gut-Brain Axis. *Cell Mol Neurobiol* 2019;39(6):883-898.

Fekrat S, Shea AM, Hammill BG, Nguyen H, Kowalski JW, Schulman KA, Curtis LH. Resource use and costs of branch and central retinal vein occlusion in the elderly. *Curr Med Res Opin* 2010;26(1):223-230.

Fuma S, Nishinaka A, Inoue Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Kondo M, Hara H. A pharmacological approach in newly established retinal vein occlusion model. *Sci Rep* 2017;2;7:43509.

Funk M, Kriechbaum K, Prager F, Benesch T, Georgopoulos M, Zlabinger GJ, Schmidt-Erfurth U. Intraocular concentrations of growth factors and cytokines in retinal vein occlusion and the effect of therapy with bevacizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(3):1025-32.

Gadacha W, Ben-Attia M, Bonnefont-Rousselot D, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N, Touitou Y. Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: pro-oxidant during day-time and antioxidant at night. *Redox Rep* 2009;14(4):154-8.

Galiniak S, Aebischer D, Bartusik-Aebischer D. Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim Pol* 2019;66(1):13-21.

Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:837042.

Garrity MM, Burgart LJ, Riehle DL, Hill EM, Sebo TJ, Witzig T. Identifying and quantifying apoptosis: navigating technical pitfalls. *Mod Pathol* 2003 16(4):389-94.

Genevois O, Paques M, Simonutti M, Sercombe R, Seylaz J, Gaudric A, Brouland JP, Sahel J, Vicaut E. Microvascular remodeling after occlusion-recanalization of a branch retinal vein in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):594-600.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1720-30.

Gueguen N, Desquiret-Dumas V, Leman G, Chupin S, Baron S, Nivet-Antoine V, Vessières E, Ayer A, Henrion D, Lenaers G, Reynier P, Procaccio V. Resveratrol Directly Binds to Mitochondrial Complex I and Increases Oxidative Stress in Brain Mitochondria of Aged Mice. **PLoS One** 2015;18;10(12):e0144290.

Guymer C, Damp L, Chidlow G, Wood J, Tang YF, Casson R. Software for Quantifying and Batch Processing Images of Brn3a and RBPMS Immunolabelled Retinal Ganglion Cells in Retinal Wholemounts. **Transl Vis Sci Technol** 2020;27;9(6):28.

İnan S. Retina anatomisi. **Kocatepe Tıp Dergisi** 2014;15(3): 355-9.

Kaneda S, Miyazaki D, Sasaki S, Yakura K, Terasaka Y, Miyake K, Ikeda Y, Funakoshi T, Baba T, Yamasaki A, Inoue Y. Multivariate analyses of inflammatory cytokines in eyes with branch retinal vein occlusion: relationships to bevacizumab treatment. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2011;6;52(6):2982-8.

Kayikcioglu O, Bilgin S, Seymenoglu G, Devenci A. State and Trait Anxiety Scores of Patients Receiving Intravitreal Injections. **Biomed Hub** 2017;2(2):1-5.

Koss MJ, Pfister M, Rothweiler F, et al. Comparison of cytokine levels from undiluted vitreous of untreated patients with retinal vein occlusion. **Acta Ophthalmol** 2012;90(2):e98-e103.

Laouri M, Chen E, Looman M, Gallagher M. The burden of disease of retinal vein occlusion: review of the literature. **Eye (Lond)** 2011;25(8):981-8.

Levere TE. The primary visual system of the rat: A primer of its anatomy. **Physiological Psychology** 1978; 6(2): 142-169.

Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. **Cell** 2008;26;135(7):1299-310.

Li RS, Chen BY, Tay DK, Chan HH, Pu ML, So KF. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells are more injury-resistant in a chronic ocular hypertension model. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2006;47(7):2951-8.

Lim JW. Intravitreal bevacizumab and cytokine levels in major and macular branch retinal vein occlusion. **Ophthalmologica** 2011;225(3):150-154.

Luo H, Zhuang J, Hu P, Ye W, Chen S, Pang Y, Li N, Deng C, Zhang X. Resveratrol Delays Retinal Ganglion Cell Loss and Attenuates Gliosis-Related Inflammation From Ischemia-Reperfusion Injury. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2018;59(10):3879-3888.

Mæng MO, Roshanth N, Kruse A, Nielsen JE, Kjærgaard B, Honoré B, Vorum H, Cehofski LJ. Laser-Induced Porcine Model of Experimental Retinal Vein Occlusion: An Optimized Reproducible Approach. **Medicina (Kaunas)** 2023;27;59(2):243.

Masin L, Claes M, Bergmans S, Cools L, Andries L, Davis BM, Moons L, De Groef L. A novel retinal ganglion cell quantification tool based on deep learning. **Sci Rep** 2021;12;11(1):702.

Maynard RL, Downes N. *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*. Elsevier Inc. First ed., 2019: s.284-291.

McAllister IL, Vijayasekaran S, Zhang D, McLenachan S, Chen FK, Yu DY. Neuronal degeneration and associated alterations in cytokine and protein in an experimental branch retinal venous occlusion model. **Exp Eye Res** 2018;174:133-146.

Mehra A, Lee KH, Hatzimanikatis V. Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. Theoretical considerations. **Biotechnol Bioeng** 2003;30;84(7):822-33.

Meng X, Zhou J, Zhao CN, Gan RY, Li HB. Health Benefits and Molecular Mechanisms of Resveratrol: A Narrative Review. **Foods** 2020;9(3):340.

Minaker SA, Mason RH, Bamakrid M, Lee Y, Muni RH. Changes in Aqueous and Vitreous Inflammatory Cytokine Levels in Retinal Vein Occlusion: A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of VitreoRetinal Diseases** 2020;4(1):36-64.

Mishra M, Tiwari S, Gunaseelan A, Li D, Hammock BD, Gomes AV. Improving the sensitivity of traditional Western blotting via Streptavidin containing Poly-horseradish peroxidase (PolyHRP). **Electrophoresis** 2019;40(12-13):1731-1739.

Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2009;50(8):3860-8.

Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Albuquerque-Béjar JJ, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. **PLoS One** 2012;7(11):e49830.

Noma H, Funatsu H, Yamasaki M, Tsukamoto H, Mimura T, Sone T, Hirayama T, Tamura H, Yamashita H, Minamoto A, Mishima HK. Aqueous humour levels of cytokines are correlated to vitreous levels and severity of macular oedema in branch retinal vein occlusion. **Eye (Lond)** 2008 Jan;22(1):42-8.

Noma H, Mimura T, Eguchi S. Association of inflammatory factors with macular edema in branch retinal vein occlusion. **JAMA Ophthalmol** 2013;131(2):160-165.

Pascal LE, True LD, Campbell DS, Deutsch EW, Risk M, Coleman IM, Eichner LJ, Nelson PS, Liu AY. Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. **BMC Genomics** 2008;23;9:246.

Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. **Cell Metab** 2008;8(2):157-68.

Pérez de Sevilla Müller L, Sargoy A, Rodriguez AR, Brecha NC. Melanopsin ganglion cells are the most resistant retinal ganglion cell type to axonal injury in the rat retina. **PLoS One** 2014;26;9(3):e93274.

Pazos M, Yang H, Gardiner SK, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC, Burgoyne CF. Rat optic nerve head anatomy within 3D histomorphometric reconstructions of normal control eyes. **Exp Eye Res** 2015; 139: 1-12.

Pfister M, Rothweiler F, Michaelis M, Cinatl J Jr, Schubert R, Koch FH, Koss MJ. Correlation of inflammatory and proangiogenic cytokines from undiluted vitreous samples with spectral domain OCT scans, in untreated branch retinal vein occlusion. **Clin Ophthalmol** 2013;7:1061-7.

Pirhan D, Yüksel N, Emre E, Cengiz A, Kürşat Yıldız D. Riluzole- and Resveratrol-Induced Delay of Retinal Ganglion Cell Death in an Experimental Model of Glaucoma. **Curr Eye Res** 2016;41(1):59-69.

Rocha-Martins M, Njaine B, Silveira MS. Avoiding pitfalls of internal controls: validation of reference genes for analysis by qRT-PCR and Western blot throughout rat retinal development. **PLoS One** 2012;7(8):e43028.

Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Fokou PVT, Martins N, Sharifi-Rad J. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. **Biomedicines** 2018;9;6(3):91.

Salmon J. Kanski's Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach. Retinal vascular diseases (Chapter 13); **Elsevier Health Sciences**, 9th edition, 2020:s. 495-553.

Schmidt-Erfurth U, Garcia-Arumi J, Gerendas BS, Midena E, Sivaprasad S, Tadayoni R, Wolf S, Loewenstein A. Guidelines for the Management of Retinal Vein Occlusion by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). **Ophthalmologica** 2019;242(3):123-162.

Shchuko AG, Zlobin IV, Iureva TN, Ostanin AA, Chernykh ER, Mikhalevich IM. Intraocular cytokines in retinal vein occlusion and its relation to the efficiency of anti-vascular endothelial growth factor therapy. **Indian J Ophthalmol** 2015;63(12):905-911.

Spooner K, Fraser-Bell S, Hong T, Chang AA. Five-year outcomes of retinal vein occlusion treated with vascular endothelial growth factor inhibitors. **BMJ Open Ophthalmol** 2019;4(1):e000249.

Sun C, Li XX, He XJ, Zhang Q, Tao Y. Neuroprotective effect of minocycline in a rat model of branch retinal vein occlusion. **Exp Eye Res** 2013;113:105-16.

Sun W, Chao G, Shang M, Wu Q, Xia Y, Wei Q, Zhou J, Liao L. Optic nerve injury models under varying forces. **Int Ophthalmol** 2023;43(3):757-769.

Suñer IJ, Margolis J, Ruiz K, Tran I, Lee P. Direct medical costs and resource use for treating central and branch retinal vein occlusion in commercially insured working-age and Medicare populations. **Retina** 2014;34(11):2250-2258.

Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M. Direct measurement of free radicals in ischemic/reperfused diabetic rat retina. **Clin Neurosci** 1997;4(5):240-5.

Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab Dispos** 2004;32(12):1377-82.

Wang L, Li P. Expressions of nestin and glial fibrillary acidic protein in rat retina after optic nerve transection. **Int J Ophthalmol** 2017;18;10(10):1510-1515.

Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS, Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci* 1996;59(1):PL15-21.

Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39(1):75-85.

Zeng K, Yang N, Wang D, Li S, Ming J, Wang J, Yu X, Song Y, Zhou X, Yang Y. Resveratrol Prevents Retinal Dysfunction by Regulating Glutamate Transporters, Glutamine Synthetase Expression and Activity in Diabetic Retina. *Neurochem Res* 2016;41(5):1050-64.

Zhang Y, Fortune B, Atchaneeyasakul LO, McFarland T, Mose K, Wallace P, Main J, Wilson D, Appukuttan B, Stout JT. Natural history and histology in a rat model of laser-induced photothrombotic retinal vein occlusion. *Curr Eye Res* 2008;33(4):365-76.

## 9. EKLER

Ek-1. Akbulut S, Pekel G, Pekel E, **Cetin EN**. Alterations in retinal and choroidal thickness following nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Int Ophthalmol* 2021; 41(8): 2723-2728.

Ek-2. Etik kurul onay belgesi.



## Alterations in retinal and choroidal thickness following nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy

Selen Akbulut · Gökhan Pekel · Evre Pekel · Ebru Nevin Cetin

Received: 22 September 2020 / Accepted: 29 March 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

### Abstract

**Purpose** To show alterations of retinal arteriolar caliber (RAC), retinal venular caliber (RVC), retinal nerve fiber layer thickness (RNFLT), peripapillary choroidal thickness (ppCT), and central macular thickness (CMT) in acute and chronic phases of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION).

**Methods** Forty-one eyes of 41 patients with NAION were included in this retrospective study. RAC, RVC, RNFLT, ppCT, and CMT measurements were performed via spectral-domain optical coherence tomography in the acute and chronic phases of NAION.

**Results** RVC, RNFLT, ppCT, and CMT were significantly thinner in the chronic phase compared to the acute phase ( $p < 0.001$ ), whereas RAC remained similar throughout the visits ( $p = 0.26$ ). The visual acuity difference between the acute and chronic

phases was not correlated with the changes of RAC, RVC, RNFLT, ppCT, or CMT.

**Conclusions** RVC, RNFLT, ppCT, and CMT decreases in the chronic phase when compared to the acute phase of NAION, whereas RAC does not change significantly.

**Keywords** Ischemic optic neuropathy · Retinal vascular caliber · Retinal nerve fiber layer · Choroidal thickness · Macular thickness

### Introduction

Ischemic optic neuropathy (ION) is the most common acute optic neuropathy in individuals older than 50 years of age [1]. Classification of ION is done as anterior or posterior, according to the segment of affected optic nerve [1, 2]. Anterior ION and posterior ION are further divided into two categories which are arteritic (i.e., related to vasculitis) and nonarteritic (i.e., not related to vasculitis) [1–3]. Nonarteritic anterior ION (NAION) accounts for the most of the ION cases [3].

NAION is manifested as sudden, painless, and monocular vision loss accompanied by optic disk edema [4]. Acute phase optic disk edema subsides in approximately 8 weeks and is followed by disk pallor and atrophy [5]. Although the exact pathogenesis of

S. Akbulut  
Eye Clinic, Zile State Hospital, Tokat, Turkey

G. Pekel (✉)  
Ophthalmology Department, Pamukkale University,  
Denizli 20070, Turkey  
e-mail: gkhanpekel@yahoo.com

E. Pekel  
Eye Clinic, Denizli State Hospital, Denizli, Turkey

E. N. Cetin  
Ophthalmology, Pamukkale University, Denizli, Turkey

Published online: 05 April 2021

Springer

NAION is not fully understood, it appears to be a multifactorial disease, mainly due to a deterioration in the blood supply of the optic nerve head leading to hypoperfusion and ischemia [6, 7]. Decreased circumpapillary perfusion density, reduced peripapillary choroidal vascularity index, thinned retinal nerve fiber layer, and decreased macular ganglion cell complex thickness were reported in NAION in the recent years [8–11].

In the present study, our aim was to demonstrate the alterations of the retinal arteriolar caliber (RAC), retinal venular caliber (RVC), retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness, peripapillary choroidal thickness (ppCT), and central macular thickness (CMT) in the acute and chronic phases of NAION. We also wanted to test the hypothesis that age or visual acuity gain may be associated with the amount of retina-choroidal thickness changes. Though some information has been identified about risk factors and clinical presentation of NAION, much remains unclear about its pathophysiology and treatment. The present study tries to fill a little gap in the huge unknown areas of NAION.

## Methods

Forty-one eyes of 41 patients with non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION) were included in this retrospective study. The medical records of the patients covered the time period between the years 2015 and 2019 in a tertiary referral center. This research was carried out in compliance with the ethical principles set out in the Helsinki Declaration and approved by the Institutional Ethical Committee.

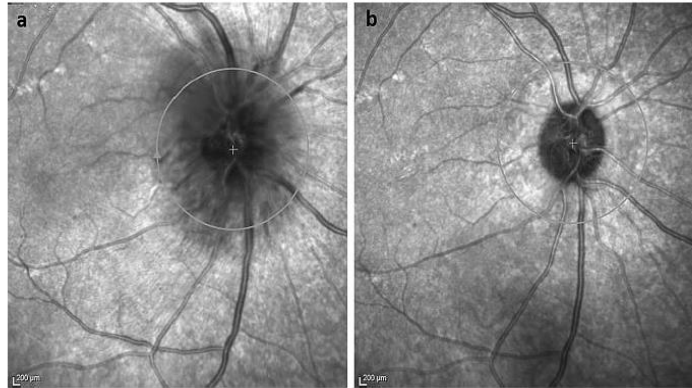
The patients had been diagnosed as NAION after detailed ophthalmological and neurological examinations. In addition, cardiovascular system, rheumatology, and infectious disease consultations were made for some of the patients to confirm the diagnosis. For the present study, ophthalmological examination records of the patients included visual acuity assessment (Snellen chart), biomicroscopy, indirect ophthalmoscopy, intra-ocular pressure, and optical coherence tomography (OCT) measurements. Visual field analysis of the patients showed inferior altitudinal defect or central scotoma. All of the patients had abnormalities on color vision in the affected eyes. The measurements were done at the acute phase (i.e.,

edematous disk and newly onset symptoms) and chronic phase (i.e., establishment of optic atrophy at least 2 months from the beginning of the disease) (Fig. 1). The treatment procedure was similar for all patients, including intravenous methylprednisolone followed by oral prednisone. Acetylsalicylic acid (Aspirin®) was also prescribed. The patients had been followed up at least 3 months. Exclusion criteria were any history of ocular surgery other than uneventful phacoemulsification and any ocular disease other than mild cataract or refractive errors. Patients with giant cell arteritis, optic neuritis, and other neurologic or ophthalmic disorders (e.g., diabetic retinopathy, hypertensive retinopathy, glaucoma, multiple sclerosis, optic disk drusen, etc.), which may affect optic nerve, were excluded.

The retinal arteriolar caliber (RAC), retinal venular caliber (RVC), retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness, peripapillary choroidal thickness (ppCT), and central macular thickness (CMT) measurements were performed by the help of spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT, Spectralis, Heidelberg, Germany). Measurements of the retinal vessel caliber (RAC and RVC) were taken using manual caliber tools on the optic disk screen provided by the SD-OCT software. First, superior and inferior temporal retinal arterioles and venules passing through an area one-half to one-disk diameter from the optic disk margin were measured. Then, the average caliber values of superior and inferior temporal retinal vessels were calculated for each eye. The average and quadrantal RNFL thickness measurements were calculated automatically by the SD-OCT device. The ppCT was measured from the outer part of the hyper-reflective line corresponding to the retinal pigment epithelium to the inner surface of the sclera in the peripapillary region at approximately 1.0 mm from the nasal optic disk margin. In all relevant SD-OCT records, the chorio-scleral interface was clearly visualized. The CMT signified the mean thickness of a 1-mm-diameter circular area at the foveal center. The ocular measurements including choroidal thickness were taken during the same period of the day (between 10:00 and 12:00 a.m.) in order to avoid diurnal variations.

The Statistical Package of the Social Sciences (SPSS, version 17.0, Chicago, IL) was used for statistical analysis. '*p*' values lower than 0.05 were accepted as statistically significant. Visual acuity





**Fig. 1** Optic disk images of a patient with NAION in the acute (a) and chronic (b) phases of the disease

values were converted from Snellen to logMAR for statistical analysis. Paired samples *t* test was used for comparison of the parameters at acute and chronic disease stages. The Pearson correlation analysis was performed in order to detect associations between age, visual acuity gain, and retina-choroidal thickness changes. The ppCT, RAC, and RVC in both acute and chronic phases were measured by 2 different researchers (SA, GP). The average of their measurements was recorded. The interobserver correlation for all the 6 sets of data was  $> 0.90$ .

## Results

A total of 41 patients (24 male, 17 female) was included in this study. The mean age of the patients was  $61.2 \pm 8.9$  years (range 46–86 years). The mean time period between the measurements at the acute and chronic stages of the disease was  $3.1 \pm 1.0$  months (range 2–5 months). Right eyes were affected in 18 cases (44%), and left eyes were affected in 23 cases (56%). Pseudo-Foster Kennedy syndrome was noticed in 13 patients (32%).

The mean visual acuity values at the acute and chronic disease stages were  $0.98 \pm 0.65$  logMAR and  $0.66 \pm 0.60$  logMAR, respectively ( $p < 0.001$ ). At the last visit, the visual acuity remained the same in 22 eyes (54%), increased in 17 eyes (41%), and decreased in 2 eyes (5%). The mean intra-ocular pressure values at the acute and chronic disease stages were

$15.3 \pm 2.7$  mmHg and  $15.0 \pm 2.9$  mmHg, respectively ( $p = 0.37$ ).

The mean retinal arteriole caliber (RAC), retinal venule caliber (RVC), peripapillary choroidal thickness (ppCT), and central macular thickness (CMT) measurements of the patients at the acute and chronic stages are shown in Table 1. The RVC, ppCT, and CMT were significantly thinner in the chronic stages compared to the acute stage ( $p < 0.001$ ), whereas RAC remained similar throughout the visits ( $p = 0.26$ ).

The mean average peripapillary RNFL measurements at the acute and chronic disease stages were  $225.3 \pm 72.1$   $\mu\text{m}$  and  $71.9 \pm 21.5$   $\mu\text{m}$ , respectively ( $p < 0.001$ ). The mean quadrantal peripapillary RNFL thickness (i.e., inferior, superior, nasal, and temporal quadrants) measurements of the patients in the acute

**Table 1** Retinal vascular caliber, choroidal thickness, and central macular thickness measurements of the patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy in the acute and chronic phases are shown

	Acute phase	Chronic phase	<i>p</i>
RAC ( $\mu\text{m}$ )	$88.0 \pm 8.1$	$86.4 \pm 7.9$	0.26
RVC ( $\mu\text{m}$ )	$141.1 \pm 17.0$	$119.2 \pm 14.3$	$< 0.001$
ppCT ( $\mu\text{m}$ )	$178.0 \pm 57.0$	$162.3 \pm 55.2$	$< 0.001$
CMT ( $\mu\text{m}$ )	$311.0 \pm 78.3$	$254.9 \pm 30.2$	$< 0.001$

RAC retinal arteriolar caliber, RVC retinal venular caliber, ppCT peripapillary choroidal thickness, CMT central macular thickness

and chronic phases were statistically significantly different as shown in Table 2.

The correlations of age and the retina-choroidal thickness changes at the visits were analyzed. Age was not found to be correlated with RAC change ( $r = 0.02$ ,  $p = 0.92$ ), RVC change ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.15$ ), average RNFL thickness change ( $r = 0.12$ ,  $p = 0.45$ ), ppCT change ( $r = 0.09$ ,  $p = 0.59$ ), and CMT change ( $r = -0.12$ ,  $p = 0.49$ ) at the acute and chronic phases of the disease.

The associations of visual acuity change and the retina-choroidal thickness changes at the acute and chronic phases were also analyzed. Visual acuity change was not correlated with RAC change ( $r = 0.24$ ,  $p = 0.14$ ), RVC change ( $r = -0.10$ ,  $p = 0.56$ ), average RNFL thickness change ( $r = 0.01$ ,  $p = 0.95$ ), ppCT change ( $r = -0.05$ ,  $p = 0.80$ ), and CMT change ( $r = -0.03$ ,  $p = 0.87$ ).

## Discussion

The outcomes of the present study show that the thickness of retina and choroid is decreased in the chronic phase compared to acute phase of NAION. Different from previously published research, this study showed that RVC is decreased, whereas RAC remained similar in the course of time. In addition, age was not found to be associated with the degree of retina-choroidal thickness alteration between the two visits. Another new finding was that visual acuity difference between the acute and chronic phases was not correlated with RAC change, RVC change, average RNFL change, ppCT change, or CMT change. Also, choroidal thickness change between acute and chronic phases of the disease was firstly evaluated in the present study.

The SD-OCT is a useful tool for monitoring RNFL thickness alterations following NAION. The thinning of RNFL after several months from the onset of NAION is shown in several studies [12–14]. In chronic stage of NAION, peripapillary RNFL atrophy is usually seen in all quadrants, but in some cases specific quadrantal RNFL damage could be seen [14–16]. In the present study, all RNFL quadrants were atrophic at the chronic stage, but were consistent with the ISNT rule. In the acute phase, superior quadrant RNFL edema was more marked, which was consistent with the inferior altitudinal visual field defect commonly seen in NAION.

In this study, the enlarged retinal venules observed in the acute phase of NAION might be due to constriction of central retinal vein by edematous optic disk. Since arteries are more resistant to compression compared to veins, caliber alteration of retinal arterioles throughout resolution was not observed in the present study. Remond et al. reported that acute NAION is associated with enlargement of both retinal arterioles and venules, while resolution NAION yielded normalization of those values [17]. As expected in most before-after studies, we did not use a control group in this study, since confounding factors (i.e., systemic hypertension, diabetes, etc.) might affect retinal vessel calibers in different individuals.

Several studies reported that mean ppCT was greater in NAION eyes compared to control group [18–21]. They suggested that a thicker choroid was not the effect, but the cause of NAION [18–21]. They hypothesized that a thick choroid may constrict optic nerve and its vessels [20, 21]. In addition to those published outcomes, we found that acute phase NAION is associated with thicker choroid compared to chronic phase. In contrast to those suggestions, one might think that thicker choroid is a compensatory

**Table 2** Segmental peripapillary RNFL thickness (inferior, superior, nasal, and temporal quadrants) measurements of the patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy in the acute and chronic phases are shown

	Acute phase	Chronic phase	<i>p</i>
Inferior quadrant ( $\mu\text{m}$ )	253.8 $\pm$ 94.6	100.6 $\pm$ 37.3	< 0.001
Superior quadrant ( $\mu\text{m}$ )	261.9 $\pm$ 96.1	81.8 $\pm$ 31.0	< 0.001
Nasal quadrant ( $\mu\text{m}$ )	174.0 $\pm$ 80.5	57.9 $\pm$ 21.3	< 0.001
Temporal quadrant ( $\mu\text{m}$ )	210.1 $\pm$ 123.2	47.5 $\pm$ 16.6	< 0.001

RNFL retinal nerve fiber layer

mechanism in the acute phase of the disease according to the outcomes of the present study.

Macular edema can accompany NAION [22, 23]. Type of macular edema seen in NAION is usually subretinal fluid accumulation. In parallel to our outcomes, it was reported that submacular fluid is resorbed in the chronic phase of NAION [22, 23]. Since vision loss in NAION is due to optic nerve axonal ischemia, resolution of macular edema in the chronic phase was not found to be associated with visual acuity gain in the present study.

The present study has some limitations. Since it is a retrospective study, it has inferior level of evidence compared to prospective studies. Measurements with OCT angiography might improve the study, but our clinic did not have this device. The lack of correlation of the visual field tests with the SD-OCT measurements was another limitation, since our archive records of visual field analysis only included types of scotomas (i.e., inferior altitudinal defect, central scotoma).

In conclusion, the RVC, RNFL thickness, ppCT, and CMT decreased in the chronic phase when compared to acute phase of NAION, whereas RAC did not change significantly. Visual acuity change was not associated with the amount of retina-choroidal thickness reduction from the acute phase to the chronic phase (in approximately 3 months). Those outcomes may be helpful for determining the timing and type of future therapeutic approach in NAION. Future studies having larger sample size and longer follow-up times should be needed to confirm the outcomes of the present research.

**Funding** None.

**Declarations**

**Conflict of interest** All authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Informed consent** N/A since it is a retrospective study.

## References

1. Bioussé V, Newman NJ (2015) Ischemic optic neuropathies. *N Engl J Med* 372:2428–2436
2. Hayreh SS (2013) Ischemic optic neuropathies—where are we now? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251:1873–1884
3. Morrow MJ (2019) Ischemic optic neuropathy. *Continuum (Minneapolis)* 25:1215–1235
4. Berry S, Lin WV, Sadaka A, Lee AG (2017) Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: cause, effect, and management. *Eye Brain* 9:23–28
5. Hayreh SS, Zimmerman MB (2007) Optic disc edema in non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245:1107–1121
6. Patel HR, Margo CE (2017) Pathology of ischemic optic neuropathy. *Arch Pathol Lab Med* 141:162–166
7. Peeler C, Cestari DM (2016) Non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION): a review and update on animal models. *Semin Ophthalmol* 31:99–106
8. Mastropasqua R, Agnifili L, Borrelli E, Fasanella V, Brescia L, Di Antonio L, Mastropasqua L (2018) Optical coherence tomography angiography of the peripapillary retina in normal-tension glaucoma and chronic nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Curr Eye Res* 43:778–784
9. Pellegrini M, Giannaccare G, Bernabei F, Moscardelli F, Schiavi C, Campos EC (2019) Choroidal vascular changes in arteritic and nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 205:43–49
10. Duman R, Yavas GF, Veliyev I, Dogan M, Duman R (2019) Structural changes of macula and optic disk of the fellow eye in patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Int Ophthalmol* 39:1293–1298
11. Sun MH, Liao YJ (2017) Structure-function analysis of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and age-related differences in outcome. *J Neuroophthalmol* 37:258–264
12. Fard MA, Afzali M, Abdi P, Yasseri M, Ebrahimi KB, Moghimi S (2016) Comparison of the pattern of macular ganglion cell-inner plexiform layer defect between ischemic optic neuropathy and open-angle glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 57:1011–1016
13. Saito H, Tomidokoro A, Tomita G, Araie M, Wakakura M (2008) Optic disc and peripapillary morphology in unilateral nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and age- and refraction-matched normals. *Ophthalmology* 115:1585–1590
14. Bellusci C, Savini G, Carbonelli M, Carelli V, Sadun AA, Barboni P (2008) Retinal nerve fiber layer thickness in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: OCT characterization of the acute and resolving phases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246:641–647
15. Quigley HA, Miller NR, Green WR (1985) The pattern of optic nerve fiber loss in anterior ischemic optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 100:769–776
16. Saito H, Tomidokoro A, Sugimoto E et al (2006) Optic disc topography and peripapillary retinal nerve fiber layer thickness in nonarteritic ischemic optic neuropathy and open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 113:1340–1344

17. Remond P, Aptel F, Cunnac P et al (2019) Retinal vessel phenotype in patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 208:178–184
18. Pérez-Sarriegui A, Muñoz-Negrete FJ, Noval S, De Juan V, Rebolleda G (2018) Automated evaluation of choroidal thickness and minimum rim width thickness in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *J Neuroophthalmol* 38:7–12
19. Nagia L, Huisingh C, Johnstone J et al (2016) Peripapillary pachychoroid in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 57:4679–4685
20. Fard MA, Abdi P, Kasaei A, Soltani Mogaddam R, Afzali M, Moghimi S (2015) Peripapillary choroidal thickness in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 56:3027–3033
21. Nikkhah H, Feizi M, Abedi N, Karimi S, Yaseri M, Esfandiari H (2020) Choroidal thickness in acute non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy. *J Ophthalmic Vis Res* 15:59–68
22. Tomsak RL, Zakov ZN (1998) Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy with macular edema: visual improvement and fluorescein angiographic characteristics. *J Neuroophthalmol* 18:166–168
23. Hedges TR 3rd, Vuong LN, Gonzalez-Garcia AO, Mendoza-Santesteban CE, Amaro-Quierza ML (2008) Subretinal fluid from anterior ischemic optic neuropathy demonstrated by optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 126:812–815

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ek.2

Evrak Tarih ve Sayısı: 11/09/2020-E.54537



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı :60758568-020/54537  
Konu :Başvurunuz hk.

11/09/2020

Sayın Prof. Dr. Ebru Nevin ÇETİN

İlgi :07.09.2020 tarihli dilekçeniz

192.168.158.14

82

"Sıçan Retinal Ven Oklüzyonu Modelinde Resveratrolün Nöroprotektif Etkisi"  
(PAUHDEK-2020/28) konulu çalışmanız 10.09.2020-tarih ve 05 sayılı  
toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasının **Hayvan Deneyleri Etigi açısından uygun olduğuna** ve **120 adet sıçan kullanılarak yapılmasına** oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE  
Başkan