

**T.C.  
KOCAELI ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**PSÖDOEKSFOLİASYON SENDROMU OLAN HASTALARIN AKÖZ  
HÜMÖR ÖRNEKLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOM ANALİZİ**

**Dr. Müge TOPRAK**

**Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi**

**2015**

**T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**PSÖDOEKSFOLİASYON SENDROMU OLAN HASTALARIN  
AKÖZ HÜMÖR ÖRNEKLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOM  
ANALİZİ**

**Dr. Müge TOPRAK**

**Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Prof.Dr.Nurşen YÜKSEL**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı**

**Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL**

**Etik Kurul Onayı: KOÜ/KAEK 2015-35**

## ÖNSÖZ

Hayatım boyunca beni destekleyen varlıklarıyla bana güç veren annem, babam ve ablama teşekkür ederim.

Eğitimim süresince gördüğüm verilen emeğin ve gayretin karşılıksız olmadığı, bize öğretilmek istenenin öncelikle çalışma disiplini olduğuydu.

Üç aylık yurt dışı deneyimimde ne kadar üst düzey bir eğitim aldığımı daha iyi anladım. Anabilim dalı başkanımız ,tez hocam , çok yönlülüğünü örnek aldığım Prof. Dr. Nurşen Yüksel'e kendimi gerçekleştirebilme fırsatları tanıdığı için , desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim .

Sabrı ve zerafeti ile dikkat çeken Doç Dr. Berna Özkan'a ; yorulmak nedir bilmeyen,cerrahi başarıları ile asistanlarını kendine hayran bırakan Doç Dr. Levent Karabaş'a ; titizliği ve akademisyen kimliğiyle örnek aldığım Prof. Dr. Özgül Altıntaş'a , Bana ROP'u sevdiren ve öğreten genç hocamız Dilara Pirhan'a desteklerinden ve emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Bu süreçte herkesten çok birlikte vakit geçirdiğim , arkadaşlarım ,meslektaşlarım asistan ekibine ; biricik arkadaşım Dr. Özge Yendur'a teşekkür ederim.

Cumhuriyete ve Atatürk İlkelerine sıkı sıkıya bağlı bir kurumda yetişmiş olmaktan gurur duyuyorum.Kliniğin kurucusu Prof. Dr. Yusuf Çağlar'ı tanıdığım için kendimi şanslı hissediyorum

İlk öğretmenim, tezimin editörü babam Memet Ali Toprak' ayrıca teşekkür ederim.

Desteginize ve inancınıza layık olmaya çalışacağım.

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI .....	2
ÖNSÖZ .....	3
İÇİNDEKİLER .....	4
SİMGE VE KISALTMALAR .....	5
TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ .....	7
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	8
2. GENEL BİLGİLER .....	9
3. MATERYAL-METOD.....	25
4. BULGULAR .....	32
5. TARTIŞMA .....	40
6. SONUÇLAR.....	50
7. ÖZET.....	51
8.ABSTRACT.....	52
9.KAYNAKLAR .....	53

## SİMGE VE KISALTMALAR

AFP:  $\alpha$ -Fetoprotein

AFM:  $\alpha$ -Albumin/aAamin

ALB: Albumin

APOA-1:Apolipoprotein A - 1

APOA-4:Apolipoprotein A -4

BOS: Beyin Omur İlık Sıvısı

cDNA:sirküler Deoksi Ribonükleik Asit

CRP: C-Reaktif Protein

DTT: Dithiothreitol

ESI-MS: Elektrospray İyonizasyon Mass Spektrometri

GİB: Göz İçi Basıncı

HDL: Yüksek Dansiteli Lipoprotein

HNK-1: Human Natural killer-1

HLA: İnsan Lökosit Antijeni

HPLC: Yüksek Performans Likit Kromatografisi

2D:İki Boyutlu

IPG: Immobilized pH Gradient

IGF-1: İnsulin-Like Growth Faktör-1

IL-6: İnterlökin-6

LCAT: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz

LOXL-1: Lisil Oksidaz Like-1

LTBP-1: Latent Transforme Edici Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein-1

MALDI-ToF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight

MMP: Matriks Metalloproteinazı

MAGP-1: Mikrofibril Bağlantılı Glikoprotein

Mrna: Messenger Ribonükleik Asit

MS:Multiple Skleroz

MW:Moleküler Büyüklük

ND-PAGE: Non Denatüre Edici Page

PAAG: Primer Açık açılı Glokom

PES: Psödoeksfoliasyon Sendromu  
PESG: Psödoeksfoliasyon Glokomu  
PEM: Psödoeksfoliasyon Materyali  
PSDMALDIMS:Post Source Decay  
RRMS: Tekrarlayan-Düzelen Multiple Skleroz  
SDS- PAGE: Denatüre Edici Page  
SELDI-TOF: Surface Enhanced Laser Desorpsiyon İyonizasyon  
TGF- $\beta$ 1: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-1  
TGase-2: Transglutaminaz- 2  
TIMPs: metalloproteinazların doku inhibitörleri  
TTR: Transtretin  
UV:Ultra Viyole  
VDBP:Vitamin D Bağlayıcı Protein  
VDR: Vitamin D Reseptörü

## TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1 Klinik olarak ön lens kapsülünde eksfoliatif materyalin karakteristik görünümü

Şekil-2 Deneysel akış Şeması

Şekil-3 Protein standart eğrisi

Şekil -4: İki boyutlu jeller üzerinde elde edilen protein profilleri ve tanımlanan bazı proteinlere ait spotlar verilmiştir.

Şekil- 5 PES ve kontrol jellerine ait tanımlanan spotların 3D karşılaştırılması

Tablo-1: Demografik veriler

Tablo-2 PES olan hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı olarak eksprese olan proteinlerin listesi

Tablo-3 Yakalanan peptid sekansları ve Mascot skorları

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Psödoeksfoliyasyon sendromu (PES); ileri yaşlarda görülen, gözün ön segmentinde ekstraselüler fibriler ya da granüler eksfoliyatif materyalin birikmesiyle ortaya çıkanklinikle karakterizedir.<sup>(1)</sup> Son yıllarda artan yoğun çalışmalara rağmen, PES'in etyoloji ve patogenezi henüz kesin olarak ortaya konamamıştır.Histopatolojik ve elektron mikroskobu bulguları, sendromun sistemik karakterli olduğunu kanıtlamaktadır. Psödoeksfoliyasyon materyali(PEM); göz dışında deri, akciğer, kalp, karaciğer, böbrek ve meninkslerde de gösterilmiştir.<sup>(1)</sup> PES çoğunlukla yaşlıların hastalığıdır, ortalama 60-70 yaş aralığında sık görülür ve ilerleyen yaşla sıklığı artar.<sup>1</sup> Irklara göre dağılımı hayli farklılık gösteren bu hastalık, yaklaşık %20 olguda glokom ve oküler hipertansiyona neden olmaktadır.<sup>(2,3)</sup>

Aköz hümör ön kamarada bulunan ekstrasellüler bir sıvıdır.Alınabilecek örneklerin kısıtlı miktarları sofistike analiz teknikleri gerektirmektedir.

Kütle spektrometreye dayalı birden fazla reaksiyon monitorize eden deneyler çok büyük sayıda örnekteki molekülleri tespit edebilmek için opsiyonlar sağlamaktadır. Kütle spektrometre tekniği, proteomiks ya da metabolik biyobelirteç keşfi için altın standart yaklaşımdır.Daha sonrasında protein profillerinin doğruluğu kanıtlanabilir.

Oftalmolojide şu ana kadar belirteçler genellikle tatmin edici değildir ve klinik pratikte kısıtlı kullanıma sahiptir.

Kolay bulunabilen örneklerden elde edilen moleküler biyobelirteçler potansiyel klinik başvuru için en uygun olanlardır. Ancak kanser biyobelirteçlerinde yapılan çalışmaların gösterdiği gibi; hastalıklı bölgeden lokal örnek alınırsa yüksek klinik değeri olan biyobelirteçleri keşfetme sansı o kadar daha fazla olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı PES olan ve olmayan gözlerde aköz hümörde protein içeriğini araştırmak, MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) metodu kullanılarak proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin karakterizasyonu ve tanımı,kantitatifdeğerlendirilmesini sağlamaktır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### Tanım

Psödoeksfoliasyon sendromu (PES), tanısı klinik olarak konan, lens ön kapsülü veya pupil kenarında gri beyaz fibrogranüler psödoeksfoliasyon materyali adı verilen maddenin ön segment muayenesinde görülmesi ile karakterize bir patolojidir.<sup>(6,7)</sup>

Psödoeksfoliasyon materyali (PEM), lens ön kapsülü ve iris dışında trabeküler yapı, zonüler bölge, siliyer cisim prosesleri, vitreus ön yüzeyi, konjonktiva, kornea, aköz hümör, arka siliyer arter, vorteks venleri, santral retinal arter, optik sinir kılıfları, orbita bağ doku septaları ve kapak derisinde de saptanmıştır.<sup>(1,11)</sup>

### Tarihçe

Fin'li oftalmolog Lindberg 1917 yılında glokomlu hastaların %50'inde pupil kenarında gri bir materyal bulunduğunu ortaya koymuş ve “*grayish flakes*” olarak bunu ilk tanımlayan olmuştur.<sup>(6,12)</sup> 1923'te Vogt bu materyalin lens kapsülünden kaynaklandığını öne sürerek “*glokoma capsülare*”, “*senile eksfoliasyon*” terimlerini kullandı.<sup>(6,13)</sup> Tarkkanen siliyer proseslerde, Ringuold konjonktiva dokusunda psödoeksfoliatif materyal varlığını, Sampaolesi ise kan-aköz bariyerindeki değişiklikleri ve melanin dispersiyonunu gösterdi.<sup>(6)</sup> 1992 yılında SchlötzerSchrehardt ve ark.<sup>(1)</sup> ilk olarak sistemik tutulumu göstermesini takiben çok kısa sürede Streeten ve ark.<sup>(8)</sup> sistemik tutulumla ilgili çalışmalarını yayınladılar.

### Terminoloji

Cam üfleyicilerinin “gerçek lens eksfoliasyon hastalığı”nda lens kapsülünün sıcaklık etkisiyle gerçek bir eksfoliasyonu (dökülmesi) mevcut iken, PES’de ekstraselüler matriks materyalinin birikimi söz konusudur.<sup>(6,14)</sup> Bu görünüm üretimde artma, materyal rezorpsiyonunda azalma veya her ikisinden kaynaklanabilir. Dvorak-Theobald’ın önerdiği ‘psödoeksfoliasyon’ terimi cam üfleyicilerinin “gerçek lens eksfoliasyon hastalığı”ndan

ayrımı açısından daha mantıklıdır.<sup>(6,15)</sup> Ancak hala “eksfoliasyon” terimini kullanan araştırmacılar da vardır.

## **Epidemiyoloji**

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar PES’in tüm dünyada yaygın olduğunu ancak sıklığının değişik etnik gruplarda ve ırklarda farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. PES beyaz ırkta çok daha yüksek oranlarda bildirilmektedir; İzlanda’da prevalansı %28, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa’da %1.6-6.3 arasında bildirilmiştir.<sup>(15,16)</sup> Yayınlarda en yüksek insidans İskandinav popülasyonunda izlenirken, Grönland Eskimoları’nda prevalans %0 olarak bildirilmiştir.<sup>(17)</sup> Asya ve Afrika popülasyonlarında PES prevalansı daha düşük olarak bildirilmektedir: Hong Kong Çinlileri’nde %0.416, Singapur Çinlileri’nde 60 yaş üstünde %0.717, Japonlarda 50 yaş üstünde %3.418, Hindistan’da %3.01-6.28 arasındadır.<sup>(15,16,18,19)</sup> Türkiye genelinde yapılmış bir prevalans çalışması mevcut olmamakla birlikte, Yalaz ve arkadaşları Çukurova Yöresi’nde yaptıkları çalışmada 60 yaş üzerinde PES sıklığını %11.2 olarak saptamıştır.<sup>(20)</sup> Komşumuz Yunanistan’ın Girit Adası’nda yapılan epidemiyolojik bir çalışmada PES prevalansı %16.1 olarak saptanmış olup bu Yunanistan’ın ana adalarında yapılan çalışmaların sonuçlarından daha düşüktür.<sup>(21)</sup> PES sıklığının yaş eşleştirmeli coğrafik ve etnik popülasyonlarda bile farklılık göstermesinin altındaki neden tam olarak bilinmemekle birlikte genetik alt yapıdaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.<sup>(22)</sup> Ayrıca bu farklılıkta çevresel (güneş ışığı) ve nutrisyonel faktörler de sorumlu tutulmaktadır.<sup>(23)</sup> Cinsiyet dağılımı ile ilgili pek çok tartışma mevcuttur. Bazı çalışmalar da cins farkı olmadığı bildirilirken,<sup>(20)</sup> bazılarında erkeklerde<sup>(21,24)</sup> bazılarında ise kadınlarda yüksek prevalans bildirilmiştir.<sup>(25)</sup> Prevalans yaşla birlikte artmaktadır ve en yüksek değerlere 70-80 yaş arasında rastlanmaktadır. Reykjavik Çalışmasında 70 yaş ve üstü Finlilerde prevalans %22; 80 yaş ve üstü İzlandalılarda prevalans %40’a ulaşmaktadır.<sup>(26)</sup> Framingham Eye Çalışmasında glokomu bulunmayan kişilerde 52-64 yaş arasında PES insidansı %0,6 iken 75-85 yaş arasında bu oran %5’e çıkmaktadır.<sup>(27)</sup>

## **Prognoz**

Glokom gelişme riski PES olan kişilerde olmayanlara göre 5 ila 10 kez daha yüksektir ve bu risk zamanla kümülatif olarak artmaktadır. PES olan hastaların yaklaşık %25’inde

GİB artışı ve bunların da üçte birinde glokom gelişmektedir. Bu kişilerde glokom progresif seyrederek.<sup>(28,29)</sup> PESG olan hastalarda gün içinde GİB dalgalanması PAAG hastalarına kıyasla daha fazladır. Bu hastalarda medikal tedaviye direnç daha fazla ve tedavide başarısızlıklar daha sıktır.<sup>(30)</sup>

PESG, PAAG'e göre daha ciddi bir klinik seyrederek ve kötü prognoza sahiptir. Ortalama GİB genel popülasyona göre PES olan normotansif hastalarda daha fazladır ve PESG olan hastalarda tanı aşamasında GİB, PAAG olan hastalardan daha yüksektir. GİB düzeyi ne olursa olsun, PES olan gözlerde glokom hasarı olasılığı daha yüksektir. Tanı anındaki optik sinir hasarı, görme alanı kaybı daha sık ve ciddidir. Cerrahi müdahaleye daha sık gereksinim vardır.

## **Etiyoloji**

Coğrafi dağılımın yanı sıra; ailesel agregasyon, hastaların yakınlarında PES için artmış risk, iki kuşak içinde iletim, tek yumurta ikizlerinde yüksek uyum oranları, heterozigotluk kaybı ve HLA çalışmaları PES için genetik bir temelin olduğunu desteklemektedir.<sup>(31,32)</sup>

Hastalığın otozomal dominant kalıtıma sahip olduğu düşünülüyor. Ama geç başlangıçlı olması ve inkomplet penetrans göstermesi genetik analizlerde önemli sorunlar oluşturmaktadır.

Bugüne kadar çeşitli kromozomal bölgeler PES ile ilişkilendirilmiştir. İzlanda ve İsveç'te yapılan iki ayrı çalışma ile LOXL-1 geninin varyantları ile PES ve PESG arasındaki ilişkinin keşfi patolojiyi daha iyi anlamamızı sağlamıştır.<sup>(33)</sup>

LOXL-1, kromozom 15 üzerinde yer alan, elastin metabolizmasında rol oynayan proteinlerin bir üyesidir. Çalışılan her popülasyonda LOXL-1 geni ile ilgili en az bir varyantın olması PES ile ilişkili varyantların eksfoliyasyon patolojisinde doğrudan bir rol oynadığını düşündürmektedir. Günümüze kadar üzerinde çalışılan her popülasyonda bu kodlama varyantlarının bir veya daha fazlası için rapor edilmiştir.

CDKN2BAS varyantlarının ve kromozom 8'deki bir intergenik bölgenin hastalarda glokom gelişme riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.<sup>(34)</sup> Bu iki varyant da PAAG ile ilişkilidir. Ancak LOXL-1 geni ile PAAG arasında ilişki bulunmamaktadır. Birçok genin eksfoliyasyonun fenotipine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Beslenme faktörleri,

otoimmünite, enfeksiyöz ajanlar ve travma gibi genetik olmayan faktörlerin de aynı zamanda patogeneizde rol oynadığı iddia edilmiştir.

PES;40 yaş altı hastalarda teşhis edilen kişilerde,özellikle irise olan,genellikle anterior segment travma öyküsü,geçirilmiş göz içi cerrahi veya yaşlı vericilerden greft ile kornea nakli öyküsü vardır. Bu olayların yatkınlığı olan bireyde PES'in erken gelişimi için tetikleyici etkide olabileceği düşünülmektedir.<sup>(35)</sup>

## Patogenez

PES'in spesifik patolojisi ve eksofoliyatif materyalin kesin bileşimi hala bilinmemektedir.Anormal ve patognomik fibriler matriks ürünlerinin kronik birikimi ile tipik ışık mikroskopik ve ultrastrüktürel bir görünümü vardır.Hem aşırı de novo sentez hem de yetersiz turnover buna neden olur. PEM'in ultrastrüktürel görünümü, fibrogranüler matriks ve bazen spiral benzeri sarılmış 8-10 nm çapındaki mikrofibrillerin bir araya gelmesi ile oluşur.Mikrofibriler kor, çeşitli glikokonjugatların biraraya gelmesi ile oluşmuş elektron-dense amorf madde ile çevrelenir. Epitelyal,endotelyal ve mezenşimal kökenli hücreler fibriler formasyonda intra ve ekstraselüler olarak yer alır.<sup>(6,35)</sup>

İmmunohistokimyasal çalışmalarda PES fibrillerinin karmaşık yapısı gösterilmiştir. Kompleks, kross-linked , yüksek oranda glikolize glikoprotein/proteoglikan yapısı taşıyan elastik lif epitoplari ve bazal membran yapıları ( elastin, tropoelastin, amiloid P, vitronektin, fibronektin) ve heparan sülfat , elastik mikrofibril komponentleri (fibrillin-1, mikrofibril bağlantılı glikoprotein (MAGP-1), emilin ve latent transforme edici büyüme faktörü TGF- $\beta$ 1bağlayıcı proteinler (LTBP-1 ve LTBP) bu karmaşık yapının komponentleridir. PES fibrilleri ile birlikte görülen diğer proteinler; kros linking enzimleri, şaperonlar, apolipoproteinler, glikozaminoglikanlar, kompleman proteinleri, proteolitik enzimler ve inhibitörleri TGF- $\beta$ 1 gibi sitokinlerdir.<sup>(35,36)</sup>

PES'li hastaların ön segment dokularında; elastik mikrofibril komponentlerinin mRNA'larının up-regule olduğu ve protein düzeylerinin arttığı kross-linking enzimi transglutaminaz- 2 (TGase-2) in desteklediği de novo sentez, agregasyon ve elastik lif komponentlerinin çapraz-bağlanmasının olduğu görülmüştür.<sup>(37)</sup>Elastik fibrillerin ve mikrofibril komponentlerinin aşırı ve de novo sentezi , matriks metalloproteinazları(MMP) ile doku inhibitorleri (TIMPs) arasındaki denge değişir. Aköz hümörde ve dokularda MMP

aktivitesi azalır. Elastotik, kross-linked fibriler materyelin dokularda birikimine neden olur.<sup>(38)</sup>

PES'in aslında bir elastik mikrofibrillopati olduğu düşünülmektedir. Büyük bir glikoprotein olan fibrillin-1, moleküller arası multiple etkileşimlere neden olur ve PES fibrillerinin temel bileşenini oluşturur.<sup>(11)</sup> Lizil oksidaz ailesinin bir üyesi olan LOXL-1 hücre dışı matris oluşumunda çok önemli bir enzimdir. Lizil oksidaz ailesi lizin veya hidroksilizin oksidatif deaminasyonu yoluyla kolajen ve elastinin çapraz bağlanmasını katalize eden lizil oksidaz (LOX) ve lisil oksidaz like 1-4 (LOXL1-4) enzimlerinden oluşur.<sup>(39)</sup>

Oksidatif stres ve iskemi /hipoksi gibi hücrel stres şartlarının pro-fibrotik sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin artmasına neden olmakta, bu faktörlerin de anormal ekfoliasyon fibrillerinin sentezini stimüle edebileceği düşünülmektedir.<sup>(40,41,42)</sup>

TGF- $\beta$ 1'in fibrotik sürecin merkezi bir aracısı olarak stimüle ettiği düşünülmektedir. TGF- $\beta$ 1'in aktif ve latent form düzeyleri PES sendromlu hastaların aköz hümöründe artmıştır. TGF- $\beta$ 1'in anterior segment dokularında aktif olarak üretildiği, çoğu geni regüle ettiği PES dokularında farklı şekilde eksprese olduğu bulunmuştur. Fibrillin-1, LTBP-1 ve 2, tropoelastin, TGase-2, klusterin ve LOXL-1 düzenlediği proteinlerdendir.<sup>(40)</sup> TGF- $\beta$ 1, lisil oksidaz ile etkileşerek elastik fiber formasyonunu etkilemektedir.

Proinflamatuvar ve profibrotik sitokin olan IL-6'nın PES'in erken evrelerinde upregule olduğu gösterilmiştir.

PES hastalarda bozulmuş antioksidan koruma mekanizmaları ve artmış oksidatif stresin varlığı gösterilmiştir.<sup>(43)</sup> Askorbik asit ve glutatyon azalmış, 8-isoprostaglandine F2a ve malondialdehid düzeyleri artmış. PES hastalarında oksidatif stres markerları serum, aköz hümör ve dokularda gösterilmiştir.<sup>(44)</sup> Özellikle iris hipoperfüzyonu ve ön kamara iskemisi LOXL-1 ekspresyonunu ve matris moleküllerinin sentezini regüle eder. PES hastalarının aköz hümörlerinde artmış düzeyde homosistein ve endotelin-1 bulunmaktadır.<sup>(45,46)</sup>

Bazı koruyucu proteinler çeşitli ısı şok proteinleri PES dokularında up regule olmakta ; glutatyon-S-transferaz , ubiquitin- konjuge enzimleri, DNA onarıcı proteinleri ve stres ile indüklenebilen transkripsiyon faktörleri gibi çoğu koruyucu genler ise PES hastalarının dokularında down regule olmaktadır.<sup>(37)</sup>

Ekstrasellüler bir şaperon olan klusterin agregasyon ve presipitasyonu engeller; klusterin, PES sendromu olan kişilerin ön segment dokularında ve aköz hümörlerinde anlamlı oranda down regüle olmaktadır.<sup>(47)</sup>

PES'li hastaların oküler dokularında; antioksidan savunma, proteozom ve şaperon fonksiyonları, endoplazmik retikulum ilişkili stres yanıtı ve DNA onarımını kapsayan hücre koruyucu mekanizmalarında değişiklikler meydana gelmektedir.

### **Eksfoliasyon Materyalinin Yapısı**

Eksfoliatif materyal eozinofilik, periyodik asit-Schiff pozitif boyanan yapıdadır. PES materyalinin formasyonunu açıklamak için protein alıcı modeli tanımlanmıştır.<sup>(43)</sup> Bu modele göre anormal bir nükleasyon proteini, aköz hümörde diğer proteinleri bağlayarak daha büyük bir protein kompleksi oluşturmaktadır. Bu protein kompleks de oküler yüzeylerde presipitatlar ve PES material depositleri oluşturmaktadır. PES 'in yanlış katlanmış proteinleri agregasyonu ve birikimi ile karakterize konformasyonel bir bozukluk olduğu düşünülmektedir.<sup>(43)</sup>

Elektron mikroskopi çalışmaları; eksfoliasyon materyalinin rasgele düzenlenmiş, elektron yoğun, periyodik çapraz bantlaşma paterninde fibrillerden oluştuğunu göstermiştir. Bu fibriller; yeni sentezlenen ya da önceden var olan mikrofibriler subünitlerin agregasyonları ile oluşur. Filamentler ortalama 10 nm çapındadır, bunların oluşturduğu daha büyük fibriller ortalama 50 nm çapındadır. Fibriller karakterisitk olarak bağlanırlar ve amorf bir zeminde bulunurlar. Bu amorf zemin periyodik asit- Schiff boyanan glikozaminoglikanlardan ve proteoglikanlardan oluşur ve fibriller ise protein yapıdadır.<sup>(1,43)</sup>

PEM çok çeşitli hücrelerden aktif ve multifokal olarak üretilir, aköz hümöre dağılır ve ön segment yapılarında depozitler oluşturur. Eksfoliasyon sürecine dahil olan hücreler; korneal endotel hücreleri, preekvatoryel lens epitel hücreleri , iristeki tüm hücreler, nonpigmente siliyer epitelyal hücreler ve endotelyal hücrelerdir. Bu hücrelerde belirgin kaba endoplazmik retikulum bulunur, hücre yüzeyine veziküler transport artar, ekstrasellüler boşluğa verilen mikrofibrilleri içeren zar girintileri oluşur.<sup>(50)</sup>

Immünohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar, eksfoliasyon materyali yüksek miktarda çapraz bağlantılar içeren, glikoproteinlerin ve proteoglikanlardan oluşan glikozile kompleks olduğunu göstermektedir. Çeşitli intraoküler ve ekstraoküler hücrelerin

membranlarına yakın eksfoliasyon fibrillerindeki fibrillin-1'in belirgin olarak boyandığı immünoelektron mikroskopide görülmektedir. Eksfoliasyon materyalinin bant paterni, izole fibrillin mikrofibrillerinin görünüşü "*bead on a string*"e benzemektedir. Fibrillin-1 de bu yapının, anormal depositlerin çekirdeğini forme eden integral yapıtaşdır.<sup>(50)</sup>

MMPs ve TIMPs arasındaki dengenin bozulması eksfoliasyon materyalinin birikimine neden olmaktadır.<sup>(50)</sup>

Heparan sülfat, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat proteoglikan, HNK-1 epitopu eksfoliasyon materyalinin karbonhidrat bileşenleridir. HNK-1 epitopu ekstraokuler ekstraokuler depozitlerde bulunmaz. İntraokuler ve ekstraokuler eksfoliasyon materyali karşılaştırıldığında protein içerikleri aynıdır ve farklı olan karbonhidrat bileşenleridir.<sup>(35)</sup>

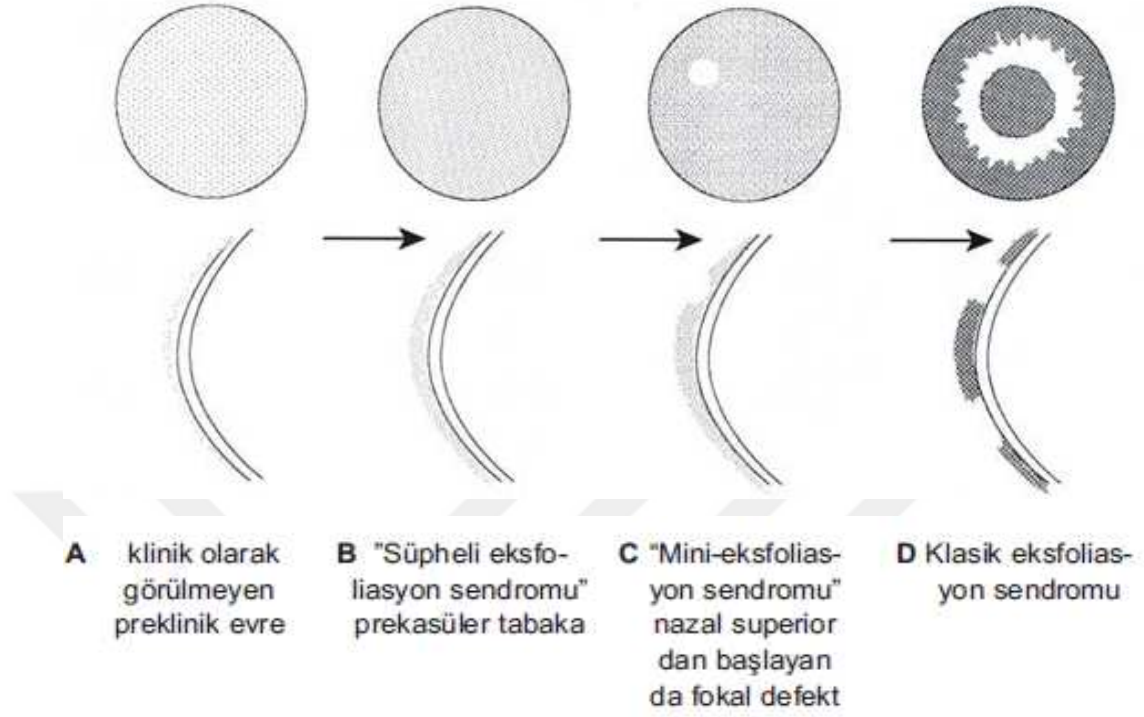
## **Klinik**

### **Korneal Değişiklikler**

Korneal endotelde eksfoliatif materyal pulcukları ve pigment birikimleri saçılmış, diffüz yada pigmenter glokomdaki Krukenberg içcikleri gibi dik içcikler şeklinde görülebilir. Eksfoliasyon sendromu olan gözlerde kornea endotelinin speküler mikroskopisi anlamlı ölçüde normalden düşük hücre yoğunluğu ve hücre boyut ve şekil değişikliği ortaya koymuştur.<sup>(51)</sup> Eksfoliatif materyal kümeleri korneal endotele yapışır ve posterior desme membranıyla kaynaşır. Eksfoliasyon sendromundaki endoteliyopati Fuchs endotelyal korneal distrofi; daha az ve daha difüz dağılmış guttata benzeri yapıların olması, ön segmentte daha fazla melanin dağılımı, peripapiller iris atrofi olmasıyla ayrılır.

### **Lens, Zonülve Silier Cisim Değişiklikleri**

Ön lens kapsülünde eksfoliatif materyalin karakteristik görünümü üç ayrı zona sahiptir. Translusen, arasıra kıvrımları olan santral disk (olguların %20 ya da daha fazlasında yoktur). Muhtemelen hareketli irise karşılık gelen saydam zon, Radyal çizgilenmeleri olabilen periferik granüler zon (sabit bulgudur, bazı olgularda lens değişikliklerinin görülebilmesi için pupil öncesinde dilate edilmelidir).



Şekil-1 Klinik olarak ön lens kapsülünde eksfoliyatif materyalin karakteristik görünümü

PES'in sıklığı yaşla beraber artmakta ve bir yaşlanma süreci olan kataraktöz lens değişimleri ile PES arasında ileri derecede anlamlı bir ilişkinin var olduğu düşünülmektedir.<sup>(52)</sup>

PES olan gözlerde katarakt sık ortaya çıkar ve daha çok nükleer opasite, daha az kortikal ve supranükleer opasite şeklindedir. Unioküler PES olan gözlerde, sendromun olduğu gözde tipik olarak daha ileri katarakt görülür.<sup>(52)</sup>

PEM en erken siliyer proseslerin üzerinde ve zonüllerde görülür. PEM içindeki proteolitik enzimler zonuler dağılmayı kolaylaştırır. PES'te lens zonülleri dejenere olmaktan ziyade siliyer cisim ve lense yapışma yerlerinden mekanik gevşeme ve enzimatik zonüloлизis sonucu ayrılır. Bu da klinik olarak iridofakodonezis, spontan lens subluksasyonu veya dislokasyonu, açılı kapanması ve hatta siliyer blok glokomu ile sonuçlanabilmektedir.<sup>(53)</sup>



## **İris Değişiklikleri**

Eksfoliyatif materyal, irisin pupiller kenarında pupiller ruff da pigment kaybı ile beyaz pulcuklar olarak görülebilir. İrisin transillüminasyonunda tipik olarak pupiller sfinkterin kenarında güve yeniği paterni görülür.

Işık ve elektron mikroskopisi irisin posterior yüzeyinde eksfoliyatif materyali gösterir. İrisin fluoresan anjiyografi çalışmalarında; hipoperfüzyon, peripupiller sızıntı ve neovaskülarizasyon görülebilir. Ultrayapısal çalışmalar vasküler bozuklukların ya da anormal ekstraselüler matriks oluşumunun doku hipoksisine neden olduğunu akla getirmektedir. İris hipoksisini, iris pigment epitelinin, stromanın ya da kasın atrofisi ile ilişkilidir. Pigment epitelinin atrofisi, ön kamara melanin dispersiyonu ile ilişkilidir ve kas hücrelerinin atrofisi zayıf midriasisine neden olur.

## **Gonioskopik Bulgular**

PES artan trabeküler ağ pigmentasyonunun neden olduğu aşırı pigment dağılımı ile ilişkilidir. Ağ pigmentasyonu pigmentli glokomda görülenden daha alacalı dağılım gösterir ve eksfoliyatif materyal pulcukları ile ilişkili olabilir.

Pigment birikimi Schwalbe Çizgisi boyunca görülebilir ve Sampaolesi çizgisi olarak adlandırılır.

Asimetrik ağ pigmentasyonu olan gözde glokom daha çok pigmentasyonu fazla olan gözde görülür. Diğer gözde PES olmadan trabeküler ağın artmış pigmentasyonu gözlenebilir ve PES'in en erken bulgusu olarak saptanabilir.

PES'de ön kamara derinliği normal olmasına rağmen, vakaların yüksek oranında ön kamara açısı kapanabilir saptanmıştır. Ön kamara açısı kapanabilir olgular tipik olarak daha sık santral ve periferik ön kamara derinliğine sahiptir.

PES olan hastalarda yapılan çalışmalarda, %9-%18'inde açığı kapanabilir olarak değerlendirilmiş, %14'ünde ise periferik anterior sineşiye bağlı kapalı açığı bulgusu görülmüş.<sup>(54,55)</sup>

Yapılan mikroskobik çalışmalar; aktif eksfoliasyon üretiminin trabeküler ağ, Schlemm kanalı, ve toplayıcı kanallar içinde olduğu gibi intertrabeküler boşluklar içinde pasif birikim ile oluşabileceğini göstermektedir.<sup>(56)</sup>

İleri vakalarda eksfoliyatif materyalin sürekli birikimi jukstakanalikuler ağın şişmesi ve Schlemm kanal yapısının yavaş yavaş daralması ve deorganizasyonuna neden olmaktadır.

Ara ara çoğalan ve göç eden endotel hücreleri pretrabeküler ağın anormal matriksini üretir ve bu matriks uveal ağın iç yüzeyini kaplar.

Eksfoliyatif materyal ayrıca katarakt cerrahisi sonrası afakik gözlerde ön hyaloidde ve pseudofakik gözlerde arka kamara intraoküler lens üzerinde görülebilir. Eksfoliasyon sendromu olan gözlerde ayrıca artmış aköz flare görülür.

### **Ultrason Biyomikroskopik Bulgular**

Ultrasonografik biyomikroskopi özellikle pupil kolay dilate olmadığında ve PES'in tanısı kesin olmadığında zonullerde yada periferik lens kapsülünde eksfoliasyon sendromu materyalinin varlığını araştırmakta önemli bir araçtır.

### **Ön Kamara, Aköz Hümör ve Trabekülüm**

İridokorneal açının kapanması ve kapalı açılı glokom insidansı normal popülasyona göre daha fazladır.<sup>(29)</sup> Bunun nedeni zonül frajilitesi ve miyotik tedavisi nedeniyle lens-iris diaframının öne gelmesi, periferik anterior ve posterior sineşilerin sık görülmesi, ön kamaranın sığlaşmasıdır. Ayrıca psödoeksfoliyatif materyalin birikimi nedeniyle rijid olan irisin, arka kamara basıncı ile en zayıf yeri olan iris kökünden öne bükülmesi, gonyoskopide “psödoplato iris” konfigürasyonu görülmesine yol açmaktadır. Pupil hareketleri esnasında ön kamarada normal olgulara göre daha fazla pigment dispersiyonu gelişir. İris pigment epiteli kaynaklı olan bu dispersiyon, kaba lens yüzeyi tarafından sürtünmesi sonucu mu yoksa irisin kendisinden kaynaklanan fundamental bir defektten mi kaynaklandığı açık değildir. Trabeküler ağın pigmentasyonu, normal ve primer açık açılı glokomlu olgulara göre PES’li olgularda daha fazladır. Açıdaki pigmentasyon, trabeküler ağın alt kısmında daha yoğun olup; pigmenter glokoma nazaran daha kaba ve siliktir.<sup>(57)</sup> PES’ da kan-aköz bariyerindeki defektin aközün yapısı ve protein içeriğindeki

değişikliklerden dolayı aköz flare artışına sebep olduğu düşünülmektedir.<sup>(58-62)</sup> Trabeküler ağın jukstakanaliküler bölümlerinde PEM'in pasif birikimini ve aktif lokal üretimini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.<sup>(11,38,55)</sup> PEM'in progresif akümülayonu ileri evrelerde, jukstakanaliküler dokunun şişmesine ve Schlemm kanal yapısının belirgin dezorganizasyonuna yol açmaktadır. Sonuç olarak psödoeksfoliatif materyalin trabeküler dokuda aşırı akümülayonu, içerdiği lizozomal proteinazlar nedeniyle geliştirdiği dejeneratif değişiklikler, hipoksi nedeniyle trabeküler yapıdaki endotelial proliferasyonu, kan-aköz bariyerindeki defekt nedeniyle aközde artmış protein seviyeleri ve iris pigment epitelinden salınmış melanin pigment depozisyonu sonucu dışa akım bölgesinde rezistans, kronik basınç yükselmesi ve glokom gelişiminde nedensel faktörler olarak görünmektedir.<sup>(6,38,68)</sup>

### **Bilateralite**

Klinik olarak unilateral tutulum bilateral tutulum için sıklıkla öncüdür ve tanıdan 5-10 yıl sonra hastaların %50'ye yakınında bilateralizasyon bildirilmiştir, genelde diğer gözde 5 yıl içinde PES görülme sıklığı % 6.8, 10 yıl içinde ise % 16.8 'dir.<sup>(63)</sup> Bilateral tutulumu olan hastalar unilateral tutulumu olanlara göre daha yaşlı olmaya ve daha yüksek glokom prevalansına sahip olmaya eğilimlidirler.<sup>(65,29)</sup> Klinik olarak tüm tutulan ve tutulmayan kontralateral gözlerin neredeyse hepsinde konjonktiva ve diğer peribulber dokularında, elektronmikroskopi ile tipik PES akümülayonu saptanmıştır.<sup>(66-69)</sup> Başka bir ışık mikroskopik immünohistokimyasal çalışmada klinik olarak etkilenmemiş gözlerin periferik irisdamarlarında klasik psödoeksfoliasyona benzeyen anormal depozitler saptanmıştır.<sup>(70,71)</sup> Bu bulgular, sözde unilateral PES, gerçekte unilateral olmaktan daha ziyade hastalığın klinik asimetric tutulumu olduğunu göstermektedir.<sup>(65)</sup> Bu asimetriyi saptayan neden günümüzde hala açıklanamamıştır.<sup>(67)</sup>

### **Sistemik tutulum**

Birçok çalışmada PES'de cilt, akciğer, karaciğer, kalp, safra kesesi ve meninkslerde tutulum gösterilmiştir.<sup>(9)</sup> Yapılan postmortem çalışmalarda da kalp karaciğer ve akciğerde PEM tesbit edilmiştir.<sup>(9)</sup> PES'te en önemli tutulum yerlerinin başında vasküler yapılar

gelmektedir. İrisde ve birçok oküler vasküler yapıda tesbit edilen PEM'in, retinada vasküler tıkanıklıklarda rolü olduğu düşünülmektedir.<sup>(72)</sup> Aynı zamanda PEM'in; sistemik hipertansiyon, anjina, miyokard enfarktı, abdominal aort anevrizması, geçici iskemik atak ve serebrovasküler olaylar, Alzheimer hastalığı, sensorinöral işitme kaybı gibi bir çok sistemik olayda da rol aldığı düşünülmektedir.<sup>(73)</sup> Mitchell ve ark. geniş bir seride PES'deki olası vasküler tutulumları incelemiştir. 3546 hastada anjina, hipertansiyon, inme ve miyokard enfarktüsü araştırılmıştır. Hastaların 80'de tek ya da çift taraflı PES tesbit edilmiştir. Bu 80 hastanın % 23,8'de anjina, % 51,3'te hipertansiyon, % 11,3'te inme ve % 13,8'de miyokard enfarktüsü bulunduğu bildirilmiştir. PES'i olmayan olgularda, inme dışında, bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az bulunmuştur.<sup>(74)</sup> Repo ve ark. Geçici iskemik atak görülen hastalarda PES sıklığının artmış olduğunu göstermişlerdir.<sup>(75)</sup> PES'li hastalarda vasküler patolojilere olan yatkınlığın kabul görmesiyle, birtakım hematolojik değişikliklerin de olabileceği fikri ile yapılan çalışmalar da vardır.<sup>(75)</sup> PES'nun göz dışı birçok dokuda olup organlarda da tesbit edilmesiyle, fibrillerin iç kulakta da depolanıp işitmeyi engelleyebileceği düşünülmüştür.<sup>(75)</sup> PES'lu hastalarda ılımlı orta düzeylerde artmış seviyelerde kan homosistein düzeyleri saptanmıştır. Bu artışın PES'taki vasküler risklerin olası sebeplerinden biri olabileceği öne sürülmüştür. Bir çok çalışmada PES'ta plazma homosistein düzeylerinin arttığı gösterilirken, glom gelişimiyle ilişkisi gösterilememiştir.<sup>(77,78)</sup> Ancak homosisteinin ekstraselüler matriks metabolizmasındaki rolü göz önüne alındığında, özellikle de PES'da, homosistein metabolizmasında yer alan vitamin B12, B6 ve folat eksikliklerinin olduğu bulunduktan sonra, tedavi hedefi olması açısından önem kazanmıştır.<sup>(78)</sup>

## **Proteomiks**

Genomun tüm protein komplementlerini (proteom) çalışan bilim dalı Proteomiks olarak adlandırılmaktadır. Proteomiks ve proteom terimleri Marc Wilkins ve arkadaşlarınca 1990'larda türetilmiştir. Bu kelimeler tüm bir organizmadaki tüm genlerin kolleksiyonlarını ifade eden genomiks ve genom kelimelerinin yansımalarıdır. Proteomiks, çok genel anlamı ile RNA-protein ilişkisini açıklamaya çalışan, hücre ve dokuları oluşturan proteinlerin ifade bulmaları sırasındaki post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile ilgilenen bir bilim dalıdır.<sup>(79)</sup> Hücrede gerçekleşen

posttranslasyonel modifikasyonlar normal ve patolojik dokulardaki farklılıkları belirler ve proteinde görülen post-modifikasyonların tümünün bilgisini protein kodlayan bölgelerdeki genomik bilgi tek başına veremez. Bu nedenlerle, genomik çalışmalar her zaman nihai protein ekspresyonu hakkında doğru bilgiler sağlayamaz iken yapılan proteom çalışmaları, genomik analizlerle belirlenemeyecek şekilde pek çok farklı yoldan gerçekleşen hastalık patolojisini ve fenotipini ortaya koyabilmektedir.

Klinik proteomiks temel amaçları şu şekilde özetlenebilecek ümit verici, yeni bir analitik disiplindir: hastalıkların erken tanısı, risklerin veya tedavi yanıtlarının izlenebilmesi için biyobelirteçlerin keşfi; klinik sonuçları düzeltebilecek yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için protein hedeflerinin tespit edilebilmesi.

## **Biyobelirteçler**

Hastalıkların patofizyolojisinin zamanla anlaşılması hastaların başarıyla tedavi edilebilmesini etkileyen en temel faktördür.<sup>(80)</sup> Günümüzde biyolojik örneklerde moleküler yöntemler kullanılarak bir takım belirteçler yardımı ile tanı konulması olağan bir uygulamadır. Belirteçlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin tespit edilmesi hastalıklar için yüksek riskli bireylerin taranmasını, erken tanı konulmasını, prognoz tahminini ve tedavi yanıtının izlenmesini sağlamaktadır. Klinik uygulamada kullanılan bu belirteçlerin esas amacı mortalite ve morbiditeyi azaltmaktır. Biyobelirteçler genellikle monoklonal antikor tabanlı metodlarla tespit edilen veya miktarı ölçülen protein molekülleridir. Ancak günümüzde biyobelirteç olarak kullanılan veya belirteç potansiyeli olan birçok molekül tek başına ideal bir molekülün özelliklerini taşımamaktadır. Teorik olarak her hastalık özgün bir biyobelirteçle ortaya çıkarılabilir ve karakterize edilebilir ve bu belirteçler tek bir molekül olabilir. Başka bir alternatif ise hastalığa özgü bir protein olmak yerine hastalık durumunda posttranslasyonel modifikasyonlarla değişmiş olan bir protein veya proteinler paneli olabilir.<sup>(81)</sup> Proteinlerin tanısal araç olarak potansiyelinin bilinmesi ve proteomiks teknolojilerdeki ilerlemeler biyobelirteç araştırmalarına ilginin artmasına neden olmuştur.

## Proteom Analizinde Kullanılan Genel Strateji

Proteomiks ile proteom ve onun komponentlerinin karakterizasyonu işi pratikte yapılabilmektedir. Proteom analizi için ilk adım örnek hazırlığı yapılmalıdır. Tüm hücre ve doku özütlerinde proteinlerin analizleri amacıyla örnek hazırlanmasındaki ana problem; bunların farklı moleküler kütle, yük, izoelektrik nokta ve çözünürlüğe sahip olmalarıdır.<sup>(82)</sup> Ayrıca bu aşamada örnek karmaşıklığının azaltılması da önemlidir. Proteom analizinde ikinci adım analitik protein ayırma teknolojisidir. Analitik protein ayırma teknolojisinde önce kompleks protein karışımlarını belli proteinlere ya da protein alt gruplarına ayrılarak basitleştirir. Daha sonra örnekler arasında karşılaştırma yapılarak protein düzeylerindeki farklılıklar belirlenir. Proteinlerin ayırma araştırıcısına analizi için spesifik proteinleri hedeflemesini sağlar. Protein ayırmanın yapılabilmemesi için iki tip metodoloji mevcuttur. Bunlardan ilki sıvı fazda ayırma yapıldığı metoddur.<sup>(82-83)</sup> İkinci metod ise proteomikte altın standart olup sıklıkla tercih edilen 2D (iki boyutlu) jel elektroforez metodudur. Bununla birlikte diğer protein ayırma teknikleri 1D jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi 1. SDS- PAGE (denatüre edici page) ve 2. ND-PAGE (non denatüre edici page), HPLC (yüksek performans likit kromatografisi), kapiler elektroforez, izoelektrik fokuslama ve kromatografik yöntemlerdir.<sup>(82,83)</sup> Ayırılmış örneklerin analizi, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-ToF), ESI-MS (Elektrospray Ionizasyon Mass Spektrometri), PSDMALDIMS (Post Source Decay) ve SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) yöntemleri ile yapılır. Kütle spektrumu ve kromatogram verileri alınan örnekler için veri tabanında tarama yapılmakta ve belirli olasılıklarla protein eşleştirmeleri elde edilmektedir. MALDI-TOF ile protein bilgisine ulaşıp proteinin adı konulduktan sonra, ESI-MS için kullanılan Q-TOF ile amino asit dizilimlerine ulaşarak proteinlerin primer amino asit dizileri aydınlatılabilmektedir. Veri tabanları üzerinden kimliği belirlenmiş olan proteinler değerlendirilerek farklı tedavi dozlarına yanıt, tedavi edilen ve edilmeyen bireylerdeki protein haritaları veya farklı hastalıkları taşıyan vakalar ile kontrol grupları arasında fark doğrudan ve en güvenilir şekilde ortaya koyulmaktadır.<sup>(82,83)</sup>

## MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi Analizi

Kütle spektrometre aletleri iyonlaştırılmış maddeleri gazfazında analiz ederler. Bu nedenle bir kütle spektrometresi iyon kaynağı, kütle/yük oranını belirleyebilen bir kütle analiz cihazı ve bir detektörden oluşur. Proteinlerin ve biyolojik moleküllerin gaz fazına taşınılabilmesi ESI(elektron-spray iyonizasyon) veya MALDI(matriks assisted laser desorption/ionization) teknikleri ile yapılır. MALDI tekniğinde analizi yapılacak maddeler katı bir kristal matriks ortamından lazerle iyonize edilir. Matriksin olmadığı ortamda biyomolekül parçalanacağı için matriksin kullanılması şarttır. İyonlaştırılmış biyomoleküller elektrik alan içerisinde hızlandırılarak bir tüp içerisine aktarılır. İyonların bu tüp içerisindeki hızları her bir iyonun kütle ve yükü ile doğru orantılıdır. Böylece her bir iyonun tüpten çıkış anı sahip olduğu kütle/yük sinyal oranına bağlı olarak değişir.

MALDI-TOF metodu kullanılarak proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin karakterizasyonu ve tanımı mümkündür. Bu metod oldukça duyarlı olup moleküler ağırlıkları 400 ile 350,000 Da arasındaki polipeptidlerin 10<sup>-15</sup> - 10<sup>-18</sup> mol seviyesinde tanımlanmasını sağlar. 3.7 Elde edilen kütle/yük değerlerinin analizi MALDI-TOF analizinden elde edilen kütle/yük değerleri Swiss-Prot data bankasında Prospector adı verilen ve ücretsiz ulaşılabilen bir programda araştırılabilir (<http://prospector.ucsf.edu/>). Bu programın amacı araştırılan proteinin kütle/yük değerlerini bugüne kadar bilinen tüm kütle/yük değerleri ile karşılaştırmak, veri tabanındaki değerlerle eşleşip eşleşmediğini araştırmak ve hangi proteine ait olduğunu tespit etmeye çalışmaktır. Protein prospector içerisinde birkaç farklı programı kullanmak mümkündür.

(Kaynak: Swiss-Prot data bankası, <http://prospector.ucsf.edu/>)

Bu bağlamda kullanabileceğimiz ikinci bir program da Peptident adı altında sunulan ve ExPasy veri bankası tarafından ücretsiz olarak kullanıma açılan veri (<http://ca.expasy.org/tools/peptident.html>). Oldukça kolay kullanılabilen bir kullanıcı-ortamına (interface) sahip olan bu program elde edilen kütle/yük değerlerini direk olarak veri bankası içerisinde araştırır.

Kısacası proteomiks analizinde kullanılan genel strateji;

(1) Ekstraksiyon, solübilizasyon, ön-fraksiyonlama, DNA'nın uzaklaştırılması, yaygın bulunan proteinlerin uzaklaştırılması gibi teknikleri içeren örnek hazırlığı.

(2) Protein ve/veya Peptitlerin tanımlanması (identifikasyonu) ve elektroforeze dayalı tekniklerin kullanımı.

### **Karşılaştırmalı Proteomiks Çalışmalarının Amacı:**

Klinik proteomiks çalışmalarında temel amaç, farklı hastalıklara ait özgün biyobelirteçlerin ortaya konması ve bunun tanı testi olarak kullanılmasıdır. Biyokimyasal mekanizmaların 60 karmaşıklığı nedeni ile, bir çok hastalıkta tek bir biyolojik belirteç ile sonuca ulaşılamamaktadır. Bu nedenle hastalık progresyonu sırasında ortaya çıkan moleküllerin çalışılmasında, çoklu belirteç panellerinin veya proteomiks panellerinin çalışılması giderek önem kazanmaktadır.<sup>(84,85)</sup>

Normal biyolojik süreçlerin ve hastalıkların altında yatan mekanizmaların tanımlanması, vücut sıvılarında, hücrelerde veya doku biyopsilerinde diyagnostik ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanması, hastalık progresyonunun izlenmesi ve subklasifikasyonu, yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi, vücut sıvı örneklerinin veya doku biyopsilerinin orijinlerinin belirlenmesi, sıvı, hücre veya dokularda protein fenotiplerinin ve post-translasyonel modların belirlenmesi, immüoglobulin klonlarının araştırılması genetik otoimmün, enfeksiyonel veya neoplastik hastalıklar olarak tanımlanabilir.



## MATERYAL-METOD

Bu çalışmada;ön kamaradan örnek alımı işlemi Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Lokal Ameliyathanesinde yapılmıştır.Proteomiks değerlendimeler ve analizler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi KABİ Proteomiks Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir Çalışma Helsinki Bildirgesinde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Kliniği Glokom departmanından klinik olarak PES tanısı ile takipli olup,Aralık 2014 ve Ağustos 2015 tarihleri arasında katarakt tanısı konan 15 hasta PES grubunu oluşturmaktaydı ve yine aynı tarihler arasında poliklinik başvurusunda katarakt tanısı alan benzer demografik özelliklere sahip 15 hasta kontrol grubunu oluşturmaktaydı.

Tüm olgulara standart 2,8 mm saydam korneal kesili fakoemülsifikasyon cerrahisi ve göz içi lens (GİL) implantasyonu uygulandı.

Çalışmaya alınan tüm hastaların demografik özellikleri kaydedildi.Görme keskinliği ölçümü, GİB ölçümü, biyomikroskopik muayene ve fundus muayenesini içeren tam bir oftalmolojik muayene yapıldı.Biyomikroskopik muayenede ön segment, lens ve vitreus değerlendirildi.Ardından %1 siklopentolat hidroklorür ve %2.5 fenilefrin ile midriyazis sağlandıktan sonra +90 dioptrilik asferik lens ile fundus muayenesi yapıldı.Operasyon planlanan gözlere biyometrik ölçüm yapılarak GİL hesaplandı.

PES tanısı için %0.5'lik tropikamid (Tropamid®, Bilim, İstanbul, Türkiye) damlası ile midriyazis sonrası biyomikroskopik muayene ile lens ön kapsülü ya da pupil kenarı boyunca ve/veya gonioskopide açıda eksfoliasyon materyali görülmesi, göz içi basıncının (GİB) 21 mmHg'nın altında olması ve glokomatöz optik sinir hasarı ile görme alanı değişikliği olmaması şartı arandı.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Bilateral gözlerden yalnızca biri
- Görsel olarak anlamlı,cerrahiye ihtiyaç duyan katarakt
- Yarıkli lamba veya gonyoskopik muayenede aşikar PES varlığı

Sadece katarakt grubunda PES belirtilerinin olmayışı, glokom ve diğer oküler patolojilerinin olmayışı

Çalışma dışı bırakılma kriterleri:

- Daha önce geçirilmiş göz içi cerrahi
- 2 haftadan uzun süre kortikosteroid kullanımı
- Üveit,retinopati gibi önceden var olan göz hastalığı
- 6 aydan kısa süre takip edilen olgular
- Laser yapılmış gözler
- Matür katarktı olan olgular

Çalışmaya ciddi sistemik hastalığı olan, bilinen tiroid, böbrek, karaciğer fonksiyon bozukluğu, malabsorbsiyon, kardiyomyopati, akut miyokart enfaktüsü, psikiyatrik hastalık, akut infeksiyon, hormon replasman tedavisi hikayesi olan son 8 hafta içinde başta statin, fibrat, niasin, nikotinik asit gibi antihiperlipidemik ilaçlar almış olan, belirgin kilo kaybı olan ve en az bir yıl süre içerisinde sigara ve alkol kullanım öyküsü hastalar dahil edilmedi. Ayrıca geçirilmiş göz içi cerrahi, diyabetik retinopati, kuru göz ve primer açık açılı glokom gibi herhangi bir oküler hastalık varlığı da çalışmaya alınmama kriterleri içinde yer aldı.

Bu çalışma KOÜ Tıp Fakültesi Etik Komitesinden onay alınarak ve Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun olarak yapıldı. Her hastaya çalışma ile ilgili ayrıntılı bilgi verildi ve yazılı onamı alındı.

### **Örnek Alınma Biçimi**

Çalışma için onam vermiş olan uygun hastaların aköz hümör örnekleri katarakt ameliyatı sırasında alınmıştır. Bu işlem çalışmaya katılan tüm katılımcılarda aynı prosedür uygulanarak yapılmış ve hasta örneklerinin alınması sırasında oluşabilecek farklılıklar ortadan kaldırılmıştır.

Tüm müdahaleler ameliyathane koşullarında yapıldı. Kontrol gruplarında peribulber anesteziden sonra göz kapakları ve çevresi %10'luk povidon-iyodin emdirilmiş steril gazlı bezle silindi. Kurulandıktan sonra steril drape örtüldü. Katarakt cerrahisine başlanmadan önce ön kamaradan 30 gauge ucu takılmış insulin enjektörü ile girilip örnek alındı(yaklaşık

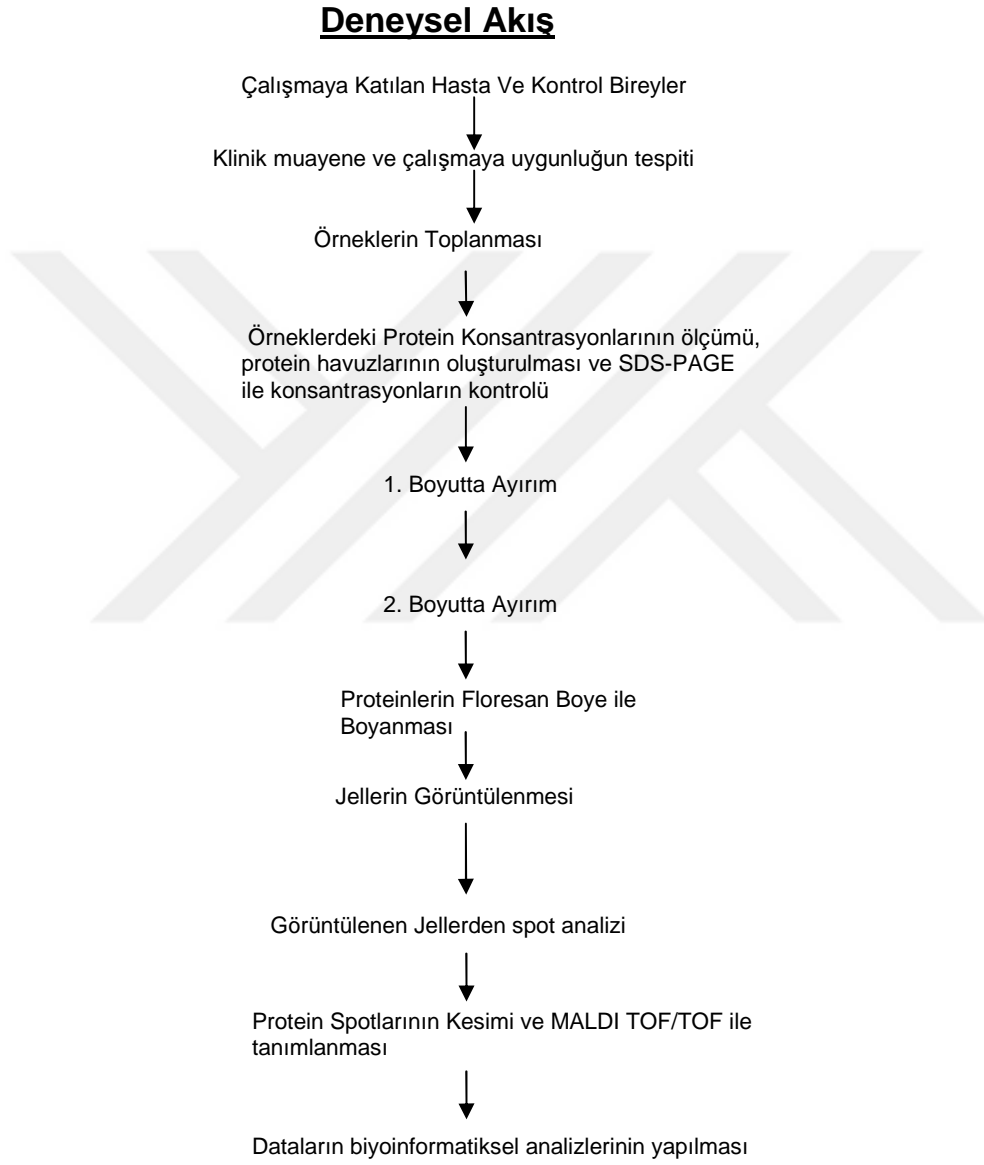
0,1 mL). Bu işlemlerin hiç birinde ön kamara koruyucu ve infüzyon kullanılmadı.Ardından rutin cerrahi prosedüre devam edildi.Hiçbir operasyonda komplikasyon gelişmedi.

Örnekler alınırken kan kontaminasyonunu engellemek için klear korneadan girildi,girilen kornea alanında ve çevresinde kan damarı olmadığından emin olundu. Alınan örnekler vakit kaybedilmeden steril Eppendorf tüplerine yerleştirildi, protein degradasyonuna fırsat vermemek için hemen KABİ Proteomiks Laboratuvarına ulaştırıldı , sıvı azot içerisinde dondurulup etiketlenip  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Örneklerin tüplere yerleştirilmesi ve transportu esnasında da özel eldiven giyilerek keratin ya da vücut yüzeyinden olası hücre kontaminasyonu engellenmeye çalışıldı.



Tez çalışmamızda kullandığımız deneysel yaklaşımların özeti akış şeması halinde Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil-2 Deneysel akış şeması

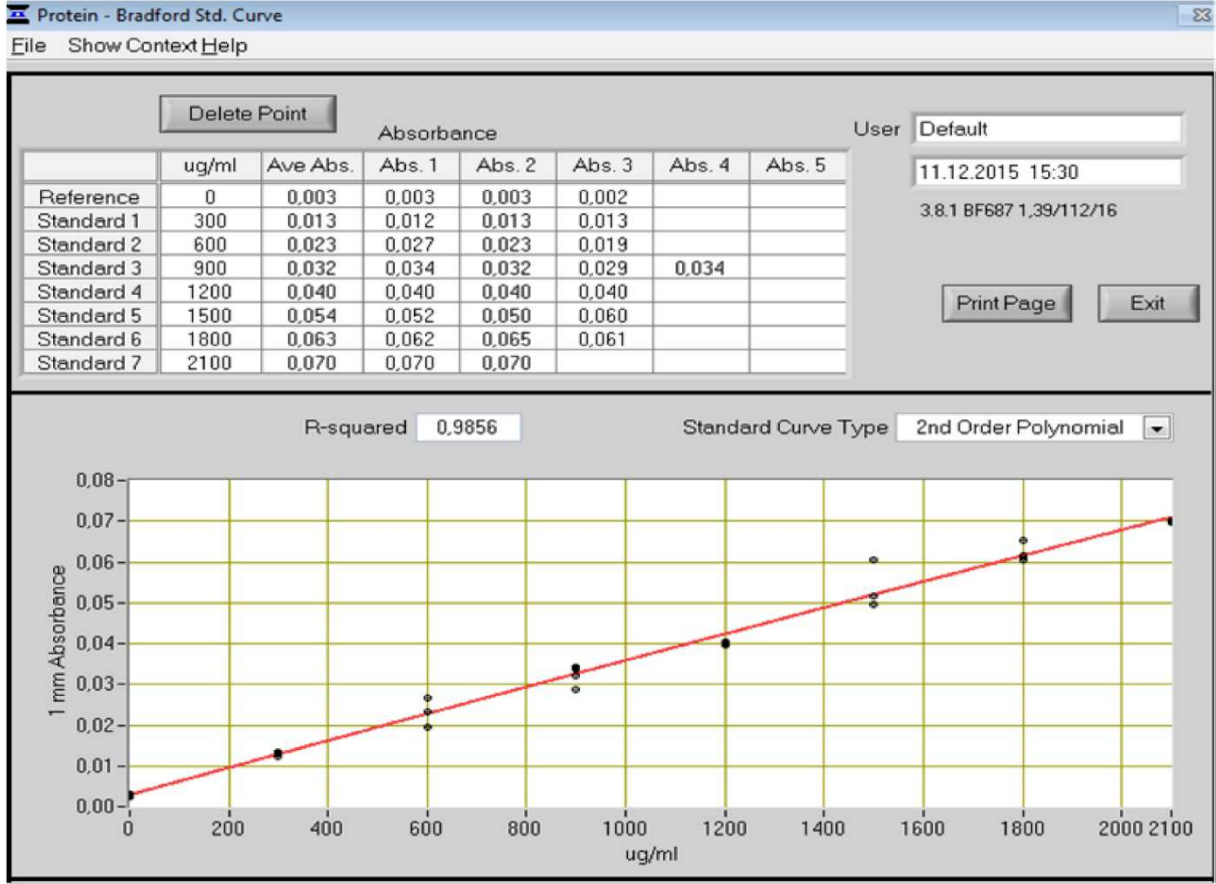
## **Örneklerden Protein Özütlelerinin Hazırlanması**

Saklandıkları  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan örnekler buz içinde tutularak (örneklerin ısınmasını engellemek amacı ile) çözülmüşlerdir. Çözülen örnekler içerisine protein yıkımını engellemek için proteaz inhibitör karışımı (Roch, ABD) eklenmiştir. Örnekler içerisinde herhangi bir koloidal kalıntı bırakmamak için  $4^{\circ}\text{C}$ 'de  $1,500\times g$ 'de 10 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrasında temiz LoBinding tüplere aktarılan üst kısım çalışmada kullanılmıştır.

## **Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**

Protein konsantrasyonları hazırlanan standartlar ve gerekli örnek dilüsyonları kullanılarak Bradford Protein Konsantrasyon ölçüm Metodu ile yapılmıştır. (NanoDrop1000, Thermo Scientific). Ölçüm sırasında kullanılan protein standardı Şekil 3'de verilmiştir.

### Şekil-3 Protein standart eğrisi



### Protein örneklerinin odaklanmaları ve 2D jel elektroforezleri

Protein örneklerinin odaklanması deneyleri DEKART protein araştırmaları ve proteom laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Protein örnekleri ilk aşamada IPG stripler tarafından emilebilmek için striplerle birlikte rehidrasyona tabi tutulmuşlardır. İzoelektrik odaklamada 75 µg protein örneği kullanılarak 7cm'lik, IPG stripler (pH 3-10, BioRad, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Gerekli miktardaki protein örneği 2D rehidrasyon tamponu (son miktar 7cm'lik stripler için 125µl,) ile karıştırılıp içerisine stripin pH'sına uygun %1 Amphylote ve %1 TBP eklenmiştir. Bu aşamadan sonra protein örnekleri fokuslama trayleri içerisine konulmuş PROTEAN IEF (BioRad) cihazı içerisinde pasif rehidrasyona tabi tutulmuştur (20°C). Pasif rehidrasyon sırasında 1. saat sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için IPG striplerin üzerilerine 1ml mineral yağı ilave edilmiş ve yaklaşık 16 saat rehidrasyon işlemine devam edilmiştir.

Rehidrasyon işleminden sonra IPG striplerin izoelektrik odaklamasına geçilmiştir. Rehidrasyon sonunda IPG stripler alınarak üzerlerinde fazla miktarda bulunan yağ kurutma kâğıdı ve su yardımı ile temizlenmiş ardından temiz bir fokuslama trayi içerisine konularak üzerlerine yeni mineral yağ eklenmiştir. Trayler daha sonra yine PROTEAN IEF (BioRad, ABD) içerisine konularak adım adım akımı yükselten üç aşamalı bir program ile 20°C' fokuslanmıştır (7cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk, S2: maksimum voltaj artışı Rapid, S3: 4000volt/ IPG strip Linear. 17cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk, S2: maksimum voltaj artışı Rapid, S3: 10000volt/ IPG strip Linear). Fokuslama sırasında proteinler ait oldukları izoelektrik noktalarına göre IPG strip üzerinde ayırma tabii tutulmuşlardır.

Fokuslama sonrasında stripler tampon I (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT) ve tampon II (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) iodoasetamid) içerisinde 30 dk lık sürelerle yıkanmışlardır. Stripler bu aşamadan sonra hazırlanan SDS poliakrilamid jellere (12% veya değişik konsantrasyonlarda) yerleştirilerek elektroforez (35mA 30 dk, 48mA 5 saat, 16°C'de) ile moleküler büyüklüklerine (MW) göre ikinci boyutta (2D) ayırma tabii tutulmuşlardır (Laemmli, 1970). İkinci boyutta ayırım sırasında kullanılacak jeller için jelden jele farklılıkları ortadan kaldırmak amacıyla DODECA (BioRad, ABD) çoklu örnek jel dökme, jel yürütme ve boyama sistemleri kullanılmıştır.

Elektroforez sonrasında jeller %40 metanol, %10 asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edilecek ardından SyproRuby (BioRad, ABD) boyası içerisinde gece boyu boyanmışlardır. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad, ABD) ile yapıldıktan sonra jellerin analizleri PDQuest Advanced programı ile yapılmış istatistikî olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter robotu (BioRad, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

### **MALDI TOF-TOF analizi**

Jellerden elde edilen protein spotları DEKART protein araştırmaları ve proteom laboratuvarında trypsin ile kesilmiş daha sonra elde edilen peptitler Zip-tip ile temizlenerek MALDI-TOF-TOF cihazında okunmuşlardır. MALDI-TOF-TOF bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içereisinde ayırdıktan sonra kütle/yük oranlarına ve peptitlerin amino asit dizilimlerine göre isimlendirmeye

yardımcı olur. Cihazdan elde edilen verilerin Mascot data bankasından faydalanılarak hangi proteine ait oldukları belirlenmiştir.

([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS))

## BULGULAR

Çalışma hastalarının demografik verileri Tablo -1’de verilmiştir. PES olan 15 katarakt hastasından (ortalama yaş  $62 \pm 17.07$  yıl, - 13 erkek ve 2 kadın) ve PES olmayan aynı yaşlarda 15 katarakt hastasından (ortalama yaş  $65.4 \pm 15.65$  yıl, 6 erkek ve 9 kadın) iki grup oluşturulup toplam 30 aköz hümör örneği kullanılarak yapılan çalışmada yaşlar da dikkate alındığında iki grup arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark saptanmamıştır ( $p=0.675$ ).

Tablo-1: Demografik veriler

	PES (n:15)	Kontrol (n:15)	<i>p</i>
Yaş(yıl) Ortalama $\pm$ SD	$62,17 \pm 17,07$	$65.4 \pm 15.65$	0,675



Cinsiyet			-
Erkek	(%86,6 )	(%60)	
Kadın	(%13,3 )	(%40)	

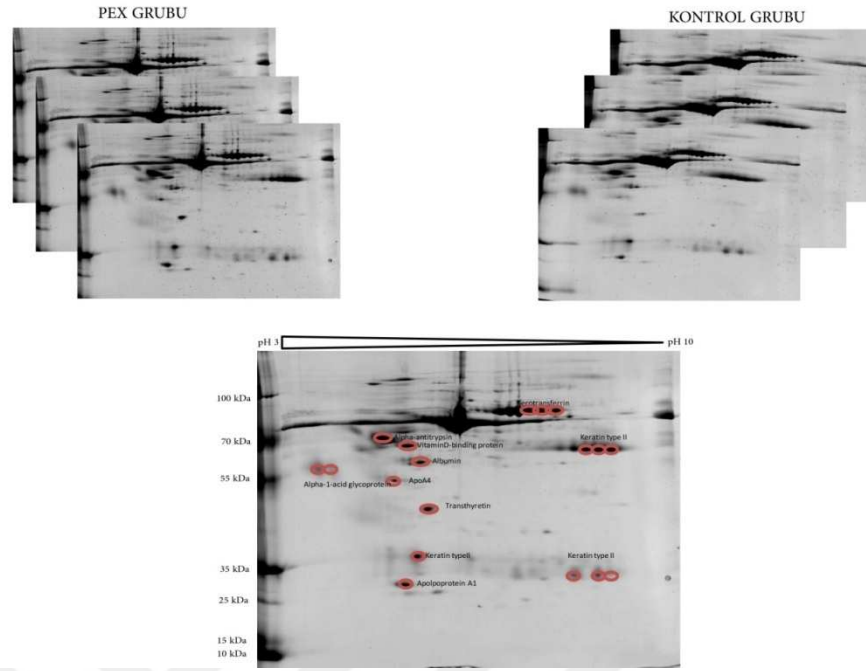
---

### **Örneklerin Protein İçerikleri**

Yapılan Bradford protein ölçümlerinde örneklerin protein konsantrasyonlarının düşük oldukları görüldü. Örnekler arası protein konsantrasyonları açısından görülen varyasyonlar (özellikle kontrol örneklerindeki protein miktarlarının oldukça düşük oluşu), örnekleri tek tek analiz etmemizi engelledi. Bu nedenle her bir örnekten eşit miktarda protein katkısının yapıldığı protein havuzları oluşturuldu. Oluşturulan havuzların ortalama hacimleri 150 ile 200 mikrolitre civarında idi. Bu havuzlardan iki boyutlu jel elektroforezi yapabilmek için örneklerin konsantre edilmesi ve temizlenmesi gerekmekte idi, çünkü ön denemelerimiz bizlere örneklerin tuz konsantrasyonlarının fazla olduğunu ve odaklamaya uygun olmadıklarını gösterir yönde idi. Sonuç olarak örnekler ticari bir kit yardımı ile aseton çöktürmesine tabi tutularak temizlendiler.

### **İki Boyutlu Jellerin Analizi**

Oluşturulan protein havuzları 2D jellerde ayırma tabi tutulduktan sonra çok duyarlı bir floresan boya olan SYPRO Ruby ile boyanmış ve yüksek çözünürlüklü bir kameraya sahip VersaDoc. MP400 görüntüleme sistemi ile görüntülenmişlerdir. Elde edilen görüntülerin analizi ise PD-Quest advance yazılımı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil-4).



Şekil -4: İki boyutlu jeller üzerinde elde edilen protein profilleri ve tanımlanan bazı proteinlere ait spotlar verilmiştir.

Jeller üzerinde ortalama 300 adet protein spotuna denk gelinmiştir. Bu spotlardan bazıları jeller üzerinde yüksek miktarda bulunuyor iken bazılarının düşük miktarda bulunan spotlar olduğu gözlenmiştir. Özellikle örneklerde bol miktarda albumin gözlemlenmiş ve bu durumun serum içeriğinin göz sıvısına bulaştığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Jellerde benzer şekilde bir serum proteini olan seruplazmin de bol miktarda görülmüştür. Jellerin analizi için kullanılan pH aralığı ile protein dağılımı arasındaki ilişki incelendiğinde proteinlerin özellikle 5-8 aralığında homojen olmayan bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Genelde proteinlerin pI değerlerinin 5-8 aralığında olduğu düşünülürse böyle bir dağılımın görülmesi gayet normaldir. Oluşturulan protein havuzlarında 2D jeller açısından bakıldığında karşımıza çıkan en büyük sorunun miktarı çok olan ve serumdan göz sıvısına geçtiğini düşündüğümüz proteinlerin miktarı daha az olan proteinlerin tanımlanmasını engellemesidir. Miktarı düşük ancak biyomarker olarak

önemi büyük olan bu az miktardaki proteinleri açığa çıkarmak için birtakım metotlar mevcuttur. Örneğin blue jel adı verilen materyal albumini bağlayan bir materyaldir ve örnekleri bu materyal ile muamele etmek mümkündür. Ancak yaptığımız ön denemelerde bu tip bir uygulamanın az miktarda bulunan proteinleri de uzaklaştırdığını göstermiştir. Dolayısı ile örnekleri oldukları gibi iki boyutlu jel elektroforezine tabi tuttuk. Jeller hakkında söylenmesi gerekli olan başka bir nokta da birçok proteinin 60000 Da'nun altında olan bölgede yoğunlaştığı gerçeğidir. Bu orta ve küçük büyüklükteki proteinlerin serum kökenli olma ihtimallerini artırmaktadır, çünkü bu proteinler rahatlıkla serumdan göz içerisine penetre olabilmektedirler. Son olarak da jellerin analizi kısmında belirtmemiz gerekli olan nokta aslında jel profillerinin genel olarak birbirlerine çok benzediği gerçeğidir. Hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki benzeşme oranı yazılım tarafından %90'nın üzerinde yüksek bir confidence oranı ile verilmiştir. Bu durum aslında yapılan analizin ne derece güvenilir olduğunun da bir bakıma göstergesidir. Eğer jeller arasında aşırı derecede farklılık gözlenecek olsa idi böyle bir sonuç deneysel varyasyonun aşırı derecede deney sonuçlarını etkilediğini gösterecekti. DEKART protein araştırmaları laboratuvarında yapılan çalışmalarda deneysel varyasyonu minimuma indiregebilmek için kullanılan pre-cast jeller ve dodece sistemleri çalışmamızda güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlamıştır.

### **Proteinlerin Tanımlanması**

Jeller üzerinde regülasyon farklılıkları görülen protein spotları robotik bir sistem aracılığı ile jellerden kesilerek çıkartıldı ve jel içi tryptik kesime tabi tutuldu. İki gün süren bu kesim işlemi sonrasında jellerden elde edilen peptitler uçlarında hidrofobik yüzeylerin bulunduğu iğne uçlu kolonlardan geçirilerek (Zip-Tipler) tutuldu ve matriks çözeltisi ile karıştırılarak MALDI-TOF/TOF cihazında tanımlandı. Toplamda 10 adet spot tanımlanan çalışmamızda bu spotlara ait MALDI-TOF/TOF verileri Tablo-2'de özetlenmiştir. Tanımlanan bu protein spotları içerisinde bir kısmı Keratin olarak belirlendi. Keratin genellikle biyolojik örneklerde bir kontaminan protein olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir hücre iskelet proteini olan keratin dışarıdan kirpikler, saç kökleri, kıl kökleri ve hatta havadaki tozdan örneğe bulaşabileceği gibi biyolojik materyalin kendisinde de yüksek miktarda bulunabilir. Bizim çalışmamızda aldığımız göz sıvısının yüksek miktarda keratin

içerdiği ancak bu keratinin çevresel mi olduğu yoksa sıvının içsel yapısında mı bulunduğu bilinmemektedir. Tablo-2’de yer alan ve güvenilir bir şekilde tanımlanan diğer proteinlerden hemen hepsi serumda karakterize edilmiş veya daha önceden varlıkları rapor edilmiş proteinlerdir. Bu proteinlerden transtranstretin ve APOA-4,PES grubunda belirgin bir şekilde karşımıza çıkmaktadır. Bu iki protein PES grubunda over eksprese olmuş proteinlerdir.



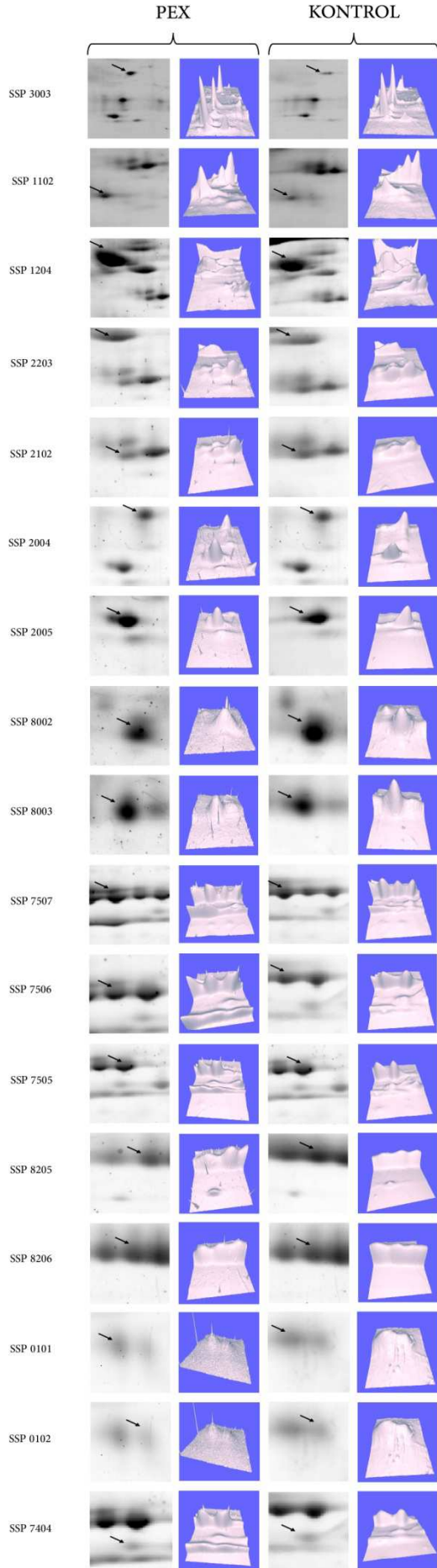
Tablo-2 PES olan hastalarda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı olarak eksprese olan proteinlerin listesi

Spot ID	SPT No	Sonuç no.	AC no.	En İyi Protein Katılımı	En İyi Protein kütlesi	En İyi Protein Skoru	Beklenen	Eşleşmeler	Hesaplama pI	Seq. Cov. (%)	En iyi protein tanımlaması
A1	3003	1	P02766	TTHY_HUMAN	15877	121	1,60E-08	11	5,52	68	Transhylerin OS=Homo sapiens GN=TFR PE=1 SV=1
A2	1102	2	P06727	APOA4_HUMAN	45371	160	2E-12	19	5,28	35	Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3
A3	1204	2	P01009	AIAT_HUMAN	46707	130	0,000000002	15	5,37	29	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3
A4	2203	2	P02774	VTDB_HUMAN	52929	57	0,039	11	5,4	18	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1
A5	2102	1	P02768	ALBU_HUMAN	69321	286	5,1e-025	23	5,92	26	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
A8	2004	1	P04264	K2C1_HUMAN	65999	297	4E-26	23	8,15	38	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
A9	2005	4	P02647	APOA1_HUMAN	30759	65	0,006	11	5,56	32	Apolipoprotein A-1 OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1
A11	8002	1	P04264	K2C1_HUMAN	65999	418	3,2E-38	29	8,15	47	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
A11	8003	1	P04264	K2C1_HUMAN	65999	271	1,6E-23	21	8,15	39	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
A12	7507	1	P02787	TRFE_HUMAN	77000	384	8,1E-35	38	6,81	39	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=2
B1	7506	1	P02787	TRFE_HUMAN	77000	374	8,1E-34	37	6,81	34	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=2
B2	7505	1	P04264	K2C1_HUMAN	65999	331	1,6E-29	23	8,15	36	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
B3	8205	1	P04264	K2C1_HUMAN	65999	413	1E-37	31	8,15	44	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
B4	8206	1	P04264	K2C1_HUMAN	65999	166	5,1E-13	9	8,15	10	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
B5	8208	1	P02538	K2C6A_HUMAN	60008	198	3,2E-16	15	8,09	21	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
B6	101	3	P02763	AIAG1_HUMAN	23497	90	0,0000023	6	4,93	22	Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1
B7	102	4	P19652	AIAG2_HUMAN	23588	77	0,0004	6	5,03	20	Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=ORM2 PE=1 SV=2
B8	7404	1	P04264	K2C1_HUMAN	65999	170	2e-013	12	8,15	26	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6

Proteinler arasındaki regülasyon farklılıklarının görülebilmesi için jellerin daha yakından analiz edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla PDQuest advance yazılımının 3D analiz opsiyonu kullanılmıştır. Tanımlanan her bir protein için yapılan 3D analizleri Şekil-5’de gösterilmektedir. Bazı protein spotlarının hasta grubunda net bir şekilde arttığı/azaldığını bu analiz sonucunda çok daha net bir şekilde görmek mümkündür.

Buna göre SSP-3003, SSP-1102, SSP-2203, SSP-2102, SSP-8002, SSP-7506, SSP-7505 numaralı protein spotlarının PES örneklerinde kontrol örneklerine kıyasla up regüle olduğu görüldü. SSP-0101, SSP-0102 numaralı protein spotlarının PES grubunda down regüle olduğu görüldü. (Şekil-5)

Elde ettiğimiz sonuçlara göre PES grubunda aköz hüümörde TTR, APOA-4, Vitamin D-binding protein, albumin, serotransferrin kontrol grubuna göre artmış olduğu; PES grubunda aköz hüümörde, alfa- asid glikoprotein-1 ve 2’nin kontrol grubuna göre azalmış olduğu görüldü.



Şekil- 5 PES ve kontrol jellerine ait tanımlanan spotların 3D karşılaştırılması



Örneklerin iki boyutlu jel elektroforezleri kontrol ve hasta grubu olmak üzere her gruptan 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.Şekil-4’de elde edilen protein örneklerinin 2 boyutlu jel elektroforezi sonrası görüntülerini göstermektedir.PDQuest Advanced-8.0.1 programı ile karşılaştırması yapılan jellerde 300 adet protein spotu analiz edilmiş ve bu spotlardan 16 tanesinde anlamlı ekspresyon farklılığı tespit edilmiştir.Farklılık gözlenen bu 16 spotlardan 10 tanesi MALDI TOF/TOF ile yüksek güvenilirlikle tanımlanmıştır. Tanımlanan veriler tablo-3’te verilmiştir.

Tablo-3 Yakalanan peptid sekansları ve Mascot skorları

Protein	Peptid Sekansı	Mascot Skoru
<b>TTR</b>	1 MASHRLLLLC LAGLVFVSEA GPTGTGESKC <b>PLMVK</b> VLDVAV RGSPAINVAV	120
	51 <b>HVFRKA</b> ADDT WEPFASGKTS <b>ESGELHGLTT</b> EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK	
	101 <b>ALGISPF</b> HEH AEWFTANDS <b>GPRRYTIAAL</b> LSPYSYSTTA <b>VVTNPKE</b>	
<b>APOA-4</b>	1 MFLKAVLTL ALVAVAGARA EVSADQVATV MWDYFSQLSN NAKEAVEHLQ	160
	51 KSELTQQLNA LFDQDLGEVN TYAGDLQK <b>KL</b> <b>VPFATELHER</b> LAKDSEKLKE	
	101 EIGKELEELR ARLLPHANEV SQKIGDNLRE LQQR <b>LEPYAD</b> <b>QLRTQVNTQA</b>	
<b>AAT</b>	1 MPSSVSWGIL LLAGLCCLVP VSLAEDPQGD AAQK <b>TDTSHH</b> <b>DQDHPTFNKI</b>	130
	51 <b>TPNLAEFAFS</b> <b>LYR</b> QLAHQSN STNIFSPVPS IATAFAMLSL GTKADTHDEI	
<b>VDBP</b>	1 MKRVLVLLLA VAFGHALERG RDYEKNKVK EFSHLGK <b>EDF</b> <b>TLSLVLVYSR</b>	57
	51 <b>KFPSGT</b> FEQV <b>SQLVK</b> EVVSL TEACCAEGAD PDCYDTRTSA LSAKSCESNS	
<b>Albümin</b>	1 MKWVTFISLL FLFSSAYSRG VFRR <b>DAHKSE</b> <b>VAHR</b> FKDLGE ENFKALVLIA	286
	51 FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENC <b>DKSL</b> <b>HTLFGDKLCT</b>	
<b>APOA-1</b>	1 MKAAVLTLAV LFLTGSQARH FWQQDEPPQS PWDRVKDLAT VYVDVLKDSG	65
	51 <b>RDYVSQ</b> FEGS <b>ALGK</b> QLNLKL LDNWDSVTST FSKLREQLGP VTQEFWDNLE	
<b>Transferrin</b>	1 MRLAVGALLV CAVLGLCLAV PDKTVR <b>WCAV</b> <b>SEHEATK</b> CQS FRDHMKSVIP	384
	51 SDGSPVACVK <b>KASYLDCIRA</b> IAANEADA VT LDAGLVYDAY LAPNNLKPVV	
<b>A1AG-1</b>	1 MALSWLTVL SLLPLLEAQI PLCANLVPVP ITNATLDQIT GK <b>WFYIASAF</b>	90
	51 <b>RNEEY</b> NKSVQ EIQTFFYFT PNK <b>TEDTIFL</b> <b>REYQTR</b> QDQC IYNTTYLNVQ	
<b>A1AG-2</b>	1 MALSWLTVL SLLPLLEAQI PLCANLVPVP ITNATLDRIT GK <b>WFYIASAF</b>	77
	51 <b>RNEEY</b> NKSVQ EIQTFFYFT PNK <b>TEDTIFL</b> <b>REYQTR</b> QDQC FYNSSYLNQV	



## TARTIŞMA

PES; etyolojisi bilinmeyen, yaşla ilişkili, deri ve çeşitli viseral organların bağ dokusu da dahil olmak üzere çok sayıda ekstraoküler ve intraoküler dokuda ekstraselüler fibriler maddenin anormal üretimi ve birikimi ile karakterize bir bozukluktur.<sup>(1,2)</sup> Bazı kanıtlar nöronal dejenerasyona neden olan inflamatuvar mekanizmaların PES ile ilişkili olduğu hipotezini desteklemektedir.<sup>(86,87)</sup>

PES sistemik bir hastalıktır ve daha önceki çalışmalar inflamatuvar mekanizmaların PES patogenezinde rol oynayabileceğini bildirmiştir.

Sistemik bir hastalık olarak düşünülen PES’de psödoeksfoliatif fibriller materyalin damar duvarında birikmesine bağlı olarak vasküler endotelde disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir.<sup>(74)</sup> Bu durum, PES hastalarındaki kardiyovasküler hastalığa yatkınlığı açıklamaktadır.

Alzheimer tipi demans, sensorinöral işitme azlığı, kardiyovasküler hastalıklar ve abdominal aort anevrizması gibi ciddi patolojilerin PES ile birlikteliğinin gösterilmesi, bu sendromun önemini ortaya koymuş ve bu konuda çeşitli çalışmaların yapılmasına neden olmuştur.<sup>(6,8)</sup>

Oküler iskemi, ön segment hipoksi, oksidatif stres ve bazı metallerin PES etiyopatogenezinde etkili olabileceği düşünülmektedir.<sup>(88,89)</sup>

PES’de oksidatif stres çoğunlukla antioksidan sistemin yetersiz çalışmasından veya reaktif oksijen (ROS) türevlerinin aşırı üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yetersiz antioksidan sisteminin en önemli ve hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülen mekanizması glutasyon üzerinden yürümektedir.<sup>(90,91)</sup> Glutasyon (GSH), hücre içi redoks reaksiyonlarında rol alan major düzenleyicidir. Redükte ve okside glutasyon (GSSG) oksidatif stresin en iyi göstergeleridir.<sup>(91,92)</sup>

PES’de şimdiye kadar yapılan çalışmalar spesifik markerları analiz etmek üzereydi. TGF- $\beta$ , endotelin-1, transferrin, klusterin, ve matris metalloproteinazlar en çok çalışılan markerlardır.<sup>(44,93,94,95)</sup> Biz de bu çalışmada “etiopatogenezde bilmediğimiz bir protein olabilir mi?” düşüncesinden hareket ederek, gelişen teknoloji ile bunu aydınlatmaya çalıştık.

Ön kamaradan alınabilecek aköz, proteomiks analizi için oldukça kısıtlı miktardadır. Daha iyi bir analiz için Emilia Hardenborg’un kullandığı ‘pooling’ yöntemini kullandık.<sup>(96)</sup>

Bu havuz oluşturma metodu çalışılacak aköz hacmini arttırmanın yanı sıra numuneler içindeki biyolojik eşitliliğın etkisini de azaltmaktadır. Biz alışmamızda,Hardenborg'dan farklı olarak retina patolojisi olan hastaları patolojinin düzeyi ne olursa olsun çalışma dışı bıraktık.

Lens glukoz,potasyum ve amino asidleri aköz hümörden alır; laktat ve piruvatı aköze verir. Ancak fakik ve afakik gözlerin aköz içeriğinin oldukça benzer olması lens metabolizmasının aköz hümör içeriğinde önemli bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir.<sup>(97)</sup> Yapılan bir çalışmada PES olan gözlerde aköz protein konsantrasyonun artmış olduğu bulunmuştur, bu da PES olan kişilerde kan aköz bariyerinin permeabilitesinde artış olabileceğini düşündürmüştür.<sup>(98)</sup>

PEM ile ilgili çalışmalarda en önemli zorluklardan biri fibriler materyalin çözünmesidir.Siyanojen bromid /formik asit gibi oldukça sert metodlar kullanmadan bunugerekleştirmek oldukça zordur. Aköz sıvısında çalışmak,örnek izolasyonundan daha az travmatik, daha iyi bir seçenek olabilir.Direkt lens materyali üzerinden alınan örneklerde izolasyon esnasında da travmaya bağlı protein karışması olabilir. Proteinlerin oksidatif posttranslasyonel modifikasyonu, onların fonksiyonuna yansiyacak şekilde yapısal değişikliklere neden olabilir.Bu nedenle bu proteinlerin tanımlanması, PES'te hangi yolların bozulduğunu anlama konusunda faydalı olabilir.

Aköz hümörün protein profili yaş ve cinsiyet eşleştirilmiş kontrollerle farklı olduğu daha önce gösterildiğinden bu çalışmada gruplardaki bireylerin yaş ve cinsiyetinin uyumlu olmasına dikkat edildi.çalışmamızda demografik verilerde anlamlı fark saptamadık.

Çalışmamızda alınan örneklerde en çok göze çarpan iki proteinTTR ve APOA-4 oldu.

Apolipoprotein A-1, insan HDL' sinin major yapısal proteindir.şilomikron yapısında da bulunur.Lesitin kolesterol aıl transferaz (LCAT) aktivatörüdür. Lipoprotein metabolizmasında HDL'nin en önemli rolü, tersine kolesterol transportudur ve APOA-1, HDL' nin bu antiaterojenik aktivitesinde LCAT' ın kofaktörü olarak rol oynamaktadır. APOA-1 , hem karaciğer hem de bağırsakta 276 aminoasit içeren Pro-APOA-1 olarak sentezlenir daha sonra yapısından 18 aminoasitlik bir bölüm ayrılarak APOA-1 haline dönüştürülür. APOA-1 'in polipeptid zincirinin –COOH ucuna yakın  $\alpha$ -heliks yapısındaki bölge HDL'nin hücre yüzeyi ile ilişkisinden sorumludur. LCAT' ı aktifleyen bölüm ise APOA-1 polipeptid zincirinin orta bölümlerindedir.Antiaterojenik özelliğine ek olarak anti inflamatuvar ve antioksidan özelliği de vardır .<sup>(99)</sup>

Pieragostino ve ark. 2011 yılında yaptığı çalışmada PES, PAAG ve kontrol gruplarının göz yaşı örneklerinin proteomiks analizini incelemişler ve PES hastalarının gözyaşı örneklerinde APOA-1, alfa-1-asid glikoprotein-1 düzeylerinde değişiklikler olduğu bildirilmişlerdir.<sup>(100)</sup>

Zil'fian AA ve ark. PES ve PAAG hastalarının aköz hümlerinde fibronektin ve insulin-like growth faktör-1'i (IGF-1) araştırmak için yaptıkları çalışmaya PES ve PAAG tanısı olan olgular ile kontrol grubu olarak senil kataraktı olan olguları dahil etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubu ile kıyaslandığında çalışma grubunda her iki sitokin de artmış olduğunu göstermişlerdir.<sup>(101)</sup>

Literatürdeki bilgiler ışığında D vitamini bağlayan proteinin ve APOA-1'in IGF-1 üzerinden PES patogenezinde rol alabileceği düşünülebilir.

Transtiretin (TTR), tetramerik plazma proteindir, tiroid hormonlarının [T3 (3,5,3'-triiodo-L-tironin) ve T4 (Tiroksin, 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironin)] ve retinol (vitamin A) taşınmasından sorumlu bir proteindir. Plazmada bir bölümü, APOA-1'e bağlı olarak, yüksek dansiteli lipoproteinlerde bulunur. Transtiretin, APOA-1'in proteolitik işlenmesinde rol alır; dolayısıyla, protein taşınmasındaki görevinin yanı sıra, proteaz aktivitesi de gösterebilmektedir.<sup>(102)</sup> TTR, beyinde koroid pleksusu tarafından üretilir ve serebrospinal sıvıya salınır.<sup>(103)</sup> Normal tavşanlarda aköz hümleri üreten siliyer epitelde immün işaretleme ile tespit edilmiştir.<sup>(104)</sup> Serebrospinal sıvı ve aköz hümlerinin ve TTR'nin salınım şeklinin arasındaki saşırtıcı benzerliği gösterilmiş olup, aköz hümlerdeki TTR'nin siliyer epitel tarafından salınması olasıdır. TTR'nin sentez yeri; bu proteinin sistemik bir etkisi olmadan, gözün ön kamarasındaki lokal etkisini açıklayabilir. TTR genindeki mutasyonlar, ailesel amiloid polinöropati ile de ilişkilidir.<sup>(105)</sup> Ailesel amiloidozis ile ilişkili spesifik gen varyasyonları ile TTR varyasyonları dahil olmak üzere birden fazla patolojik olan ve olmayan TTR varyasyonları tanımlanmıştır.<sup>(106)</sup> Bu varyasyonların bazıları izoelektrik odaklama (IEF) isimli görüntüleme tekniği kullanılarak bulundu.<sup>(107)</sup> TTR ve onun varyasyonları amiloid depozitleri olarak bilinen çözünmez protein fibrillerinin ekstraselüler polimerizasyonuna neden olur. Birikimin mekanizması henüz bilinmemektedir.<sup>(108,109,110)</sup>

Sıçanlarda yapılan diğer bir çalışma TTR'nin; retina pigment epiteli ve retina gangliyon hücrelerini içine alan yaygın oküler dağılımını gösterdi.<sup>(111)</sup> Başka bir hayvan çalışmasında diyabeti olmayan sıçanlarla karşılaştırıldığında, diyabetik hayvanların müller hücrelerinde

TTR genlerinin daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir.<sup>(112)</sup> SELDI-TOF çalışmasında da inflamatuvar bir hastalık olan romatoid artrit tanılı hastalarda plazma biyomarkeri olarak tanımlanmıştır<sup>(113)</sup>.TTR'nin artmış düzeyleri, serebrospinal sıvıda prostaglandin D sentaz ve TTR içeren bir protein kompleksinde tespit edilmiştir.Alzheimer hastalarında TTR'nin artmış düzeyleri serebrospinal sıvıda prostaglandin D sentaz ve TTR içeren bir protein kompleksinde tespit edilmiştir.<sup>(114,115)</sup> Diğer çalışmalar Alzheimer hastalarının serebrospinal sıvısında TTR'nin kontrollere göre daha düşük seviyeleri raporlamıştır.<sup>(116)</sup> Meme kanseri hastalarının leptomeningeal metastazları azalmış TTR düzeyleri göstermiştir<sup>(116)</sup> ve 2D elektroforez çalışması Guillain Barre sendrom tanılı hastaların serebrospinal sıvısında azalmış TTR düzeyleri göstermiştir.<sup>(118)</sup>

Takahiro ve ark.ratlarda amiloid formasyonunda oksidatif stresin rolünü göstermek için yaptığı çalışmada MALDI/TOF-MS yöntemini kullanmışlardır.TTR'nin oksidatif strese duyarlı olduğunu ve oksidatif stres koşullarında tiyol residüsü üzerinden posttranslasyonel modifikasyon geliştiğini, bunun da amiloid formasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. TTR, birçok nörodejeneratif durum ile ilişkilendirilmiştir.Bizim çalışmamızda TTR düzeyi belirgin olarak kontrol grubuna göre artmıştır.Sonuçlarımız yapılan diğer proteomiks çalışmaları ile uyumludur.SSS de olduğu gibi, aköz hümeördeki TTR, retinol için ve PES'deki ön segment değişikliklerine katkıda bulunan diğer proteinler için bağlayıcı protein olarak görev yapabilir.

İnsan serumunda bulunan Vitamin D Bağlayan Protein (VDBP), yaklaşık 58 kDa ağırlığında bir glikoproteindir<sup>(119)</sup>.VDBP; albumin (ALB),  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), ve  $\alpha$ -albumin/atamin (AFM) gen ailesinin bir üyesidir.İnsanda, 4. kromozomda, 4q11-q13 bantları arasında bulunmaktadır<sup>(120)</sup>, VDBP gerek beslenme yolu ile alınan gerekse UV etkisi ile deride sentezlenen Vitamin D'nin plazmada taşınım ilgili hücelere ulaştırılmasından sorumlu globüler bir proteindir.Östrojene bağımlı şekilde karaciğer tarafından sentezlenir ve böbrek, iskelet kası, bağırsak, kemik, akciğer ve karaciğerin kendisi tarafından uzaklaştırılır. Serum, idrar, anne sütü, semen, tükürük, BOS gibi birçok vücut sıvısında bulun lenfosit, monosit ve nötrofil yüzeyinde bulunur. Üretim ve yıkım arasındaki denge sayesinde VDBP'nin plazma seviyesi, ana ligandı olan 25-OH vitamin D seviyesinden sürekli daha fazla olacak şekilde ayarlanır.

VDBP'nin cDNA yapısı, ilk olarak insanlarda belirlenmiştir. Bunu sırasıyla sıçan, fare, tavşan, kaplumbağa ve en son olarak da tavuk izlemiştir<sup>(119)</sup>.VDBP, 16 aminositlik sinyal

peptid dizisi kesildikten sonra, ALB ve AFP ile belirgin bir dizi homolojisi gösteren 458 amino asitlik bir protein olarak salgılanır.VDBP, diğer ALB ailesi üyeleri gibi yüksek sistein miktarına (hepsi disülfid halinde, toplam 28 adet) ve özgün üç bölgesi olan modüler bir yapıya sahiptir.Yapısında iki farklı bağlama bölgesi tanımlanmıştır. Bunlardan biri 35 ile 49'uncu bakiyeler arasında bulunan Vitamin D bağlayan bölge; diğeri ise 373 ile 403'üncü bakiyeler arasında bulunan aktin bağlayan bölgedir <sup>(122)</sup>.Son yapılan çalışmalarla; Vitamin D'nin sterol bağlayan cep bölgesinin çok seçici olduğu, böylelikle bağlanma cebinin içerisinde ligandın üç boyutlu bütünlüğünün korunduğu ortaya konmuştur <sup>(122)</sup>. VDBP molekülü bilinen 124'den fazla çeşidiyle çok yüksek seviyede bir polimorfizm göstermektedir <sup>(123)</sup>.Molekülün makrofaj uyarıcı aktivitesinin gösterilmesiyle "Makrofaj aktive edici faktör" olarak da adlandırılmaktadır<sup>(124)</sup>.

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar Vitamin D miktarı ve Vitamin D alımı ile ilgili problemlerin nörodejeneratif hastalıklar ve nöron hasarı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.<sup>(125)</sup>

VDBP birçok önemli fonksiyonu olan plazma proteinidir. Bunların arasında D vitamini metabolitlerinin taşınması, kemik gelişiminin kontrolü, yağ asitlerinin bağlanması, aktinin ayrıştırılması, immün ve inflamatuvar cevapların modülasyonu ile ilgili daha pek çok iyi tanımlanmamış roller bulunmaktadır <sup>(126)</sup>.Ancak, oküler dokulardaki VDBP fonksiyonlarının potansiyel rolü açık değildir.Eski çalışmalar APOA-1 ve VDBP'nin hiperkolesterolemi<sup>(127)</sup> ve kemik iliği transplantasyonu prosedürleri<sup>(128)</sup> dahil olmak üzere belli hastalıklarda arttığını göstermiştir.Ayrıca bazı hastalıklarda APOA-1 yolunun patofizyolojisine VDBP'nin dahil olabileceği önerilmektedir.

PES' in patogenezi ve VDBP seviyesi arasında bağlantı olduğu, birden fazla proteomiks çalışma tarafından önerilmiştir <sup>(129,130)</sup>. VDBP'nin rolünün D vitaminini bağlamasına mı bağlı olduğu hala bilinmemektedir. Öte yandan, VDBP, D vitamini bağlamasından bağımsız olarak net immün modülatör etkiye sahiptir<sup>(131)</sup>.Benzer şekilde, yapılan proteomiks çalışmalarda progresif tipte Multiple Skleroz hastalarında artmış düzeyler bulunmuşken, klinik olarak izole sendromda ve Tekrarlayan-Düzelen Multiple Skleroz(RRMS) relapslarında hastaların serebrospinal sıvısında azalmış VDBP seviyeleri gösterilmiş <sup>(132)</sup>. Relapslar sırasında gerçekleşen VDBP oksidasyonu ile ilişkili değişiklikler, MS'te VDBP aktivitesinin ve sonuç olarak tüm D vitamini aksının modülasyonunun karmaşıklığını gösterir.

D vitamininin ve vitamin D reseptörünü aktive eden D vitamini analoglarının (VDR agonistleri ya da modülatörleri) endotel disfonksiyonu ile ilişkili önemli risk faktörleri olan inflamasyonu, trombozu ve vazodilatasyonu modüle ettiği gösterilmiştir<sup>(131)</sup>.

Hirai ve ark.<sup>(133)</sup> DBP'deki genetik varyasyonların insülin direnci ile ilişkili olduğunu yayınlamıştır. Artmış DBP'nin insülin toleransını artırabileceği ve IGF-1'in üretimini azaltabileceği için<sup>(134)</sup>, bununla birlikte, IGF-1'in PES patogenezi ile ilişkili olduğu gösterildiği için<sup>(135)</sup>, VDBP ve PES arasında bir bağlantı olabileceği düşünülebilir.

İnce bağırsakta üretilen ve sonrasında plazmaya salınan bir glikoprotein olan apolipoprotein A-4 (APOA-4) trigliseritten zengin lipoproteinler ve HDL ile ilişkilidir. Ayrıca lipoprotein içermeyen form şeklinde de bulunur<sup>(136)</sup>. APOA-4'ün lipid metabolizmasında önemli rolü olduğu ve lipid oksidasyonu sırasında endojen inhibitör şeklinde davranarak ateroskleroza karşı koruyucu fonksiyonu olduğu gösterilmiştir<sup>(137)</sup>. MS hastalarında APOA-4 ile ilgili yapılan bir çalışmada APOA-4'ün hem kontroller hem de remisyondaki hastalarla karşılaştırıldığında relaps fazındaki hastalarda artmış oksidasyon gösterdiği görülmüştür. Önceleri APOA-4'ün trigliseritten zengin lipoprotein metabolizmasına ve ters yönde kolesterol taşınmasına dahil olduğu bilinmekteydi. Daha yakın zamanda, APOA-4'ün oksidatif stresi modüle edebileceği<sup>(138)</sup> ve koroner arter kalsifikasyonunda<sup>(139)</sup> rol oynayabileceği önerilmiştir.

Birbirinden farklı VDR agonistleri endotel fonksiyonu ve nefrektomi uygulanmış sıçanların aort gen ekspresyonu üzerinde farklı etkiler gösterir. APOA-4 ve VDBP'nin pankreas kanserli hastalarda seviyelerinin değiştiği gösterilmiştir. Bu proteinlerin yalnızca vitamin ve lipidlerin metabolizmasında rol oynamadığını, inflamatuvar süreçler ile bağlantılı olduğunu düşünebiliriz.

Spaulding ve ark. intrasellüler glutatyon redoks dengesini göstermek için yaptıkları çalışmada APOA-4'ün istatistiksel olarak anlamlı şekilde feokromositoma hücrelerinde apoptozisi azalttığını göstermişlerdir. APOA-4'ün glutatyon reduktaz ve glukoz 6 fosfat dehidrojenaz enzimlerinin aktivitesini modüle ederek redoks dengesini etkilediğini bildirmişlerdir.<sup>(140)</sup>

Normal insan aköz hümründeki ana protein, albümindir<sup>(141)</sup> ve yağ asitleri, vitaminler, hormonlar, metal iyonları, retinoidlerin taşınmasındaki kabiliyetinden dolayı oküler dokulardaki epitel hücrelerin düzgün büyümesi ve farklılaşması için gerekli olduğu düşünülmektedir<sup>(142)</sup>. Albümin, hem plazma hem de serebrospinal sıvının ana elemanıdır

ve amiloid B taşıma kabiliyetinden dolayı Alzheimer hastalığında suçlanmaktadır. Albüminin plazma kolloid ozmotik basıncını dengeleme, antioksidan aktivite, normal mikrovasküler geçirgenliğin ayarlanması, yağ asitleri ve hormonları taşıma gibi pek çok görevi vardır. Alzheimer hastalarının serebrospinal sıvısında, glokom tanılı maymunların retinasında ve primer konjenital glokom tanılı insanların aköz hümöründe artmış albümin düzeyleri saptanmıştır<sup>(143,144)</sup>.

Albumin, her bir molekülünde bir tane sülfhidril grubu taşır, primer olarak ekstraselüler antioksidan savunma sisteminin ana üyelerindedir. Albumin bakırı sıkı; demiri ise zayıf bir şekilde bağlar ve bağlı metal yüzeyinde kalır. Bu metaller oksidatif stress reaksiyonlarına katılabilirler; fakat oluşan oksijen radikalleri albumin tarafından etkisiz hale getirilir.

PES'te aköz hümördeki artmış albümin düzeyleri oksidatif stress,<sup>(145)</sup> ya da yaşlanma sonucuna sekonder bir cevap olabilir. Aynı zamanda aköz hümörde artmış albümin düzeyi inflamatuvar olarak zayıflayan kan aköz bariyerindeki artmış geçirgenlik sonucu olabilir. Yaşlanmayla beraber aköz hümördeki TTR ve albümin düzeylerinin değişmekte olduğu rapor edilmiştir<sup>(146)</sup>.

$\alpha$ 1-antitripsin, tek bir 394 rezidürlük polipeptit zincirinden oluşan bir glikoproteindir. Bu glikoproteinde karbonhidrat oranı % 12'dir.  $\alpha$ 1-antitripsinin toplam molekül ağırlığı 52 kDa'dur. Aktif bölge, "gerilmiş" (*stressed*) bir büküm ihtiva eder; serin proteazlar ile reaksiyonu esnasında reaktif bölgenin karboksiterminal kısmından küçük bir parçanın ayrılması sonucu oluşan yapı da "gevşemiş" (*relaxed*) konfigürasyon olarak adlandırılır.  $\alpha$ 1-antitripsinin tersiyer yapısı globüler bir proteindir. Yaklaşık olarak 20 amino asitlik bir peptid parçasından oluşan proteinin reaktif merkez bükümü, moleküler yüzey üzerinde dar bir alana yerleşmiştir.  $\alpha$ 1-antitripsin molekülünün enzim inhibisyonu yapan bu kısmında 358. pozisyonda çok önemli olan metionin aminoasiti yerleşmiştir. Sigara içenlerde bu aminoasit oksidanlar tarafından oksidasyona uğrayarak metionin sülfoksida dönüşür. Bu durum  $\alpha$ 1-antitripsinin nötrofil elastaz üzerindeki inhibitör etkisinin normalden çok daha az olmasına neden olur.  $\alpha$ 1-antitripsin, serin proteazların aktif bölgesi ile tetrahedral yapı oluşturarak onların aktivitesini engeller<sup>(147,148,149)</sup>. İnflamatuvar olayları düzenlemedeki etkisini proteazları inhibe ederek ortaya çıkartmaktadır<sup>(150)</sup>.

Dolaşımdaki  $\alpha$ 1-antitripsin aynı zamanda inflamasyona duyarlı bir plazma proteindir (fibrinojen, seruloplazmin, haptoglobülin gibi)<sup>(151)</sup>. Yakın zamanda insan korneasında,

aköz hümorede ve vitreusda yüksek  $\alpha 1$ -antitripsin düzeyleri saptanmıştır. Lokal inflamatuvar (iltihabi) mikroçevrede  $\alpha 1$ -antitripsin seviyesini lokal olarak up regüle etmek proteinaz aktivitesini kontrol etmek için önemli bir faktördür.<sup>(152,153,154)</sup>

$\alpha 1$ -antitripsinin asıl fonksiyonu, inflamasyon sırasında aşırı salınmış proteinazları inhibe etmektir. Esas olarak hepatositler tarafından üretilir ve serin proteaz inhibitörü olarak görev yaptığı kana sekrete edilir.<sup>(155)</sup> Funding ve ark.nın yaptığı çalışmada kornea allogreft rejeksiyonu sırasında aköz hümorede ciddi derecede yüksek  $\alpha 1$ -antitripsin seviyeleri saptanmıştır.<sup>(156)</sup> Onların çalışmasına göre  $\alpha 1$ -antitripsin, inflamasyondaki proteolitik aktiviteye karşı koruyucu role sahiptir. Bulgularımızın ve önceki çalışmaların ışığında, artmış  $\alpha 1$ -antitripsin düzeyleri PES hastalarında inflamasyona karşı koruyucu rol oynayabilir.  $\alpha 1$ -antitripsin; endotelde ve aköz hümorede bulunur. Korneal epitelyal hücrelerde, stromal keratositlerde ve endotelial hücrelerde  $\alpha 1$ -antitripsin mRNA'sı ve proteini gösterilmiştir. Bu durum, PES'teki korneal patolojileri açıklayabilir.  $\alpha 1$ -antitripsinin yüksek konsantrasyonları korneayı bozulan elastaz dengesine karşı koruyor ve proteolitik aktiviteyi minimize ediyor olabilir<sup>(157)</sup>.

Evereklioglu ve ark.nın çalışmasında, Behçet hastalarında inaktif dönemde dahi, sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek serum  $\alpha 1$ -antitripsin düzeyleri saptanmış ve bu durum inflamatuvar olaylarda akut faz reaktanı artışına bağlanmıştır<sup>(158)</sup>. Cumurcu ve ark. nın çalışmasında da bizim çalışmamıza benzer şekilde PES'de serum  $\alpha 1$ -antitripsin aktivitesi artmış olarak bulunmuştur<sup>(159)</sup>.

Serum elektroforezinde  $\beta$  fraksiyonunda yer alan ve bir glikoprotein olan transferrin başlıca karaciğerde ve daha az olmak üzere retikuloendotelial sistem, testis ve overlerde sentezlenmektedir. Tek bir polipeptid zincirinden meydana gelen bu molekül demir, çinko, bakır, kobalt ve kalsiyumu geri dönüşümlü olarak bağlayabilmektedir. Transferrin aynı zamanda bir negatif akut faz reaktanıdır. Biz çalışmamızda PES hastalarının aköz humör örneklerinde kontrol grubuna göre transferrin düzeyini up- regüle olarak tespit ettik.

Oksidatif stres oluşumunda düşünülen diğer bir mekanizma ise demir (Fe) ve çinko (Zn) gibi ağır metallerin aköz humorda birikmesi nedeniyle oksijenden türeyen ROS türevlerinin artmasıdır<sup>(90,160)</sup> Transferin serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu inhibe eder.

PES hastalarında artmış inflamasyonu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Fiore ve ark. PES olan gözlerde olmayanlara göre lazer sonrası inflamatuvar reaksiyonun daha fazla



olduğunu göstermiştir<sup>(161)</sup>. Drolsum ve ark.katarakt cerrahisi sonrası PES'li gözlerde postoperatif inflamasyonun ve geçici fibronid reaksiyonun daha sık olduğunu saptamıştır.<sup>(162,163)</sup>. Ritch ve ark.postoperatif dönemde ön kamarada normale göre artmış inflamasyon olduğunu göstermiştir<sup>(164)</sup>.

Funding'in yaptığı proteomiks çalışmasında 2D GEL ve mass spektrometri yöntemini kullanarak akut korneal greft rejeksiyonu gelişen hastaların aköz hümlerini incelemiş ve tespit ettikleri spotlardan albumin,  $\alpha$ 1-antitripsin, serin proteinaz inhibitör ve transtiretini tanımlamışlardır<sup>(156)</sup>.

PES'teki aköz hümler protein değişiklikleri ile nörodejeneratif hastalıklardaki serebrospinal sıvıdaki değişiklikler arasındaki benzerlikler ilginçtir. Aköz hümler ve serebrospinal sıvı birden fazla ortak protein içermektedir.Oksidatif stres dokuları koruyan proteinlerin kaybı şeklindeki değişikliklerin her iki organ sisteminde patolojik durumlarda doku hasarına katkıda bulunabileceği ortak görüş olmuştur.

Bu çalışmada aköz hümlerdeki proteinleri değerlendirdik.PES'li hastalarda aköz hümler proteinleri kontrol grubuna göre farklar gösterebilir.Bu bilgi PES'in mekanizmasını çözmek ve bu duruma ait potansiyel biyomarkerları tanımlamak için yeni görüşler ortaya çıkarabilir.

Proteomiks çalışmalarında araştırılan belirteç aday proteinler daha önce tespit edilmemiş proteinler olabileceği gibi bilinen proteinler de olabileceği göz önüne alındığında bu sonuçların daha ileri araştırmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Proteomiks araştırmaları 'daha çok teknoloji' olarak özetlenebilir. Bu teknolojinin geliştirilmesi sırasında gereken malzemenin ve alt yapının ülkemizde üretilmemesi nedeniyle hem ulaşılmasının kısmi olarak güç hem de maliyetinin yüksek olması proteomiks çalışmalarını kısıtlamaktadır ve tekrarlanabilirliğini güçleştirmektedir.Ayrıca MALDI analizinin ülkemizde birkaç merkezde mevcut olmasına rağmen hizmet satın alımının hizmet sağlayıcılar tarafından zamanında karşılanamaması bir başka sınırlılıktır. Elde edilen verileri literatürler ışığında yorumlamak dışında çalışmacılara henüz yeterli getirim sağlanamamıştır.Zaman içerisinde bu güçlükler aşıldığında bu konuda daha iddialı sonuçları bildirmek mümkün olabilecektir. Yaptığımız çalışmada PES hastalarının aköz hümlerinde, normal katarakt hastalarından daha farklı bir protein profili tespit ettik. Elde ettiğimiz veriler ve literatür taraması bize PES'in patogenezinde inflamatuvar süreçlerin ve oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını

göstermektedir. Albuminin aköz hümorede artmış olması bize kan aköz bariyerinin bozulmuş olabileceğini düşündürmektedir. Elektroforezde belirgin olarak gördüğümüz TTR ve APOA-4 varlığı, bu proteinlerin Alzhiemer'da ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda artmış olması sistemik bir hastalık olan PES'in diğer nörodejeneratif hastalıklar ile bağımlı kuvvetlendirmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada saptanan bulgular PES'de ön segment dokularında oksidatif stresin tetiklediği, sınırlı bir subklinik inflamasyon olduğunu destekler. Bu kronik aktif stres yanıtı, bozulmuş stres savunma mekanizmalarıyla beraber ve genetik geçmiş ile kombinasyon halinde inflamatuvar proteinleri tetikleyerek kronik kan aköz bariyeri bozulması gibi patolojik doku etkilerine neden olur. PES patogenezinde rol alabilecek proteinleri aydınlatmak ve görmeyi tehdit edecek olan bu inflamatuvar sürecin erken safhasında potansiyel farmakolojik hedef olabilecek proteinleri belirlemek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇLAR

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Kliniği Glokom departmanından takipli klinik olarak PES olduğu belirlenen 15 sayıda birey ve benzer demografik özellikte katarakt cerrahisi planlanan ek okuler patolojisi olmayan 15 sayıda birey çalışmaya dahil edilerek alınan humör aköz örnekleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Proteomiks değerlendirmeler ve analizler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi KABİ Proteomiks Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 300 adet protein olduğu görülmüştür, bulunan bu proteinlerden kontrol grubuna göre farklı regülasyon gösteren proteinler tanımlanmıştır.

PES grubundan alınan aköz hüme örneklerindeki iki boyutlu jel elektroforezi şekilleri, kontrol grubu örneklerinden farklıydı, bu durum PES gelişimiyle birlikte aköz hümeördeki protein içeriğinin de değiştiğini göstermektedir. PES hastalarının hüme aközlerinde transtiretin, APOA-4, Vitamin D-binding protein, albumin, serotransferrinin kontrol grubuna göre artmış olduğu saptanmıştır. PES grubunda aköz hümeörde, alfa- asid glikoprotein-1 ve 2 'nin kontrol grubuna göre azalmış olduğu görülmüştür.

Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz proteinlerin ortak noktalarından bir diğeri sistemik dolaşımda yer almaları ve çoğunun karaciğere de sentezlenmesidir. Bu proteinler hem inflamasyon süreçlerinde artmaktadır hem de dolaşımda bulunan temel ekstraselüler antioksidanlardır. Elde ettiğimiz proteinlerin yolak analizleri, inflamatuvar süreçlerin PES patolojisinde esas rolü oynayabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanında sonuçlarımız diğere nörodejeneratif hastalıklar ile PES'in ilişkisini ve ortak yanları olduğu görüşünü desteklemektedir

Birlikte düşünülüğünde, bu çalışmaların sonuçları; proteinlerdeki dalgalanmaların patolojik değişikliklere ve PES'in komplikasyonlarına neden olabileceğini düşündürmektedir. Aköz hümeo değişiklikleri ile PES arasındaki bağı daha iyi ortaya koyabilmek için daha fazla katılımcının olduğu, PES hastalarının daha uzun dönemli incelendiği çalışmalar yapmak gerekmektedir. İleri dönemde yapılacak çalışmalarda PES'li hastaların evrelerine göre elde edilen proteinler değerlendirilebilir, potansiyel farmakolojik hedef olabilecek proteinleri belirlenebilir.

## ÖZET

# PSÖDOEKSFOLİASYON SENDROMU OLAN HASTALARIN AKÖZ HÜMÖR ÖRNEKLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOM ANALİZİ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı psödoeksfoliasyon sendromunun gelişimine dahil olan olası mekanizmaları aydınlatmaktır.PES’li hastaların aköz hümör içeriğinin proteomiks analizi gerçekleştirildi ve PES olmayan katarakt hastalarının aköz hümör örnekleri ile karşılaştırıldı.

**Gereç ve yöntem :** 15 PES’li hasta ve benzer demografik özelliklerde PES olmayan 15 kişiden oluşan kontrol grubu olmak üzere katarakt ameliyatı esnasında aköz hümör örnekleri alındı.Her örnek için protein konsantrasyon ölçümü yapıldıktan sonra havuzlama metodu uygulandı.Örnekler temizlenerek IPG striplerine yüklendi.Standart protokol kullanılarak odaklama ve ikinci boyutta ayırım gerçekleştirildi.Jeller Sypro ruby boyası ile boyandı ve PDQest Advance yazılımı ile analiz edildi.

**Sonuç :** 300 protein spotu tespit edildi ve bu spotlardan 10 tanesinin farklı ekspresyon özellikleri gösterdiği MALDI TOF/TOF ile tanımlandı.Analiz edilen proteinlerden özellikle iki tanesinin,APOA-4 ve transtiretinin , PES grubunda yüksek olarak eksprese olduğu görüldü.

**Tartışma :** Bu sonuçler PES’in moleküler mekanizmasını anlamada yol gösterici olabilir ve biyobelirteç olarak kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler :** pseudoeksfoliasyon ,proteomiks , aköz hümör

## **ABSTRACT**

### **COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF THE AQUEOUS HUMOR FROM PATIENTS WITH PSEUDOEXFOLIATION SYNDROME**

**Purpose :** The purpose of this study was to identify the possible mechanisms involved in the development of pseudoexfoliation. A proteomic analysis of the aqueous humor composition in the eyes of patients with PES was performed and compared with that in the eyes of patients with cataract (non-PES; controls).

**Material and method :** During cataract surgery ,aqueous humor from 15 patients with PES and 15 patients with cataract (non-PES) was collected. After measuring protein concentrations of each samples, pools were formed and cleaned up before loading onto IPG strips (11 cm, pH3-10). Focusing and second dimension separation were carried using standard protocols. Gels were stained with sypro ruby and analyzed with PDQuest Advance software.

**Results :** 300 proteins spot were detected and 10 spots displaying differences in their expression were identified using MALDI TOF/TOF. Two of these proteins, namely ApoA4 and transthyretin, were highly over expressed in the PEX group.

**Discussion :** They may be significant in understanding molecular mechanism of PEX and may hold values as biomarkers.

**Keywords :** pseudoexfoliation , proteomic ,aqueous humor

## KAYNAKÇA

1. Schlötzer- Schrehardt U, Koca MR, Nauman GOH, Volkholz H. Pseudoexfoliation Syndrome. Ocular manifestation of a systemic disease. Arch Ophthalmol 1992; 110:1752-1756.
2. Ball SF. Exfoliation syndrome prevalence in the glaucoma population of South Louisiana. Acta Ophthalmol 1988; 184:93–98.
3. Krause U, Alanko HI, Karna J, Miettinen R, Larimi T, Jaanio E, Ollila OI, Takala J. Prevalence of pseudoexfoliation syndrome in Finland. Acta Ophthalmol (Copenh) 1988; 66(Suppl 184):120–122
4. Anderson, L., Hunter, C.L., 2006. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. Mol. Cell. Proteomics 5, 573–588.
5. Luca Agnifili, Damiana Pieragostino, Alessandra Mastropasqua, Vincenzo Fasanella, Lorenza Brescia, Gian Marco Tosi, Paolo Sacchetta, Leonardo Mastropasqua. Molecular biomarkers in primary open-angle glaucoma: from noninvasive to invasive
6. Naumann GO, Schlötzer-Schrehardt U, Küchle M. Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations. Review. Ophthalmology. 1998; 105:951-968.
7. Küchle M, Amberg A, Martus P, Nguyen NX, Naumann GO. Pseudoexfoliation syndrome and secondary cataract. Br J Ophthalmol. 1997; 81:862-866.
8. Streeten BW, Li ZY, Wallace RN, Eagle RC Jr, Keshgegian AA. Pseudoexfoliative fibrilopathy in visceral organs of a patient with pseudoexfoliation syndrome. Arch Ophthalmol. 1992; 110:1757-1762.
9. Morrison JC, Green WR. Light microscopy of the exfoliation syndrome. Review. Acta Ophthalmol Suppl 1988; 66:5-27.
10. Schlötzer-Schrehardt U, Von der Mark K, Sakai LY, Naumann GO. Increased extracellular deposition of fibrillin-containing fibrils in pseudoexfoliation syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997; 38:970-984.

11. Streeten BW, Dark AJ, Wallace RN, Li ZY, Hoepner JA. Pseudoexfoliative fibrilopathy in the skin of patients with ocular pseudoexfoliation. *Am J Ophthalmol.* 1990; 110:490-9.
12. Garner A. Exfoliation syndrome. Editorial. *Br J Ophthalmol* 1990;74:449
13. Skuta L.G, Morgan K.R, Glaucoma. Exfoliation Syndrome, Pigment Dispersion Syndrome, and the Associated Glaucomas. *Gn: Duane's Clinical Ophthalmology.* Ed. Tasman W, Jaeger A.E. 2002 vol.3 chapter 54B
14. Karp LC, Fazio RJ, Culbertson WW, Gren RW. True exfoliation of the lens capsule. *Arch Ophthalmol.* 1999 Aug;117:1078-80
15. Cashwell LF Jr, Shields MB. Exfoliation syndrome: Prevalance in a southeastern United States population. *Arch Ophthalmol* 198;106:335-6.
16. Aström S, Linden C. Incidence and prevalance of pseudoexfoliation and open angle glaucoma in northern Sweden. *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85:828-31
17. Lantukh VV, Piatin MM. Features of ocular pathology among the indigenous inhabitants of Chukotka. *Vestn Oftalmol* 1982;(4):18-20.
18. Krishnadas R, Nirmalan PK, Ramakrishnan R, Thulasiraj RD, Katz J, Tielsch JM, Friedman DS, Robin AL. Pseudoexfoliation in a rural population of southern India: the Aravind Comprehensive Eye Survey. *Am J Ophthalmol* 2003;135:830-7.
19. Thomas R, Nirmalan PK, Krishnaiah S. Pseudoexfoliation in southern India: the Andhra Pradesh Eye Disease Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1170-6.
20. Yalaz M, Othman I, Nas K, Eroglu A, Homurlu D, Cıkıntaş Z, Ashouri A. The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the eastern Mediterranean area of Turkey. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1992 Apr;70:209-13.
21. Kozobolis VP, Papatzanaki M, Vlachonikolis IG, Pallikaris IG, Tsambarlakis IG. Epidemiology of pseudoexfoliation in the island of Crete (Greece). *Acta Ophthalmol Scand.* 1997 Dec;75:726-9.
22. Challa P. Genetics of pseudoexfoliation syndrome. *Curr Opin Ophthalmol* 2009;20(2):88-91.
23. Stein J, Pasquale LR, Talwar N, Kim DS, Reed DM, Nan B, et al. Geographic and climatic factors associated with the exfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 2011;129(8):1053-1060.

24. Mccarty CA, Taylor HR. Pseudoexfoliation syndrome in Australian adults. *Am J Ophthalmol* 2000 May;129:629-33.
25. Mitchell P, Wang JJ, Hourihan F. The relationship between glaucoma and pseudoexfoliation: The Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1999 Oct;117:1319-24.
26. Jonasson F, Damji KF, Arnarsson A, Sverrisson T, Wang L, Sasaki H, Sasaki K. Prevalance of open-angle glaucoma in Iceland: Reykjavik Eye Study. *Eye* 2003;17:747-53
27. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA, et al. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973- 1975. *Surv Ophthalmol* 1980;24:335-610
28. Bengtsson B, Heijl A. A long-term prospective study of risk factors for glaucomatous visual field loss in patients with ocular hypertension. *J Glaucoma* 2005;14:135-8.
29. Leske MC, Heijl A, Hussein M, et al. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment. The Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2003;121:48-56.
30. Konstas AGP, Mantziris DA, Stewart WC. Diurnal intraocular pressure in untreated exfoliation and primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997;115:182-5.
31. Damji KF. Is pseudoexfoliation syndrome inherited? A review of genetic and nongenetic factors and a new observation. *Ophthalmic Genet* 1998;19:175-85.
32. Orr AC, Robitaille JM, Price PA, et al. Exfoliation syndrome: clinical and genetic features. *Ophthalmic Genet* 2001;22:171-85.
33. Thorliefsson G, Magnusson KP, Sulem P, et al. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 2007;317:1397-400.
34. Wiggs JL, Yaspan BL, Hauser MA, et al. Common variants at 9p21 and 8q22 are associated with increased susceptibility to optic nerve degeneration in glaucoma. *PLoS Genet* 2012;8:e1002654.
35. Ritch, R., Schlötzer-Schrehardt U., 2001. Exfoliation syndrome. *Surv. Ophthalmol.* 45, 265-315.
36. Ovodenko, B., Rostagno, A., Neubert, T.A., Shetty, V., Thomas, S., Yang, A., Liebmann, J., Ghiso, J., Ritch, R., 2007. Proteomic analysis of exfoliation deposits. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 1447-1457



37. Zenkel, M., Poschl, E., von der Mark, K., Hofmann-Rummelt, C., Naumann, G.O.H., Kruse, F.E., Schlotzer-Schrehardt, U., 2005. Differential gene expression in pseudoexfoliation syndrome. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 3742–3752.
38. Schlotzer-Schrehardt, U., Lommatzsch, J., Kuchle, M., Konstas, A.G.P., Naumann, G.O.H., 2003. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and primary open-angle glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1117–1125.
39. Csizsar, K., 2001. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 70, 1–32.
40. Schlotzer-Schrehardt, U., Zenkel, M., Kuchle, M., Sakai, L.Y., Naumann, G.O.H., 2001. Role of transforming growth factor- $\beta$ 1 and its latent form binding protein in pseudoexfoliation syndrome. *Exp. Eye Res.* 73, 765–780.
41. Ho, S.L., Dogar, G.F., Wang, J., Crean, J., Wu, Q.D., Oliver, N., Weitz, S., Murray, A., Cleary, P.E., O'Brien, C., 2005. Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* 89, 169–173.
42. Yoneda, K., Nakano, M., Mori, K., Kinoshita, S., Tashiro, K., 2007. Disease-related quantitation of TGF- $\beta$ 3 in human aqueous humor. *Growth Factors* 25, 160–167.
43. Schlotzer-Schrehardt, U., Naumann, G.O.H., 2006. Perspective ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* 141, 921–937.
44. Koliakos, G.G., Befani, C.D., Mikropoulos, D., Ziakas, N.G., Konstas, A.G.P., 2008. Prooxidant antioxidant balance, peroxide and catalase activity in the aqueous humour and serum of patients with exfoliation syndrome or exfoliative glaucoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Epub ahead of print.
45. Koliakos, G.G., Konstas, A.G.P., Schlotzer-Schrehardt, U., Hollo, G., Mitova, D., Kovatchev, D., Maloutas, S., Georgiadis, N., 2004. Endothelin-1 concentration is increased in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* 88, 523–527
46. Bleich, S., Roedl, J., von Ahsen, N., Schlotzer-Schrehardt, U., Reulbach, U., Beck, G., Kruse, F.E., Naumann, G.O.H., Kornhuber, J., Junemann, A.G.M., 2004. Elevated

- homocysteine levels in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 138, 162–164.
47. Zenkel, M., Kruse, F.E., Junemann, A.G., Naumann, G.O.H., Schlotzer-Schrehardt, U., 2006. Deficiency of the extracellular chaperone clusterin in eyes with pseudoexfoliation syndrome may be implicated in the aggregation and deposition of pseudoexfoliative material. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1982–1990
50. Matthias Zenkel, Ursula Schlotzer-Schrehardt, The Composition of Exfoliation Material and the Cells Involved in Its Production *J Glaucoma* 2014;23:S12–S14 Volume 23, Number 8 Suppl 1
51. Miyake K, Matsuda M, Inaba M. Corneal endothelial changes in pseudoexfoliation syndrome. *Am J Ophthalmol.* 1989 Jul 15;108(1):49-52.
52. Şenol N, Erda S: Senil psödoeksfoliasyonlarda kataraktöz lens değişiklikleri. *T Oft Gaz* 1988;18:325-327.
53. Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GOH: A histopathologic study of zonular instability in pseudoexfoliation syndrome. *Am J Ophtalmol* 118:730,1994.
54. Wishart PK, Spaeth GL, Poryzees EM. Anterior chamber angle in exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol.* 1985 Feb;69(2):103-7.
55. Gross FJ, Tingey D., Ebstein DL. Increased prevalence of occludable angles and angle-closure glaucoma in patients with pseudoexfoliation. *Am J Ophthalmol* 1994 Mar 15;117(3):333-6.
56. Schlotzer-Schrehardt U, Naumann GO, Trabecular meshwork in exfoliation syndrome with or without open angle glaucoma. A morphometric, ultrastructural study *Invest ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(9) 1750-1764
57. Layden WE, Ritch R, King DG, Teekhasaene C. Combined exfoliation and pigment dispersion syndrome. *Am J Ophthalmol.* 1990 May; 109:530-534.
58. Kuchle M, Ho TS, Nguyen NX, Hannappel E, Naumann GO. Protein quantification and electrophoresis in aqueous humor of pseudoexfoliation eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:748-752.
59. Berlau J, Lorenz P, Beck R, Makovitzky J, Schlötzer-Schrehardt U, Thiesen HJ, Guthoff R. Analysis of aqueous humour proteins of eyes with and without pseudoexfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001 Oct;239:743-746.

60. Kuchle M, Nguyen NX, Horn F, Naumann GO. Quantitative assessment of aqueous flare and aqueous 'cells' in pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1992; 70:201-208
61. Dotsenko V, Neshkova E, Namazova I, Vavilova L, Yarovaya G. Hageman factor and kallikrein in pathogenesis of senile cataracts and the pseudoexfoliation syndrome. *Immunopharmacology*. 1996; 32:141-145
62. Cellini M, Possati GL, Rossi A, Moretti M, Torregiani A. Pseudoexfoliation capsulae and endothelin-1 plasma levels. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 2000; 120:8-9
63. Seland JH. The ultrastructural changes in the exfoliation syndrome [review]. *Acta Ophthalmol Suppl* 1988; 184:28-34.
64. Schlötzer-Schrehardt U, Kuchle M, Jünemann A, Naumann GO. Relevance of the pseudoexfoliation syndrome for the glaucomas. *Ophthalmologie*. 2002; 99:683-690
65. Hammer T, Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GO. Unilateral or asymmetric pseudoexfoliation syndrome? An ultrastructural study. *Arch Ophthalmol*. 2001 Jul; 119:1023-31
66. Streeten BW, Dark AJ, Wallace RN, Li ZY, Hoepner JA. Pseudoexfoliative fibrilloglycogen in the skin of patients with ocular pseudoexfoliation. *Am J Ophthalmol*. 1990 Nov 15; 110:490-9
67. Seland JH. The ultrastructural changes in the exfoliation syndrome [review]. *Acta Ophthalmol Suppl* 1988; 184:28-34
68. Schlötzer-Schrehardt U, Kuchle M, Naumann GO. Electron-microscopic identification of pseudoexfoliation material in extrabulbar tissue. *Arch Ophthalmol*. 1991 Apr; 109:565-70
69. Schlötzer-Schrehardt U, Körtje KH, Erb C. Energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM) in the elemental analysis of pseudoexfoliative material. *Curr Eye Res*. 2001 Feb; 22:154-6
70. Morrison JC, Green WR. Light microscopy of the exfoliation syndrome. Review. *Acta Ophthalmol Suppl* 1988; 66:5-27
71. Brooks AM, Gillies WE. The development of microneovascular changes in the iris in pseudoexfoliation of the lens capsule. *Ophthalmology*. 1987 Sep; 94:1090-7

72. Cursiefen C, Handel A, Schönherr U, Naumann GOH. Pseudoexfoliation in patients with branch and central retinal vein thrombosis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997; 211:17-21.
73. Repo LP, Terasvirta ME, Koivisto KJ. Generalized transluminescence of the iris and the frequency of the pseudoexfoliation syndrome in the eyes of transient ischemic attack patients. *Ophthalmology* 1993; 100:352-355.
74. Mitchell P, Wang JJ, Smith W. Association of pseudoexfoliation syndrome with increased vascular risk. *Am J Ophthalmol* 1997; 124:685-687.
75. Repo LP, Suhonen MT, Terasvirta ME, Koivisto KJ. Color doppler imaging of the ophthalmic artery blood flow spectra of patients who have had transient ischemic attack. *Ophthalmology* 1995; 102:994-1119.
76. Cahil M, Early A, Srack S, Blayney AW, Eustace P. Pseudoexfoliation and sensorineural hearing loss. *Eye* 2002; 16:261-266.
77. Bleich S, Jünemann A, Von Ahsen N. Homocysteine and risk of open angle glaucoma. *J Neural Transm* 2002; 109:499-504.
78. Puustjarvi T, Blomster H, Kontkanen M, Punnonen K, Terasvirta M. Plasma and aqueous humor levels of homocysteine in exfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242:749-754.
79. Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:82-7.
80. Etzion R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L: The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 243-252
81. Rifai N, Gillette MA, Carr SA: Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 971-983
82. Marko-Varga G. Proteomics principles and Challenges. *Pure Appl Chem* 2004; 76:829-837. 106. 92. Biberoglu G. Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı. *T Klin J Med Sci* 2003; 23:491-498.
83. Moore CA, Khoury MJ, Bradley LA. From genetics to genomics using gene-based medicine to prevent disease and promote health in children. *Semin Perinatol* 2005; 29:135-43

84. Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001; 19:242-7. 109.
85. Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol* 1972; 26:3-27.
86. Damji KF, Bains HS, Stefansson E, et al. Is pseudoexfoliation syndrome inherited? A review of genetic and nongenetic factors and a new observation. *Ophthalmic Genet.* 1998;19:175–185.
87. Janciauskiene S, Krakau T. Alzheimer's peptide and serine proteinase inhibitors in glaucoma and exfoliation syndrome. *Doc Ophthalmol.* 2003;106:215–223.
88. Yüksel N, Karabaş VL, Arslan A, Demirci A, Çağlar Y. Ocular hemodynamics in pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation glaucoma. *Ophthalmology* 2001; 108:1043-49.
89. Ocakoğlu O, Koyluoglu N, Kayıran A, Tamçelik N, Ozkan S. Microvascular blood flow of the optic nerve head and peripapillary retina in unilateral exfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82(1): 49- 53.
90. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
91. Bump EA, Brown JM. Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharmacol Ther* 1990;47(1):117- 36.
92. Kim JW, No JK, Ikeno Y, et al. Age-related changes in redox status of rat serum. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;34:9-17
93. Koliakos, G. G., Konstas, A. G. P., Schlotzer-Schrehardt, U.,Hollo, G. et al., Endothelin-1 concentration is increased in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* 2004, 88, 523–527.
94. Zenkel, M., Kruse, F. E., Junemann, A. G., Naumann, G. O. H. et al., Clusterin deficiency in eyes with pseudoexfoliation syndrome may be implicated in the aggregation and deposition of pseudoexfoliative material. *Invest. Ophthalmol.Vis. Sci.* 2006, 47, 1982–1990.
95. Inatani, M., Tanihara, H., Katsuta, H., Honjo, M. et al., Transforming growth factor-beta(2) levels in aqueous humor of glaucomatous eyes. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2001, 239, 109–113.

96. Hardenborg E, Botling-Taube A, Hanrieder J, Andersson M, Alm A, Bergquist J. Protein content in aqueous humor from patients with pseudoexfoliation (PEX) investigated by capillary LC MALDI-TOF/TOF MS. *Proteomics Clin Appl*. 2009 Mar;3(3):299-306. doi: 10.1002/prca.200780077
97. .Berlau J, Lorenz P, Beck R, Makovitzky J, Schlötzer-Schrehardt U, Thiesen HJ, Guthoff R. Analysis of aqueous humour proteins of eyes with and without pseudoexfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001 Oct;239:743-6
98. Kuchle M, Nguyen NX, Horn F, Naumann GO. Quantitative assessment of aqueous flare and aqueous 'cells' in pseudoexfoliation syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1992 Apr;70:201-8
99. B. Verges. Apolipoprotein A-IV in diabetes mellitus. *Diabetes Metab.*, 21 (2) (1995), pp. 99–105
100. Pieragostino D, Bucci S, Agnifili L, Fasanella V, D'Aguanno S, Mastropasqua A, Ciancaglini M, Mastropasqua L, Di Ilio C, Sacchetta P, Urbani A, Del Boccio P. Differential protein expression in tears of patients with primary open angle and pseudoexfoliative glaucoma . *Molecular BioSystems* 2012 Apr;8(4):1017-28. doi: 10.1039/c1mb05357d. Epub
101. Zil'fian AA, Avagian SA, Zil'fian AV. Fibronectin and insulin-like growth factor-1 in pathogenesis of open-angle and pseudoexfoliative glaucoma *Georgian Med News*. 2013 Jul-Aug;(220-221):13-7..
- 102 Liz MA, Faro CJ, Saraiva MJ, Sousa MM. Transthyretin, a new cryptic protease. *J Biol Chem*. 2004 May 14;279(20):21431-8. Epub 2004 Mar 19.
- 103 .Aleshire SL, Bradley CA, Richardson LD, Parl FF. Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium. *J Histochem Cytochem*. 1983;31:608–612
104. Deepak P. Edward, Rachida Bouhenni, Anterior Segment Alterations and Comparative Aqueous Humor Proteomics in the Buphthalmic Rabbit (An American Ophthalmological Society Thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2011 Dec; 109: 66–114.
105. Saraiva MJ. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum Mutat*. 2001;17:493–503

106. Hou X, Aguilar MI, Small DH. Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration. *FEBS J.* 2007;274:1637–50.
107. Connors LH, Ericsson T, Skare J, Jones LA, Lewis WD, Skinner M. A simple screening test for variant transthyretins associated with familial transthyretin amyloidosis using isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1407:185–92.
108. Lei M, Yang M, Huo S. Intrinsic versus mutation dependent instability/flexibility: a comparative analysis of the structure and dynamics of wild-type transthyretin and its pathogenic variants. *J Struct Biol.* 2004;148:153–68.
109. Schweigert FJ, Wirth K, Raila J. Characterization of the microheterogeneity of transthyretin in plasma and urine using SELDI-TOF-MS immunoassay. *Proteome Sci.* 2004;2:5.
110. Bergen HR, 3rd, Zeldenrust SR, Butz ML, Snow DS, Dyck PJ, Dyck PJ, Klein CJ, O'Brien JF, Thibodeau SN, Muddiman DC. Identification of transthyretin variants by sequential proteomic and genomic analysis. *Clin Chem.* 2004;50:1544–52.
111. Dwork AJ, Cavallaro T, Martone RL, Goodman DS, Schon EA, Herbert J. Distribution of transthyretin in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:489–96.
112. Gerhardinger C, Costa MB, Coulombe MC, Toth I, Hoehn T, Grosu P. Expression of acute-phase response proteins in retinal Muller cells in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:349–57.
113. Naishiro Y, Suzuki C, Kimura M, Yamamoto M, Takahashi H, Sohma H, Hori T, Shinomura Y, Kokai Y, Imai K. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2007;30:145–50. Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI.
114. Lovell MA, Lynn BC, Xiong S, Quinn JF, Kaye J, Markesbery WR. An aberrant protein complex in CSF as a biomarker of Alzheimer disease. *Neurology.* 2008;70:2212–8.
115. Finehout EJ, Franck Z, Choe LH, Relkin N, Lee KH. Cerebrospinal fluid proteomic biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2007;61:120–9.
116. Serot JM, Christmann D, Dubost T, Couturier M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;63:506–8.
117. Rompp A, Dekker L, Taban I, Jenster G, Boogerd W, Bonfrer H, Spengler B, Heeren R, Smitt PS, Luider TM. Identification of leptomeningeal metastasis-related proteins in

- cerebrospinal fluid of patients with breast cancer by a combination of MALDI-TOF, MALDI-FTICR and nanoLC-FTICR MS. *Proteomics*.2007;7:474–81.
118. Yang YR, Liu SL, Qin ZY, Liu FJ, Qin YJ, Bai SM, Chen ZY. Comparative proteomics analysis of cerebrospinal fluid of patients with guillain-barre syndrome. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;28:737–44.
119. White, P. and N. Cooke, The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab*, 2000. 11(8): p. 320-7.
120. Cooke, N.E., et al., Direct regional assignment of the gene for vitamin D binding protein (Gc-globulin) to human chromosome 4q11-q13 and identification of an associated DNA polymorphism. *Hum Genet*, 1986. 73(3): p. 225-9.
121. Haddad, J.G., et al., Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Biochemistry*, 1992. 31(31): p.7174-81.
122. Swamy, N., et al., Probing the vitamin D sterol-binding pocket of human vitamin D-binding protein with bromoacetate affinity labeling reagents containing the affinity probe at C-3, C-6, C-11, and C-19 positions of parent vitamin D sterols. *Arch Biochem Biophys*, 2000. 373(2): p. 471-8.
123. Cleve, H. and J. Constans, The mutants of the vitamin-D-binding protein: more than 120 variants of the GC/DBP system. *Vox Sang*, 1988. 54(4): p. 215-25.
124. Thyer L, Ward E, Smith R, Fiore MG, Magherini S, Branca JJ, Morucci G, A novel role for a major component of the vitamin D axis: vitamin D binding protein-derived macrophage activating factor induces human breast cancer cell apoptosis through stimulation of macrophages. *Nutrients*. 2013 Jul 8;5(7):2577-89. doi: 10.3390/nu5072577.
125. Kuller L. H., Littlejohns T. J., Henley W. E., et al. Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Neurology*. 2014;83(10):920–928. doi: 10.1212/wnl.0000000000000755
126. Gomme PT, Bertolini J. Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends Biotechnol*.2004;22:340–5.
127. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Caceres PJ, Sacristan D, Perez-Vizcaino F, Segura A, Tamargo J, Lopez-Farre A. Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients. *J Proteome Res*. 2006;5:2301–8.
128. Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Urata Y, Marumoto Y, Nishina H, Nakamura K, Okita K, Sakaida I. Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient



mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics*. 2006;6:2564–70.

129. González-Iglesias H, Álvarez L, García M, Escribano J, Rodríguez-Calvo PP, Fernández-Vega L, Coca-Prados M. Comparative proteomic study in serum of patients with primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma. *J Proteomics*. 2014 Feb 26;98:65–78. doi: 10.1016/j.jprot.2013.12.006. Epub 2013 Dec 16.

130. Taube AB, Hardenborg E, Wetterhall M, Artemenko K, Hanrieder J, Andersson M, Alm A, Bergquist J. Proteins in aqueous humor from cataract patients with and without pseudoexfoliation syndrome. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*. 2012;18(6):531–41.

131. Roussel BD, Macrez R, Jullienne A, Agin V, Maubert E, et al. (2009) Age and albumin D site-binding protein control tissue plasminogen activator levels: neurotoxic impact. *Brain* 132: 2219–2230

132. Disanto G, Ramagopalan S, Para A, Handunnetthi L (2011) The emerging role of vitamin D binding protein in multiple sclerosis. *Journal of Neurology* 258: 353–358

133. Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Hirai A, Chiba M, Akai H, Suzuki C, Toyota T. Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:1951–3.

134. Cordain L, Eades MR, Eades MD. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003;136:95–112.

135. Rohe B, Safford SE, Nemere I, Farach-Carson MC. Regulation of expression of 1,25D3-MARRS/ERp57/PDIA3 in rat IEC-6 cells by TGF beta and 1,25(OH)2D3. *Steroids*. 2007;72:144–50

136. D'Aguanno S, Barassi A, Lupisella S, d'eri GM, Del Boccio P, et al. (2008) Differential cerebro spinal fluid proteome investigation of Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 193: 156–160

137. Qin X, Swertfeger DK, Zheng S, Hui DY, Tso P (1998) Apolipoprotein AIV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 274: H1836–H1840

138. Beilin O, Karussis DM, Korczyn AD, Gurwitz D, Aronovich R, et al. (2005) Increased thrombin inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research* 79: 351–359
139. Inaba Y, Ichikawa M, Koh C-S, Inoue A, Itoh M, et al. (1999) Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Dermatan Sulfate. *Cellular Immunology* 198: 96–10
140. Spaulding HL, Saijo F, Turnage RH, Alexander JS, Aw TY, Kalogeris TJ. Apolipoprotein A-IV attenuates oxidant-induced apoptosis in mitotic competent, undifferentiated cells by modulating intracellular glutathione redox balance. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Jan;290(1):C95-C103. Epub 2005 Aug 24.
141. Tripathi RC, Millard CB, Tripathi BJ. Protein composition of human aqueous humor: SDS-PAGE analysis of surgical and postmortem samples. *Exp Eye Res*. 1989;48:117–130.
142. Wakabayashi Y, Kawahara J, Iwasaki T, Usui M. Retinoic acid transport to lens epithelium in human aqueous humor. *Jpn J Ophthalmol*. 1994;38:400–406.
143. Bouhenni RA, Al Shahwan S, Morales J, et al. Identification of differentially expressed proteins in the aqueous humor of primary congenital glaucoma. *Exp Eye Res*. 2011;92:67–75
144. Carter-Dawson L, Zhang Y, Harwerth RS, et al. Elevated albumin in retinas of monkeys with experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:952–959.
145. Sacca SC, Izzotti A. Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye. *Prog Brain Res*. 2008;173:385–407.
146. Inada K, Murata T, Baba H, Murata Y, Ozaki M. Increase of aqueous humor proteins with aging. *Jpn J Ophthalmol*. 1988;32:126–131
147. Jhonson A.R, Rohlis E.M, Silverman L.M. Proteins. In *Textbook of Clinical Chemistry*. Burtis C.A; Aswood E.R (Eds.) Third Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia (1999):477-540.
148. Carrell R.W, Travis J.  $\alpha$ -1-Antitrypsin and Serpins: Variation and Counter-Variation. *Trends Biochem. Sci* (1985);10:20-24.
149. Fregonose L. and Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2008);3:16
150. Synder M.R, Katzmann J.A, et al. Diagnosis of  $\alpha$ -1 Antitrypsin Deficiency:

An Algorithm of Quantification, Genotyping and Phenotyping. *Clinical Chemistry* (2006):2236–2242

151. Engstrom G, Lind P, Hedblad B, et al. Lung function and cardiovascular risk: relationship with inflammation-sensitive plasma proteins. *Circulation* (2002);106: 2555-60.
152. Boskovic G, Twinning SS. Local control of alpha-1 proteinase inhibitor in the human cornea by growth factors and cytokines. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1403:37–46.
153. Ando H, Twinning SS, Yue BY, et al. MMPs and proteinase inhibitors in the human aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:3541–3548.
154. Clausen R, Weller M, Wiedeman P, et al. An immunochemical quantitative analysis of the protein pattern in physiologic and pathologic vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1991;229:186–190.
155. Pierce JA. Antitrypsin and emphysema. Perspective and prospects. *JAMA*. 1998;259:2890–2895.
156. Funding M, Vorum H, Nexø E, Ehlers N. Alpha-1-antitrypsin in aqueous humour from patients with corneal allograft rejection. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005 Jun;83(3):379-84.
157. Hiemstra PS. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem Soc Trans* 30: 116–120. DOI:10.1042/BST0300116
158. Evereklioglu C<sup>1</sup>, Inalöz HS, Kirtak N, Doganay S, Bülbül M, Ozerol E, Er H, Ozbek E. Serum leptin concentration is increased in patients with Behçet's syndrome and is correlated with disease activity. *Br J Dermatol*. 2002 Aug;147(2):331-6.
159. Cumurcu T, Ozyurt H, Demir HD, Yardim H. Serum alpha-1-antitrypsin levels in patients with pseudoexfoliative syndrome. *Curr Eye Res*. 2008 Feb;33(2):159-62. doi: 10.1080/02713680701861752.
160. Kim JW, No JK, Ikeno Y, et al. Age-related changes in redox status of rat serum. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;34:9-17
161. Fiore PM, Melamed S, Epstein DL. Trabecular precipitates and elevated intraocular pressure following argon laser trabeculoplasty. *Ophthalmic Surg*. 1989;20:697–701.
162. Drolsum L, Haaskjold E, Sandvig K. Phacoemulsification in eyes with pseudoexfoliation. *J Cataract Refract Surg*. 1998;24:787–792.

163. Drolsum L, Davanger M, Haaskjold E. Risk factors for an inflammatory response after extracapsular cataract extraction and posterior chamber IOL. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1993;71:771–776

164. Ritch R, Schlotzer-Schardt U. Exfoliation syndrome. *Surv Ophthalmol*. 2001;45:265–315

