

Cerrahi Menopoz ve Kronik Serebral Hipoperfüzyon Oluşturulmuş Sıçanlarda Spironolaktonun Prefrontal Korteks ve Göz Dokularında Glikojen ve Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi

Effect of Spironolactone on Glycogen and Oxidative Stress Parameters in Prefrontal Cortex and Eye Tissues in Rats in Which Surgical Menopause and Chronic Cerebral Hypoperfusion Performed

Meryem ERGENÇ¹ , Hale SAYAN ÖZAÇMAK² , İnci TURAN² , Veysel Haktan ÖZAÇMAK² 

¹Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

²Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

ORCID ID: Meryem Ergenç 0000-0002-0628-4791, Hale Sayan Özaçmak 0000-0002-3564-0468, İnci Turan 0000-0003-2211-3914,

Veysel Haktan Özaçmak 0000-0003-2651-8353

Bu makaleye yapılacak atıf: Ergenç M ve ark. Cerrahi menopoz ve kronik serebral hipoperfüzyon oluşturulmuş sıçanlarda spironolaktonun prefrontal korteks ve göz dokularında glikojen ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi. Med J West Black Sea. 2022;6(2):177-185.

Bu çalışma "Kronik Serebral Hipoperfüzyon Oluşturulan Overektomize Dişi Sıçanlarda Mineralokortikoid Reseptör Antagonistinin Hipokampal Fonksiyonlar Üzerine Etkileri" başlıklı doktora tez çalışmasından türetilmiştir.

Sorumlu Yazar

Meryem Ergenç

E-posta

meryemergenc@gmail.com

Geliş Tarihi

16.03.2022

Revizyon Tarihi

07.07.2022

Kabul Tarihi

18.07.2022

ÖZ

Amaç: Kronik serebral hipoperfüzyon (KSH), ilerleyici hipokampal hasar ve bilişsel bozukluklarla birlikte vasküler demansa yol açar. KSH retinadaki kan akımında da azalmaya neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı KSH oluşturulmuş overektomize sıçanlarda spironolaktonun göz ve prefrontal korteks (PFC) dokularındaki oksidatif stres ve glikojen seviyelerine etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: Wistar Albino cinsi 32 adet dişi sıçan, her grupta 8 adet olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı: 1)Kontrol, 2)KSH, 3)KSH+Spironolakton 25mg/kg 4)KSH+Spironolakton 50mg/kg. Sıçanlara deneyin başlangıcında bilateral ovariektomi (OVX) uygulandı, OVX'ten 5 hafta sonra ortak bilateral ortak karotid arter oklüzyonu (2VO) ile KSH modeli oluşturuldu. Spironolakton 2VO'dan üç gün önce ve 2VO'dan sonra 3 hafta boyunca günde 1 kez oral gavaj yoluyla uygulandı. Deney sonunda doku glikojen, indirgenmiş glutatyon (GSH), malondialdehid (MDA) ve AA düzeyleri ölçüldü. İstatistiksel analiz ANOVA ve Bonferroni testleri kullanılarak yapıldı.

Bulgular: KSH, PFC'de oksidatif stres belirteçlerinde artışa ve glikojen düzeyinde bir azalmaya neden oldu. Benzer şekilde KSH göz dokusunda hem glikojen hem de AA düzeyinde azalmaya neden oldu. Spironolaktonun 25 mg/kg dozu ile tedavi edilen grupta KSH grubuna kıyasla göz AA ve PFC glikojen düzeyleri azalırken PFC'deki MDA düzeyi artmış olarak bulundu ($p<0.05$). 50mg/kg spironolakton uygulanan grupta ise KSH grubuna kıyasla PFC glikojen düzeyleri ve tüm gruplara kıyasla göz glikojen düzeyi önemli ölçüde arttığı saptandı ($p<0.05$).

Sonuç: Sonuçlarımız spironolakton uygulamasının KSH oluşturulmuş overektomize sıçanlarda PFC ve göz dokularında oksidatif stresi azaltarak ve glikojen düzeylerini artırarak KSH'un neden olduğu retinal ve serebral hasarı azaltmada etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Kronik serebral hipoperfüzyon, Overektomi, Spironolakton, Glikojen, Oksidatif stres



Bu eser "Creative Commons Atıf-GayriTicari-4.0 Uluslararası Lisansı" ile lisanslanmıştır.

ABSTRACT

Aim: Chronic cerebral hypoperfusion (CCH) leads to vascular dementia with progressive hippocampal damage and cognitive impairments. CCH also causes a decrease in blood flow in the retina. The aim of this study was to investigate the effects of spironolactone on oxidative stress and glycogen levels in the eye and prefrontal cortex (PFC) tissues in ovariectomized rats with CCH.

Material and Methods: 32 female Wistar Albino rats were randomly divided into four groups, 8 in each group: 1)Control, 2)KSH, 3) KSH+Spironolactone 25mg/kg 4)KSH+Spironolactone 50mg/kg. The rats underwent bilateral ovariectomy (OVX) at the start of the experiment, a CCH model was created with permanent occlusion of the common carotid arteries (2VO) 5 weeks after OVX. Spironolactone was administered by oral gavage three days before 2VO and once daily for three weeks after 2VO. At the end of the experiment, tissue glycogen, reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and ascorbic acid (AA) levels were measured. Statistical analysis was performed using ANOVA and Bonferroni tests.

Results: CCH caused an increase in oxidative stress markers and a decrease in glycogen level in PFC. Similarly, CCH caused a decrease in both glycogen and AA levels in the eye tissue. In the group treated with 25mg/kg spironolactone, the AA and PFC glycogen levels of the eyes decreased, while the MDA levels in the PFC were increased compared to the CCH group ($p<0.05$). In the group administered 50mg/kg spironolactone, PFC glycogen levels and eye glycogen levels were significantly increased compared to the CCH group ($p<0.05$).

Conclusion: Our results show that spironolactone administration can be effective in reducing retinal and cerebral damage caused by CCH by reducing oxidative stress and increasing glycogen levels in PFC and eye tissues in ovariectomized rats with CCH.

Keywords: Chronic cerebral hypoperfusion, Ovariectomy, Spironolactone, Glycogen, Oxidative stress

GİRİŞ

Kronik serebral hipoperfüzyon (KSH) vasküler demans ve Alzheimer hastalığı (AD) gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda yaygın bir patolojik mekanizmadır. Yapılan çalışmalar KSH'un glial aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu, mitokondrial disfonksiyonu, nöroinflamasyonu, kan beyin bariyeri (KBB) hasarını, beyaz cevher lezyonunu, tau hiperfosforilasyonunu, amiloid beta (A β) birikimini artırarak nörodejenerasyona ve sonuçta da nöronal hasara yol açabileceğini göstermektedir (1,2). Ayrıca bu değişiklikler öğrenme ve hafızayla ilişkili hipokampus ve prefrontal korteks (PFC)'de anormal beyin yapısı ve işlevine yol açarak bilişsel bozulmaya neden olmaktadır (3,4). KSH sıçanlarda bilateral ortak karotid arterlerin kalıcı oklüzyonu (2VO) ile indüklenebilmektedir ve serebrovasküler bozuklukların patofizyolojisini araştırmak için deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (5). Oftalmik arter internal karotid arterin ilk ana dalıdır ve karotid arter tıkanıklığı oküler hemodinami üzerinde doğrudan etkisi vardır. Bu durum, oküler damarlarda yavaş hatta tersine akışa neden olur (6). Karotis stenozu olan hastalarda santral retinal arter perfüzyon basıncının dramatik olarak normal değerlerin %50'sinin altına düşebileceğini ve bunun da retinal iskemiyeye neden olabileceğini bildirilmektedir (7). Dolayısıyla 2VO, vasküler defektlerle ilişkili retina dejenerasyonunun mekanizmalarını ve tedavisini araştırmak için de kullanılan bir modeldir (5,8).

Hipoksik-iskemik beyin ve retina hasarının gelişiminde ve ilerlemesinde enerji metabolizmasının bozulması ve oksidatif stres oluşumu önemli rol oynar (1). Normal beyin aktivitesi esas olarak astrositlerin metabolik plastisitesine bağlıdır ve sadece kandan glukoz tedarikini değil, aynı zamanda beyindeki spesifik aktiviteyi besleyen astrositlerde depolanan glikojeni de gerektirir (9). Astrositlerdeki glikojen, aksonların hayatta kalması için esastır ve tükenmesi beyin fonksiyon

bozuklukları ve nörodejenerasyon ile ilgilidir. Benzer şekilde retina nöronları da yüksek bir enerji talebine sahiptir, ancak enerji depolama kapasitesi zayıftır. Müller hücreleri, retinal glikojenin ana depolarıdır (10).

Aslında sadece demans türlerinde değil santral sinir sistemi ile ilişkili birçok nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisinde ROS önemli rol oynar (2). Çünkü beyinde hem antioksidan enzim aktiviteleri düşüktür hem de oksidatif metabolik aktivite ve çoklu doymamış yağ asitlerinin içeriği nispeten yüksektir ve bu durum nöronları iskemiyeye karşı oldukça duyarlı kılar (11). Bu nedenle iskemik durumlarda beyin dokusunun antioksidan savunma mekanizmaları, dokuyu oksidatif hasara karşı koruyamayabilir (12). KSH mitokondriyal disfonksiyona ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olabilir, bu da antioksidanlar ve ROS dengesini oksidatif hasar üreten ROS birikimine doğru değiştirebilir (5). ROS birikimini önlemede endojen antioksidanların yanı sıra eksojen antioksidanlar da önemli rol oynar. Suda çözünür bir antioksidan ve çeşitli enzimler için bir kofaktör olan askorbik asit (AA), ROS oluşumunu inhibe etmede ve normal hücrel metabolizma sırasında üretilen oksijen ve nitrojen bazlı radikal türlerini doğrudan temizlemede etkilidir (12). Vücutta en yüksek AA konsantrasyonları beyin ve nöroendokrin dokularda bulunur ve nöronlarda milimolar AA konsantrasyonları, ROS üretimi ile karakterize nörolojik hastalıklarda apoptotik nörodejenerasyonun çeşitli nedenlerine ve oksidatif strese karşı etkili bir şekilde koruma sağlar (12,13).

Menopoz, dolaşımdaki östrojenlerdeki çarpıcı azalma ile ilgilidir. Endokrin sistemdeki bu önemli değişiklik ve KSH özellikle demans ve bilişsel bozulma ile ilişkili beyin fonksiyonları üzerinde büyük bir etki yapma potansiyeline sahip risk faktörleridir (14). Hayvanlarda menopoz; endojen estradiol ve progesteron üretimini ortadan kaldırmak için bilateral ovariectomi (OVX) yapılarak taklit edilmektedir (15,16).

Mineralokortikoid reseptör (MR) aktivasyonunun çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. MR'ın fizyolojik aktivatörü olan yüksek aldosteron düzeylerinin hipertansiyonu indüklediği, inflamasyonu ve fibrozu artırdığı ve kardiyovasküler hastalıkları şiddetlendirdiği bilinmektedir (17). Dahası hipertansiyon ve mineralokortikoid reseptör aktivasyonu, serebral parankimal arteriyoller üzerine etki ederek, serebral perfüzyonu sınırlayabilir ve bu da bilişsel işlev bozukluğuna katkıda bulunabilir (18). MR'ler klasik olarak, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesinde rol aldıkları böbreğin distal toplama kanalında yapılmaktadırlar (19). MR'i beyinin nükleus tractus solitarii, hipokampus, PFC ve amigdala gibi çeşitli bölümlerinde de bulunurken (20) retinada, retinal ve koroidal damarlarda ve nöral ve glial orijinli hücrelerde eksprese edilir (21). MR'lerin bu bölgelerdeki etkileri sodyum ve potasyum homeostazının korunmasının ötesine uzanır. Bazı çalışmalarda aldosteron seviyesindeki artışın ve MR aktivasyonunun farelerde serebrovasküler hasara neden olduğunu bildirilmiştir (22,23). Ayrıca yüksek plazma aldosteron konsantrasyonunun vasküler demansla ilişkili beyaz cevher lezyonu arasında korelasyon olduğunu gösteren hem klinik hem de hayvan çalışmaları mevcuttur (24,25). Ayrıca retinal iskemi modelinde aldosteron uygulamasının retinal ganglion hücre hasarını indüklediği ve spironolaktonun koruyucu etkiler gösterdiği saptanmıştır (26). Spironolakton bir MR antagonistidir ve mineralokortikoid-MR aktivasyonunun neden olduğu çeşitli hücre hasarı inhibe eder. Literatürde çok sayıda çalışma, çeşitli dokularda spironolaktonun MR aracılığıyla indüklenen oksidatif hasarı ve nöroinflamasyonu iyileştirdiği (21,27,28), öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını artırdığı rapor edilmiştir (19). Çeşitli hayvan modellerinde spironolaktonun retina (26) ve beyin (29) de dahil olmak üzere çeşitli dokularda hipoksik-iskemik hasara karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (17,27). Ayrıca spironolakton uygulamasının glikojen enerji metabolizmasını iyileştirdiği, insülin direncini, glukoz ve lipid metabolizmasını iyileştirdiği de bildirilmiştir (15,16).

Bu çalışmanın amacı KSH oluşturulmuş overektomize dişi sıçanlarda bir mineralokortikoid reseptör antagonisti olan spironolaktonun göz ve PFC dokularındaki oksidatif stres ve glikojen seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

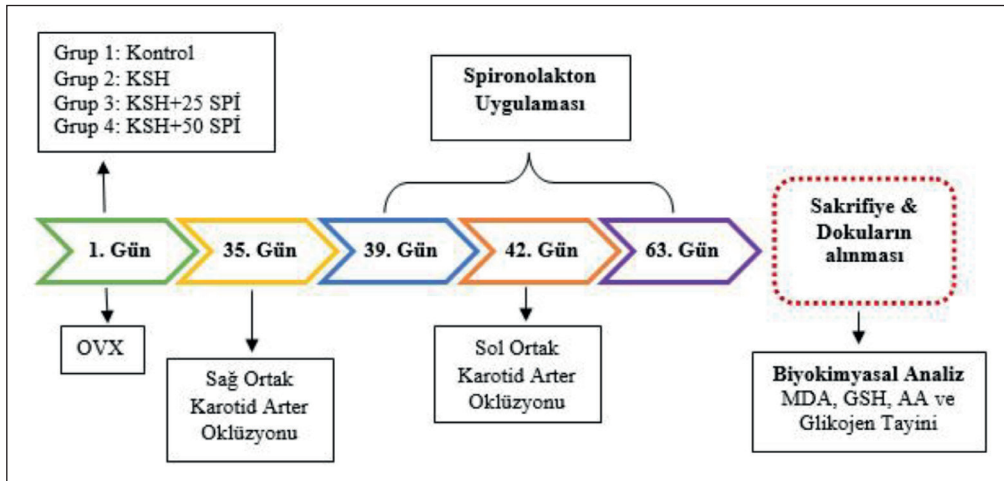
Çalışmada Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden (Etik kurul no: 2020-28-01/10) temin edilen 2 aylık 150-200 gr ağırlığında dişi Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Tüm sıçanlar günlük değiştirilen taze musluk suyu ve standart pelet yem ile beslendi. Ayrıca sıçanlar kafeslerde, 12 saat ışık-karanlık sirkadiyen ritimde, 21°C sıcaklıkta aynı ortamda tutuldular.

Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP No: 2020-2625-9946-02).

Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda 32 adet denek her grupta 8 hayvan olacak şekilde rastgele dört gruba ayrıldı. Hayvanlara önce OVX yapıldı, OVX'ten beş hafta sonra ise 2VO ile KSH oluşturuldu. Spironolakton(Spylacton, World Medicine, Türkiye) KSH'dan üç gün önce ve KSH'dan sonra üç hafta boyunca 25 ve 50 mg/kg dozlarında günde bir kez distile suda eritilerek oral gavaj yoluyla uygulandı. Kontrol gruplarına ise sadece distile su uygulandı. Deney sonunda hayvanlar yüksek doz anestezi uygulanarak feda edildi. Göz ve PFC dokuları hızlıca çıkarıldı ve biyokimyasal analizlerin yapılacağı güne kadar -80°C'de saklandı (Şekil 1).

- (1) KONTROL: OVX'ten beş hafta sonra sahte KSH cerrahi yapılan ve günlük distile su (p.o) uygulanan grup
- (2) KSH: OVX'ten beş hafta sonra 2VO ile KSH oluşturulan ve günlük distile su (p.o) uygulanan grup
- (3) KSH+25 SPİ: OVX'ten beş hafta sonra 2VO ile KSH oluşturulan ve günlük 25 mg/kg spironolakton (p.o) uygulanan grup



Şekil 1: Deney Prosedürü.

(4) KSH+50 SPİ: OVX'ten beş hafta sonra 2VO ile KSH oluşturulan ve günlük 50 mg/kg spironolakton (p.o) uygulanan grup

Cerrahi İşlemler

Overektomi

Endojen estradiol ve progesteron üretimini ortadan kaldırmak için daha önce tarif edildiği gibi tüm hayvanlarda cerrahi menopoz modeli oluşturuldu. Kısaca hayvanlar, ketamin (90 mg / kg, i.p.) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezi altında dorsal bölgeden oluşturulan kesilerle overler dikkatlice çıkarıldı ve disseke edildi. Kas tabakası ve cilt cerrahi ipek ile dikilerek yara kapatıldı. OVX sonrası ovaryan hormonların dolaşımından tamamen uzaklaşması ve modelin yerleşmesi için 5 hafta beklenildi (16).

KSH (2VO) Hayvan Modeli

Sıçanlara OVX'ten 5 hafta sonra KSH mortalite riskini azaltmak için modifiye edilmiş bir model ile; önce sağ taraf 1 hafta sonra ise sol taraf ortak karotid arterin kalıcı ligasyonu ile indüklendi. Hayvanlar ketamin (90 mg / kg) ve ksilazin (10 mg / kg) i.p. ile anestezi uygulandı. Kısaca, bir orta hat servikal kesi atıldı, komşu dokular dikkatlice disseke edilerek ortak karotid arter açığa çıkarıldı. Karotid arter vagus sinirinden nazikçe izole edildi ve her bir arter 5/0 ipek sütür ile kalıcı olarak bağlandı. Sahte ameliyat edilen kontrol hayvanlarına ise ligasyon yapılmadan aynı operasyon uygulandı (11).

Biyokimyasal Analizler

Çalışma yapılacağı gün PFC ve göz dokuları -80°C'den çıkarıldı buz üstünde çözünmesi beklendi. Göz dokusu total olarak çalışılmış olup bir tanesinden AA tayini yapılırken diğerinden glikojen tayini yapıldı. PFC dokusundan ise malondialdehid (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), AA ve glikojen tayinleri yapıldı.

PFC ve göz dokuları glikojen seviyeleri daha önce tarif edildiği gibi Lo metoduna göre çalışıldı (30). Kısaca, örneklerin üzerine Na₂SO₄ ile doyurulmuş %30'luk KOH çözeltisi eklendi ve 30 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Sonra örnekler buzda soğutuldu ve %95'lik etanol eklenerek buzda 30 dk bekletildi. Daha sonra santrifüj edilerek süpernatantlar atıldı ve 3 ml distile su eklendi. Cam bagetlerle eşit sürelerde karıştırılarak hazırlanan yeni örneklerin üzerine %5'lik fenol ve %98'lik H₂SO₄ solüsyonları (1:1:5) eklendi. Numuneler 30C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 490nm'de spektrofotometrede (UVmini-1240 spectrophotometer, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) okundu.

PFC ve göz dokuları AA seviyeleri Roe ve Keuther'in metodu esas alınarak çalışıldı (31). Doku örnekleri soğuk perklorik asit ve etilendiamintetraasetik (PCA / EDTA) ile homojenize edildi ve satrifüjlendi. Elde edilen süpernatana standart ve renk reaktifi (% 0.6 bakır sülfat,% 5 tiyoüre ve 2,4-dinitrofenilhidrazin, 1: 1: 20) eklendi. Örnekler 37°C'de 3

saat inkübe edildikten sonra 0°C'ye soğutuldu ve üzerine % 65'lik sülfürik asid eklendi. Elde edilen numunelerin absorbansları 515 nm'de spektrofotometrede okundu.

PFC'de lipid peroksidasyon düzeyi, doku MDA içeriğinin ölçülmesiyle belirlendi. Kısaca, PFC doku numuneleri soğuk trikloroasetik asit (%10 TCA) içinde homojenize edildi ve santrifüjlendi. Elde edilen süpernatana %1'lik butilhidroksi tolüenden (BHT) ve %0.67 tiyobarbitürik asit (TBA) eklendi ve 15 dakika 100°C'de kaynatıldı. Daha sonra örneklerin absorbansı 535 nm'de spektrofotometrede ölçüldü (32).

PFC'de GSH seviyeleri, daha önce anlatıldığı gibi Aykaç yöntemine göre ölçüldü (33). Kısaca MDA ölçümünde kullanılan yöntemle elde edilen süpernatantlara 0,3M Na₂HPO₄ ve ditiobisnitrobenzoat (DTNB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) eklendi. Örnekler vortekslenildikten sonra absorbansı 412 nm'de spektrofotometrik olarak okundu.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U-SA) programı kullanılarak analiz edildi ve değerler ortalama ± standart hata olarak verildi. Shapiro-wilk testi ile normallik analizi yapıldı. Grupların istatistiksel karşılaştırmasında tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için Bonferroni post hoc testi kullanıldı. PCF ve göz dokularında ölçülen MDA, GSH, AA ve glikojen değerleri arasındaki korelasyon Spearman testi ile değerlendirilmiştir. p<0.05 veya daha düşük olasılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Glikojen Sonuçları

Şekil 2'de gösterildiği gibi, KSH grubu sıçanların hem göz hem de PFC dokularında kontrol gruplarına ve spironolakton ile tedavi edilen KSH sıçanlarına kıyasla glikojen seviyesinde bir azalma olduğu gözlemlendi. 25mg/kg ve 50mg/kg spironolakton uygulaması, KSH grubuna kıyasla hem PFC'de ve hem de göz dokusunda düşen glikojen seviyesini anlamlı olarak artırdı (p<0.05) (Tablo 1) (Şekil 2A,B).

Askorbik Asit Sonuçları

KSH sonrasında göz dokusunda suda çözünebilir antioksidan bir molekül olan AA seviyesi düştüğü ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. 25mg/kg spironolakton uygulaması KSH grubuyla kıyaslandığında AA düzeylerini anlamlı olarak artırdığı tespit edildi (p<0.05). Ayrıca KSH sonrası PFC'de AA seviyeleri anlamlı olarak düşüş sergilerken spironolakton uygulamasının AA seviyesini kontrol grubu düzeyinde koruduğu bulundu (p<0.05) (Tablo 2) (Şekil 3A,B).

Prefrontal kortekste MDA ve GSH Sonuçları

2VO ile indüklenen KSH'un PFC'de MDA seviyesini kontrol grubu hayvanlarına kıyasla artırdığı fakat istatistiksel ola-

rak anlamlı olmadığı bulundu. Buna karşılık spironolaktan tedavisi PFC'de KSH grubuna kıyasla MDA seviyelerini düşürdüğü tespit edildi. 25mg/kg spironolaktan dozunun KSH grubuna göre MDA seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı

şekilde düşürdüğü tespit edildi ($p<0.05$). Ayrıca çalışmamızda GSH seviyelerini de ölçtük fakat KSH'un ve spironolaktan uygulamasının GSH düzeylerine etkisinin olmadığı tespit edildi (Tablo 2) (Şekil 4A,B).

Tablo 1: Spironolaktan uygulamasının doku glikojen seviyelerine (mg/g yaş doku) etkisi.

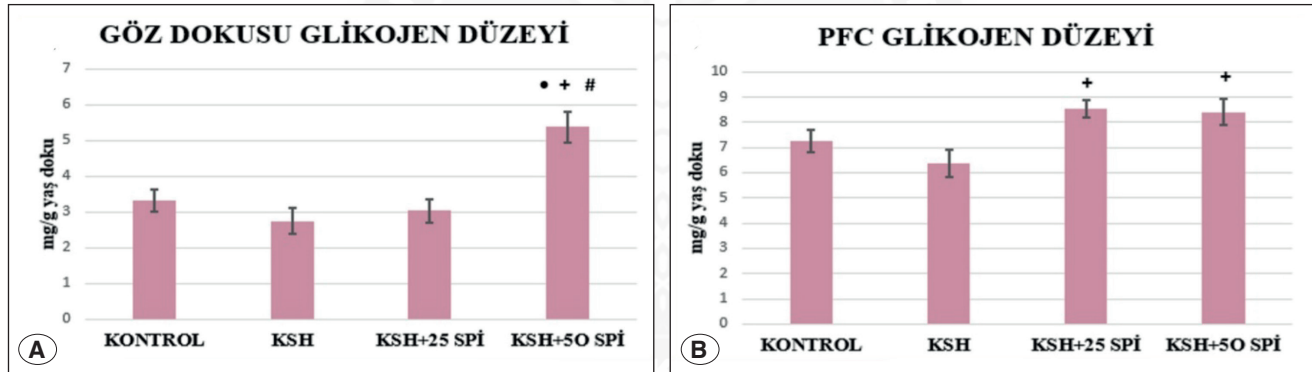
	KONTROL	KSH	KSH+25 SPI	KSH+50 SPI	p değeri
Göz-Glikojen	3,32±0,30	2,75±0,37	3,04±0,33	5,38±0,43 ^{•*}	0,001
PFC-Glikojen	7,24±0,45	6,38±0,54	8,52±0,35 ⁺	8,39±0,52 ⁺	0,015

• Kontrol grubuna göre, + KSH grubuna göre, # KSH+25 SPI grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

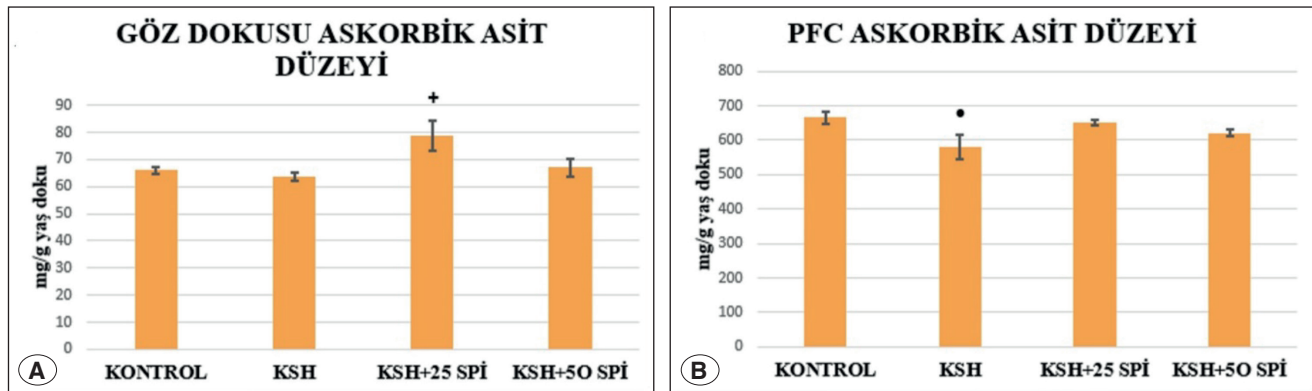
Tablo 2: Spironolaktan uygulamasının doku oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi.

	KONTROL	KSH	KSH+25 SPI	KSH+50 SPI	p değeri
Göz-AA	66,03±1,24	63,52±1,57	78,97±5,55 ⁺	67,06±3,26	0,019
PFC-AA	665,59±18,41	579,56±35,11 [•]	651,31±8,55	620,98±10,96	0,029
PFC-MDA	87,04±3,41	96,76±11,53	56,10±8,51 ⁺	64,85±5,96	0,008
PFC-GSH	11,32±0,33	12,25±0,41	11,97±0,29	12,19±0,07	0,499

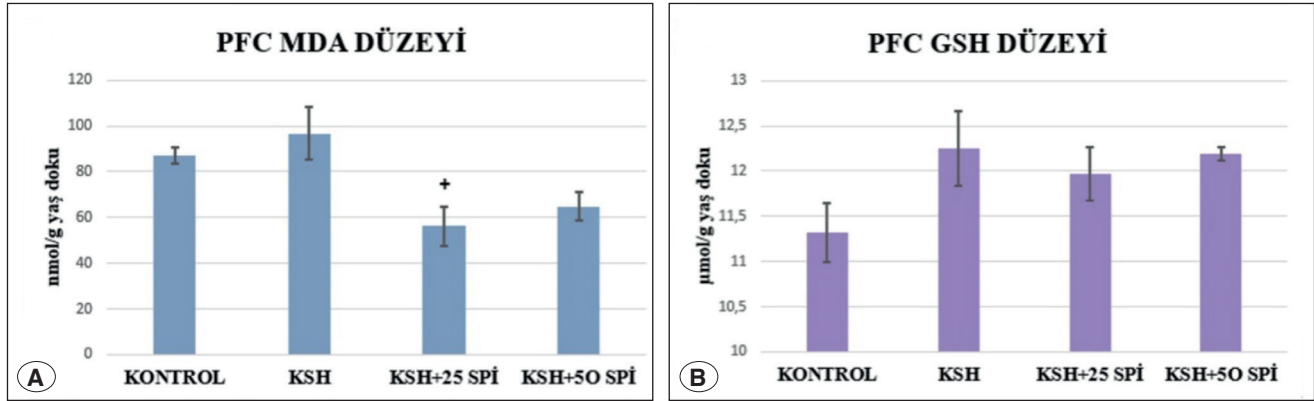
• Kontrol grubuna göre, + KSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). MDA: Malondihaldehid (nmol/g yaş doku). GSH: İndirgenmiş glutatyon ($\mu\text{mol/g}$ yaş doku). AA: Askorbik asit (mg/g yaş doku).



Şekil 2: Deney gruplarının PFC ve göz dokusundaki glikojen düzeyleri. • Kontrol grubuna göre, + KSH grubuna göre, # KSH+25 SPI grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).



Şekil 3: Deney gruplarının PFC ve göz dokularında AA düzeyleri. • Kontrol grubuna göre, + KSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4: Deneysel grupların PFC'de MDA ve GSH düzeyleri. + KSH grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

Spearman korelasyon testi ile PFC dokusu MDA ve glikojen düzeyleri arasında orta düzeyde ($r = -0,508$) korelasyon tespit edilmiştir ($p = 0,022$).

TARTIŞMA

Sonuçlarımız, spironolakton uygulamasının KSH oluşturulmuş overektomize sıçanların PFC ve göz dokularında oksidatif stresi azaltarak ve glikojen düzeylerini artırarak KSH'un neden olduğu oküler ve serebral hasarı azaltmada etkili olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla KSH'un neden olduğu serebral ve retinal hasarın patofizyolojisinde mineralokortikoid/MR etkileşiminin belirleyici faktörlerden biri olduğu önerilebilir.

Aldosteron, Anjiyotensin II dahil olmak üzere çeşitli uyarılara yanıt olarak salınan ve etkilerini MR'lerine bağlanarak ortaya çıkaran bir steroid hormondur. Aldosteronun MR'ye bağlanması vücuttaki elektrolit ve su dengesine katkıda bulunurken uygun olmayan MR aktivasyonunun kan basıncından bağımsız çeşitli doku ve organlarda zararlı etkiler göstererek patolojiyi tetikleyebileceği bildirilmektedir (21). Aldosteron seviyelerini düşürmede anjiyotensin II ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri 'aldosteron kaçışı' fenomeni nedeniyle etkisiz kalabilmekte aldosteronun hedef organlardaki olumsuz etkilerinin devam etmesine yol açmaktadır (34). Bir dizi klinik ve prelinik çalışmada MR antagonizminin hedef organlardaki aldosteronun olumsuz etkilerini azaltabileceği rapor edilmiştir (28,34,35). Örneğin hipoksik retinopati modeli oluşturan bir çalışmada gözün MR'lerini eksprese ettiği ve bu reseptörlerin retinal vasküler patolojide yer aldığı gösterilmiştir. Ayrıca yazarlar, MR blokajının bu sıçan modelinde inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkili patolojik anjiyogenezde bir azalmaya yol açtığını belirtmişlerdir (36).

Spironolakton non-selektif bir MR antagonistidir ve MR aracılı hücre hasarı inhibe eder. Daha önceki çalışmalarda 25 ve 50 mg/kg spironolakton uygulamasının vücut ağırlığı, kan basıncı, kalp hızı ve plazma elektrolit düzeyleri

gibi fizyolojik parametreler üzerine etkili olmadığı gösterilmiştir (23,37). Spironolaktonun antihipertansif ve diüretik etkisinden bağımsız olarak koruyucu ve tedavi edici etkilerinin altında yatan mekanizmalar birçok yolağa bağlanmıştır. Özellikle spironolakton uygulamasının anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve anti-anjiyogenik etkili olduğunu gösteren çalışmaların sayısı oldukça fazladır (18-21,27). Örneğin Zhao ve ark.nın yaptığı bir çalışmada tip 2 diyabetli sıçanlarda spironolakton uygulamasının damar geçirgenliğini düzenleyen proteinlerin sentezini artırarak retinal inflamasyonu, vasküler geçirgenliği ve ödemi azalttığını sonuçta da retinopatinin erken ve geç patojenik etkilerini iyileştirdiği bildirilmiştir (38). Başka bir çalışmada ise aldosteron uygulaması sıçandaki intraoküler basıncı yükseltmeden retina sinir lifi tabakasının incelmeye ve glommatöz optik sinir dejenerasyonuna neden olurken spironolaktonun, retinal gangliyon hücre kaybını ve dejenerasyonu önlediği bildirilmiştir (39). Ayrıca spironolaktonun çeşitli hayvan modellerinde kalp (40), böbrek (41), bağırsak (17), retina (26) ve beyin (29) gibi doku ve organlarda iskemik hasara karşı yararlı etkiler sağladığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Oyamada ve ark. spironolakton tarafından MR aracılı sinyalleme baskılanması, beyin yeniden şekillenmesi üzerinde enfarktüs boyutunu önemli ölçüde etkileyen ROS üretiminin azaltılması ve nöronların apoptozunun önlenmesi gibi nörokoruyucu etkiyi indüklediğini göstermişlerdir (29). Bu nedenle spironolakton uygulamasının koruyucu ve tedavi edici hücre mekanizmaları aracılığıyla hipoksik-iskemik koşullarda retinal ve serebral hasarı azaltmada etkili olabileceği düşünülmektedir (29,30). Fakat KSH modelinde spironolaktonun beyin dokusundaki etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

KSH VaD'in başlıca nedeni iken bilişsel ve davranışsal düşüşle karakterize çeşitli nörodejeneratif hastalıkların da patogeneze katılan önemli bir faktördür. 2VO, KSH'un hayvan modelidir (2). Aynı zamanda retina ve optik siniri de etkiler, böylece vasküler defektlerle ilişkili retina dejenerasyonunun mekanizmalarını ve tedavisini araştırmak için

faydalı bir model sağlar (5,8). Oküler iskemik sendromun serebral iskeminin erken bir belirtisi olduğu ve retinal ve beyin iskemisi arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir (42). KSH hücre ölümü ile sonuçlanabilen bir dizi biyokimyasal yolağı aktive eder ve ilk olarak nöronal enerji metabolizması bozulur. Enerji metabolizmalarının bozulması ROS üretiminde artışa neden olarak oksidatif stresi tetikler. Böylece iske mi oksidatif stresi içeren kompleks mekanizmalarla dejenerasyona yol açar ve retinal ve serebral hücre sayılarında azalmaya neden olur (43). Beyin ve retina glikojen rezervuarları ağırlıklı olarak sırasıyla astrosit ve Müller hücrelerinde bulunur. Glikojen deposu komşu nöronlara ve aksonlara enerji sağlayarak, hipoglisemi, serebral iske mi, öğrenme gibi hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda önemli bir rol oynar (10). Artan kanıtlar, hücre enerji metabolizmasındaki bozuklukların aldosteron seviyelerinin artmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (27). Dahası çeşitli hayvan modellerinde spironolaktun uygulamasının glikojen metabolizmasını iyileştirdiği, özellikle glikojen sentaz fosforile eden ve inaktive eden glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) düzeylerini azaltarak etkili olduğu bildirilmiştir (15,16,27,31). Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre PFC'de spironolaktunun her iki doz uygulamasının da glikojen düzeylerini KSH grubuna kıyasla artırdığı, göz dokusunda ise 50mg/kg spironolaktun uygulamasının glikojen seviyelerinin artırılmasında daha etkili olduğu saptanmıştır. Çalışmamız bu yönüyle literatürdeki diğer çalışmaları desteklemektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlara göre PFC dokusunda MDA ve glikojen düzeyleri arasında bir korelasyon tespit edilmiştir. PFC dokusunda MDA artarken glikojenin azaldığı belirlenmiştir.

Serbest radikaller ve antioksidan sistem arasındaki denge sızliğin neden olduğu oksidatif stres çeşitli hastalıkların patolojik sürecinde yer aldığı kabul edilmektedir (1). Özellikle beyin çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir, büyük miktarlarda oksijen tüketir ve homeostazı sürdürmek için büyük miktarlarda ATP gerektirir, bu nedenle oksidatif hasara karşı hassastır. ROS'un hücrelere zarar verdiği mekanizmalar, hücre zarlarındaki çoklu doymamış asitlerin peroksidasyonunu, DNA mutasyonlarını ve proteinlerin ve lipidlerin nitratlanması ve karbonilasyonunu içerir (11). MDA lipid peroksidasyonunun ana ürünüdür oksidatif stresin biyolojik belirteci olarak çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (5). Çalışmamızda 25mg/kg spironolaktun uygulamasının PFC'de KSH'un neden olduğu MDA düzeylerini azaltmada etkili olduğu görülmüştür. Benzer şekilde spironolaktunun beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu baskıladığını ve antioksidan kapasiteyi artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (17,23,30,32). Mikroglial hücre kültürü çalışmasında spironolaktunun hipoksi ile artan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve oksidaz katalitik birimi (NOX) izoformlarının düzeylerini azaltarak mikroglial aktivasyonu azalttığı bildirilmiştir (27).

Hücreler, oksidan molekülleri nötralize eden veya ortadan kaldıran süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, GSH ve AA gibi önemli antioksidanlara sahiptir (11,42). Beyindeki azalan AA düzeyleri Alzheimer hastalığı, depresyon, anksiyete ve şizofreni dahil olmak üzere nörodejeneratif ve psikiyatrik bozukluklarla ilişkilidir (13). Ayrıca AA retina, aköz hümör ve lens dahil olmak üzere gözde de bulunur ve görme kaybının önemli nedenleri olan katarakt ve glokomlu hastalarda AA konsantrasyonunun azaldığı bildirilmiştir (44). Spironolaktun tedavisinin antioksidan etki gösterdiğini bildiren çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Örneğin Chen ve arkadaşları AH modelinde spironolaktunun GSH ve hücre sel antioksidan seviyelerini artırmada önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör (Nrf2) düzeylerini artırdığını rapor etmişlerdir (19). Başka bir çalışmada ise diyabetli hayvanlarda spironolaktun SOD, GSH, total antioksidan kapasitesini artırırken MDA seviyelerini azaltarak oksidatif hasarı iyileştirdiği rapor edilmiştir (33). Literatürle uyumlu olarak bu çalışmada KSH'nun PFC'de AA asit düzeylerini azaltırken spironolaktun ile tedavinin AA seviyelerini koruduğunu tespit ettik. Ayrıca gözde 25mg/kg spironolaktun uygulaması AA seviyesini KSH grubu sıçanlarına kıyasla artırdığı bulundu. Çalışmamızda KSH ve spironolaktun uygulamasının GSH düzeylerine etki etmediğini tespit ettik.

Yaşam süresinin büyük bir bölümünde kadınlar serebrovasküler hastalıklardan korunur; ancak menopozdan sonra risk artar, bu da seks hormonlarının bu korumada önemli bir rol oynayabileceğini düşündürür (45). Menopoz sonrası kadınlarda, östrojen ve progesteronların önemli ölçüde azalmasının, AD başlangıcına eğilimi artırdığı varsayılmaktadır. Toplam yaşamları boyunca özellikle östrojen maruziyeti kısa olan kişilerde vasküler demans görülme riskinin arttığı gösterilmiştir (46).

Bu çalışma sonucunda cerrahi menopoz modelinde spironolaktunun göz ve PFC dokularında glikojen düzeylerini ve AA seviyelerinde artış sağlayarak ve KSH ile oluşturulan hipoksik-iskemik hasarı azaltan yararlı etkisi görülmüştür. Bu sonuçlar retinal ve serebral dejenerasyon yaratan patolojilerde MR antagonizminin yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceğini göstermektedir. Altta yatan patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılması için yapılacak ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Teşekkür

Çalışmaya katkılarından dolayı Öğr. Gr. Salih Erdem, Arş. Gör. Dr. Nazan Elma ve finansal destek sağlayan BAP birimine teşekkür ederiz.

Yazar Katkı Beyanı

Fikir: **Meryem Ergenç, Hale Sayan Özçmak**, Tasarım: **Meryem Ergenç, Hale Sayan Özçmak**, Veri toplama veya işleme: **Meryem Ergenç, Hale Sayan Özçmak, İnci Turan**, Analiz veya

Yorumlama: **Meryem Ergenç, Hale Sayan Özçmak**, Literatür taraması: **Meryem Ergenç, Veysel Haktan Özçmak, İnci Turan**, Yazma: **Meryem Ergenç, Veysel Haktan Özçmak, İnci Turan**, Onay: **Meryem Ergenç**.

Çıkar Çatışması

Bulunmuyor.

Finansal Destek

Çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP No: 2020-2625-9946-02).

Etik Kurul Onayı

Çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu (Etik kurul no: 2020-28-01/10) onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Hakemlik Süreci

Kör hakemlik süreci sonrası yayınlanmaya uygun bulunmuş ve kabul edilmiştir

KAYNAKLAR

1. Rajeev V, Fann DY, Dinh QN, Kim HA, De Silva TM, Lai MKP, Chen CL, Drummond GR, Sobey CG, Arumugam TV. Pathophysiology of blood brain barrier dysfunction during chronic cerebral hypoperfusion in vascular cognitive impairment. *Theranostics* 2022;12(4):1639-1658.
2. van der Flier WM, Skoog I, Schneider JA, Pantoni L, Mok V, Chen CLH, Scheltens P. Vascular cognitive impairment. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:18003.
3. Luo P, Chen C, Lu Y, Fu T, Lu Q, Xu X, Li C, He Z, Guo L. Baclofen ameliorates spatial working memory impairments induced by chronic cerebral hypoperfusion via up-regulation of HCN2 expression in the PFC in rats. *Behav Brain Res* 2016;308:6-13.
4. Bajaj P, Singh H, Kalotra S, Kaur G. Butanol extract of *tinospora cordifolia* alleviates acute sleep deprivation-induced impairments in cognitive functions and neuromuscular coordination in middle-aged female rats. *Neuromolecular Med* 2022;24(2):202-214.
5. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2007;54(1):162-180.
6. Du R, Meng ZY, Wang JL, Wang YL. Efficacy of osthole in management of hypoperfused retina. *J Ophthalmol* 2018;2018:6178347.
7. Ong TJ, Paine M, O'Day J. Retinal manifestations of ophthalmic artery hypoperfusion. *Clin Exp Ophthalmol*. 2002;30(4):284-291.
8. Hei Y, Zhang X, Chen R, Zhou Y, Gao D, Liu W. High-mobility group box 1 neutralization prevents chronic cerebral hypoperfusion-induced optic tract injuries in the white matter associated with down-regulation of inflammatory responses. *Cell Mol Neurobiol* 2019;39(7):1051-1060.
9. Walls AB, Schousboe A. Brain glycogen: Emergency fuel and dynamic function in neurotransmission. *Metab Brain Dis* 2015;30(1):249.
10. Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M, Schallek J, Kılıç K, Villafranca-Baughman D, Can A, Di Polo A, Dalkara T. Retinal ischemia induces alpha-SMA-mediated capillary pericyte contraction coincident with perivascular glycogen depletion. *Acta Neuropathol Commun* 2019;7(1):134.
11. Ozacmak VH, Sayan H, Cetin A, Akyildiz-Igdem A. AT1 receptor blocker candesartan-induced attenuation of brain injury of rats subjected to chronic cerebral hypoperfusion. *Neurochem Res* 2007;32(8):1314-1321.
12. Lee JM, Lee JH, Song MK, Kim YJ. NXP031 improves cognitive impairment in a chronic cerebral hypoperfusion-induced vascular dementia rat model through Nrf2 signaling. *Int J Mol Sci* 2021;22(12):6285.
13. Kocot J, Luchowska-Kocot D, Kielczykowska M, Musik I, Kurzepa J. Does vitamin C influence neurodegenerative diseases and psychiatric disorders? *Nutrients* 2017;9(7):659.
14. Xu C, Dai Y, Bai J, Ren B, Xu J, Gao F, Wang L, Zhang W, Wang R. 17beta-oestradiol alleviates endoplasmic reticulum stress injury induced by chronic cerebral hypoperfusion through the Haemoglobin/HIF 1alpha signalling pathway in ovariectomized rats. *Neurochem Int* 2021;148:105119.
15. Aremu AO, Lilian DC, Olufemi SA, Aderemi OL. Combined but not single treatment with ethinylestradiol/levonorgestrel and spironolactone reduces plasminogen activator inhibitor-1 in insulin-resistant ovariectomized rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2019;20(4):1470320319895933.
16. Olatunji LA, Adeyanju OA, Michael OS, Usman TO, Tostes RC, Soladoye AO. Ameliorative effect of low-dose spironolactone on obesity and insulin resistance is through replenishment of estrogen in ovariectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2019;97(1):65-74.
17. Ozacmak HS, Ozacmak VH, Barut F, Araslı M, Ucan BH. Pretreatment with mineralocorticoid receptor blocker reduces intestinal injury induced by ischemia and reperfusion: Involvement of inhibition of inflammatory response, oxidative stress, nuclear factor κB, and inducible nitric oxide synthase. *J Surg Res* 2014;191(2):350-361.
18. Diaz-Otero JM, Yen TC, Fisher C, Bota D, Jackson WF, Dorrance AM. Mineralocorticoid receptor antagonism improves parenchymal arteriole dilation via a TRPV4-dependent mechanism and prevents cognitive dysfunction in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018;315(5):H1304-H1315.
19. Adeyanju OA, Michael OS, Soladoye AO, Olatunji LA. Blockade of mineralocorticoid receptor ameliorates oral contraceptive-induced insulin resistance by suppressing elevated uric acid and glycogen synthase kinase-3 instead of circulating mineralocorticoid. *Arch Physiol Biochem* 2020;126(3):225-234.
20. Chen L, Shi R, She X, Gu C, Chong L, Zhang L, Li R. Mineralocorticoid receptor antagonist-mediated cognitive improvement in a mouse model of Alzheimer's type: Possible involvement of BDNF-H(2) S-Nrf2 signaling. *Fundam Clin Pharmacol* 2020;34(6):697-707.
21. Wilkinson-Berka JL, Agrotis A, Deliyanti D. The retinal renin-angiotensin system: Roles of angiotensin II and aldosterone. *Peptides* 2012;36(1):142-150.

22. Northcott CA, Fink GD, Garver H, Haywood JR, Laimon-Thomson EL, McClain JL, Pires PW, Rainey WE, Rigsby CS, Dorrance AM. The development of hypertension and hyperaldosteronism in a rodent model of life-long obesity. *Endocrinology* 2012;153(4):1764-1773.
23. Dinh QN, Young MJ, Evans MA, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Aldosterone-induced oxidative stress and inflammation in the brain are mediated by the endothelial cell mineralocorticoid receptor. *Brain Res* 2016;1637:146-153.
24. Yuan Y, Li N, Liu Y, Zhu Q, Heizhati M, Zhang W, Yao X, Zhang D, Luo Q, Wang M, Chang G, Cao M, Zhou K, Wang L, Hu J, Maimaiti N. Positive association between plasma aldosterone concentration and white matter lesions in patients with hypertension. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:753074.
25. Pires PW, McClain JL, Hayoz SF, Dorrance AM. Mineralocorticoid receptor antagonism prevents obesity-induced cerebral artery remodeling and reduces white matter injury in rats. *Microcirculation* 2018;25(5):e12460.
26. Liu Y, Hirooka K, Nishiyama A, Lei B, Nakamura T, Itano T, Fujita T, Zhang J, Shiraga F. Activation of the aldosterone/mineralocorticoid receptor system and protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism in retinal ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res* 2012;96(1):116-123.
27. Rana I, Suphapimol V, Jerome JR, Talia DM, Deliyanti D, Wilkinson-Berka JL. Angiotensin II and aldosterone activate retinal microglia. *Exp Eye Res* 2020;191:107902.
28. Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology* 2010;151(5):2040-2049.
29. Oyamada N, Sone M, Miyashita K, Park K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Itoh H, Nakao K. The role of mineralocorticoid receptor expression in brain remodeling after cerebral ischemia. *Endocrinology* 2008;149(8):3764-3777.
30. Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 1970;28(2):234-236.
31. Berger J, Shepard D, Morrow F, Taylor A. Relationship between dietary intake and tissue levels of reduced and total vitamin C in the nonscorbutic guineapig. *J Nutr* 1989;119:734-740.
32. Casini A, Ferrali M, Pampella A, Maellaro E, Combati M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene in toxicated mice. *Am J Pathol* 1989;123:520-531.
33. Aykac G, Uysal M, Yalan AS, Kocak Toker N, Sivas A, Oz H. The effects of chronic ethanol injection on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 1985;36:71-76.
34. Wang X, Zhu Y, Wang S, Wang Z, Sun H, He Y, Yao W. Effects of eplerenone on cerebral aldosterone levels and brain lesions in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2020;17:42(6):531-538.
35. Rudolph AE, Rocha R, McMahon EG. Aldosterone target organ protection by eplerenone. *Mol Cell Endocrinol* 2004;217(1-2):229-238.
36. Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Harbig J, Miller AG. Identification of a retinal aldosterone system and the protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism on retinal vascular pathology. *Circ Res* 2009;104(1):124-133.
37. Rigsby CS, Burch AE, Ogbi S, Pollock DM, Dorrance AM. Intact female stroke-prone hypertensive rats lack responsiveness to mineralocorticoid receptor antagonists. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(4):R1754-1763.
38. Zhao M, Gelize E, Levy R, Moulin A, Azan F, Berdugo M, Naud MC, Guegan J, Delaunay K, Pussard E, Lassiab P, Bravo-Osuna I, Herrero-Vanrell R, Behar-Cohen F. Mineralocorticoid receptor pathway and its antagonism in a model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2021;70(11):2668-2682.
39. Nitta E, Hirooka K, Tenkumo K, Fujita T, Nishiyama A, Nakamura T, Itano T, Shiraga F. Aldosterone: A mediator of retinal ganglion cell death and the potential role in the pathogenesis in normal-tension glaucoma. *Cell Death Dis* 2013;4(7):e711.
40. Leader CJ, Wilkins GT, Walker RJ. The effect of spironolactone on cardiac and renal fibrosis following myocardial infarction in established hypertension in the transgenic Cyp11a1Ren2 rat. *PLoS One* 2021;16(11):e0260554.
41. Lindhardt JL, Nielsen PM, Hansen ESS, Qi H, Tougaard RS, Mariager CØ, Bertelsen LB, Kim WY, Laustsen C. The hemodynamic and metabolic effects of spironolactone treatment in acute kidney injury assessed by hyperpolarized MRI. *NMR Biomed* 2020;33(10):e4371.
42. Ritzel RM, Pan SJ, Verma R, Wizeman J, Crapser J, Patel AR, Lieberman R, Mohan R, McCullough LD. Early retinal inflammatory biomarkers in the middle cerebral artery occlusion model of ischemic stroke. *Mol Vis* 2016;22:575-588.
43. Turan I, Cengil O, Onar B, Altuğ B, Sayan Ozacmak H, Ozacmak VH. Environmental enrichment attenuate retinal oxidative stress induced by bilateral carotid artery occlusion. *Med J West Black Sea* 2019;3(3):101-108.
44. Leite MT, Prata TS, Kera CZ, Miranda DV, de Moraes Barros SB, Melo LA Jr. Ascorbic acid concentration is reduced in the secondary aqueous humour of glaucomatous patients. *Clin Exp Ophthalmol* 2009;37(4):402-406.
45. Yoo JE, Shin DW, Han K, Kim D, Won HS, Lee J, Kim SY, Nam GE, Park HS. Female reproductive factors and the risk of dementia: A nationwide cohort study. *Eur J Neurol* 2020;27(8):1448-1458.
46. Robison LS, Gannon OJ, Salinero AE, Zuloaga KL. Contributions of sex to cerebrovascular function and pathology. *Brain Res* 2019;1710:43-60.