

Yaygın Retina Hastalıklarında Deneysel Hayvan Modellerinde Gelişmeler: Rodentler'den Zebra Balığı'na

Update on experimental animal models in common retinal diseases: Rodents to Zebrafish

Muhammed Necati DEMİR¹, Mehmet Akif ACAR¹

ÖZ

Diyabetik retinopati (DR) ve Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu (YBMD) görme kaybı ile sonuçlanabilen yaygın retina hastalıklarıdır. Son yıllarda tedavi sürecinde yaşanan olumlu gelişmelere rağmen, bu ve diğer retina hastalıklarının patofizyolojisi ve tedavisine yönelik arayışlar halen devam etmektedir. Bu konuda deneysel çalışmalar için uygun deney hayvanı seçimi çok önemlidir. Literatürde çok sayıda hayvan modeli bildirilmekle birlikte ideal modele henüz ulaşılamamıştır. Bu makalede özellikle DR, YBMD ve benzer retina hastalıkları ile ilgili araştırmalarda kullanılabilecek deneysel hayvan modelleri hakkında bilgi sunulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Diyabetik retinopati, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, deneysel hayvan modelleri

ABSTRACT

Diabetic Rethinopathy (DR) and Age-related Macular Degeneration (AMD) are common retinal diseases that can result with visual impairment. In spite of the new developments in the treatment modalities of these diseases there are stil many ongoing research in patophysiology and treatment. The choice of experimental animal model is very important in these researches. There are several models reported in the literature. However, an ideal model has not yet been reached. In this review, it is aimed to share information about experimental animal models that can be used for DR, AMD and similar retinal diseases.

Key words: Diabetic rethinopathy, age-related macular degeneration, experimental animal models

Diyabetik retinopati (DR) ve Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu (YBMD) tüm dünyada körlüklerin en önde gelen sebeplerindedir. Günümüzde bu yaygın görülen retina hastalıklarının tedavisinde kullanılan yöntemler ve ilaçlar önemli faydalar getirmekle birlikte tedavi arayışları devam etmektedir. Dünya genelinde 415 milyon insan diyabet hastalığından etkilenmiştir ve 2040 yılında bu sayının 642 milyon olması beklenmektedir.¹ DR'li hastaların yaklaşık %60'ı 10 yıl içerisinde proliferatif sürece ilerlerken, %35'i ciddi görme kaybı yaşamaktadır.² YBMD 65 yaş üstü her üç kişiden birinde kuru veya yaş tip olmak üzere görülebilmekte, YBMD'nun %10-15'inden sorumlu olan yaş tip te-

davi edilmez ise hızla görme kaybına neden olabilmektedir.³ Bu hastalıkların patofizyolojisinin aydınlatılması ve tedavide gerekli aday ilaçların etkinliğinin araştırılması deneysel hayvan modellerinin kullanımını gerekli kılmakta ancak günümüzde halen ideal hayvan modelleri bulunmamaktadır.

Bu yazıda DR, YBMD gibi retina hastalıklarının fizyopatolojisi dikkate alınarak bu konularda çalışma yapmak isteyen araştırmacılar için son yıllarda kullanımı giderek artan zebra balığından, maymunlara kadar farklı türlerde hayvan modelleri tanıtılmakta, ülkemizde oftalmoloji alanındaki bilimsel çalışmaların artırılması hedefiyle araştırmacıların deneylerinde en uygun hayvan modelini seçmelerine yardımcı

1- Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Anabilim Dalı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi - Received: 14.03.2017

Kabul Tarihi - Accepted: 27.04.2017

Ret-Vit 2017;26:275-282

Yazışma Adresi / Correspondence Address:

M. Necati DEMİR

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları ABD
Ankara - TÜRKİYE

Phone: +90 532 316 5200

E-mail: demirnecati@hotmail.com

olmak amaçlanmaktadır. Bu makalede ayrıca retina damar tıkanıklığı, prematüre retinopati gibi proliferatif süreçle seyredilen diğer retina hastalıklarına yönelik çalışmalar için de faydalı olabilecek bilgiler verilmektedir.

Hayvan modelleri

Hastalıkların etiyoloji ve patofizyolojisinin aydınlatılması, korunma ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve tedavi ajanlarının etkilerinin gösterilmesi gerekliliği biyomedikal araştırmalarda deney hayvanlarının kullanımını vazgeçilmez kılmaktadır. Bu çalışmalarda ilgili patoloji kolay ve tekrarlanabilir şekilde oluşturulmalı, hayvanların bakımı kolay olmalıdır. Russel ve Burch deneysel hayvan çalışmalarında temel ilkeleri "3R" (Replacement, Reduction, Refinement) olarak özetlemişlerdir.⁴ Biyomedikal araştırmalarda kullanılan hayvan modelleri 5 grup içinde sınıflandırılabilir.⁵

- 1- Spontan modeller. Bu gruptaki hayvan modellerinde hastalıklar ve koşullar insanda olduğu gibi spontan olarak meydana gelir.
- 2- Deneysel modifiye modeller. Bu gruptaki hayvan modellerinde hastalıklar ve koşullar kimyasal veya cerrahi tekniklerle oluşturulur.
- 3- Genetik modifiye modeller. Bu gruptaki hayvan modellerinde hastalıklar ve koşullar genetik işlemlerle oluşturulur.
- 4- Negatif modeller. Bu gruptaki hayvanlar özel koşul veya hastalıklara karşı dirençlidir.
- 5- Orphan (Öksüz) modeller.

DR'de retinada meydana gelen yapısal ve fizyolojik değişimler:

DR retina neovaskülarizasyonunun varlığına göre nonproliferatif (NPDR) ve proliferatif diyabetik retinopati (PDR) olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. NPDR'nin ciddiyeti retinada meydana gelen yapısal patolojilerin varlığı ile belirlenmektedir. Kapiller endotel bazal membranındaki kalınlaşma ve perisit kaybı sonucu mikroanevrizmalar gelişirken, diyabetik sürecin ilerlemesi ve gelişen iskeminin de etkisi ile venöz damarlardaki lokalize genişlemeler, kıvrılmış retinal damarlar, intraretinal mikrovasküler anamoliler (İRMA) gibi yapısal değişiklikler ortaya çıkmakta ve bu değişimler ilerleme göstermektedir.^{6,7} Klinisyen için bu bulguların tanımlanması ve değişimler hastalığın izleminde oldukça önem taşımaktadır.

Diyabetik Maküla ödemi (DMÖ) gelişimi maküla anatomisinde değişime yol açarak başlangıçta görme bulanıklığına neden olmakta, ödemin ilerlemesiyle görme keskinliği giderek azalmaktadır. Mikroanevrizmalardan kaynaklanan fokal sızıntıların yanı sıra geniş bir nörovasküler ağla yapılanmış endotel bariyerinin bozulması ödeme neden olurken; Hipoksi, inflamasyon, oksidatif stres gibi patolojik süreçler

ve dokulardan salınan çeşitli mediatörler (büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler vb.) vasküler geçirgenliği artırarak retina içine daha fazla sıvının geçişine neden olmaktadır.^{8,9}

PDR sürecinde gelişen zayıf ve yırtılabilir özellikteki yeni damarlanmalar retina üzerinde veya vitreus içinde kanamalara yol açabilmekte ve bu yeni damarların çevresinde biriken doku proteinleri ve fibröz materyaller transforming growth factor- β (TGF- β) gibi büyüme faktörlerinin de etkisiyle fibrin membranlar oluşturarak retinada traksiyonlara ve dekolmana neden olabilmektedir.¹⁰

Günümüzde DR patofizyolojisine yönelik önemli immünojenik çalışmalar yapılmış bulunmaktadır. Müller hücrelerinin işleyişinde fibriler asidik protein salınımı, ganglion hücrelerinde preapoptotik moleküller ve apoptozis artmakta, retina kan damarlarında vazoendotelial büyüme faktörü (VEBF) seviyesi yükselmektedir. Diyabetik hastalarda aközde ve serumda çeşitli sitokinlerin, inflamatuvar ajanların ve anjiyojenik moleküllerin seviyeleri de yüksek bulunmaktadır. DR oksidatif stres, inflamasyon, protein kinaz C aktivasyonu gibi bağlantılı mekanizmaların ve çok sayıda molekülün görev aldığı oldukça kompleks ve araştırmaya açık bir patolojik süreç olarak karşımıza çıkmaktadır.¹¹⁻¹⁶

DR tedavisi gerekli sistemik tedavi altında lokal olarak göze uygulanan lazer fotokoagülasyon, göz içi ilaç tedavileri ve cerrahi tedavilerden oluşmaktadır. DR tedavi süreçleri genel olarak komplikasyonların önlenmesi ve düzeltilmesi üzerinde ilerlemekte fizyopatolojiye dönük tedavi arayışları halen devam etmektedir. Uygulanan tüm lokal tedaviler özellikle görme keskinliğinin korunmasında kazanımlar sağlamakla birlikte ne yazık ki kalıcı çözümler getirmemekte ve önemli yan etkileri olabilmektedir. Kullanımı giderek artan intravitreal steroid ve anti-VEBF uygulamaların gözde kök hücreler üzerine etkilerini araştıran çalışmalar da yayımlanmıştır.^{17,18}

DR tedavisinde hedef bozulmuş nörovasküler ağın yeniden yapılandırılması, hücreler arası bütünlüğün tekrar sağlanması ve patolojik yeni damarlanmanın önlenmesi olmalıdır ki bu durum çok sayıda çalışma gerektirmektedir. Tedavide kullanılan veya aday ilaçların klinik öncesi zorunlu testleri de dikkate alındığında bu çalışmalar için uygun deneysel hayvan modellerinin ne kadar önemli olduğu aşikardır. Mevcut hayvan modellerinin hiçbiri insandaki DR patofizyolojisini tamamen yansıtmamaktadır ve çoğu hayvan modeli DR'nin erken bulgularını bize sunmaktadır.^{7,14} Aşağıda uzun yıllar laboratuvarında yaygın olarak kullanılmış olan kemirgen türlerinden büyük hayvan modellerine kadar DR hayvan modellerinin bize sunduğu imkanlar ve kısıtlar hakkındaki bilgiler örnek modeller ile sunulmaktadır.

DR Hayvan Modelleri

Diyabetes Mellitus (DM) ilk olarak 1920 yılında bir köpekte pankreasın tamamen çıkarılması ile modellendirilmiştir. DM için kullanılan hayvan modelleri genel olarak üç sınıf

altında toplanmaktadır ki bu sınıflama DR modelleri için de geçerlidir.^{5,14,16}

- 1- Hiperglisemi sağlanarak oluşturulan modeller
- 2- Spontan modeller
- 3- Retinal yeni damarlanma modelleri

Deney hayvanlarında farmakolojik olarak streptositozin (STZ) ve alloksan (ALX) gibi kimyasal ajanlar ile pankreasdaki β hücrelerini öldürerek, cerrahi olarak pankreasın çıkarılması ile veya galaktoz/sukroz ile besleme yapılarak hiperglisemi oluşturmak mümkündür.^{5,14,19-22}

Farmakolojik hiperglisemi modelinde en yaygın kullanılan kimyasal ajan STZ dir. STZ kimyasal olarak pankreas β hücrelerini öldürerek etki eder. Rodent ve büyük hayvan modellerinde yaygın olarak kullanılan bu yöntem zaman etkinliği avantajı taşır. STZ DR fare modelinde bir hafta içerisinde retinopatiye bağlı patolojik bulguların gözlenmesi mümkündür.¹⁹ Aynı amaçla kullanılan bir diğer ajan olan ALX ile indüklenen hayvan modellerinde hafif derecede DR bulguları elde edebilmek için daha uzun bir süreye ihtiyaç vardır ki bu süre fare için 3 ayı bulabilmektedir.²⁰

Yüksek galaktoz, yağ, sukroz diyeti ile beslenen büyük deney hayvanlarında DR hayvan modeli oluşturmak mümkündür. Ancak bu teknik süre dezavantajı taşımaktadır.^{21,22} İstisnai olarak zebra balığı modelinde balık havuzuna yüksek konsantrasyonda glukoz konarak hiperglisemi oluşturmak oldukça kolaydır ki bu konu hakkında ileride bilgi verilecektir.²³

Cerrahi teknik olarak pankreotektomi yapılan özellikle kedi²⁴, maymun²⁵ gibi hayvan modellerinde 1-2 hafta gibi bir sürede hiperglisemi oluşturulması mümkünken ne yazık ki bu hayvanlarda DR bulgularının gözlenebilmesi için yıllarca beklemek gerekebilmektedir.²⁵

Spontan DR hayvan modellerinin oluşturulması daha çok genetik teknolojinin kullanılması ile mümkün olmaktadır. Bu teknikle rodent ve zebra balığı gibi hayvan modellerinde yüksek başarı oranı ile kalıcı fenotipler oluşturmak mümkündür. Endojen mutasyon aktarımı ile spontan hiperglisemi oluşturulan deney hayvanları çiftleştirilerek çoğaltılıp DR hayvan modeli olarak kullanılır. Tekniğin en önemli dezavantajı yüksek maliyet gerektirmesi ve teknoloji bağımlı olması iken oluşturulacak DR modeli için uzun zaman gerekmektedir.^{14,16,23}

Retinal anjiyojenezis modeli yüksek serum glukoz düzeyi olmaksızın retinada yeni damarlanmanın oluşturulması esasına dayanmaktadır. Bu model yaygın olarak yüksek oksijene maruziyet ve VEBF ajanlarının kullanımı ile oluşturulmaktadır. VEBF kullanımı tavşan ve maymun gibi büyük hayvan modelleri için daha uygundur. Prematüre retinopatisi veya vasküler tıkanıklıklara bağlı proliferatif retinopatiler için de bu modelden faydalanmak mümkündür.¹⁶

Retina hastalıkları için hayvan modelleri ile çalışırken fundus fotoğrafı (FF), fundus floresein anjiyografisi (FFA), optik kohorens tomografi (OKT), elektrofizyoloji gibi tekniklerden faydalanabileceğimiz gibi doku ve kök hücre^{17,18} düzeyinde çeşitli histolojik, moleküler ve biyokimyasal tekniklerden de faydalanmamız mümkündür.²⁶

Rodent DR Modelleri

Rodent modeller kolay elde edilebilen, nispeten ucuz, kısa çoğalma döngüleri olan ve insana benzer genetik alt yapıları bulunan deney hayvanlarıdır. Bu grup içinde en fazla kullanılan hayvan türleri fare ve ratlardır. Bu hayvan modelinde erken DR bulgularını kolayca görebilmek mümkünken insandaki patolojik bulguları tam yansıtmaması ve geç dönem bulguların oluşturulamaması modelin en önemli eksikliğini oluşturmaktadır. Diğer taraftan FF, OKT, FFA gibi tetkiklerin bu hayvan modelinde gerçekleştirilmesi açısından da zorluklar söz konusudur.^{14,16,26}

İntraperitoneal (ip) STZ enjeksiyonu sonrası fare modelinde ilk üç gün içerisinde serum glukoz düzeyi 350mg/dl'yi aşar. İlk haftanın sonunda vasküler geçirgenlikte artış FITC (Fluorescein isothiocyanate)-dextran gibi bir molekül i.v verilmesi ile modellenenmektedir. Bu aşamada araştırmacılar aday ilaçların vasküler geçirgenlik üzerine olan etkilerini 24 saatlik bir zaman dilimi içerisinde test edebilirler. Aynı hayvan modelinde 7-12. günler arası yüksek oksijen maruziyetine bırakılma sonucu 14-17. günler arası retina yeni damarlanmaları elde etmek ve bu damarlara etki edebilecek aday ilaçları test etmek de mümkündür.^{7,27}

STZ ile oluşturulan DR fare modelinde doz uygulamada (180-200mg/kg, ip, tek doz) (100-40mg/kg, ip, ardışık 2-5 günde çoklu doz) açısından çok çeşitlilik olmakla birlikte tüm farelerde 1-4 hafta içerisinde hiperglisemi gelişmektedir. Rat modelinde STZ uygulamasında intravenöz (i.v) uygulama mümkün olup (30-65mg/kg, i.v tek doz) i.p. olarak ise 45-80mg/kg tek doz uygulama ile DR modeli oluşturmak mümkündür.¹⁴

Spontan olarak oluşturulan db/db fare modelinde doğum sonrası 8. haftada hiperglisemi başlar. Mikrovasküler komplikasyonların görülmeye başladığı ve VEBF seviyesinin yükseldiği 18. haftada model DR araştırmalarına başlamaya uygun hale gelir.²⁸ Spontan fare modeline diğer bir örnek olan Akita (Ins2Akita) farelerinde hiperglisemi doğum sonrası 4. haftada başlamakta ilerleyen dönemlerde mikrovasküler komplikasyonlar gözlenmekte bu hayvan modelinde 9 ay sonunda retina dış katında yeni damarlanmalar izlenebilmektedir.²⁹

Biobreeding (BB) rat modeli tip 1 DM modeli olarak oluşturulmuş olup³⁰, Zucker diyabetik spontan tip 2 rat modelinde (ZDF) diyabet eğilimi şişman erkek ratta ortaya çıkmakta, 6-7. haftada hiperglisemi gelişmekte ve doğum sonrası 20. haftada bu model DR çalışmalarına hazır hale gelmektedir.³¹

Şişman olmayan Goto-Kakizaki ratları (GK), Otsuka Long_Evans Tokushima fatty (OLEFT) ve yine şişman olmayan spontan diyabetik Torii (SDT) ratları tip 2 DR modeli için oluşturulmuş diğer rat model örnekleridir.^{7,14,26} SDT Fatty rat modeli insana benzer olarak ciddi retinopati bulguları gösterdiğinden diğer ratlardan ayrılmaktadır. Bu modelde diyabet normal SDT modelinden farklı olarak doğum sonrası 4 kat daha kısa bir sürede 5 hafta içerisinde gelişmektedir.³² Örnekleri verilen tüm bu fare ve rat DR modellerinde erken dönem retina vasküler değişimleri modellemek, gerek DM patolojisi mekanizmalarına yönelik gerekse VEBF ve aday ilaç çalışmaları yapmak mümkün olmaktadır.

Kimba ve OIR farelerinde insan VEBF165 gen mikroenjeksiyonu veya yüksek oksijen maruziyeti ile retinal yeni damarlanma modelleri oluşturmak mümkündür. Kimba farelerinde retina yeni damarlarında artışla birlikte retinada iskemi bulguları izlenirken; %75 oksijen maruziyetine bırakılan OIR farelerinde doğum sonrası 12. günde retinal damarlarda regresyon, iskemi ve 17. günde yeni damarlanma oluşabilmektedir.^{33,34} Floresein isothiocyanate-dextran veya isolectin-B4 veya CD31 gibi endotel hücre belirleyicileri ile retina yeni damarlanmaları görünür hale gelmektedir.³⁵ Diyabetik Torii Rats (DTR) modeli ile retina yapısal anomalilerin yanı sıra PDR sürecine benzer şekilde traksiyonel retina dekolmanı (TRD) ve vitreus hemorajisi (VH) gibi komplikasyonlar gösterilebilir. Yaklaşık 20. haftada glikozüri görülen bu modelde 40. haftada erkek ratların tamamına yakınında DM gelişmektedir. Ancak insandan farklı olarak bu modelde yeni damarlanmalar belirgin bir retina iskemisi ile birlikte olmamaktadır.³⁶

Tavşan DR Modeli

Tavşan modelinde farmakolojik olarak veya diyetle DM oluşturmak mümkünken VEBF ile indüklenmiş yeni damarlanmalar oluşturulabilir. Bu modelde 100mg/kg/i.v STZ enjeksiyonu ile hiperglisemi ve 19. haftadan sonra çeşitli derecelerde retinopati bulguları elde etmek mümkündür. Ancak oluşan retinopatilerin çeşitliliği modelin kullanımını sınırlı kılmaktadır.^{21,37}

Tavşanların standart yemeklerine 24 hafta süreyle %10 domuz yağı, %40 sukroz ve % 0.1-0.5 kolesterol eklenmesi ile diyetle oluşturulmuş DR modeli geliştirilmiştir. Bu süre içerisinde retinada mikroanevrizmalar izlenebilmekte beslenme süresinin uzatılması ile bulgular ilerleyebilmektedir ki bu durum insandaki retinopati ile uyumlu ama yavaş bir gelişim göstermektedir.²¹

İnsan rekombinan VEBF polimerik moleküllerin tavşan vitreusuna yerleştirilmesini takiben 7 gün içerisinde retina damarlarında genişleme ve kıvrımlanma gözlenmiş, 14-21. günler arasında oluşan yeni damarlardan sızıntı FFA ile gösterilmiştir. Bu modelde yeni damarlanmanın 35. haftada regrese olması VEBF molekülünün bitmesine dayandırılmıştır.³⁸ Tavşanlarda oluşturulan yeni damarlanma modelin-

de araştırmacıların dikkat etmesi gereken bir konu vardır ki bu da optik arterin horizontal olarak iki yönlü dallanması ve bu damarların halka şeklinde bir kapiller ağla devam etmesidir. Özellikle medüller bant üzerindeki lezyonlarda buradaki damar yapısı nedeniyle fonksiyonel hasar gösterilemeyebilir ayrıca vasküler ağ sadece küçük bir alandadır ve bu durum deneylerde dikkate alınmalıdır.¹⁴

Kedi DR modeli

DR modeli olarak kullanılan kedilerin büyük çoğunluğunda STZ/ALX enjeksiyonu ile veya olmaksızın pankreatektomi tekniği kullanılmaktadır. Cerrahi sonrası iki hafta içerisinde hiperglisemi gelişen kedilerde birkaç yılı (5-7 yıl) bulan sürelerde erken dönem retinopatiler rapor edilmiştir ancak bu model maliyeti, gözlem süresinin çok uzun olması ve moleküler çalışmalar için belirteçlerin eksikliği nedeniyle çok kullanım alanı bulamamaktadır.^{14,24,26}

Köpek DR modeli

STZ ve ALX enjeksiyonu veya daha uygun bir model olarak galaktoz diyeti (normal diyetle ek olarak %30 galaktoz) ile DR modeli oluşturmak mümkündür. Çalışmalar erken dönem DR bulgularının kimyasal grupta 3 yıldan, galaktoz diyeti grubunda ise 5 yıldan sonra arttığını gözlediğini göstermiştir.^{22,39} Örneğin galaktoz diyeti ile oluşturulan köpek DR modelinde intraretinal mikrovasküler anomaliler, yumuşak eksuda oluşumu ve sinir lifi tabakasında gliozis gibi patolojiler 5 yıl sonunda rapor edilirken; 6. yıldan sonra retina yeni damarlanması bildirilmektedir. Genç köpeklerde bulgular daha erken ortaya çıkmaktadır. Gözlem süresinde bu hayvanlarda katarakt nedeniyle lensektomi gerekebilmektedir. Köpek DR modeli avantaj olarak insana benzer retinopati bulguları göstermektedir. Fare, rat ve zebra balığından farklı olarak köpeklerin makula içermesi büyük bir avantajdır ayrıca göz kitlesi neredeyse insana benzer bir hacime sahiptir. Bu özellik farmakokinetik çalışmalara ve OKT ve ERG gibi cihazlarla kolayca çalışabilmeye imkan vermektedir. Kedilere benzer olarak bu modelin kullanımına yönelik duygusal direncin yanı sıra maliyet, moleküler belirteçlerin eksikliği ve uzun gözlem süresi gibi kısıtlılıklar mevcuttur.^{14,26}

Maymun DR modeli

Maymunlarda göz yapıları insana yakındır ve makula mevcudiyeti vardır. Eksudalar, retina kanamaları, IRMA ve mikroanevrizmalar gibi patolojiler bu hayvanlarda oluşabilmektedir. Tip 1 DM bu hayvanlarda STZ enjeksiyonu veya pankreatektomi ile oluşturulabilmektedir. Ancak bu hayvanlarda önemli DR bulguları 6 ile 15 yıl arasında ortaya çıkabilmektedir. Tip 2 DM şişman rhesus maymunlarında spontan olarak görülmekte ancak önemli DR bulgularının oluşması 15 yıl gibi bir süre alabilmektedir.^{25,40} Başlangıç retin morfolojisi bulgularındaki değişiklikler, ileri retinopati

bulgularının olmaması, düşük doğum oranı, yüksek maliyet, uzun gözlem süresi ve etik endişeler araştırma alanında bu hayvan modelinin kullanımını da sınırlı tutmaktadır.^{14,26}

Zebra Balığı DR modeli

Özellikle memeli hayvanların araştırmalarda kullanılmasının etik açıdan getirdiği zorluklar, görsel gelişim ve bozukluklar açısından insana benzerliği nedeniyle zebra balıklarının yaygın kullanımına neden olmuştur.

Zebra balıkları %2 glukoz içeren tatlı suya maruz bırakıldıklarında ilk gün hiperglisemi gerçekleşmiş ve bu 30. günün sonunda kalıcı hale gelmiştir. Hiperglisemik zebra balığı modelinde insana benzer olarak yapısal retina anamolileri görülmektedir.⁴¹ Intraperitoneal (i.p) olarak STZ verilen zebra balığı modelinde hiperglisemi gelişmekte ve karakteristik DR bulguları oluşturulabilmektedir.⁴² Zebra balığı modelinde kolayca gelişebilen DR bulguları bu hayvan modelini günümüzde önemli bir alternatif haline getirmiştir. Güncelliği nedeniyle Zebra balıkları ile ilgili ayrıntılı bilgi YBMD bölümünde verilecektir.^{7,14,23}

YBMD’da retinada meydana gelen yapısal ve fizyolojik değişimler:

YBMD erken ve ilerlemiş dönem bulguları ile seyreden bir retina hastalığı olup ileri evrede ciddi görme kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Erken dönem YBMD’nun en önemli belirtisi RPE düzeyinde biriken ‘‘druzen’’adını verdiğimiz depozitlerdir. Bruch membranında kalınlaşma ve fotoreseptör hücrelerinde azalma diğer erken dönem belirtilerini oluştururken, son zamanlarda özellikle hastalığın ilerlemesinde etkili olduğu düşünülen bir diğer lezyon ise retiküler psödodruzendir. Hastalığın patofizyolojisinde; Genetik faktörler, immün sistemde bozulma, lipit metabolizmasında yaşanan değişimler, bir kısım kimyasal mediatörler ve onlara ait reseptör patolojileri ve oksidatif stres gibi süreçler yer almaktadır. İlerlemiş dönem YBMD ise retina pigment epitelinde (RPE) ve üzerindeki fotoreseptör hücrelerde kayıpla seyreden yama tarzında atrofi veya koroidal yeni damarlanma (KNV) oluşumu ile karakterizedir.⁴³

Özellikle son 10 yıldır kullanımı giderek artan göz içi ilaç tedavileri ile önemli gelişmeler kaydedilmekle birlikte hastalığın patofizyolojisine yönelik araştırmalar bir yandan erken dönem YBMD’nun ilerlemesinin engellenmesi diğer taraftan ileri dönem YBMD tedavisi hedefiyle devam etmektedir. Bu amaçla deneysel YBMD hayvan modelleri geliştirilmesi çalışmaları da sürmektedir. Bu bölümde hastalığın patofizyolojik özelliklerine yönelik geliştirilmiş olan hayvan modelleri hakkında bilgi verilecektir.

YBMD Hayvan Modelleri

Rodentlerin insana benzer şekilde bir makula yapısına ve RPE düzeyinde druzen benzeri bir birikime sahip olmaması

gibi dezavantajları olsa da bu amaçla en sık kullanılan hayvan modeli yine de fare ve sıçanlardır.⁴³ Son yıllarda özellikle YBMD genetik mutasyonu taşıyan transgenik fareler geliştirilmiştir. Maymunlar bu hastalık için kullanım alanı bulmuş bir diğer modelken⁴⁴, katarakt, DR gibi hastalıklarda kendisinden fazlaca faydalanılan zebra balıklarının^{14,23} YBMD çalışmalarında da kullanımı giderek artmaktadır.

Druzen çok sayıda immün kompleks parçacıkları, amiloid proteinleri ve lipit molekülleri içermektedir. Foveaya sahip bir memeli olan ve insana benzeyen maymunlar druzen oluşumu ile birliktelik gösteren benzer genetik polimorfizm taşımakta ve druzen çalışmaları için çok ideal bir hayvan modeli oluşturmaktadırlar.⁴³ Bununla birlikte maymunlarda druzen insana göre çok daha erken yaşlarda oluşmaktadır. 278 yaşlı dişi Macaque maymununun % 32’sinde arka segmentte çeşitli sayıda ve insana benzer şekilde vitronectin, amiloid protein, kompleman faktör5 gibi moleküller gösterilmiş ancak ileri evre YBMD bulguları bu hayvanlarda tespit edilememiştir.⁴⁴

Yaşla giderek artan özellikte druzen benzeri materyal içeren fare türleri mevcuttur ancak bu moleküllerin yerleşim yeri RPE tabanında değildir. Yaşlı farelerde lizozom birikimi insandan farklı olarak RPE bazalinde değil daha çok apikalinde gerçekleşmektedir.⁴⁵

Erken YBMD; RPE ve Bruch membranındaki değişimlerle karakterizedir. YBMD’da Bruch membranında parçalanma, kalsifikasyon, lipit ve protein birikimi ile kalınlaşma ve elastin kaybı görülebilmektedir. Özellikle bazal lineer depozit birikimi hastalığın ilerlemesi ile birliktelik göstermektedir.⁴³ ApoE’den yoksun farelerde (ApoE-null mice) yüksek serum trigliserid ve kolesterolü ile birlikte kalınlaşmış Bruch membranı oluşturulabilmektedir.⁴⁶ Transgenik HTRA1 salınımı ile fare RPE hücrelerinde kopmalar ve yapısal değişimler gösterilmiştir.⁴⁷ Yüksek yağ diyeti ile 6 ay beslenen C57BL6 farelerinde kalın Bruch membranı geliştirilebilmiştir.⁴⁸

YBMD fizyopatolojisinde özellikle ileri evrelerde immün sistem disregülasyonunun rolü bu sistemle ilişkili molekülleri kodlayan gen çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu konuda artmış YBMD gelişme riski ile ilişkilendirilen ilk gen Kompleman faktör H (Cfh) genidir.⁴⁹ Cfh’dan yoksun farelerde (Cfh-null mice) retina fonksiyonlarında azalma, RPE tabanında otofloresan lezyonlar ve artmış C3 birikimi gösterilmiştir.⁵⁰ Diğer taraftan *Monocyte chemoattractant protein 1* (Ccl2) gibi bazı moleküller ve onların reseptörleri YBMD gelişimi riski ile ilişkilendirilmiştir.¹⁴ Dokuz aylık Ccl2’den yoksun farelerde (Ccl2-null mice) fotoreseptör kaybı, Bruch membranda kalınlaşma, C3/C4 depolanması ve RPE’de druzen benzeri birikimler gösterilmiş, bu farelerin bir kısmında 18. aydan sonra KNV oluştuğu rapor edilmiştir.⁵¹

Retina fotoreseptör dış segmentleri yüksek poliansatüre yağ oranı ve yüksek oksijen tüketimi nedeniyle oksidatif strese

duyarlıdır ki YBMD'da oluşan hücrel hasarda oksidatif stresin de rolü olduğu düşünülmektedir.¹⁴ Retinadaki başlıca antioksidan enzim sistemi *superoksidge dismutase* (Sod) enzim sistemidir ve üç izoenzimden oluşmaktadır. Sod1'den yoksun farelerde (Sod1-null mice) yedi aydan itibaren artmış druzen benzeri birikimler, Bruch kalınlaşması, fotoreseptör hücre kaybı ve %8 oranında KNV rapor edilmiştir.⁵²

Bruch membranına yapılan fotoablasyon ile koroidal damarlar retina içine büyümekte ve oluşan klasik tipte KNV ile deneysel araştırmalar yapmak mümkündür. Bu amaçla fare ve maymun gibi hayvanlarda KNV modeli geliştirilmiştir.^{53,54} Diğer taraftan VEBF molekülü kullanarak oluşturulan retinal vasküler sızıntı üzerinde YBMD'ye yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilir.⁵⁵

Zebra Balığı YBMD Modeli

Zebra balıkları (*Danio rerio*) kısa sürede olgunlaşmaları, çok sayıda yumurta vermesi, kolayca mutasyon meydana getirebilmesi, genetik analizin zor olmaması, hızlı ve gözlemlenebilir göz gelişimi ve insana benzer göz morfolojisine sahip olması nedeniyle oftalmoloji araştırmalarında hızlıca yerini almıştır.^{23,56} Memelilerdeki retinanın kendine özgün hücrel katları zebra balıklarında da gösterilmiştir. Zebra balıkları düşük maliyetle kolayca üretilebilmektedir. Seksüel olarak 3-4 ay gibi bir sürede olgunlaşan bu balıklar haftada 200-300 döl verebilmektedir. Annenin dışında şeffaf bir embriyoda gerçek zamanlı olarak bu balıkların organogenezis süreci gözlemlenebilmektedir. İlaç geçişlerine müsait olan embriyo laboratuvar şartlarında kolayca kullanılabilir. Organ gelişimi günler içerisinde tamamlanmakta ve 1 hafta içerisinde fonksiyonel hale gelmektedir.^{23,56}

Bununla birlikte göz çalışmaları için önemli avantajlar içeren zebra balıkları ile çalışırken bazı anatomik farklılıkları dikkate almak gerekmektedir. Zebra balıklarının lensleri sferiktir ve vitreus hacimleri küçüktür.²³ Retina yapısı çok hızlı gelişir ve beşinci günden sonra fonksiyonel hale gelir.⁵⁷ Zebra balıklarının retinasında makula yoktur ve retina üç adet nükleer, iki adet pleksiform tabaka olmak üzere beş retina katmanından oluşur. Dış nükleer tabaka rod ve kon hücreleri içerirken horizontal, amakrin ve bipolar hücreler iç nükleer tabakada yer alır. Gangliyon hücre tabakasında yer alan gangliyon hücre aksonları retina sinir lifi tabakasına yerleşir ve miyelinlidir.⁵⁸ İnsandan farklı olarak ultraviyole duyarlı kon hücrelerine de sahip olan zebra balıkları bu nedenle tetrakromatik görmeye sahiptir.⁵⁹

Zebra balığı gözü fare gözünden farklı olarak gelişimini hızlı tamamlar ve insana benzer şekilde baskın kon hücre yapısına sahiptir ki bu YBMD araştırmaları için önemli bir avantajdır. Retina bir optik arter tarafından kanlanır ve bu arter 4 ila 9 ana dallanma yapar. Dallanan ana damarlar kapiller yatakla anastomoz yapan küçük damarlar ile retina periferine uzanır. Bu radyal damar ağı gangliyon hücre tabakası ile temas edecek şekilde retinanın tüm iç yüzünü örter. Oksijen-

den yoksun kan retinayı çevreleyen venler ile toplanır.^{14,23}

Erişkin Zebra balıklarının (5-18 aylık) retinasında, hava doygunluğu aşamalı olarak 48-72 saat süreyle %10'a kadar azaltılmış ve 12 gün süreyle devam ettirilmiş akvaryum ortamında yeni damarlanma geliştirilebilmiş ve oral olarak kullanılan anti-VEBF ajanların (sunitinib ve ZM323881) bu patolojik değişimler üzerine etkisi gösterilmiştir.⁶⁰ Bu model anti-anjiyojenik ajanlar ile yapılacak çalışmalar için faydalı bir model olarak kullanılabilir. Üç-on gün süreyle hipoksik ortamda kalmış yetişkin zebra balıklarında sızdıran, disorganize kan damarları bir başka çalışmada da oluşturulabilmiştir.⁶¹ Retina yeni damarlanması zebra balıklarında aynı zamanda transgenik metodla da oluşturulabilir. Gnn mutant Zebra balığı YBMD'na benzer bir fenotip ortaya çıkarmıştır. Kırmızı kon hücrelerinde fertilizasyon sonrası beşinci günde oluşan distrofi daha sonra insandaki YBMD'nu andıracak şekilde diğer kon hücrelerine de yayılmaktadır.⁶²

Retina patolojilerinde patofizyoloji, yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi ve tedavi ajanlarına yönelik çalışmalarda deneysel hayvan model arayışları devam edecektir. Bu makalede DR ve YBMD patofizyolojileri dikkate alınarak hayvan modelleri hakkında sunulan bilgiler, benzer bulgulara sahip retina dejenerasyonu ve vasküler retinopatilerde de kullanılabilir. Bugün için mevcut hastalıklarda kullanılan tek bir model yoktur. DR için en önemli kısıt ileri evre DR bulgularının henüz istenen düzeyde ve zamanda oluşturulamamasıdır. Erken YBMD patofizyolojisine yönelik güzel modeller geliştirilmiş olsa da ileri evre patolojilerine yönelik membran veya atrofi modelleri de henüz ideal noktada değildir. Görüntüleme teknikleri açısından önemli avantajlara sahip olmakla birlikte büyük hayvan modelleri, etik nedenler ve yüksek maliyet gibi nedenlerle deneysel çalışmalarda çok fazla kullanılamamaktadır. Anatomik benzerlik açısından eksiklikler içeren rodentler yaygın olarak kullanılmakla birlikte özellikle Zebra balığının yukarıda anlatılan özellikleri bu modelin kullanımını son yıllarda giderek artırmış ve bu hayvanı deneysel çalışmalarda yeni bir alternatif haline getirmiştir.

KAYNAKLAR / REFERENCES

- 1- IDF Diabetes Atlas: 7th edition. Available from: <http://www.eatlas.idf.org/>; (8 Şubat 2016 tarihinde bu bilgilere ulaşılmıştır.)
- 2- Wong TY, Mwamburi M, Klein R et al. Rates of progression in diabetic retinopathy during different time periods: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2009; 32(12): 2307-13.
- 3- Lim LS, Mitchell P, Seddon JM et al. Age-related macular degeneration. *Lancet*, 2012; 379: 1728-38.
- 4- Russel WMS and Burch RL. The principles of humane experimental technique (Universities Federation for Animal Welfare). Herts, England, p. 238, 1992.
- 5- Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In vivo*. 2009; 23: 245-58.

- 6- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study design and baseline patient characteristics. ETDRS report number 7. *Ophthalmology*. 1991; 98(5):741-56.
- 7- Jo DH, Cho CS, Kim JH et al. Animal models of diabetic retinopathy: doors to investigate pathogenesis and potential therapeutics. *Journal of Biomedical Science*. 2013; 20(38): 1-13.
- 8- Kim JH, Kim JH, Park JA et al. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*. 2006; 39(4):339-45.
- 9- Jo DH, Kim JH, Kim JH: How to overcome diabetic retinopathy: focusing on blood-retinal barrier. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*. 2012; 12(2):110-7.
- 10- Saika S, Yamanaka O, Okada Y et al. TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. *Front Biosci*. 2009; 1:376-90.
- 11- Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Muller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1998; 47(3): 445-9.
- 12- Barber AJ, Lieth E, Khin SA et al. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes: early onset of effect of insulin. *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 102(4): 783-91.
- 13- Lutty GA, McLeod DS, Merges C et al. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Archives of Ophthalmology*. 1996; 114(8): 971-7.
- 14- Lai AK, Lo AC. Animal models of diabetic retinopathy: Summary and Comparison. *Journal of Diabetes Research*. 2013; 106594: 1-29
- 15- Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *The Lancet*. 2010; 376(9735):124-36
- 16- Mi XS, Yuan TF, Ding Y et al. Choosing preclinical study models of diabetic retinopathy:key problems for consideration. *Drug Design, Development and Therapy*.2014; 8:2311-9.
- 17- Demir MN, Acar U, Sobaci G, et al. The effects of commonly used intravitreal steroids on proliferation index of ciliary body-derived mesenchymal cells: an in vitro study. *Cutan Ocul Toxicol*. 2016; 35(1):53-7.
- 18- Acar U, Erginturk DA, Alpaslan FP, et al. Effects of Commonly Used Intravitreal Anti-VEGF Drugs on Mesenchymal Stem Cells Derived from the Limbus and Ciliary Body. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2016; doi:10.1111/ceo.12715.(Epub ahead of print)
- 19- Kumar S, Zhuo L. Longitudinal in vivo imaging of retinal gliosis in a diabetic Mouse model. *Exp Eye Res*. 2010;91(4):530-536.
- 20- Gaucher D, Chiappore JA, Paques M, et al. Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy. *Vision Res*. 2007;47(5): 612-623.
- 21- Helfenstein T, Fonseca FA, Ihara SS, et al. Impaired glucose tolerance plus hyperlipidemia induced by diet promotes retina microaneurysms in New Zealand rabbits. *Int. J. Exp. Path*. 2011; 92:40-9.
- 22- Kador PF, Blessing K, Randazzo J, et al. Evaluation of the vascular targeting agent combretastatin A-4 prodrug on retinal neovascularization in the galactose-fed dog. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2007;23(2):132-42.
- 23- Chhetri J, Jacobson G, Gueven N. Zebrafish-on the move towards ophthalmological research. *Eye*. 2014; 28:367-80.
- 24- Hatchell DL, Toth CA, Barden CA, Saloupis P. Diabetic retinopathy in a cat. *Experimental Eye Research*. 1995; 60(5):591-3.
- 25- Tso MOM, Kurosawa A, Benhamou E, et al. Microangiopathic retinopathy in experimental diabetic monkeys. *Transactions of the American Ophthalmological Society*.1988;86:389-421.
- 26- Robinson R, Barathi VA, Chaurasia SS, et al. Update on animal models of diabetic retinopathy:from molecular approaches to mice and higher mammals.*Dis Model Mech*.2012;5(4):444-56.
- 27- Anderson HR, Stitt AW, Gardiner TA, Archer DB. Diabetic retinopathy: morphometric analysis of basement membrane thickening of capillaries in different retinal layers within arterial and venous environments. *Br J Ophthalmol*. 1995;79(12):1120-3.
- 28- Cohen MP, Hud E, Shea E, Shearman CW. Vitreous fluid of db/db mice exhibits alterations in angiogenic and metabolic factors consistent with early diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res*. 2008;40(1):5-9.
- 29- Han Z, Guo J, Conley SM, Naash MI. Retinal angiogenesis in the Ins2Akita Mouse model of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):574-84.
- 30- Sima AAF, Chakrabarti R, Garcia-Salinas R, Baku PK. The BB rat;an authentic model of human diabetic retinopathy. *Current Eye Research*. 1985;4(10):1087-92.
- 31- Danis RP, Yang Y: Microvascular retinopathy in the Zucker diabetic fatty rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(7):2367-71.
- 32- Masuyama T, Katsuda Y, Shinohara M. A novel model of obesity-related diabetes: introgression of the *Lepr(fa)* allele of the Zucker fatty rat into nonobese Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats. *Exp. Anim*. 2005;54:13-20.
- 33- Lai CM, Dunlop SA, May LA, et al. Generation of transgenic mice with mild and severe retinal neovascularization. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89(7):911-6.
- 34- Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35(1):101-11.
- 35- Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse:a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc*. 2009; 4(11): 1565-73.
- 36- Shinohara M, Masuyama T, Shoda T, et al. A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. *Int J Exp Diabetes Res*. 2000; 1(2):89-100.
- 37- Drago F, Manna CL, Emmi I, Marino A. Effects of sulfinpyrazone on retinal damage induced by experimental diabetes mellitus in rabbits. *Pharmacological Research*. 1998;38(2):97-100.
- 38- Ozaki H, Hayashi H, Viores SA. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. *Experimental Eye Research*, 1997;64(4):505-17.
- 39- Kern TS, Engerman RL. Capillary lesions develop in retina rather than cerebral cortex in diabetes and experimental galactosemia. *Archives of Ophthalmology*. 1996; 114(3):306-10.
- 40- Kim SY, Johnson MA, McLeod DS. Retinopathy in monkeys with spontaneous type 2 diabetes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2004;45(12):4543-53.
- 41- Gleeson M, Connaughton V, Arneson LS. Induction of hyperglycaemia in Zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetologica*. 2007;44(3):157-63.

- 42- Olsen AS, Sarras MP, Intine RV. Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus. *Wound Repair Regen.* 2010; 18(5):532-42.
- 43- Fletcher EI, Jobling AI, Greferath U, et al. Studying Age-related macular degeneration using animal models. *Optometri and Visual Science.* 2014; 91(8):878-6.
- 44- Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H, et al. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*) *FASEB J.* 2005;19(12):1683-5.
- 45- Ramkumar HL, Zhang J, Chan CC, et al. Retinal ultrastructure of murine model of dry age-related macular degeneration (AMD). *Prog Retin Eye Res.* 2010;29:169-90.
- 46- Dithmar S, Curcio CA, Le NA, et al. Ultrastructural changes in Bruch's membrane of apolipoproteinE-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(8):2035-42.
- 47- Vierkotten S, Muether PS, Fauser S. Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components. *PLoS one.* 2011;6(8): e22959.
- 48- Dithmar S, Sharara NA, Curcio CA, et al. Murine high-fat diet laser and photochemical model of basal deposits in Bruch membrane. *Archive Ophthalmol.* 2001; 119(11): 1643-49.
- 49- Priya RR, Chew EY, Swaroop A. Genetic studies of age-related macular degeneration: lessons, challenges, and opportunities for disease management. *Ophthalmology.* 2012; 119(12):2526-36.
- 50- Coffey PJ, Gias C, McDermott CJ, et al. Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(42):16651-6.
- 51- Ambati J, Anand A, fernandez S, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med.* 2003;9(11):1390-7.
- 52- Imamura Y, Noda S, Hashizume K, et al. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(30):11282-87.
- 53- Ryan SJ. Subretinal neovascularization after argon laser photocoagulation. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 1980;215(1):29-42.
- 54- Lambert V, Lecomte J, Hansen S. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat Protoc.* 2013; 8(11):2197-211.
- 55- Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2004; 79(2): 275-85.
- 56- Goldsmith P, Harris WA. The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2003; 14(1):11-8.
- 57- Bilotta J, Saszik S. The zebrafish as a model visual system. *Int J Dev Neurosci.* 2001; 19(7):621-9.
- 58- Dowling J. *The retina: An Approachable Part of the Brain.* Belknap Press of Harvard University Press: Cambridge, MA, USA. 1987;18: 12-32.
- 59- Robinson J, Schmitt EA, Harosi FI, et al. Zebrafish ultraviolet visual pigment: absorption spectrum, sequence and localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(13): 6009-12.
- 60- Cao R, Jensen LDE, Soll I, et al. Hypoxia-induced retinal angiogenesis in zebrafish as a model to study retinopathy. *PLoS ONE.* 2008;3(7):e2748.
- 61- Cao Z, Jensen LD, Rouhi P, et al. Hypoxia-induced retinopathy model in adult zebrafish. *Nat Protoc.* 2010;5(12); 1903-10.
- 62- Biehlmaier O, Neuhauss SCF, Kohler K. Double cone dystrophy and RPE degeneration in the retina of the zebrafish gnn mutant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(3): 1287-98.