



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**PRİMER AÇIK-AÇILI GLOKOM VE EKSFOLİYATİF  
GLOKOMDA SERUM OTOANTİKORLARININ  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Meltem KILIÇ**

**ANKARA  
2015**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**PRİMER AÇIK-AÇILI GLOKOM VE EKSFOLİYATİF  
GLOKOMDA SERUM OTOANTİKORLARININ  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Meltem KILIÇ**

**TEZ DANIŞMANI:  
Prof. Dr. Murat İRKEÇ**

**ANKARA  
2015**

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın kurgulanmasında ve yürütülmesinde bana en büyük desteği veren Sayın Prof. Dr. Murat İrkeç'e, bütün aşamalarında fikirleri ile bana yol gösteren Doç. Dr. Mehmet Cem Mocan ve Doç. Dr. Sibel Kocabeyoğlu'na; laboratuvar aşamasında teorik ve pratik anlamda çalışmama katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Yasemin Gürsoy Özdemir, Sayın Sevda Lüle ve Luis Alarcon Martinez'e; verilerin istatistiksel analizinde yardımları için Yağmur Gürkan'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her anlamda yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Bu tez, 25.12.2014 tarih ve 2014/50-1 sayılı karar ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tıp ve Sağlık Birimleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (014 D12 101 010),

**Dr. Meltem KILIÇ**

## ÖZET

### **Kılıç M., Primer Açık-Açılı Glokom ve Eksfoliatif Glokomda Serum Otoantikörlerinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2015**

Glokom, görme işlevinde kayıp ile birlikte, gangliyon hücreleri ve aksonlarının dejenerasyonu ile karakterize kronik ve progresif bir optik nöropati olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada primer açık-açılı glokom, eksfoliatif glokom hastaları ile sağlıklı kontrollerden alınan serum örneklerinde bulunan otoantikörlerin sıçan retina gangliyon hücrelerinde bulunan antijenlere bağlanıp bağlanmadığını değerlendirmek amaçlandı. Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda değerlendirilen primer açık-açılı glokomu olan 20 hasta, eksfoliatif glokomu olan 25 hasta, ve kontrol grubu olarak 20 sağlıklı birey dahil edildi. Bütün bireylerden ayrıntılı oftalmolojik muayenenin ardından alınan serum örnekleri, sıçan retina kesitleri ile inkübe edildi. İmmünohistokimyasal olarak oluşan antijen antikor reaksiyonları flöresan mikroskop altında incelendi. Retina gangliyon hücre tabakasında pozitif boyanma kontrol grubunda %50, primer açık-açılı glokom grubunda %10, eksfoliatif glokom grubunda %8 oranında görüldü. Kontrol grubundaki pozitif boyanma yüzdesi diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan yüksek fark bulundu ( $p=0.002$ ). Çalışmamızın bulguları, glokom hastalarının serumlarında retina gangliyon hücre tabakası ile ilişkili koruyucu otoimmün faktörlerin ya da proapoptotik faktörlerin işleyişini durduran otoantikörlerin azalmış olabileceğini düşündürmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Glokom, Eksfoliasyon, Otoimmünite, Otoantikör

## ABSTRACT

**Kılıç M., Evaluation of Serum Antibodies in Primary Open Angle Glaucoma and Exfoliative Glaucoma, Hacettepe University School of Medicine, Department of Ophthalmology, Thesis of Ophthalmology, Ankara, 2015**

Glaucoma is a form of progressive chronic optic neuropathy with degeneration of ganglion cells and axons. In this study, we aimed to evaluate whether autoantibodies found in serum samples taken from primary open angle glaucoma, exfoliative glaucoma patients and healthy controls were able to bind to rat retinal ganglion cell antigens. Twenty patients with primary open angle glaucoma, 25 patients with exfoliative glaucoma and 20 healthy control subjects included in the study. Serum samples taken from each individual after a detailed ophthalmological examination were incubated with rat retinal sections. Antigen-antibody reactions which occurred immunohistochemically were examined under a fluorescent microscope. Positive staining in retinal ganglion cell layer was detected in 50% of the control group, 10% of the primary open angle glaucoma group and 8% in the exfoliative glaucoma group. When percentage of positive staining in the control group was compared to other groups', the difference was statistically significant ( $p=0.002$ ). Our findings suggest that protective antibodies or antibodies inhibiting proapoptotic factors which are associated with retinal ganglion cell layer might be reduced in glaucoma patients' sera.

**Key Words:** Glaucoma, Exfoliation, Autoimmunity, Autoantibodies

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
KISALTMALAR .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. GLOKOM .....	2
2.1.1. Tanım .....	2
2.1.2. Etyopatogenez.....	2
2.1.2.1. Mekanik Teori .....	2
2.1.2.2. İskemik Teori .....	3
2.1.2.3. İmmünolojik Teori .....	3
2.1.3. Primer Açık-Açılı Glokom .....	3
2.1.3.1. Risk Faktörleri.....	3
2.1.3.2. Klinik Belirti ve Bulgular .....	4
2.1.4. Eksfoliatif Glokom.....	4
2.1.4.1. Klinik Belirti ve Bulgular .....	5
2.2. RETİNA GANGLİYON HÜCRELERİ .....	5
2.2.1. Retina Gangliyon Hücresi Apoptozis Mekanizmaları .....	5
2.2.1.1. Nörotrofik Faktörlerin Azalması.....	6
2.2.1.2. Eksitotoksisite .....	6
2.2.1.3. Reaktif Oksijen Radikalleri .....	6
2.2.1.4. Mitokondriyel Disfonksiyon .....	6

2.2.1.5. Glial Nöronal Etkileşme.....	7
2.2.1.6. Hümorale Otoimmünite .....	7
2.3. BRN 3A.....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
3.1. ARAŞTIRMAYA DAHİL OLMA KRİTERLERİ .....	9
3.1.1. Kontrol ve hasta gruplarının belirlenmesi, serum örneklerinin elde edilmesi .....	12
3.1.2. İmmünohistokimya öncesi sıçanlardan doku elde edilmesi ve elde edilen dokuların kesilmesi .....	12
3.1.3. Serum Örneklerinin İmmünohistokimya Metoduna Hazırlanması.....	12
3.1.4. İmmünohistokimya .....	13
3.2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	16
4. BULGULAR .....	17
5. TARTIŞMA .....	23
6. SONUÇLAR.....	33
7. KAYNAKLAR .....	34

## KISALTMALAR

<b>ANA</b>	:	Antinükleer Antikor
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>EG</b>	:	Eksfoliatif Glokom
<b>EGS</b>	:	European Glaucoma Society (Avrupa Glokom Cemiyeti)
<b>ELISA</b>	:	Enzym Linked Immunosorbent Assay
<b>EM</b>	:	Eksfoliatif Materyal
<b>ENA</b>	:	Extractable Nuclear Antibody
<b>FN</b>	:	False Negative (Yanlış Negatiflik)
<b>FP</b>	:	False Positive (Yanlış Pozitiflik)
<b>GİB</b>	:	Göz içi Basıncı
<b>HÜTF</b>	:	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
<b>HSP</b>	:	Heat Shock Protein (Isı Şok Proteini)
<b>İHK</b>	:	İmmünohistokimya
<b>MKK</b>	:	Merkezi Kornea Kalınlığı
<b>MD</b>	:	Mean Deviation (Ortalama Sapma)
<b>NO</b>	:	Nitrik Oksit
<b>PAAG</b>	:	Primer Açık-Açılı Glokom
<b>PBS</b>	:	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)
<b>PSD</b>	:	Pattern Standart Deviation (Patern Standart Sapma)
<b>RGC</b>	:	Retina Ganglion Cell
<b>RGH</b>	:	Retina Gangliyon Hücresi
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik asit
<b>RPM</b>	:	Rate Per Minute
<b>TNF</b>	:	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

- Şekil 3.1.** Çalışmaya dahil edilen bireylere uygulanan anket formu ..... 9
- Şekil 3.2.** Retina gangliyon hücresinde antijen antikor reaksiyonlarının şematik anlatımı..... 14
- Şekil 3.3.** Kontrol grubunda retina gangliyon hücre tabakasında pozitif boyanma..... 15
- Şekil 3.4.** Şekil 3.3'teki kesitin mavi filtre ile görünümü (Hoechst solüsyonu ile boyanmış hücre çekirdekleri) ..... 15
- Şekil 3.5.** Kontrol grubundan başka bir retinal kesitin kırmızı filtre altında görünümü ..... 16
- Şekil 4.1.** Şematik olarak retina gangliyon hücresinde görülen antijen antikor reaksiyonu ..... 29

## TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
<b>Tablo 4.1.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların yaş ortalaması .....	17
<b>Tablo 4.2.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların cinsiyet dağılımları .....	18
<b>Tablo 4.3.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların hipertansiyon oranları.....	18
<b>Tablo 4.4.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların diyabetes mellitus oranları.....	18
<b>Tablo 4.5.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların sigara kullanım oranları.....	19
<b>Tablo 4.6.</b> Çalışmaya dahil edilen gruplarda ailede glokom varlığı .....	19
<b>Tablo 4.7.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların görme keskinliği ortalamaları (Snellen Eşeli ile) .....	19
<b>Tablo 4.8.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların C/D oranı ortalamaları .....	20
<b>Tablo 4.9.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların göz içi basıncı ortalamaları (mmHg).....	20
<b>Tablo 4.10.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların merkezi kornea kalınlığı açısından karşılaştırılması ( $\mu\text{m}$ ) .....	20
<b>Tablo 4.11.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların görme alanı parametrelerinin karşılaştırılması (sağ göz) .....	21
<b>Tablo 4.12.</b> Çalışmaya dahil edilen grupların görme alanı parametrelerinin karşılaştırılması (sol göz) .....	21
<b>Tablo 4.13.</b> Gruplarda retina gangliyon hücre tabakasında pozitif boyanma oranları .....	22

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Primer açık-açılı glokom (PAAG) ve eksfoliatif glokom (EG) patogenezinde çeşitli genetik, biyokimyasal ve anatomik teoriler öne sürülmekle beraber çoğu çalışma grubu glokom patogenezinde immünitenin rol aldığı teorisi üzerinde durmaktadır (1-5).

Bugün artmış göz içi basıncı glokom gelişiminde majör risk faktörü iken oksidatif stres, vasküler faktörler ya da otoimmünitenin rolü tartışılmaktadır. Yapılan çalışmalarda ısı şok proteinleri (HSP 60, HSP 27, HSP 70), glikozaminoglikanlar, myelin bazik protein, vimentin, glial fibriler asidik protein,  $\alpha$  fodrin,  $\gamma$  enolaz, antifosfatidilserin, nöron spesifik enolaz, glutatyon S- transferaz gibi birçok proteine karşı antikorlar gösterilmiştir (6-15). Bu bulgular en azından bir grup hastada mevcut optik nöropatiye sistemik hümoral bağışıklıktaki değişikliklerin neden olduğunu düşündürmektedir (2, 16).

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada glokom başlığı altında tanımlanan bir grup hastalık etyopatogenetik olarak araştırılmıştır, ancak immünitenin rolü halen aydınlanmış değildir. PAAG ve normal basınçlı glokom hastalarının değerlendirildiği çalışmalar mevcut olmamakla birlikte eksfoliatif glokomda otoimmünite araştırılmamıştır (10, 12, 40-44). PAAG ve EG hasta serumlarında retina gangliyon hücrelerine karşı otoantikor bulunmamaktadır null hipotezi ile yola çıkılan bu çalışmada PAAG, EG ve kontrol hastalarının serum bileşenlerinin sıçan retina tabakalarına bağlanıp bağlanmadığını değerlendirmek amaçlanmıştır.

Çalışmamız, körlüğün sık nedenlerinden biri olan glokom hastalığının patogenezinin aydınlatılması adına yapılacak çalışmaların temelini oluşturması açısından önem taşımaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. GLOKOM

#### 2.1.1. Tanım

Glokom, görme işlevinde kayıp ile birlikte, gangliyon hücreleri ve aksonlarının dejenerasyonu ile karakterize kronik ve progresif bir optik nöropatidir ve dünyada önlenebilir körlüğün ikinci nedenidir (17-19).

Göz içi basıncı (GİB) yüksekliğinden bağımsız olarak optik diskte çukurlaşma ve sonucunda gelişen görme alanı defektleri ile glokom varlığından bahsedilebilir. Retina gangliyon hücre kaybı, retina sinir lifi ve optik disk seviyesinde belirgindir. Bu nedenle vertikal çukurluk/disk (C/D) oranının değerlendirilmesi, nöroretinal rimdeki yapısal glokomatöz hasarı göstermede değerli bir yöntemdir. İşlevsel hasar ise tipik görme alanı defektleri ile belirlenir (20).

#### 2.1.2. Etyopatogenez

Glokomda, artmış göz içi basıncı en önemli değiştirilebilir risk faktörü olarak kabul edilse de patogenezinde ve progresyonunda pek çok etken rol oynamaktadır ve patogenezi tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bu konuda çeşitli teoriler ortaya atılmıştır. Bunlardan başlıcaları aşağıda belirtilmiştir.

##### 2.1.2.1. Mekanik Teori

Yüksek GİB'nin skleral duvarda oluşturduğu gerilim sonucunda lamina kribrozada distorsiyona ve çukurlaşmaya neden olur. Bu distorsiyon aksoplazmik akımı bozar ve optik atrofi gelişir (21).

### **2.1.2.2. İskemik Teori**

Oküler kan akımı, perfüzyon basıncı ile doğru, vasküler direnç ile ters orantılıdır. GİB yükselmesi, artmış vasküler direnç, sistemik hipotansiyon gibi oküler kan akımını azaltan etkenler oküler perfüzyon basıncının azalmasına, optik sinir başının perfüzyon bozukluğuna ve glokomatöz optik nöropatiye yol açar (22).

### **2.1.2.3. İmmünolojik Teori**

Bu teori, retina gangliyon hücre apoptozisine neden olan etkenler arasında immün sistemin de yer alabileceğini söylemektedir. Deneysel glokom modellerinde ve glokom hastalarının serumlarında otoantikör seviyelerinde artışın retinal gangliyon hücre ölümü ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (4). Bunun yanı sıra koruyucu otoimmünitenin azalması ile de nörodejenerasyon gelişebilir (4).

### **2.1.3. Primer Açık-Açılı Glokom**

PAAG, optik sinir başı ve retina sinir lifinde karakteristik morfolojik değişiklikler ile seyreden kronik ilerleyici bir optik nöropatidir. İlerleyici retina gangliyon hücre ölümü ve görme alanı kaybı bu değişiklikler ile ilişkilidir (20).

#### **2.1.3.1. Risk Faktörleri**

PAAG için risk faktörleri yaş, ırk, yüksek GİB, ailede glokom öyküsü, merkezi kornea kalınlığının (MKK) ince olması, yüksek miyopidir. GİB değiştirilebilen tek risk faktörüdür (20).

### 2.1.3.2. Klinik Belirti ve Bulgular

PAAG bilateral olup genellikle asimetric başlangıçlıdır. Son döneme kadar genellikle belirti vermez. Hastalar ışıktan rahatsız olma, ışık etrafında hale görüntüsü ve görme alanı kaybıyla doktora başvurabilir.

Ön kamara açısının açık olması, GİB'nin 21 mm Hg'nin üzerinde olmasının yanında optik disk çukurluğunun vertikal olarak genişlemesi PAAG'nun klinik bulgularıdır. Optik sinir başı muayenesi direkt ya da indirekt oftalmoskopi ile yapılır. Bilgisayarlı analiz yöntemleri ile de optik sinir başı analizi yapılabilir. Optik disk çukurluğunun genişlemesi dışında hastalarda nöroretinal rimde incelleme, lokalize sinir lifi defektleri, damarlarda nazalizasyon ve atenüasyon, optik sinir başında hemorajiler, peripapiller atrofi görülebilecek diğer bulgularıdır. Optik Koherens Tomografi ile retina sinir lifi tabakasındaki incelleme tespit edilebilir (20).

### 2.1.4. Eksfoliyatif Glokom

Eksfoliyasyon sendromu, anormal fibriler yapıda materyalin, özellikle gözün ön segmentinde ve ekstraoküler dokularda birikmesiyle karakterize yaygın bir ekstrasellüler bağdoku bozukluğudur (20, 23). LOXL1 gen polimorfizmi ile ilişkisi gösterilmiştir (24). Prevalansı yaş ile artmakta ve coğrafik olarak değişiklik göstermekle birlikte 60 yaş üzeri bireylerde %10-20 oranında görülmektedir (25).

Eksfoliyasyon materyali, gözde en sık lens ön kapsülünde, pupil kenarında, kornea endotelinde, trabeküler ağda, zonül ve siliyer cisimde birikir ve zonül zaafiyeti, yetersiz midriyazis, kan-aköz bariyer disfonksiyonu, katarakt oluşumu, fakodonezis gibi pek çok intraoküler komplikasyona neden olmaktadır. ES, glokomun belirlenebilen en sık risk faktörüdür ve EG sekonder açık-açılı glokomun en sık formudur. PAAG ile karşılaştırıldığında EG, daha hızlı progresyon göstermektedir ve prognozu daha kötüdür (20, 26, 27).

### **2.1.4.1. Klinik Belirti ve Bulgular**

Genellikle bilateral ve asimetrik başlangıçlı olup, çoğunlukla 60 yaş üzeri bireyler etkilenir. GİB'daki diurnal fluktuasyon PAAG ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. Biyomikroskopik muayenede lens ön kapsülünde pupil hareketine bağlı olarak şeffaf zon oluşur. Böylelikle lens ön kapsülünde merkezi disk ve çevresinde periferal eksfoliatif madde birikimi görülür. Pupil kenarı, kornea endoteli, lens zonüllerinde eksfoliatif madde birikimi ile iristen pigment kaybına ikincil transilüminasyon defekti görülebilir. Schwalbe hattı önünde pigment birikimi Sampaolessi çizgisi olarak adlandırılır ve EG için patognomoniktir. Tanı sırasında görme alanı kaybı ve optik sinir hasarı daha ileri düzeydedir ve medikal tedaviye daha dirençlidir (20).

## **2.2. RETİNA GANGLİYON HÜCRELERİ**

Retina gangliyon hücresi (RGH) retinanın iç tabakasında bulunan multipolar bir nöron çeşididir. Görsel veriyi fotoreseptörlerden bipolar ve amakrin hücreler aracılığı ile alıp talamus, hipotalamus, mezensefal ve orta beyine iletir. Aksonları optik sinir, optik kiazma ve optik traktusu oluşturur. Retina gangliyon hücre ölümü çeşitli optik nöropatiler ile ilişkilidir. Örneğin; optik nörit, anterior iskemik optik nöropati, Leber'in herediter optik nöropatisi ve glokom (28, 29).

### **2.2.1. Retina Gangliyon Hücresi Apoptozis Mekanizmaları**

Nekrozdan farklı olarak apoptozis, kromatin kondansasyonu, fragmantasyonu, oksidatif hasar, otofajik dejenerasyon, kaspaz yollarının aktivasyonunun yol açtığı programlı bir hücre ölümüdür. Retina gangliyon hücre apoptozisinde nörotrofik faktörlerin azalması, eksitotoksisite, reaktif oksijen radikalleri, mitokondriyel disfonksiyon ve glial nöronal etkileşme gibi mekanizmalar sorumludur (29-33).

### **2.2.1.1. Nörotrofik Faktörlerin Azalması**

GİB yükselmesi ile nörotrofinlerin RGH aksonları boyunca anterograd ve retrograd transportu engellenir. Nörotrofinlerin azalması ile apoptozis indüklenir (30, 31, 33).

### **2.2.1.2. Eksitotoksisite**

Vitreol glutamat artışı ile N-metil D-aspartat reseptörleri gibi iyonotrofik reseptörlerin aşırı aktivasyonu sonucu RGH içine kalsiyum girişi artar ve oluşan oksidatif stres hücre ölümüne sebep olur (29, 33).

### **2.2.1.3. Reaktif Oksijen Radikalleri**

Aksotomi sonrası reaktif oksijen radikallerin artışı ile mitokondri zar potansiyelinin kaybı ve mitokondriyal apoptotik faktörlerin salınımı sonucu hücre ölümü gerçekleşir. Bunun yanı sıra ışık maruziyeti sonucu da reaktif oksijen radikali seviyesi artabilir ve yukarıda bahsedilen mekanizmaya ek olarak radikallerin DNA, proteinler ve lipidler ile etkileşimi sonucu apoptozis gelişebilir (29, 33).

### **2.2.1.4. Mitokondriyel Disfonksiyon**

Elektron transport zincirinde kompleks I ve IV inhibisyonu sonucu reaktif oksijen radikali oluşumu artar ve sitokrom c salınımı ile apoptozis gerçekleşir (29, 33).



### **2.2.1.5. Glial Nöronal Etkileşme**

Astrositler, mikroglialar ve Müller hücreleri glial hücrelerdir ve nöronların işlevlerinin idamesi için toksik maddelerin uzaklaştırılmasının yanı sıra nörotrofin salgılanmasında da görev alırlar. Glokomda glial hücrelerden artmış TNF $\alpha$  ve nitrik oksit (NO) salınımı ile apoptozisin gerçekleştiği gösterilmiştir (29, 33).

### **2.2.1.6. Hümorale Otoimmünite**

Retina gangliyon hücrelerine karşı oluşan otoantikorlar apoptozisi ekstrinsik olarak başlatırlar. TNF $\alpha$ , Fas L gibi ölüm ligandlarının aktivasyonu ile prokaspaz 8'in kaspaz 8'i aktive etmesi; kaspaz 3'ün apoptozisi başlatmasına neden olur (33).

## **2.3. BRN 3A**

Retina, trigeminal nükleus, dorsal kök gangliyonu, iç kulakta bulunan nöron gruplarından salgılanan transkripsiyon faktörlerinden olan Brn 3 ailesi farelerde retina gangliyon hücrelerinin gelişimi, farklılaşması, morfolojisi ve işlevi açısından önemlidir. Yetişkin albino sıçanlarda Brn 3a pozitif RGH sayısı fazladır. Brn 3a'nın en önemli özelliklerinden bir tanesi ise RGH hasarlanması halinde bile canlı kalmasıdır. Bu özellik Brn 3a'yı RGH'ni tespit etme ve saymada bir belirteç haline getirmektedir (34).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda değerlendirilen PAAG olan 20 hasta, EG olan 25 hasta ve kontrol grubu olarak 20 sağlıklı birey dahil edildi.

Çalışmaya katılan tüm bireylere görme keskinliği, biyomikroskopik muayene, dilatasyonlu fundus muayenesi, Goldmann aplanasyon tonometresiyle GİB ve MKK ölçümünü içeren detaylı oftalmolojik muayene yapıldı. Glokom hastalarında Humphrey Perimetri (HFA-II 750, Carl Zeiss Meditec, Dublin, California) ile 24-2 SITA-Standart görme alanı testi uygulandı. Yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, sistemik hastalık öyküsü ve tedavileri, diğer göz hastalıkları öyküsü ve tedavisi, geçirilmiş göz cerrahileri ve aile öyküsünü içeren 15 soruluk bir anket Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uygulandı (Şekil 3.1). Çalışmaya katılacak tüm olgulardan aydınlatılmış onam alındı.

<b>Ad-Soyad:</b>	<b>Dosya No:</b>
<b>Kanın alındığı hastane:</b>	
<b>Telefon no: Cep:</b>	
<b>Ev:</b>	
<b>Doğum Yeri:</b>	
<b>Doğum Tarihi:</b>	
<b>Öğrenim durumu:</b>	
<b>Sigara kullanımı:</b>	<b>Süre:</b>
<b>Kadın ise gebelik sayısı:</b>	<b>Miktar:</b>
<b>İlk mensyaşı:</b>	<b>Düşük sayısı:</b>
<b>OKS kullanımı:</b>	<b>Menapoz yaşı:</b>
<b>Sistemik Hastalıklar</b>	<b>Süre:</b>
<b>Hastalık ve süresi:</b>	
<b>Aldığı tedavi ve süresi:</b>	
<b>Eksfoliasyon glokomu tanı zamanı:</b>	
<b>Aldığı tedavi ve süresi:</b>	
<b>Başka göz hastalığı:</b>	
<b>Medikal tedavi ve süresi:</b>	
<b>Cerrahi tedavi ve zamanı:</b>	
<b>Ailede Eksfoliasyon Glokomu Öyküsü:</b>	
<b>Tanı zamanı:</b>	
<b>Aldığı tedavi ve süresi:</b>	
<b>Ailede başka göz hastalığı:</b>	
<b>Hastalık ve süresi:</b>	
<b>Tedavi ve süresi:</b>	

**Şekil 3.1.** Çalışmaya dahil edilen bireylere uygulanan anket formu

### 3.1. ARAŞTIRMAYA DAHİL OLMA KRİTERLERİ

#### a. Eksfoliasyon glokomu grubu dahil edilme kriterleri:

- 1) Ön segment muayenesinde (lens ön kapsülü, iris kenarı) eksfoliatif materyal bulunması
- 2) Bir ya da iki gözünde göz içi basıncının 22 mm Hg'nin üzerinde ya da tedavi ile kontrol altında olması

- 3) Bir ya da iki gözünde glokomatöz optik disk çukurlaşmasının olması
- 4) Glokomatöz görme alanı defekti varlığı (35)

**b. Primer açık-açılı glokom grubu dahil edilme kriterleri:**

- 1) Ön segment muayenesinde (lens ön kapsülü, iris kenarı) eksfoliatif materyal bulunmaması
- 2) Bir ya da iki gözünde göz içi basıncının 22 mm Hg'nin üzerinde olması ya da tedavi ile kontrol altında olması
- 3) Bir ya da iki gözünde glokomatöz optik disk çukurlaşmasının olması
- 4) Glokomatöz görme alanı defekti olması (20)

**c. Kontrol grubu dahil edilme kriterleri:**

- 1) 50 yaş üzeri olmak
- 2) Ön segment muayenesinde (lens ön kapsülü, iris kenarı) eksfoliatif materyal bulunmaması
- 3) Göz içi basınçlarının tedavisiz 22 mm Hg'nin altında olması
- 4) Glokomatöz optik disk çukurlaşmasının olmaması
- 5) Glokomatöz görme alanı defektinin olmaması

Çalışma Eylül 2014 – Nisan 2015 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu'ndan 17.09.2014 tarihli GO 14/465-18 karar numaralı etik kurul izni ve Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 18.11.2014 tarihli 2014/64-01 karar numaralı etik kurul izni alındıktan sonra HÜTF Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve HÜTF Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan maddeler ve özellikleri aşağıda anlatılmıştır:

- I. **Anti- BRN 3A Antikoru** (Anti-BRN 3A antibody, ABCAM, katalog no: ab30880): Tavşandan üretilen fare ya da sıçan Brn 3a'ya bağlanan bir poliklonal antikordur. Sıvı halde bulunur ve 1-2 hafta gibi kısa dönemlerde +4 °C'de saklanabilir. Uzun süreli kullanımlarda -20 ya da -80 °C'de saklanmalıdır. 1 ml içerisinde 0,5 mg yoğunluktadır ve tüp içerisinde 100 µg yoğunlukta bulunmalıdır.
- II. **FITC-Bağlı Keçi Anti-İnsan IgG** (Goat anti-Human IgG (H+L)-FITC, MinX none, Jackson IMM., katalog no: 109-095-003): FITC ile bağlı ağır ve hafif zincir yapılarını içeren poliklonal bir ikincil antikordur.
- III. **Normal Eşek Serumu** (Normal Donkey Serum, JACKSON, katalog no: 017-000-121): Arka planda oluşabilecek nonspesifik antijen antikor reaksiyonlarının blokajı için primer antikordan önce doku normal eşek serumu ile inkübe edilmelidir. Dilüe kullanımlarda daha iyi sonuç alınır. Prezervan olarak %0.05 oranında sodyum azid içerir. 2-8 °C'de saklanabilir. Uzun süreli kullanımlarda -20 ya da -80 °C'de saklanmalıdır.
- IV. **Cy3 Tavşan Anti-Keçi IgG İkincil Antikoru** (Rabbit Anti-Goat IgG (H&L) Cy3, BioVision, katalog no: 6911-250): Hafif ve ağır zincir yapılarını içeren bir ikincil antikordur. Prezervan olarak %0.05 oranında sodyum azid içerir. Uzun süreli kullanımlarda -20 °C'de saklanmalıdır. 1/100- 1/800 konsantrasyonlarında kullanılabilir.

Yöntem basamakları aşağıda maddelenmiştir:

### **3.1.1. Kontrol ve hasta gruplarının belirlenmesi, serum örneklerinin elde edilmesi**

Her bir hastadan ve kontrol grubundan alınan yaklaşık 7-8 ml periferik kan örneğinin 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjü sonrası elde edilen serumlar soğuk zincir ile laboratuara ulaştırıldı ve -80°C'de bölünerek muhafaza edildi.

### **3.1.2. İmmünohistokimya öncesi sıçanlardan doku elde edilmesi ve elde edilen dokuların kesilmesi**

HÜTF Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü'nde dekapite edilen üç adet yetişkin Wistar albino cinsi erkek sıçandan elde edilen göz küreleri formaldehit ile muamele sonrası dondurucu jel içine gömülerek -80 °C'de kesit alma işlemine kadar muhafaza edildi. Daha sonra bu dondurucu jel içerisine gömülmüş göz kürelerinden kriyostat ile 20 µm kalınlığında kesitler poli-L-lizin ile kaplı camlara alınarak, immünohistokimya (İHK) yapılacağı zamana kadar -20 °C' de saklandı.

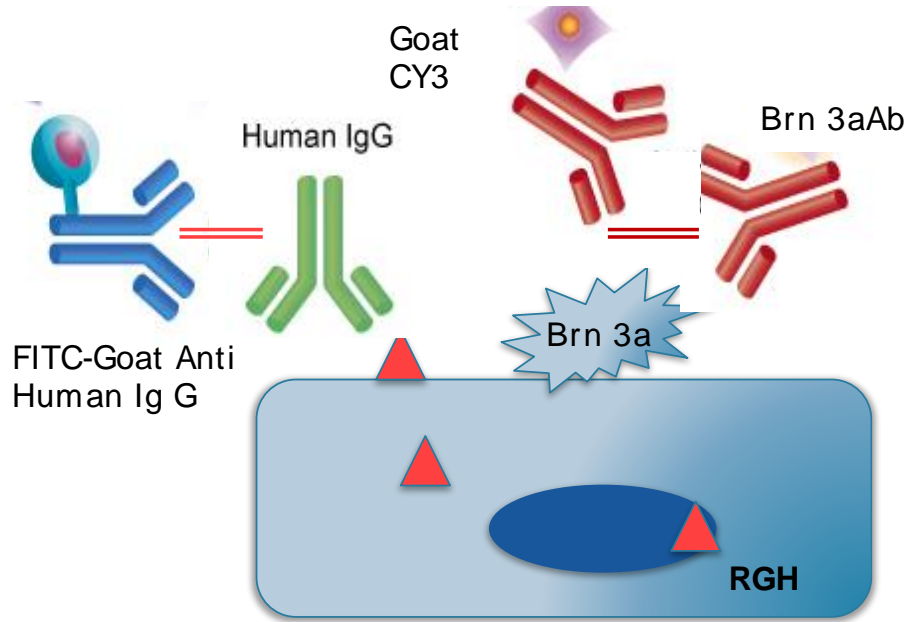
### **3.1.3. Serum Örneklerinin İmmünohistokimya Metoduna Hazırlanması**

Genel olarak serum örneklerinin çok fazla protein barındırmaları sebebiyle, yapılacak İHK öncesi serum örneklerinin blokaja tabi tutulmaları gerekmektedir. Bu amaçla her bir serum örneğinden 2.5 µl alınarak son hacim fosfat tamponlu salin (PBS) ile 150 µl ye tamamlanmış ve bu karışım 10 mg tartılarak tüplere konulmuş ginea domuz karaciğer liyofilizati ile karıştırıldı. Elde edilen bu karışım 50 dakika boyunca oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda karıştırıldı ve ardından 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant tekrar 10 mg tartılıp tüpe

konulmuş ginea domuz karaciğer liyofilizati ile karıştırıldı ve yukarıda belirtilen işlemler yinelendi. Toplam üç kez tekrarlanan bu işlem sonucu oluşan süpernatant temiz bir tüpe alınarak, İHK' da birincil antikor olarak kullanıldı.

### 3.1.4. İmmünohistokimya

Elde edilen kesitler oda sıcaklığında 5 dakika kadar bekletildikten sonra etrafları hidrofobik pap kalemi ile çizildi. Dokular 2 kez 5 dakika PBS ile dondurucu jel artıklarından temizlenmeleri amacıyla yıkandı. Bu yıkamanın akabinde dokular 4 dakika %10 formol ile fikse edildi ve 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra dokular %0.1 CHAPS içeren PBS solüsyonunda 4 dakika bekletildi ve tekrar 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Bu işlemden sonra tüm dokular 60 dakika oda sıcaklığında %10 normal eşek serumu içeren PBS solüsyonunda bekletildi. Bu blokaj aşamasının bitiminde, daha önceden İHK için hazırlanmış hasta serumları ile 70 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon sağlandı. Ardından yine tüm dokular 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra 60 dakika boyunca yine oda sıcaklığında 1/200 konsantrasyonda FITC-bağlı insan IgG ikincil antikorunu içeren PBS solüsyonu ile bekletildi. 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Yıkamadan hemen sonra ise 1/100 konsantrasyonda Brn 3a antikorunu içeren PBS solüsyonu ile gece boyu +4 °C'de bekletildi. Ertesi gün yine kesitler 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra keçi-IgG' ne karşı üretilmiş olan Cy3 tavşan anti-keçi IgG ikincil antikorunu 1/400 konsantrasyonda içeren PBS solüsyonu ile oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildikten sonra tekrar 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Ardından tüm dokular Hoescht solüsyonu içeren kapatma ortamı ile kapatıldı.

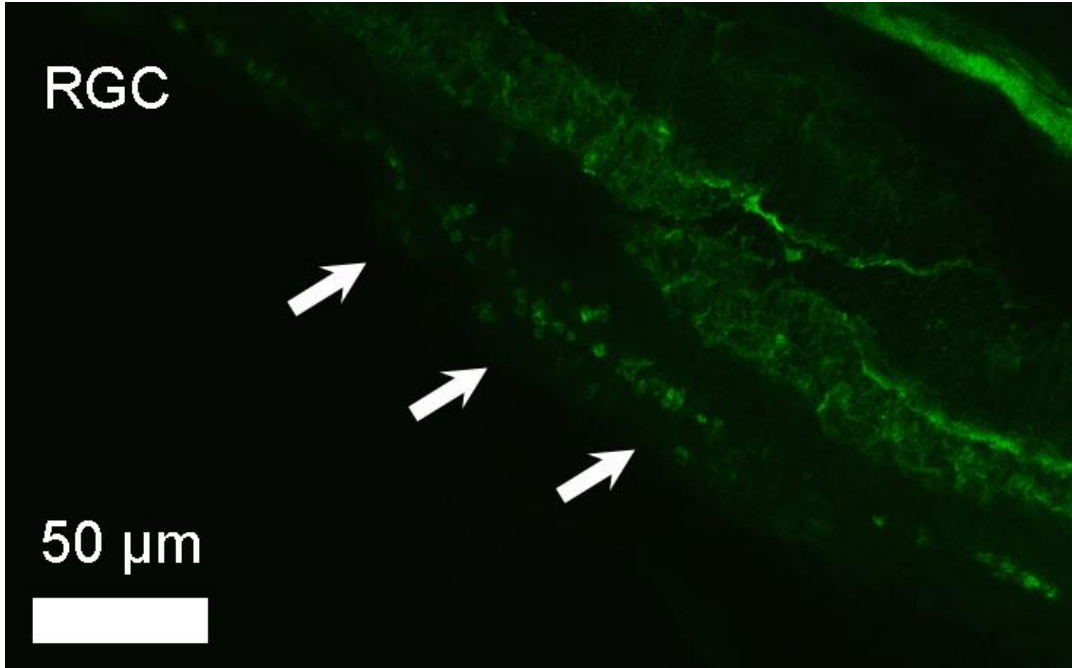


**Şekil 3.2.** Retina gangliyon hücresinde antijen antikor reaksiyonlarının şematik anlatımı

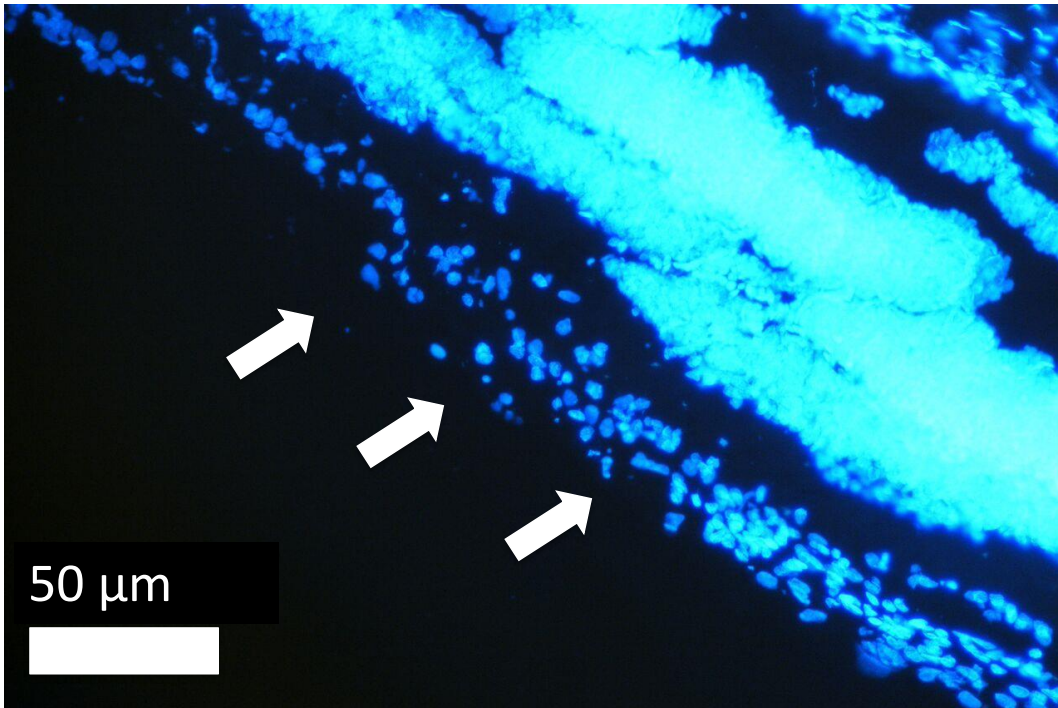
(▲ : Antijen)

Boyanan preparatlar flöresan mikroskop ile incelendi. Her bir sıçan retina kesiti mavi, kırmızı ve yeşil filtre altında incelendi. Mavi filtre ile hücre çekirdekleri (Hoechst Solüsyonu ile boyanmış), kırmızı filtre ile retinal gangliyon hücreleri (RGH üzerinde bulunan Brn 3a ve ona bağlanan primer antikor anti- Brn 3a antikorunu işaretleyen kırmızı filtre altında sinyal veren tavşan anti-keçi Cy3 ikincil antikorunu), yeşil filtre ile de oluşan antijen antikor reaksiyonu (RGH'de lokalizasyonunu bilmediğimiz bir antijene bağlanan insan serumunda bulunan insan IgG ile reaksiyon gösteren, yeşil filtre altında sinyal veren FITC-bağlı anti-insan IgG ikincil antikorunu) tespit edildi. Yeşil filtre altında görülen yeşil sinyal pozitif boyanma olarak değerlendirildi (Şekil 3.2-3.5).

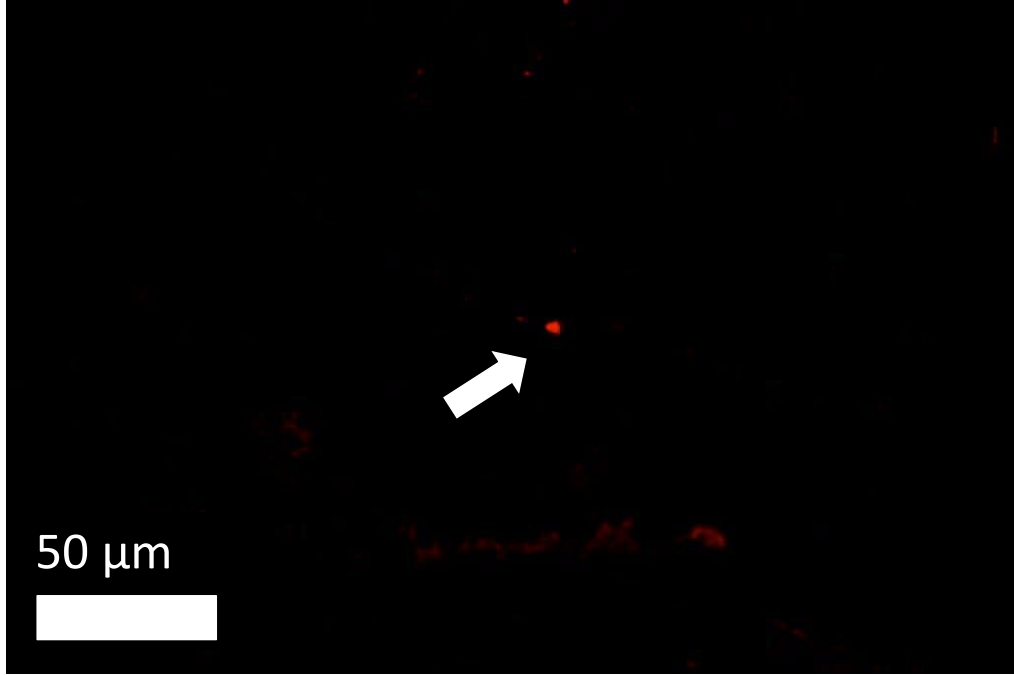




**Şekil 3.3.** Kontrol grubunda retina gangliyon hücre tabakasında pozitif boyanma



**Şekil 3.4.** Şekil 3.3'teki kesitin mavi filtre ile görünümü (Hoechst solüsyonu ile boyanmış hücre çekirdekleri)



**Şekil 3.5.** Kontrol grubundan başka bir retinal kesitin kırmızı filtre altında görünümü

(Anti Brn 3a antikorunu+ Cy3 Tavşan Anti-Keçi IgG İkincil Antikoru ile retina gangliyon hücresi üzerinde sinyal görünüyor)

### 3.2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Analizler IBM SPSS Statistics Versiyon 22.0 (New York, Amerika Birleşik Devletleri) programı ile yapıldı. Değişkenlere ilişkin uygun tanımlayıcı istatistikler ve grafikler elde edildi. Tüm değişkenlerin gruplarda normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk normallik testi ile, gerekli varsayımların sağlandığı durumda 3 grup ortalamaları arası fark tek yönlü varyans analizi ile %95 güven düzeyinde test edildi. Gerekli varsayımların sağlanmadığı durumda 3 grup dağılımları arası fark Kruskal-Wallis varyans analizi ile, gruplar arası fark bulunduğu farklılığın hangi gruplar arasında olduğu ikili karşılaştırma testleri ile, ikili grup karşılaştırmaları için gerekli varsayımlar sağlandığında iki grup ortalamaları arası fark iki evren ortalaması arası farkın önemlilik testi (t-testi) ile, varsayımlar sağlanmadığı durumda Mann-Whitney U testi ile %95 güven düzeyinde test edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda değerlendirilen 65 hastanın demografik verileri Tablo 4.1'de özetlenmiştir. Grupların yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ( $p<0.001$ ). EG grubu ile PAAG grubu arasında yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.227$ ). Kontrol grubu ile EG arasında yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p<0.001$ ). Kontrol grubu ile PAAG grubu arasında yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p<0.001$ ).

**Tablo 4.1.** Çalışmaya dahil edilen grupların yaş ortalaması (ortalama± standart sapma)

	<b>KONTROL</b> <b>(n=20)</b>	<b>PAAG</b> <b>(n=20)</b>	<b>EG</b> <b>(n=25)</b>	<b>TOPLAM</b> <b>(n=65)</b>
YAŞ ORTALAMASI (yıl), min-maks	60,8± 7,5 (51-78)	69,0 ± 9,5 (51-84)	72,4± 9,6 (55-88)	67,7± 10,2 (51-88)

(PAAG: Primer Açık-Açılı Glokom Grubu, EG: Eksfoliatif Glokom Grubu)

Gruplardaki cinsiyet dağılımları Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Gruplar arasında cinsiyet bakımından anlamlı fark yoktur ( $p=0.161$ ).

**Tablo 4.2.** Çalışmaya dahil edilen grupların cinsiyet dağılımları

<b>GRUPLAR</b>	<b>ERKEK</b>	<b>KADIN</b>
KONTROL (n=20)	12 (%60)	8 (%40)
PAAG (n=20)	6 (%30)	14 (%70)
EG (n=25)	11 (%44)	14 (%56)
TOPLAM (n=65)	29 (%44,6)	36 (%55,4)

Hipertansiyon ( $p=0,547$ ), diyabetes mellitus varlığı ( $p=0,570$ ), sigara kullanımı ( $p=0,473$ ), ailede glokom öyküsü ( $p=0,229$ ) açısından karşılaştırıldığında 3 grup arasında ilişki yoktur (Tablo 4.3- 4.6).

**Tablo 4.3.** Çalışmaya dahil edilen grupların hipertansiyon oranları

<b>GRUPLAR</b>	<b>YOK</b>	<b>VAR</b>
KONTROL (n=20)	9 (%45)	11 (%55)
PAAG (n=20)	6 (%30)	14 (%70)
EG (n=25)	11 (%44)	14 (%56)

**Tablo 4.4.** Çalışmaya dahil edilen grupların diyabetes mellitus oranları

<b>GRUPLAR</b>	<b>YOK</b>	<b>VAR</b>
KONTROL (n=20)	16 (%80)	4 (%20)
PAAG (n=20)	13 (%65)	7 (%35)
EG (n=25)	18 (%72)	7 (%28)

**Tablo 4.5.** Çalışmaya dahil edilen grupların sigara kullanım oranları

GRUPLAR	YOK	VAR
KONTROL (n=20)	11 (%55)	9 (%45)
PAAG (n=20)	12 (%60)	8 (%40)
EG (n=25)	18 (%72)	7 (%28)

**Tablo 4.6.** Çalışmaya dahil edilen gruplarda ailede glokom varlığı

GRUPLAR	YOK	VAR
KONTROL (n=20)	18 (%90)	2 (%10)
PAAG (n=20)	15 (%75)	5 (%25)
EG (n=25)	17 (%68)	8 (%32)

Gruplara ilişkin görme keskinliği, C/D oranı, GİB ve MKK'na ilişkin tanımlayıcı istatistikler sırasıyla Tablo 4.7- 4.10'da gösterilmiştir. GİB ortalamaları sağ göz ( $p=0.040$ ) ve sol göz ( $p=0.008$ ) için ayrı ayrı kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. MKK açısından sağ göz ( $p=0.362$ ) ve sol göz ( $p=0.180$ ) için ayrı ayrı kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

**Tablo 4.7.** Çalışmaya dahil edilen grupların görme keskinliği ortalamaları (Snellen Eşeli ile) (ortalama± standart sapma)

GRUPLAR	SAĞ GÖZ	SOL GÖZ
KONTROL	0,8± 0,1	0,7± 0,1
PAAG	0,6± 0,2	0,5± 0,3
EG	0,5± 0,3	0,4± 0,3

**Tablo 4.8.** Çalışmaya dahil edilen grupların C/D oranı ortalamaları (ortalama± standart sapma)

GRUPLAR	SAĞ GÖZ	SOL GÖZ
PAAG	0,4± 0,2	0,5± 0,2
EG	0,5± 0,2	0,5± 0,2

**Tablo 4.9.** Çalışmaya dahil edilen grupların göz içi basıncı ortalamaları (mmHg) (ortalama± standart sapma)

GRUPLAR	SAĞ GÖZ	SOL GÖZ
KONTROL	13,9± 2,4	13,9± 2,2
PAAG	15,4± 2,1	15,5± 2,8
EG	17,3± 5,7	15,8± 2,6

**Tablo 4.10.** Çalışmaya dahil edilen grupların merkezi kornea kalınlığı açısından karşılaştırılması (µm) (ortalama± standart sapma)

GRUPLAR	SAĞ GÖZ	SOL GÖZ
KONTROL	549,0± 33,6	554,0± 32,3
PAAG	538,5± 41,9	538,1± 41,4
EG	541,8± 48,7	534,3± 36,7

Çalışmaya dahil edilen grupların görme alanı parametreleri sağ göz için karşılaştırıldığında ortalama sapma (MD) ( $p=0.026$ ), patern standart sapma (PSD) ( $p=0.369$ ), yanlış pozitiflik (FP) ( $p=0.956$ ), yanlış negatiflik (FN) ( $p=0.749$ ), test süresi ( $p=0.929$ ) açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.11).

**Tablo 4.11.** Çalışmaya dahil edilen grupların görme alanı parametrelerinin karşılaştırılması (sağ göz) (ortalama± standart sapma)

GRUPLAR	MD	PSD	FP	FN	TEST SÜRESİ (sn)
KONTROL	3,5±2,5	2,3±1,4	2,8±4,5	3,8±5,2	350±55
PAAG	5,8±4,9	3,7±3,2	2,6±4,8	3,4±4,4	300±87
EG	10,2±10,1	3,8±3,03	4,2±10,5	4,3±5,2	349±70

(MD: ortalama sapma, PSD: patern standart sapma, FP: yanlış pozitiflik, FN: yanlış negatiflik)

Çalışmaya dahil edilen grupların görme alanı parametreleri sağ göz için karşılaştırıldığında ortalama sapma (MD) ( $p=0.007$ ), patern standart sapma (PSD) ( $p=0.138$ ), yanlış pozitiflik (FP) ( $p=0.489$ ), yanlış negatiflik (FN) ( $p=0.320$ ), test süresi ( $p=0.410$ ) açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.12).

**Tablo 4.12.** Çalışmaya dahil edilen grupların görme alanı parametrelerinin karşılaştırılması (sol göz) (ortalama± standart sapma)

GRUPLAR	MD	PSD	FP	FN	TEST SÜRESİ (sn)
KONTROL	3,5±1,9	2,3±1,2	3,0±3,4	3,5±5,8	358±67
PAAG	9,1±7,0	4,0±2,7	3,5±7,9	4,6±5,2	351±85
EG	10,2±2,2	3,6±3,0	4,6±16	4,0±6,6	338±57

(MD: ortalama sapma, PSD: patern standart sapma, FP: yanlış pozitiflik, FN: yanlış negatiflik)

Gruplar retina gangliyon hücre tabakasında pozitif boyanma açısından incelendiğinde tespit edilen boyanma yüzdeleri Tablo 4.13'te gösterilmiştir. Kontrol grubundaki boyanma yüzdesi diğer gruplar ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p=0.002$ ). Test gücü analizi sonucunda ise güç 0,92 olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4.13.** Gruplarda retina gangliyon hücre tabakasında pozitif boyanma oranları

GRUPLAR	POZİTİF BOYANMA
KONTROL	%50 (10/20)
PAAG	%10 (2/20)
EG	%8 (2/25)

Pozitif boyanma olan 14 bireyin yaş ortalaması 64 yıldır, pozitif boyanma görülmeyen 51 bireyin yaş ortalaması ise 68 yıldır. Boyanmanın yaş faktöründen etkilenip etkilenmediğini değerlendirmek amacıyla boyanma olan ve olmayan bireylerin yaş ortalamaları arasında karşılaştırma yapıldığında boyanma ve yaş faktörü arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.183$ ).



## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, serum örneklerinin sıçan retinası ile inkübasyonu sonrası immünohistokimyasal olarak tespit edilen antijen antikor reaksiyonları sağlıklı kontrollerde, PAAG ve EG grubuna göre daha yüksek oranda pozitif bulunmuştur. Şekil 4.1’de gösterildiği gibi retina gangliyon hücrelerine karşı serumda bulunan insan IgG’nin bağlandığı antijenin retina gangliyon hücresinin hangi kısmında olduğu (hücre zarı, sitoplazma, çekirdek) bilinmemektedir.

Literatürde glokom hastalarının serum antikor profilini, retinal antijenlerle immünizasyon sonrası oluşan antikor cevabını ve dokudaki etkilerini inceleyen pek çok çalışma yapılmıştır (7, 8, 36-39). Laspas ve arkadaşlarının (36) oluşturdukları oküler antijen ile immünizasyon sonrası oluşan serum antikor reaktivitesi ve retina gangliyon hücre kaybının altında yatan patomekanizmanın aydınlatılmasını amaçladıkları deneysel otoimmün hayvan modelinde, optik sinir homojenatı ya da keratin ile immünizasyon sonrası göz içi basıncı ve fundus muayenesi yapılmıştır. İmmünize edilen sıçanlardan ve kontrol sıçan grubundan toplanan serumlar immünize sıçan ve sağlıklı sıçan retina, optik sinir ve beyin kesitleri ile inkübe edilmiştir (36). Retina, optik sinir ve beyine karşı otoantikor seviyelerinde artış izlenmiştir (36). Optik sinir homojenatı ile immünizasyon sonrası antikor birikimi glia aktivasyonu ve demyelinizasyonunda artış görülmüştür (36). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise retina gangliyon hücre kaybında belirgin artış olmuştur (36). İmmünizasyon sonrası elde edilen serumda bulunan otoantikorların dokuda yarattığı etki retina gangliyon hücre ölümü yönünde olmuştur. Bizim çalışmamızda da retina gangliyon hücrelerine karşı otoantikor tespit edilmiştir, ancak retina gangliyon hücre ölümünü artırıp arttırmadığı bilinmemektedir. Benzer şekilde Joachim ve arkadaşlarının (37) yaptığı optik sinir antijenleri ile immünizasyon sonrası oluşan otoreaktiviteyi inceleyen

otoimmün glokom modelinde immünizasyon sonrası göz içi basıncı belirli aralıklarla ölçülmüş ve alınan aköz hümor örneğinde ELISA ile IgG miktarı değerlendirilmiştir. Optik sinir ve beyin kesitleri incelenmiştir (37). Optik sinir homojenatı ile immünizasyon sonrası aköz hümorede bulunan immünoglobulin miktarında belirgin artış olduğu, retina gangliyon hücre sayısında azalma olduğu ve optik sinirde aksonal hasar olduğu görülmüştür (37). HSP 27 ile immünizasyonun sadece retina gangliyon hücre ölümüne neden olmadığını, aynı zamanda da sistemik antikor profilini değiştirip değiştirmediğini araştıran Joachim ve arkadaşları (38) ise HSP 27 ile immünize edilen sıçanlar immünizasyondan 2 hafta öncesi ile sonrası 4. 5. ve 6. haftada göz içi basıncı ölçümü ile incelenmiştir. Alınan serum örnekleri Western Blot ve mass spektrometri ile antikor profili açısından tayin edilmiş ve hazırlanan retinal kesitlerde retina gangliyon hücreleri Brn 3a işaretlendikten sonra sayılmıştır (38). GİB ve fundus muayenesi açısından gruplar arasında immünizasyon öncesi ve sonrasında farklılık olmamakla beraber immünizasyon sonrası göz içi basıncından bağımsız olarak retina gangliyon hücre kaybı ve serum antikor profil değişiklikleri saptanmıştır (38). Bu çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde retina gangliyon hücreleri Brn 3a aracılığı ile işaretlenmiştir. Joachim ve arkadaşlarının (38) çalışmasında Brn 3a antikoruna boyanma sonrası retina gangliyon hücre sayımı yapılabilmıştır, ancak bizim çalışmamızda Brn 3a antikoruna boyanma sonrası hücre sayımı yapılamamıştır. Hücre sayımının yapılamaması, insan serumu dışında iki farklı antikor ile muamele sonrası Brn 3a antikoruna etkili boyanma olamaması ile açıklanabilir. Glokomda otoimmünitenin patogenepte rol alıp almadığını araştıran bir diğer grup olan Gramlich ve arkadaşlarının (39) insan donör gözlerinden elde edilen retina örneklerinde IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , interlökinler, kompleman kaskadı üyeleri gibi proinflamatuvar mediatörler ve antikorları mikroarray ile tayin ettikleri çalışmalarında TNF $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL6, IL8 glokomatöz donörlerde yüksek bulunmuştur. Glokomatöz retinada IgG birikiminin yanında kontrol grubunda

da bazı gözlerde birikim görülmüştür (39). Bu çalışmada gösterilen insan glokomatöz retinasında mikroglialarca sağlanan proinflamatuvar çevrede IgG antikor birikimi glokomun patogenezinde diğer nörodejeneratif hastalıklara göre immünolojik mekanizmaların da olduğunu düşündürmektedir (39). Başka bir immünohistokimyasal çalışma olan Tezel ve arkadaşlarının (7) yaptığı çalışmada DNA, RNA, çekirdek proteinleri, retinal proteinler ve proteoglikanlara karşı serum antikorları olan glokom hastalarında glikozaminoglikanlara karşı serum immünreaktivitesi değerlendirilmiştir. PAAG, normal basınçlı glokom ve sağlıklı kontrollerden elde edilen serumlarda Western Blot ile gösterilen antikorların kondroitin sülfat, heparan sülfat gibi optik sinir başı proteoglikanlarına bağlandığı görülmüştür (7). Normal basınçlı glokom hasta serumlarından elde edilen antikorlar ELISA ile diğer gruplara göre daha yüksek oranda bağlanma göstermiştir (7). Postmortem gözlerde yapılan immünohistokimyasal çalışma ile de normal basınçlı glokom grubunda diğer gruplara göre daha fazla boyanma görülmüştür (7). Glokomu olan hastalarda optik sinir başı glikozaminoglikanlarına karşı otoantikor seviyelerinde artış görülmüştür (7). Tezel ve arkadaşlarının (8) glokom hastalarında serum antikorlarının hedefi olan küçük molekül ağırlıklı retinal proteinlerin tanımlanması ve bu antikorların retinal apoptozisi başlatma kabiliyetini araştırdıkları başka bir çalışmada normal basınçlı glokom, PAAG ve sağlıklı kontrollerden alınan serumlar Western Blot ve ELISA ile incelenmiştir. HSP 27 ve  $\alpha$ -kristaline karşı immünreaktivite retinal fraksiyonlarda immünopresipitasyon test edilmiştir (8). İmmünohistokimya izole insan retinasında ex vivo olarak ve sıçan retina kültüründe in vitro olarak çalışmıştır (8). Normal basınçlı glokomda küçük molekül ağırlıklı retinal proteinlere karşı antikor seviyelerinde artış olduğu görülmüştür. Bu bulgu glokomatöz optik nöropati patogenezinde immünitenin önemi olduğunu düşündürmüştür (8).

Glokomda otoimmün reaksiyonları immünohistokimyasal olarak araştıran gruplardan farklı olarak, serum antikor profilinin incelendiği

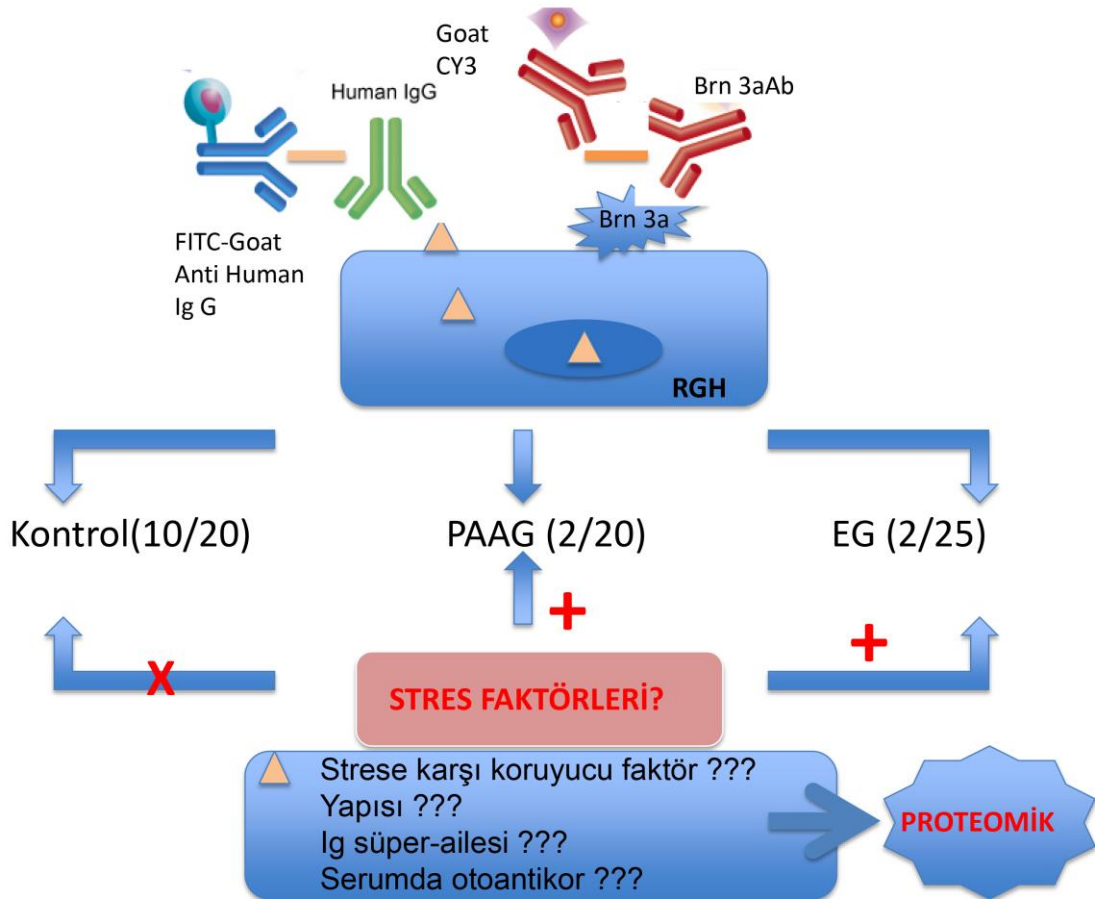
çalışmalar da başka gruplarca yapılmıştır (6, 40-42). Wax ve arkadaşlarının (6) normal basınçlı glokom hastalarında ELISA ile anti-Ro/SS-A pozitifliğinin optik nöropatinin otoimmün mekanizması ile ilişkili olup olmadığını araştırdıkları çalışmada Western Blot ile bakteriyel HSP 60'a karşı serum immünreaktivitesi değerlendirilmiş ve normal basınçlı glokom hastalarında yüksek bulunmuştur. HSP 60 ile Ro/SS-A arasındaki bu çapraz reaksiyon glokomatöz optik nöropatinin otoimmün bir optik nöropati olabileceği düşünülmüştür (6). Bu çalışmadan anlaşıldığı üzere serumda bulunan otoantikorların birbirleri ile çapraz reaksiyon gösteren antijenlere bağlanması sonucu optik nöropati gelişebilir. Bizim çalışmamızda tespit edilen insan IgG'nin bağlandığı antijen, başka bir antijen ile çapraz reaksiyon göstermiş olabilir. Yano ve arkadaşlarının (40) nörofilament proteinin glokomatöz optik nöropatide bir otoantijen olup olmadığını değerlendirdikleri çalışmalarında normal basınçlı glokom, PAAG ve kontrol grubundan alınan serum örnekleri nörofilament proteine karşı antikorlar açısından ELISA ile değerlendirilmiştir. Glokomatöz hastalarda antikor seviyeleri diğer hastalara göre daha yüksek bulunmuştur (40). Bizim çalışmamızda ise farklı olarak sağlıklı kontrollerde antikor tespit edilmiştir. Hammam ve arkadaşlarının (41) yaptığı normal basınçlı glokom ve otoimmünite arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarında normal basınçlı glokom, PAAG ve kontrol grubundan alınan serum örneklerinde ANA (antinükleer antikor), ENA (extractable nuclear antigen), anti dsDNA, IgA, IgG, IgM seviyeleri ile serum elektroforezi çalışılmıştır. Glokom hastalarında ANA, ENA, IgA seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (41). Serum otoantikor profilinin normal basınçlı glokom hastalarındaki farklılığı glokom patogenezinde otoimmün faktörlerin rol aldığını desteklemektedir. Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri'nden iki farklı popülasyondaki glokom hastalarında optik sinir antijenine karşı oluşan antikor profili değişikliklerini karşılaştırıldığı bir çalışmada PAAG, normal basınçlı glokom ve sağlıklı kontrollerden alınan serum örneklerinin optik sinir başı antijenlerine karşı gelişen IgG antikor paterni açısından Western Blot ile

incelendiği bir çalışmada normal basınçlı glokomu olan hastalardan alınan serumlarda  $\alpha$ -fodrine karşı antikor varlığı görülmüştür (42). Alzheimer Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda da  $\alpha$ -fodrine karşı antikor varlığının olması serum antikor paterninin glokom için bir belirteç olup olmayacağını düşündürmektedir (42).

Çalışmaların bulguları glokom hastalarının serumlarında bulunan otoantikorların optik nöropati patomekanizmasında rol alabileceğine işaret etmektedir. Çoğu çalışma grubu normal basınçlı glokom ve PAAG hasta serumlarında otoantikorları araştırmıştır, ancak bizim çalışmamızda farklı olarak eksfoliatif glokom hasta serumları da incelenmiştir (10, 12, 40- 44). Boehm ve arkadaşlarının (43) yaptıkları glokom hastalarının serumlarında ve aköz hümor sıvılarındaki antikor profilini karşılaştırmayı amaçladıkları çalışmalarında PAAG ve sağlıklı kontrollerden alınan örneklerde antijen mikroarray ile otoantikor tayini yapılmıştır. HSP 27, myelin basic protein ve  $\alpha$ 1-antitripsine karşı immün reaktivitede artış görülürken, glial fibriler asidik protein ve  $\beta$ 1-kristaline karşı immünreaktivitede azalma görülmüştür. Serum ve aköz hümor örnekleri bireyler arası karşılaştırıldığında güçlü ilişki olduğu saptanmıştır (43). Bu bulgulardan anlaşıldığı üzere glokom patogenezinde upregüle proteinler olabileceği gibi bazı proteinlerin de downregülasyonu söz konusudur. Romano ve arkadaşlarının (44) normal basınçlı glokomda otoimmünitenin rolünü araştırdıkları çalışmalarında hasta serumu retinanın subselüler kısmı ile immünblotmaya ek olarak, saflaştırılmış sığır rodopsini ve saflaştırılmış rekombinan insan rodopsini ile karşılaştırılmış ve ELISA ile anti rodopsin antikorları tayin edilmiştir (44). Normal basınçlı glokom hastalarında PAAG hastalarına göre antikor seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (44). Bu bulgu optik nöropatide otoimmün bileşenin olabileceğini düşündürmektedir. Kremmer ve arkadaşlarının (12) yaptığı bir çalışmada normal basınçlı glokom, PAAG ve sağlıklı kontrollerden oluşan 3 grup karşılaştırılmıştır. Hasta serumlarında ELISA ile antifosfolipid antikorları, antikardiyolipin, anti  $\beta$ 2 glikoprotein ve antifosfatidilserin tayin

edilmiştir (12). Bu moleküllerin önemi ise erken apoptoziste hücre zarında işlev görmelerinden gelmektedir. Normal basınçlı glokom hastalarında antifosfatidilserin seviyelerinde artış anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (12). Antifosfatidilserinin apoptozis sürecinde önemli olan fosfatidilserine spesifik bağlanması yerel tromboza sebep olabilmesi açısından önemli olduğu belirtilmiştir (12).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda glokomatöz optik nöropati patogenezinde glokom hasta serumlarında retinal antijenlere karşı artmış serum otoantikoru tespit edilmiştir (6- 8, 36-44). Bu çalışmaların yanısıra nöroprotektif otoantikordardan bahseden çalışmalar da mevcuttur (2, 4, 45-51). Sağlıklı bireylerde mevcut serum immunglobulinlerin 2/3'ü doğal olarak bulunan otoantikordardır (2). Bunlar düzenleyici etkenler olarak değerlendirilebilirler (2). Hedef molekülün işlevinin modülasyonunu ve fizyolojik işlevlerini etkileyebilirler (2). Bazı otoantikorların azalması doğal koruyucu otoantikorların azalmasına ve nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna sebep olabilir (2). Wax ve arkadaşlarının (45) yaptığı bir çalışmada HSP 27 ve 60 ile immunizasyon sonrası enükleasyon uygulanan Lewis ratlardan elde edilen kesitler incelendiğinde insanlarda görülen glokomatöz aksonal hasar benzeri aksonal hasar görülmüştür (45). Retinaya T hücre infiltrasyonunda artış ve immünizasyon sonrası aktive T hücrelerden salgılanan Fas-L aracılı apoptoziste artış in vitro olarak gösterilmiştir (45). Bu çalışmada HSP immünizasyonu sonrası oluşan deneysel otoimmün glokom modeli ile koruyucu otoimmünite ve otoimmün nörodejeneratif hastalıkların tetiklenmesi arasındaki zıt roller araştırılmıştır (45). Bell ve arkadaşlarının (2) yaptıkları çalışmada glokom hastalarının serumunda 14-3-3 antikorunun downregüle olduğu gösterilmiştir. Bu antikorun hücreler üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar glokom hastalarında koruyucu otoimmünite teorisi ile uyumaktadır (2, 4).



**Şekil 4.1.** Şematik olarak retina gangliyon hücresinde görülen antijen antikor reaksiyonu

Shoenfeld ve arkadaşlarına (46) göre de otoimmünite çoğunlukla koruyucudur. Sağlıklı bireylerin serumlarında bulunan otoantikorların çoğunlukla IgM izotipinde olduğu üzerinde durmuşlardır (46). Örneğin IgM tipinde anti dsDNA koruyucu iken, IgG tipinde anti dsDNA patolojiktir ve glomerüler bazal zarda birikime yol açarak hastalık patogenezinde rol almaktadır (46). Bu çalışma bizim çalışmamızda kontrol grubunda görülen pozitif boyanmanın mekanizmasını aydınlatmada önemlidir.

Glokom ile benzer olarak nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığının patogenezinde de koruyucu otoimmün faktörlerin azalması söz konusu olabilir. Britschgia ve arkadaşlarının (47) yaptığı bir çalışmada Alzheimer hastalığı ve sağlıklı kontrollerden oluşan iki gruptan elde edilen

plazma ve BOS örnekleri incelenmiştir. Toksik A $\beta$  ve amloidojenik non A $\beta$  türlerine karşı doğal antikorlar tayin edilmiştir (47). Sağlıklı kontrollerde antikor seviyeleri yüksek bulunmuş ve plazma IgG'nin A $\beta$  nörotoksitesini azalttığı görülmüştür (47).

Nörodejeneratif hastalıklarda glial fibriler asidik protein (GFAP)'in arttığı bilinmektedir. Wilding ve arkadaşlarının (48) nöroretinal hücrelerde anti GFAP antikorlarının etkisini değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidatif stres uygulanan RGC-5 (retina ganglion cell) kültürü ile çoğaltılmış retina ganglion hücrelerinde anti GFAP antikorunun ERP5 (endoplazmik retikulum protein) ile bağlanarak hücre sağkalımını artırdığı görülmüştür (48). Glokom hastalarında anti GFAP antikorunun azaltarak düzenlendiği gösterilmiştir (48). Bu koruyucu etki ise otoantikorların her zaman yıkıcı olmadığını göstermektedir (48). Benzer şekilde oksidatif stres uygulanan nöroretinal hücrelerde  $\gamma$  synuclein antikorlarının etkisinin incelendiği bir çalışmada retina gangliyon hücreleri RGC-5 kültürü ile çoğaltılmış ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidatif stres uygulanmıştır (49). Anti  $\gamma$ -synuclein antikorları ile maruziyet sonrası retina gangliyon hücre sağkalımında artış ve reaktif oksijen radikalleri seviyelerinde düşüş görülmüştür (49). Glokom hastalarında otoantikor seviyelerinde azalma koruyucu otoimmüitenin kaybını işaret edebilir (49). Shimazaki ve arkadaşlarının (50) insan serumunda anti retinal IgG profilini tanımlamayı amaçladıkları çalışmada insan donör gözlerden hazırlanan retinal doku özütü ile serum otoantikorları arası bağlanma sekonder antikor ile gösterilmiştir. Sağlıklı kontrol grubunda IgG reaktivitesi belirgin yüksek bulunmuştur ve bu çalışmada da koruyucu otoimmüitenin kaybının optik nöropati patogenezindeki rolü vurgulanmıştır (50).

Bizim çalışmamızda kontrol grubunda diğer gruplara göre daha yüksek oranda pozitif boyanma olmasının birinci olası mekanizması olan koruyucu otoimmüitenin varlığını destekleyen çalışmalardan yukarıda bahsedilmiştir.



Wax ve arkadaşlarının (51) bir derlemesinde glokomda immün sistemin iki ayaklı olduğundan, birinci ayağın yıkıcı otoimmünite, ikinci ayağın ise koruyucu otoimmünite olduğundan bahsedilmektedir. Glokomda rol alan otoantikolar myasthenia graviste olduğu gibi patojenik; ya da strese karşı otoprotektif olabilirler (51).

Diğer bir olası mekanizma ise daha önce de değinildiği gibi bir takım proapoptotik faktörlerin inhibe edilmiş olabileceğidir. Proapoptotik faktörlere örnek olarak TNF $\alpha$  ve Fas-L (Fas ligand) örnek olarak verilebilir. Coxon ve arkadaşlarının (29) çalışmalarında belirttiği gibi apoptozisin mekanizmalarından birisi de glial-nöronal etkileşmedir. Glial hücreler TNF $\alpha$ , glutamat ve NO gibi apoptozisi indükleyen nörotoksik moleküller salgırlar. TNF $\alpha$  kaspaz 8 aracılı ekstrinsik apoptozisi başlatan bir ölüm ligandır. Artmış salınım ve azalmış geri alınım sonucu artan intravitreal glutamat kalsiyum aracılı mekanizmalar ile apoptozise neden olur (29). Bunun yanı sıra NO oluşturduğu mitokondriyel disfonksiyon sonucu mitokondriden ölüm mediatörlerinin salınmasına ve reaktif oksijen radikallerinin artışına sebep olur (29). Bu çalışmada görüldüğü gibi TNF $\alpha$  bir proapoptotik faktör olarak rol oynamaktadır (29). TNF $\alpha$ 'nın retinal iskemi ve glokom gibi retinal nörodejenerasyonun görüldüğü durumlarda zararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir (52). Mak ve Yeh (53) ise TNF $\alpha$ 'nın nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) sinyal kaskadını başlattığını raporlamışlardır. Dvorianchikova ve Ivanov'un (54) yaptıkları çalışmada da TNF $\alpha$ 'nın merkezi sinir sisteminde birçok fizyolojik ve patolojik durumda rol oynayan bir inflamatuvar sitokin olduğundan bahsedilmiştir. Retinada TNF $\alpha$ 'nın yararlı ve zararlı etkilerinin araştırıldığı çalışmada kantitatif RT-PCR ve Western Blot ile retina gangliyon hücrelerinde ve astrositlerdeki NF- $\kappa$ B ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir (54). TNF'ye maruz bırakılmış hücrelerde NF- $\kappa$ B ve JNK aktivitesi eş zamanlı olarak ELISA ve Western Blot ile belirlenmiştir (54). Retina gangliyon hücreleri TNF varlığında NF- $\kappa$ B aktivasyonunu başaramamıştır. Bunun yanı sıra astrositlerde TNF'nin NF- $\kappa$ B

ve JNK sinyal kaskadını başlattığı görülmüştür (54). Glial hücrelerin sağkalımı ve nörotoksik proinflamatuvar mediatörlerin salınımında artış olduğu düşünülmüştür. Bu bulgular TNF, NF- $\kappa$ B ve JNK sinyal kaskadının retina gangliyon hücreleri ve astrositlerde zıt yollarla aktive olduğunu göstermektedir (54).

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda kontrol grubu, PAAG ve EG grubu ile pozitif boyanma açısından karşılaştırıldığında kontrol grubunda boyanma yüzdesi anlamlı olarak yüksek bulundu. PAAG ve EG grubunda boyanma oranının düşük olması glokom patogenezinde yıkıcı otoimmünitenin önemli bir mekanizma olmadığını düşündürmektedir. Glokomu olan hasta serumlarında otoantikor bulunmaması koruyucu otoantikorların ya da proapoptotik faktörleri inhibe eden otoantikorların glokom hastalarında azaldığını düşündürmektedir. Çalışmamızda varlığını gösterdiğimiz antijen antikor reaksiyonunun bileşenlerinin hangi proteinler olduğu ve antijenin retina gangliyon hücrelerinin hangi kısmında (hücre zarı, sitoplazma, çekirdek) olduğu bilinmese de, bulgularımız glokom patogenezinde koruyucu otoimmünitenin kaybını desteklemektedir. Varlığı gösterilen antijen antikor reaksiyonunun bileşenlerinin proteomikler ile tayini bir sonraki aşama olabilir. Bu çalışma ileride glokom patogenezinin aydınlatılacak çalışmaların temelini oluşturacak çalışmalardan birisi olmasının yanı sıra EG hasta serumlarının otoantikorlar açısından değerlendirildiği ilk çalışmadır.

## 6. SONUÇLAR

- 1) Kontrol grubu, primer açık-açılı glokom ve eksfoliatif glokom grubu ile retinal gangliyon hücre tabakasında pozitif boyanma açısından karşılaştırıldığında kontrol grubunda pozitif boyanma yüzdesi anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0.002$ ).
- 2) Primer açık-açılı glokom ve eksfoliatif glokom grubunda pozitif boyanma oranının anlamlı olarak düşük olması, glokom hastalarının serumlarında retina gangliyon hücre tabakası ile ilişkili koruyucu otoimmün faktörlerin ya da proapoptotik faktörlerin işleyişini durduran otoantikörlerin azalmış olabileceğini düşündürdü.
- 3) Sıçan retina kesitlerinin Brn 3a antikoru ile boyanması her kesitte optimum düzeyde bulunmadı.
- 4) İnsan IgG'nin bağlandığı retina gangliyon hücresinde bulunan antijenin, hücrenin hangi kısmında (çekirdek, sitoplazma, hücre zarı) olduğu belirlenemedi.
- 5) Kontrol grubunun yaş ortalaması, PAAG ve EG grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ( $p<0.001$ ). Pozitif boyanma olan ve olmayan bireylerin yaş ortalamaları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.183$ ). Boyanma faktörünün yaş faktöründen etkilenmediği tespit edildi.

## 7. KAYNAKLAR

1. Tezel G, Wax MB. The immune system and glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2004;15:80-84.
2. Bell K, Gramlich OW, Von Thun Und Hohenstein-Blaul N, Beck S, Funke S, Wilding C, Pfeiffer N, Grus FH. Does autoimmunity play a part in the pathogenesis of glaucoma?. *Prog Retin Eye Res*. 2013;36:199-216.
3. Shazly TA, Aljajeh A, Latina MA. Autoimmune basis of glaucoma. *Semin Ophthalmol*. 2011;26:278-281.
4. Grus FH, Sun D. Immunological mechanisms in glaucoma. *Semin Immunopathol*. 2008;30:121-126.
5. Wax MB. The case for autoimmunity in glaucoma. *Exp Eye Res*. 2011; 93:187-190.
6. Wax MB, Tezel G, Saito I, Gupta RS, Harley JB, Li Z, Romano C. Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1998;125:145-57.
7. Tezel G, Edward DP, Wax MB. Serum autoantibodies to optic nerve head glycosaminoglycans in patients with glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1999;117:917-924.
8. Tezel G, Seigel GM, Wax MB. Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:2277-2287.

9. Joachim SC, Reichelt J, Berneiser S, Pfeiffer N, Grus FH. Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246:573-580.
10. Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N, Grus FH. Antibodies to alpha b-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody pattern against retinal antigen in aqueous humor. *Curr Eye Res.* 2007;32:501-509.
11. Maruyama I, Ohguro H, Ikeda Y. Retinal ganglion cells recognized by serum antibody against gamma-enolase found in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:1657-1665.
12. Kremmer S, Kreuzfelder E, Klein R, Bontke N, Honneberg-Quester KB, Steuhl KP, Grosse-Wilde H. Antiphosphatidylserine antibodies are elevated in normal tension glaucoma. *Clin Exp Immunol.* 2001;125:211-215.
13. Reichelt J, Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH. Analysis of autoantibodies against human retinal antigens in sera of patients with glaucoma and ocular hypertension. *Curr Eye Res.* 2008;33:253-261.
14. Ikeda Y, Maruyama I, Nakazawa M, Ohguro H. Clinical significance of serum antibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients. *Jpn J Ophthalmol.* 2001;46:13-17.
15. Yang J, Tezel G, Patil RV, Romano C, Wax MB. Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1273-1276.

16. Rieck J. The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:2393-2409.
17. Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, Johnson GJ. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol.* 2002;86:238–242.
18. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006;90: 262–267.
19. Ringvold A. Epidemiology of the pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol Scand.* 1999;77:371–375.
20. European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma. (Dördüncü baskı). 2014;73-129
21. Dongqi H, Zeqin R. A biomathematical model for pressure-dependent lamina cribrosa behavior. *J Biomech.* 1999;32: 579-584.
22. Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, Serra LM, Renard JP, Stefansson E. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21:359-393.
23. Schlötzer-Schrehardt U. Genetics and genomics of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2011;18:30-36.
24. Kasım B, Irkeç M, Alikışıfoğlu M, Orhan M, Mocan MC, Aktaş D. Association of LOXL1 gene polymorphisms with exfoliation syndrome/ glaucoma and primary open angle glaucoma in a Turkish population. *Mol Vis.* 2013;19:114-120.
25. Ringvold A. Epidemiology of the pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol Scand.* 1999;77:371–375.

26. Schlötzer-Schrehardt U. Molecular pathology of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma - new insights from LOXL1 gene associations. *Exp Eye Res.* 2009;88:776-785.
27. Challa P. Genetics of Pseudoexfoliation Syndrome. *Curr Opin Ophthalmol.* 2009;20:88–91.
28. Masland RH. The tasks of amacrine cells. *Vis Neurosci.* 2012;29:3-9.
29. Coxon KM, Duggan J, Guo L, Cordeiro MF. Retinal ganglion cell apoptosis and neuroprotection. *Encyclopedia of the Eye.* 2010;62-72.
30. Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:764-774.
31. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, Mitchell RS. Retrograd axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute iop elevatipon in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3460-3466.
32. Nashine S, Liu Y, Kim BJ, Clark AF, Pang IH. Role of C/EBP homologous protein in retinal ganglion cell death after ischemia/reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:221-231.
33. Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31:152-181.
34. Nadal-Nicola's FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Alburquerque-Béjar JJ, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Whole number, distribution and co-expression of Brn 3 transcription

- factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One*. 2012;7:1-16.
35. Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome. *Surv Ophthalmol*. 2001;45:265-315.
  36. Laspas P, Gramlich OW, Müller HD, Cuny CS, Gottschling PF, Pfeiffer N, Dick HB, Joachim SC, Grus FH. Autoreactive antibodies and loss of retinal ganglion cells in rats induced by immunization with ocular antigens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:8835-8848.
  37. Joachim SC, Reinehr S, Kuehn S, Laspas P, Gramlich OW, Kuehn MI, Tischoff I, von Pein HD, Dick HB, Grus FH. Immune response against ocular tissues after immunization with optic nerve antigens in a model of autoimmune glaucoma. *Mol Vis*. 2013;19:1804-1814.
  38. Joachim SC, Grus FH, Kraft D, White-Farrar K, Barnes G, Barbeck M, Ghanaati S, Cao S, Li B, Wax MB. Complex antibody profile changes in an experimental autoimmune glaucoma animal model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:4734-4742.
  39. Gramlich OW, Beck S, Von Thun and Hohenstein-Blaul N, Boehm N, Ziegler A, Vetter JM, Pfeiffer N, Grus FH. Enhanced insight into the autoimmune component of glaucoma: igG accumulation and pro-inflammatory conditions in human glaucomatous retina. *PLoS One*. 2013;8:1-11.
  40. Yano T, Yamada K, Kimura A, Takeshita T, Minohara M, Kira J, Senju S, Nishimura Y, Tanihara H. Autoimmunity against neurofilament protein and its possible association with HLA-DRB1\*1502 allele in glaucoma. *Immunol Lett*. 2005;100:164-169.



41. Hammam T, Montgomery D, Morris D, Imrie F. Prevalence of serum autoantibodies and paraproteins in patients with glaucoma. *Eye (Lond)*. 2008;22:349-53.
42. Grus FH, Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N. Serum autoantibodies to alpha-fodrin are present in glaucoma patients from Germany and the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:968–976.
43. Boehm N, Wolters D, Thiel U, Lossbrand U, Wiegel N, Pfeiffer N, Grus FH. New insights into autoantibody profiles from immune privileged sites in the eye. *Brain Behav Immun*. 2012;26:96-102.
44. Romano C, Barrett DA, Li Z, Pestronk A, Wax MB. Anti-rodopsin antibodies in sera from patients with normal-pressure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:1968-75.
45. Wax MB, Tezel G, Yang J, Peng G, Patil RV, Agarwal N, Sappington RM, Calkins DJ. Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T cell-derived fas-ligand. *J Neurosci*. 2008;28:12085-12096.
46. Shoenfeld Y, Toubi E. Protective autoantibodies role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2599–2606.
47. Britschgi M, Olin CE, Johns HT, Takeda-Uchimura Y, LeMieux MC, Rufibach K, Rajadas J, Zhang H, Tomooka B, Robinson WH, Clark CM, Fagan AM, Galasko DR, Holtzman DM, Jutel M, Kaye JA, Lemere CA, Leszek J, Li G, Peskind ER, Quinn JF, Yesavage JA, Ghiso JA, Wyss-Coray T. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:12145–12150.

48. Wilding C, Bell K, Funke S, Beck S, Pfeiffer N, Grus FH. GFAP antibodies show protective effect on oxidatively stressed neuroretinal cells via interaction with ERP57. *J Pharmacol Sci*. 2015;127:298-304.
49. Wilding C, Bell K, Beck S, Funke S, Pfeiffer N, Grus FH.  $\gamma$  synuclein antibodies have neuroprotective potential on neuroretinal cells via proteins of the mitochondrial apoptosis pathway. *PLoS One*. 2014;9:1-9.
50. Shimazaki K, Jirawuthiworavong GV, Heckenlively JR, Gordon LK. Frequency of anti-retinal antibodies in normal human serum. *J Neuroophthalmol*. 2008;28:5-11.
51. Wax MB, Yang J, Tezel G. Serum autoantibodies in patients with glaucoma. *J Glaucoma*. 2001;10:22-24.
52. Tezel G. TNF- $\alpha$  signaling in glaucomatous neurodegeneration. *Prog Brain Res*. 2008;173:409-421.
53. Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res*. 2002;4:243-252.
54. Dvorianchikova G, Ivanov D. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates activation of NF- $\kappa$ B and JNK signaling cascades in retinal ganglion cells and astrocytes in opposite ways. *Eur J Neurosci*. 2014;40:3171-317.