

Geçici Retinal İskemi Modelinde Brimonidinin Mikroglia Morfolojisi Üzerine Etkileri: Brimonidin Nöroinflamasyonu Baskılıyor mu?

Selcan Ekicier Acar¹, M. Sinan Sarıcaoğlu², Aysel Çolak³, Zeynep Aktaş⁴, Aysel Sepici Dinçel⁵

Amaç: Bu çalışmada ratlarda geçici retinal iskemi modeli oluşturularak, brimonidinin mikroglia hücre morfolojisi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Erkek Wistar ratların sağ gözlerinde geçici retinal iskemi modeli oluşturuldu (n = 12). Ratlar üç gruba ayrıldı: Geçici retinal iskemi modeline topikal brimonidin tedavisi uygulanan gözler (1), sham tedavi uygulanan gözler (2) ve uygulama yapılmayan kontrol grubu (3). Tedavi topikal olarak uygulandı ve 4 hafta sonunda ratlar sakrifiye edildi. Dokular immunohistokimyasal olarak iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü 1 (Iba-1) pozitifliği açısından incelendi. Iba-1 pozitif mikroglia hücrelerinin dört ana fenotipi (ramified, primed, reaktif ve amoeboid-fagositik) retina katmanlarında incelendi.

Bulgular: Geçici retinal iskemi modelinde Iba-1 pozitif mikroglia hücrelerinin sayısı kontrol grubunda 43.3 ± 6.02 , sham grubunda 100.67 ± 7.50 , topikal brimonidin grubunda 57.67 ± 14.64 idi. Toplam Iba-1 pozitif mikroglial hücre sayısındaki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Ramified ve primed mikroglia hücrelerini karşılaştırdığımızda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$).

Reaktif mikroglial hücre sayısı sham tedavisi grubunda 10 ± 1.41 , topikal brimonidin grubunda ise 5.75 ± 1.71 idi ($p < 0.05$). Amoeboid-fagositik mikroglial hücrelerin sayısı sham tedavi grubunda 9.5 ± 1.29 , topikal brimonidin grubunda ise 2.25 ± 0.50 idi. Reaktif ve amoeboid hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu ($p < 0.05$).

Sonuç: Ratlarda yapılan merkezi sinir sistemi çalışmalarında akut yaralanma sonrasında mikroglia morfolojisinin değiştiği ve hücrelerin ramified formdan amoeboid – fagositik forma dönüştüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada oluşturulan geçici retinal iskemi modelinde topikal brimonidin tedavisi alan ratlarda mikrogliaların ramified formdan reaktif ve amoeboid forma geçişlerindeki azalma, brimonidinin nöroinflamasyonu baskılayıcı özellikleri olabileceğini göstermiştir.

Giriş

Mikroglialar merkezi sinir sisteminde inflamatuvar olaylara aracılık eden doğal bağışıklık sistemi hücreleridir. Merkezi sinir sistemi çalışmalarında mikrogliaların multiple skleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Creutzfeldt-Jakob gibi nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılı olduğu gösterilmiştir [1] [2]. Retina ve optik sinir dokularında merkezi sinir sistemine benzer nöronal, glial-mikroglial ve immünolojik yanıtların ortaya çıkması glokomda olduğu gibi nörodejeneratif süreçte nöroinflamasyon ve immunomodülasyonun önemini gündeme gündeme getirmektedir.

Glokom, retina ganglion hücre (RGH) kaybı ile karakterize optik sinirin multifaktöriyel nörodejeneratif bir hastalığıdır. Bu yolakta RGH kaybı, hücre aksonlarının ve somalarının dejenerasyonu, artan gliozis ve mikroglial hücre aktivasyonunun önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Glokomatöz optik sinir hasarı için ana risk faktörü yüksek göz içi basıncı (GİB) olmakla birlikte, bazı olgularda GİB normal sınırlarda olsa da hasar gelişmektedir. Bununla beraber, yüksek GİB ile optik nöropati geliştirmeyen olgular da söz konusudur [3] [4]. Bu durum glokom patofizyolojisinin birden çok mekanizma ile ilişkili olduğunun açık kanıtıdır. Glokom tedavisinde ana hedef RGH'lerini korumaktır. Bu nedenle son zamanlarda tedavi stratejilerinde GİB düşüşüne ek olarak, nöron koruyucu yaklaşımın da dikkate alınması konusunda öneriler gündeme gelmektedir. Dolayısıyla RGH kaybını engelleyen moleküller ve gliozis/mikroglial aktivasyonu baskılayarak nöroinflamasyonda azalma sağlayabilecek tedavi ajanlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar da hız kazanmaktadır.[5][6][7][8].

Nöroinflamasyon, optik sinir başı veya retina düzeyinde astrositler, mikroglialar ve periferik hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından oluşturulan bağışıklık ile ilgili herhangi bir cevap olarak tanımlanabilir [9]. Mikroglia hücreleri merkezi sinir sistemindeki birincil immun sistem hücreleridir. Sinir sistemi homeostazının devamı, korunması ve restorasyonunda görev yapmaktadırlar. Mikroglial hücreler, nöronların hayatta kalması için yaşamsal görevlerde yer almalarına rağmen, bu dengeyi bozan herhangi bir uyarı ile bir dizi nörodejeneratif bozuklukta nedensel faktör olarak karşımıza çıkabilmektedirler. Nöronal sağ kalımı risk altına sokabilecek stres koşulları altında mikroglial hücreler aktive olarak hasar gören hücrelerle etkileşime girer hale gelirler [8] [10][11].

Bu çalışmanın amacı bu bilgilerden yola çıkarak nöron koruyucu etkinliği daha önceki çalışmalarla gösterilmiş bir molekül olan brimonidinin, ratlarda geçici retinal iskemisi modeli

oluşturularak mikroglial hücreler üzerindeki morfolojik etkilerinin araştırılması ve nöroinflamatuvar süreçteki etkinliğinin belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntemler

Deney Hayvanı Seçimi ve Grupların Oluşturulması

Araştırma ARVO oftalmik ve görme araştırmalarında deney hayvanlarının kullanımı bildirimini dikkate aldı ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca onaylandı. Erkek Wistar albino ratların (250-300 gr) sağ gözlerinde geçici retinal iskemi modeli oluşturuldu. Sol gözler kontrol olarak tanımlandı. Mekanik optik sinir hasarı oluşturulan ratlar üç gruba ayrıldı: topikal brimonidin tedavisi uygulanan gözler (grup 1, n=4), sham tedavi uygulanan gözler (grup 2, n=4) ve uygulanma yapılmayan kontrol grubu (grup 3, n=4). Tedavi topikal olarak uygulandı. Tedavi uygulanan ratlara 4 hafta sonunda ksilazain-ketamin anestezisi altında enükleasyon işlemi yapıldı ve sakrifiye edildiler.

Geçici Retinal İskemi Modelinin Oluşturulması

Ksilazain-ketamin anestezisine ek olarak ratlara topikal proparakain Hcl %0,5 damla uygulandı. Her ratın sağ pupili sikloptolat %1 ve tropikamid %0,5 damla ile dilate edildi. Operasyon mikroskobu altında sağ gözün ön kamarası, 1 L'lik dengeli tuz çözeltisine (BSS, Alcon Laboratories, Fort Worth, TX) tutturulmuş 30 gauge bir iğne ile kanüle edildi. GİB 50 dakika süre ile 70-80 mmHg ye yükseltildi. Basınca bağlı iskemi, oftalmoskopta gözlerin beyazlaşması ve arteriyel nabız eksikliği açısından incelenerek doğrulandı. İğne çıkarıldıktan sonra, reperfüzyonu doğrulamak için oküler fundus gözlendi. Potansiyel enfeksiyonları önlemek için antibiyotikli göz merhemi uygulanarak operasyona son verildi.

Dokuların Hazırlanması

Enükle edilmiş gözler %10 tamponlu formalinde sabitlendi. Gözün tüm katmanlarını inceleyebilmek için fiksasyon solüsyonuna alkol eklendi ve intravitreal alkol enjeksiyonu yapıldı. Enükle edilmiş gözler, optik sinirden korneaya yatay kesitlerle ikiye kesildi. Parafin bloklarından doku mikrodizi örnekleri oluşturuldu. Tüm dokular Hematoksilin Eosin (H&E) boyaması ile incelendi.

Doku örneklerindeki mikroglialların belirlenmesi ve morfolojik detayların değerlendirilebilmesi için immunohistokimyasal inceleme yapıldı. İmmünhistokimyasal incelemeler için Iba-1 (1: 1000, klon: poliklonal, EDTA, Synaptic Sistemler, Göttingen,

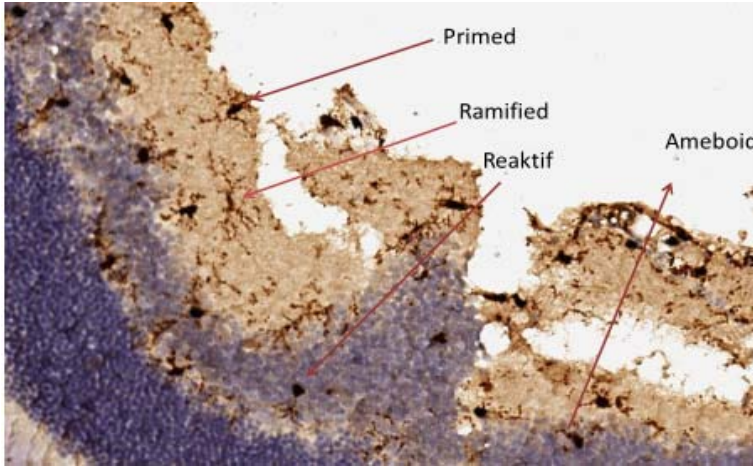
Almanya) antikorunu kullanıldı. Değerlendirmeler, bu konuda deneyimli ve preparatlar konusunda bilgilendirilmemiş bir patolog tarafından her bir retinanın posterior kısmından başlanarak 10 büyük büyütme alanındaki mikroglialar sayılarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Hücre sayısı ve gruplar arası mikroglia hücrelerinin oranlarındaki istatistiksel anlamlılık Kruskal Wallis ve Friedman testleri ile belirlendi. İstatistiksel analizler SPSS 18.0 pencereleri (SPSS Inc, Chicago, Illinois, ABD) ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

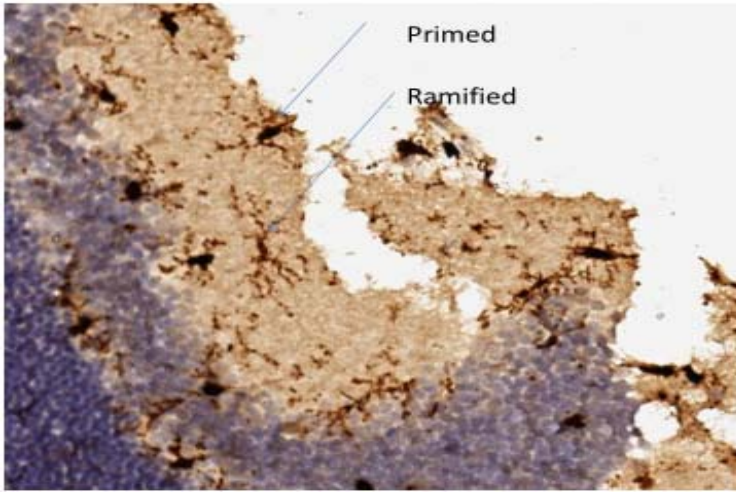
Mikroglial Fenotiplerinin Morfolojik Analizleri

Tüm retina katmanlarında Iba-1 immunreaktif mikroglia hücrelerinin sayımı ve değerlendirilmesi yapıldı. Önceki çalışmalarda tarif edilen dört ayrı morfolojik fenotip retina katmanlarında kolayca tanınabilir durumdaydı [1][12][13] [14]. Klasik olarak farklı aktivasyon durumlarına göre mikroglia fenotipleri ramified, primed, reaktif ve amoeboid-fagositik olarak tanımlanmıştır (Figür 1).



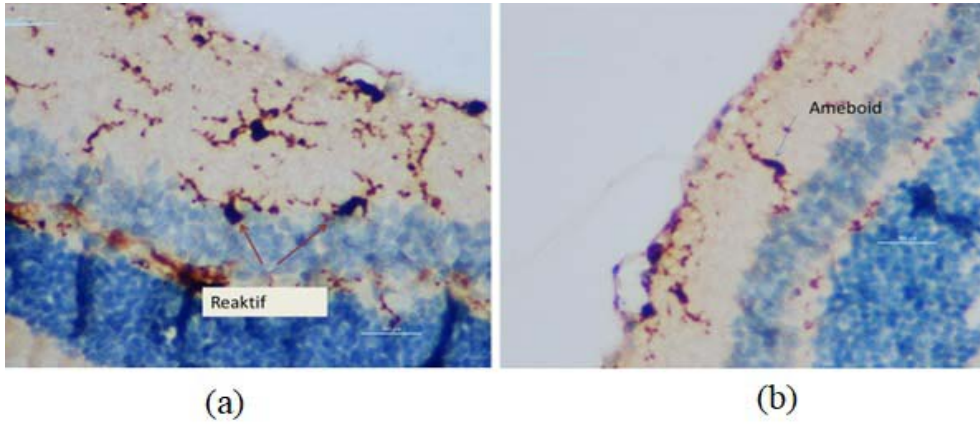
Figür 1: Farklı aktivasyon durumlarına göre mikroglialar

Ramified mikroglialar küçük bir hücre gövdesine sahip, oldukça dallanmış uzantıları olan hücrelerdir. Primed mikroglialar ise ramified hücrelere oranla daha irice ve elipsoid hücre gövdelerine sahip olup, dallanmaları ramified hücreler kadar uzun ve belirgindir (Figür 2).



Figür 2: Ramified mikroglialar küçük gövdeleri ve oldukça dallanmış uzantıları, Primed mikroglialar daha büyük hücre gövdeleri ve ramified hücrelere benzer dallanmış uzantılar

Reaktif ve amoeboid mikroglialar her ikisi de amoeboid şeklindeki hücre gövdelerine sahiptir. Reaktif mikroglia hücreleri genel olarak hücre gövdesi çapından daha uzun ve dallanmaları devam eden uzantılara sahiptir (Figür 3a). Amoeboid mikroglialar ise uzantıları olmayan ya da hücre gövdesi çapı boyunca olduğu görülen dallanmamış uzantılara sahip hücrelerdir (Figür 3b).

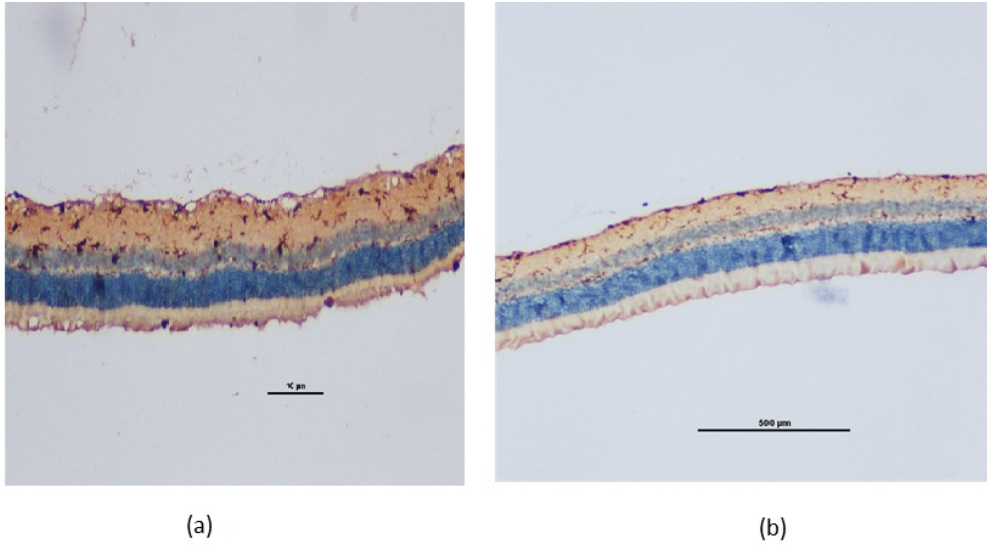


Figür 3: (a) Reaktif mikroglialar amoeboid hücre gövdeleri, az sayıda uzantı ve dallanmalar, (b) Amoeboid mikroglialar hücre gövdesinden çıkan dallanması olmayan uzantılar

Bulgular

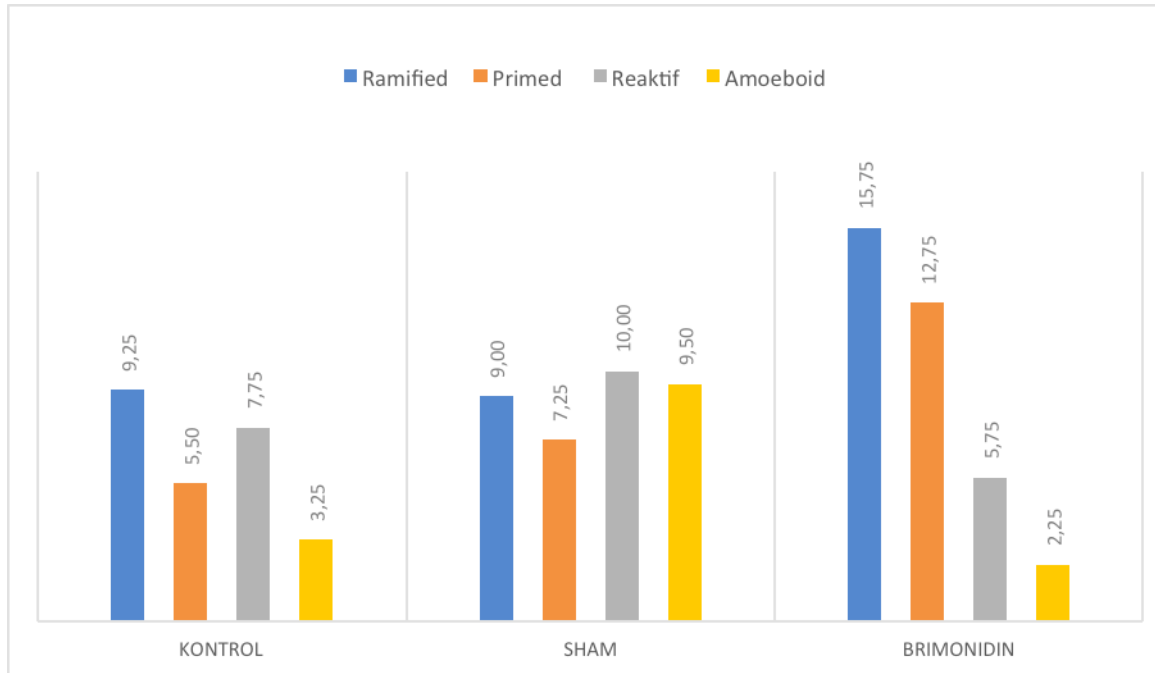
Geçici retinal iskemi modelinde Iba-1 pozitif mikroglia hücrelerinin sayısı kontrol grubunda 43.3 ± 6.02 , sham tedavi grubunda 100.67 ± 7.50 ve topikal brimonidin grubunda

57.67 ± 14.64 idi (Figür 4). Topikal brimonidin grubunda toplam Iba-1 pozitif mikroglial hücre sayısındaki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).



Figür 4: Sham grubu(a) ile karşılaştırıldığında topikal brimonidin tedavisinde (b) mikroglia sayısında azalma ve morfolojisindeki değişim

Ramified ve primed mikroglia hücrelerini karşılaştırdığımızda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Tablo 1).



Tablo 1: Mikroglia fenotiplerinin gruplardaki sayıca dağılımı

Reaktif mikroglial hücre sayısı sham tedavisi grubunda 10 ± 1.41 , topikal brimonidin grubunda ise 5.75 ± 1.71 idi ($p < 0.05$). Amoeboid-fagositik mikroglial hücrelerin sayısı sham tedavi grubunda 9.5 ± 1.29 , topikal brimonidin grubunda ise 2.25 ± 0.50 idi ($p < 0.05$). Reaktif ve amoeboid hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu (Tablo 1).

Tartışma

Merkezi sinir sisteminin immün sistem uyumlu hücreleri olan mikroglialar nöropatolojik sensörler olarak görev yaparlar ve fizyolojik koşullar altında nöron koruyucu özellikleri vardır. Mikroglialar travma ve dejeneratif süreçlere immün-fenotipik ve morfolojik değişiklikler göstererek proliferasyon, migrasyon ve inflamatuvar sitokin üretimi gibi cevaplar verirler. Kontrolsüz bir mikroglial cevap ise, aşırı inflamasyon nedeni ile nöronal sağ kalımı riske sokabilir. Alzheimer, Parkinson ve glokom gibi çeşitli nörodejeneratif süreçlerle ilerleyen hastalıkların etiopatogenezinde nöroinflamatuvar yanıt önemli olup, mikroglial hücreler bu yanıtın anahtar oyuncularındır [15][16][17][18][19].

Dünyada körlüğün önde gelen nedenlerinden olan glokom, geri dönüşü olmayan RGH ölümü ve görme alanı kaybı ile karakterizedir. Glokomatöz hastalığın ilk aşamalarından itibaren glial aktivasyonun önemli olduğu gösterilmiştir[20]. Glokomdaki nörodejeneratif süreçte aktive olan mikroglial hücreler morfolojik değişiklikler sergileyebilirler. Bu bağlamda çoğalabilir, göç edebilir veya enzimlerin, reseptörlerin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etkilerini değiştirebilirler. Sonuçta aşırı inflamatuvar yanıt nöronal dejenerasyona sebep olur [21][22]. Aktif mikroglial uzantıların geri çekilmesi, hücre gövdesinin genişlemesi ve büyümesi, myeloid hücre belirteçlerinin ekspresyonu gibi süreçlerden geçerler. Yüksek aktivasyon durumlarında mikroglia hücreleri amoeboid morfoloji gösterir ve makrofajlar gibi davranarak fagositoz yaparlar [23][24].

Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, geçici retinal iskemi modeli oluşturularak sham tedavi uygulanan gözlerde Iba-1 pozitif mikroglial hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmuştur. Eş zamanlı olarak amoeboid formda belirgin artış olması, oluşturulan deneysel modelde iskemi sonrası amoeboid fagositik cevap oluşumu ile nöroinflamasyonun tetiklendiği saptanmıştır.

Farklı morfolojilere ek olarak, aktive edilmiş mikroglialar farklı fonksiyonel fenotiplere sahiptir. Hasar görmüş hücreler IFN- γ gibi sitokinler salgılayarak M1 mikroglial

aktivasyona sebep olurlar. Bu fenotip, dokuda inflamasyona sebep olan proteolitik enzimler ve pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-12 ve NO gibi) üretimi ile karakterizedir. M1 mikroglial hücreler amoeboid morfoloji ve yüksek fagositik kapasiteye sahiptir [23][25][26]. İkinci aktif mikroglial fenotip, M2, anti inflammatuar mediatörler ve nörotrofik faktörler salgılayarak nöronlar için destekleyici bir mikro-ortam oluşturur. M2 mikroglial hücreler daha küçük gövdeye ve dallanmış uzantılara sahiptirler [26][27].

Klinik glomk çalışmalarında ve deneysel glomk modellerinde proinflammatuar sitokin seviyeleri yüksek bulunmuştur. Deneysel glomk çalışmalarında aktif mikroglial hücrelerin göç edebildikleri ve ölü hücreleri ortadan kaldırdıkları gösterilmiştir [10][28][29][30]. Amoeboid mikrogliaların insan lamina cribrosasında zarar görmüş aksonları fagosite ettiği belirlenmiştir [31]. Çalışmamızda literatürü destekler şekilde geçici retinal iskemi oluşturulan gözlerde amoeboid cevapta artış gözlendi, ancak immünolojik belirteçlere bakılmadığı için proinflammatuar sitokin seviyelerindeki değişim gösterilemedi.

Glomk tedavisinde GİB düşüşüne ek olarak nöron koruyucu etkileri olan, nöroinflamasyonu baskılayan ve immunomodulasyonu düzenleyen ajanlar gündemdedir. Brimonidin glomk tedavisinde hem GİB düşüşü sağlayan hem nöron koruyucu etkileri klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilen bir ajandır. Brimonidinin deneysel kemirgen modellerinde sistemik olarak uygulandığında hipotansif etkisinin olmadığı, ancak nöron koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir[32]. İncelenen diğer olası etki mekanizmaları; apoptotik kaskadın inhibisyonunu, glutamat toksisitesinin azaltılması, RGH'nin güçlü bir nöroprotektoru olan endojen beyin türevi nörotrofik faktör ekspresyonu artışıdır [33][34][35][36].

Bizim bilgimize göre literatürde brimonidinin mikroglialar ve nöroinflamasyon üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma yoktur. Bu açıdan çalışmamız topikal brimonidin tedavisinin mikroglial hücreler üzerindeki etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Brimonidinin gliozisi azalttığı; immunohistokimyasal çalışmalarda astrosit, müller hücre sayılarında ve glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonunda azalma oluşturduğu gösterilmiştir, ancak mikroglialar üzerindeki etkileri net bilinmemektedir [32][37] [38]. Çalışmamızda topikal brimonidin tedavisi uygulanan ratlarda reaktif ve amoeboid-fagositik mikroglial hücrelerin sayısındaki anlamlı azalma brimonidinin nöroinflamasyonu azaltıcı etkilerinin olabileceğine işaret etmektedir. Ramified fenotipte mikrogliaların sayıca artmış olması, içlerinde M2 benzeri aktif anti inflammatuar mikroglialarda artış olabileceğini

düşündürmekle birlikte, bunu göstermek için mikroglia hücre yüzey belirteçlerinin çalışıldığı daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç

Literatür glokomatöz nörodejenerasyonda immün sistem hücrelerinin önemini göstermektedir. Glial kaynaklı nöroinflamasyonun RGH sağ kalımını etkileyebildiği bilinmektedir. Glokomda yeni tedavi stratejileri tartışılırken nöron koruma ile birlikte nöroinflamasyonun baskılanması da gündemdedir. Nörodejenerasyonda immün hücrelerin spesifik tepkilerini ve etkileşimlerini göstermek için şüphesiz daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- [1] S. G. Torres-Platas *et al.*, “Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex,” *J. Neuroinflammation*, vol. 11, p. 12, Jan. 2014.
- [2] A. I. Ramirez *et al.*, “The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer’s Disease, Parkinson, and Glaucoma.,” *Front. Aging Neurosci.*, vol. 9, p. 214, 2017.
- [3] A. Sawada, J. A. Rivera, D. Takagi, T. Nishida, and T. Yamamoto, “Progression to Legal Blindness in Patients With Normal Tension Glaucoma: Hospital-Based Study,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 56, no. 6, p. 3635, Jun. 2015.
- [4] “The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group.,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 126, no. 4, pp. 498–505, Oct. 1998.
- [5] G. Tezel, B. C. Chauhan, R. P. LeBlanc, and M. B. Wax, “Immunohistochemical Assessment of the Glial Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Glaucoma,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 44, no. 7, p. 3025, Jul. 2003.
- [6] G. Tezel and X. Yang, “Caspase-Independent Component of Retinal Ganglion Cell Death, In Vitro,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 45, no. 11, p. 4049, Nov. 2004.
- [7] M.-L. Ko, P.-H. Peng, M.-C. Ma, R. Ritch, and C.-F. Chen, “Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 39, no. 3, pp. 365–373, Aug. 2005.
- [8] S. Zhang *et al.*, “Detection of early neuron degeneration and accompanying glial responses in the visual pathway in a rat model of acute intraocular hypertension,” *Brain Res.*, vol. 1303, pp. 131–143, Nov. 2009.
- [9] P. A. Williams *et al.*, “Neuroinflammation in glaucoma: A new opportunity,” *Exp. Eye Res.*, vol. 157, pp. 20–27, Apr. 2017.
- [10] B. Rojas *et al.*, “Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers,” *J. Neuroinflammation*, vol. 11,

no. 1, p. 133, Jul. 2014.

- [11] G. Tezel, B. C. Chauhan, R. P. LeBlanc, and M. B. Wax, "Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 7, pp. 3025–33, Jul. 2003.
- [12] N. Stence, M. Waite, and M. E. Dailey, "Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices," *Glia*, vol. 33, no. 3, pp. 256–266, Mar. 2001.
- [13] Z. Sołtys, M. Ziaja, R. Pawliński, Z. Setkiewicz, and K. Janeczko, "Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods," *J. Neurosci. Res.*, vol. 63, no. 1, pp. 90–97, Jan. 2001.
- [14] G. W. Kreutzberg, "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS," *Trends Neurosci.*, vol. 19, no. 8, pp. 312–318, Aug. 1996.
- [15] M. P. Mattson, "Apoptosis in neurodegenerative disorders," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 2, pp. 120–130, Nov. 2000.
- [16] A. I. Ramirez *et al.*, "The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 9, p. 214, Jul. 2017.
- [17] A. Verkhratsky, V. Parpura, M. Pekna, M. Pekny, and M. Sofroniew, "Glial cells in the pathogenesis of neurodegenerative diseases," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 5, pp. 1291–1301, Oct. 2014.
- [18] C. K. Glass, K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto, and F. H. Gage, "Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 918–934, Mar. 2010.
- [19] I. J. MacCormick, G. Czanner, and B. Faragher, "Developing retinal biomarkers of neurological disease: an analytical perspective," *Biomark. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 691–701, Jul. 2015.
- [20] G. Tezel and Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference Working Group, "The Role of Glia, Mitochondria, and the Immune System in Glaucoma," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 50, no. 3, p. 1001, Mar. 2009.
- [21] G. W. Kreutzberg, "Microglia, the first line of defence in brain pathologies.," *Arzneimittelforschung.*, vol. 45, no. 3A, pp. 357–60, Mar. 1995.
- [22] B. Rojas *et al.*, "Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers," *J. Neuroinflammation*, vol. 11, no. 1, p. 133, Jul. 2014.
- [23] R. M. Ransohoff and A. E. Cardona, "The myeloid cells of the central nervous system parenchyma," *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 253–262, Nov. 2010.
- [24] G. C. Brown and J. J. Neher, "Microglial phagocytosis of live neurons," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, no. 4, pp. 209–216, Apr. 2014.
- [25] H. González, D. Elgueta, A. Montoya, and R. Pacheco, "Neuroimmune regulation of

- microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 274, no. 1–2, pp. 1–13, Sep. 2014.
- [26] H. Kettenmann, U.-K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, “Physiology of Microglia,” *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 2, pp. 461–553, Apr. 2011.
- [27] M. M. Varnum and T. Ikezu, “The Classification of Microglial Activation Phenotypes on Neurodegeneration and Regeneration in Alzheimer’s Disease Brain,” *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 60, no. 4, pp. 251–266, Aug. 2012.
- [28] B. I. Gallego *et al.*, “IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma,” *J. Neuroinflammation*, vol. 9, no. 1, p. 586, Dec. 2012.
- [29] A. Bosco *et al.*, “Early Reduction of Microglia Activation by Irradiation in a Model of Chronic Glaucoma,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e43602, Aug. 2012.
- [30] L. Yuan and A. H. Neufeld, “Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 64, no. 5, pp. 523–532, Jun. 2001.
- [31] A. H. Neufeld, “Microglia in the Optic Nerve Head and the Region of Parapapillary Chorioretinal Atrophy in Glaucoma,” *Arch. Ophthalmol.*, vol. 117, no. 8, p. 1050, Aug. 1999.
- [32] E. WoldeMussie, G. Ruiz, M. Wijono, and L. A. Wheeler, “Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 42, no. 12, pp. 2849–55, Nov. 2001.
- [33] H. S. KIM, Y. I. CHANG, J. H. KIM, and C. K. PARK, “Alteration of retinal intrinsic survival signal and effect of [α]2-adrenergic receptor agonist in the retina of the chronic ocular hypertension rat,” *Vis. Neurosci.*, vol. 24, no. 02, pp. 127–139, Mar. 2007.
- [34] M. Hernández, J. H. Urcola, and E. Vecino, “Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments,” *Exp. Eye Res.*, vol. 86, no. 5, pp. 798–806, May 2008.
- [35] K. Ma, L. Xu, H. Zhang, S. Zhang, M. Pu, and J. B. Jonas, “Effect of Brimonidine on Retinal Ganglion Cell Survival in an Optic Nerve Crush Model,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 147, no. 2, pp. 326–331, Feb. 2009.
- [36] U. Yiğit *et al.*, “An immunohistochemical analysis of the neuroprotective effects of memantine, hyperbaric oxygen therapy, and brimonidine after acute ischemia reperfusion injury,” *Mol. Vis.*, vol. 17, pp. 1024–33, Apr. 2011.
- [37] L. Vidal, F. Díaz, A. Villena, M. Moreno, J. G. Campos, and I. Pérez de Vargas, “Reaction of Müller cells in an experimental rat model of increased intraocular pressure following timolol, latanoprost and brimonidine,” *Brain Res. Bull.*, vol. 82, no. 1–2, pp. 18–24, Apr. 2010.
- [38] D. Lee *et al.*, “Brimonidine blocks glutamate excitotoxicity-induced oxidative stress and preserves mitochondrial transcription factor a in ischemic retinal injury,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e47098, 2012.

