

İskemi Sonucu Retinada Oluşan Hasarın Bölgesel Farklılıkları

REGIONAL DIFFERENCES OF DAMAGE IN THE RETINA AFTER ISCHEMIA

Kemal ÖZBİLGİN*, Barış TOPRAK**, İbrahim TUĞLU***, Verda TOPRAK****, Mine YURTSEVEN*****

* Doç.Dr., Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD,

** Uz.Dr., Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD,

*** Yrd.Doç.Dr., Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD,

**** Uz.Dr., Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, MANİSA

***** Prof.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD, İZMİR

Özet

Amaç: Retinanın herhangi bir nedenle iskemi ile karşılaşması körlükle sonuçlanabilmektedir. İskemi sonrası retinada ortaya çıkan değişiklikler, iskeminin şiddetine, ve süresine bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Kontrollü şiddette uygulanan iskeminin retinada oluşturduğu değişikliklerin bilinmesi, iskemik hasarda mekanizmaların açıklanmasına ve iskemiyeye karşı koruyucu önlemlerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Bu çalışmada, intraoküler basınç uygulayarak oluşturulan iskeminin, retina üzerine olan etkileri ve bu etkilerin bölgesel farklılıklarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 20 adet erişkin erkek sıçan alındı ve 2 eşit gruba ayrıldı. Birinci grup sıçanların sağ göz ön kamaralarına enjektörle girildi ve 60 dakika süre boyunca 150 mmHg basınç uygulandı. İkinci (sham) gruba ait hayvanların sağ göz ön kamarasına girildi, basınç uygulanmadı. Her grubun sol gözleri ise kontrol grubu olarak değerlendirildi. Deneylerden hemen sonra alınan gözler ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için iki parçaya ayrıldı. Işık mikroskopik incelemeler için ayrılan doku Hematoksilen-Eosin ile boyandı. Bu preparatlarda retina tabakalarının (ganglion hücre, iç pleksiform, iç çekirdek, dış çekirdek ve foto reseptör tabakası) kalınlıkları periferik ve merkezi bölgelerde ayrı ayrı ölçüldü ve retinanın tüm kalınlığına oranları hesaplandı. Elektron mikroskopik inceleme için ayrılan doku örnekleri epon bloklar haline getirildi ve retina tabakaları incelendi.

Bulgular: Kontrol ve iskemik grubun retinalarının istatistiksel karşılaştırılmasında iskemik grubun iç pleksiform tabakasında belirgin incelme olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Bu inceleme retinanın periferik bölgesinde, merkezdekenden çok daha ($p<0.001$) anlamlı bulundu. Ultrastrüktürel incelemede iskemik gruba ait doku örneklerinde ganglion hücre tabakasında ve dış çekirdek tabakasında bulunan hücrelerin normal yapılarını koruduğu, buna karşılık iç çekirdek tabakasında apoptotik kriterlere uyan hücrelerin varlığı dikkat çekici bulundu.

Sonuç: İç pleksiform tabakada inceleme olarak ortaya çıkan iskemik değişikliklerin, retinanın periferik bölgesinde daha belirgin olduğu, bunun iç çekirdek tabakadaki hücrelerin apoptozis yolu ile azalmasına bağlı olduğu tespit edildi. Herhangi bir nedenle iskemiyeye maruz kalan retinanın periferik bölgesinin öncelikli olarak incelenmesinin, iskemik hasarın belirlenmesi ve komplikasyonların önlenmesi açısından önemli olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İskemi, Retina, Apoptozis, Ultrastrüktür

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:264-269

Summary

Purpose: Retinal pathology due to ischemia may result with blind eye. Alterations in ischemic retina depends on differences in ischemic duration and magnitude. To know the alterations in the retina due to ischemic injury may help to explain the pathogenic mechanisms and to improve the prevention of the damage. In this study, we aimed to investigate the effect of ischemia on the cells of retina and the alterations of the regional differences in ischemic retina.

Materials and Methods: Twenty male rats were divided into two equal groups. In the first group, intraocular pressure was raised to 150 mmHg with cannulation of the anterior chamber. In the second group (sham) cannulation was performed but the eye was not pressurised. The left eyes of each animal were served as controls. Immediately after the experimental procedure, the animals were sacrificed and the eyes were enucleated for electron microscopic and light microscopic evaluation. The specimens for the light microscopic evaluation were stained with Hematoxylin-Eosin. The thickness of the ganglion cell layer, inner plexiform layer, inner nuclear layer, outer nuclear layer, and photoreceptor layer were measured in the periphery and the central part of the retina and their ratio to total thickness of the retina was calculated.

Results: It was found that the inner plexiform layer was significantly ($p<0.05$) thinner in the experimental group than the sham group. The peripheral inner plexiform layer was more significantly ($p<0.001$) thinner than the central inner plexiform layer in the experimental group. The cell morphology was found as normal in the ganglion cell layer and outer nuclear layer. However, it was interesting to note that a few cells in inner nuclear layer were determined as apoptotic according to ultrastructural criteria.

Conclusion: It was concluded that the ischemic damage occurred as thinning of inner plexiform layer was more effective in the peripheral retina and the reason for this result may due to death of cells in the inner plexiform layer by apoptosis. This result is important for the early diagnosis and treatment of ischemic damage in the retina.

Key Words: Ischemia, Retina, Apoptosis, Ultrastructure

T Klin J Med Sci 2001, 21:264-269

Geliş Tarihi: 28.09.2000

Yazışma Adresi: Dr.Kemal ÖZBİLGİN

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji AD, MANİSA

Retina iskemiyeye karşı diğer sinir dokularından daha dayanıklıdır (1), ancak ameliyat, emboli ve glokom gibi çeşitli nedenlerle uzun süreli iskemiyeye maruz kaldığı olgularda oluşan hasar genellikle körlükle sonuçlanır (2).

Retinada ortaya çıkan değişiklikler iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir (3).

DeneySEL olarak retinada iskemi, retinal arter oklüzyonu, karotis oklüzyonu veya kan basıncını intraoküler göz basıncından daha yüksek düzeye çıkarılması gibi yöntemler ile oluşturulabilmektedir (1,2,4). Retinada iskemi oluşturanın en yaygın kullanılan ve başarılı olan yöntemi ise göz içi basıncının ön kamaradan girilerek yükseltilmesidir (5-11). Bu yöntemle oluşturulan iskemide, en önemli değişikliğin iç pleksiform tabakada incelleme biçiminde gözleendiği rapor edilmiştir (6-8). Retinadaki iskemik hasardan, iskemi boyunca artan serbest oksijen radikalleri, N-Methyl-D-Aspartat Acid (NMDA) reseptörleri ve sitokinler sorumlu tutulmaktadır (12,13).

Retina iskemiyeye diğer sinir dokularından daha dirençlidir. Smith ve arkadaşları karotisin oklüzyonu ile oluşturdukları iskeminin beyinde 2. dakikada yapısal değişikliklere neden olduğunu tespit etmişlerdir (4). Retinada iskemik değişiklikler ise 30-60 dakikalık iskemiden sonra ortaya çıkmaktadır (6,7,14). Şiddetli iskemilerde retinayı oluşturan hücrelerde nekroz gözlenirken daha hafif iskemilerde apoptozis ortaya çıkmaktadır (15-18).

Retinanın iç bölgesi retinal damarlardan, dış bölgesi ise koroid damarlarından beslenmektedir. İntraoküler basınç yükselmesinde retinayı besleyen damarların kan akımında farklı biçimde değişiklikler olmaktadır. Kediler üzerinde yapılan çalışmada intraoküler basınç sistolik kan basıncı üzerine çıkarıldığında, retinal kan akımının %6, koroid kan akımının ise %0.6 oranında azaldığı tespit edilmiştir (5). Anderson ve Davis maymunlar üzerinde yaptıkları çalışmada hafif derece iskemide retinanın periferik kısmının daha fazla etkilendiğini bildirmişlerdir (10). İnsanlarda da glokomdaki görme alan defektlerinin ve diabetik retinopatilerdeki mikroanjyopatilerin retinanın üst kadranında gözlenmesini araştıran çalışmasında, Chung ve arkadaşları, üst bölgede bulunan damarların hiperkapni durumunda alt kadrandakilere göre daha güçlü vasokonstriksiyon yaptığını tespit etmişlerdir (19). Bu tip çalışmalarda genellikle Doppler ile kan akım miktarı ölçülmüş, histolojik düzeydeki araştırmalarda ise retinanın merkezine yakın referans bölgesinden alınan ölçümler kullanılmıştır (5,6,10).

Bu çalışmada oluşturulan iskeminin retina hücrelerine ve tabakalarına olan etkisinin, bu etkilerin bölgesel farklılıklarının, ışık ve elektron mikroskopik tekniklerle incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

İskemiyinin sıçan retinasında oluşturacağı etkileri incelemek amacı ile, kullanılan erişkin 20 adet erkek Wistar albino sıçan, iki gruba ayrıldı. Deney başlamadan önce hayvanlara Ketamin 30mg/kg ve Xylazine 2mg/kg intraperitoneal verilerek genel anestezi uygulandı. Birinci grubu oluşturan sıçanların sağ gözlerine ön kamaradan dental iğne ile girilerek, manometre kontrolü altında 150 mmHg basınç

altında serum fizyolojik uygulandı. Diğer grubun (sham) sağ gözlerine aynı şekilde girildi ancak basınç uygulanmadı. Bu işlemlerden hemen sonra hayvanlar sakrifiye edildi ve gözleri enükle edildi. Hayvanların sol gözleri ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Her gruptan alınan doku örnekleri ışık ve elektron mikroskopik inceleme için iki parçaya ayrıldı.

Işık Mikroskopik Yöntem

Işık mikroskopik inceleme için alınan gözler bütün halinde 48 saat % 10'luk formalin içerisinde tespit edildikten sonra parafin blok halinde hazırlandı. Doku bloklarından alınan seri kesitlerinden optik sinir içeren her 10 kesitten biri Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyandı. HE ile boyanmış preparatlarda retinanın optik sinire yakın bölgesi merkez, corpus ciliare'ye yakın bölgesi perifer olarak kabul edildi. Her iki bölgeden alınan görüntüler bilgisayara aktarıldı. Alınan görüntüler üzerinde Excell 8.0 programı kullanılarak, iç sınırlayıcı membrana dik olarak alınan lineer ölçümlerle retinanın Ganglion hücre (GHT), iç pleksiform (İPT), iç çekirdek (İÇ), dış çekirdek (DÇ) ve fotoreseptör hücre (FR) tabaka kalınlıkları ölçüldü ve retinanın tüm kalınlığına oranları hesaplandı. Her göz için alınan 10 kesitte ve her kesitte çevre ve merkezden yapılan 10 ölçümün ortalama ve standart deviasyonları Graphpad 4.0 programında tek yönlü varyans analizi kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi, p<0.05 anlamlı ve p<0.001 çok anlamlı olarak kabul edildi.

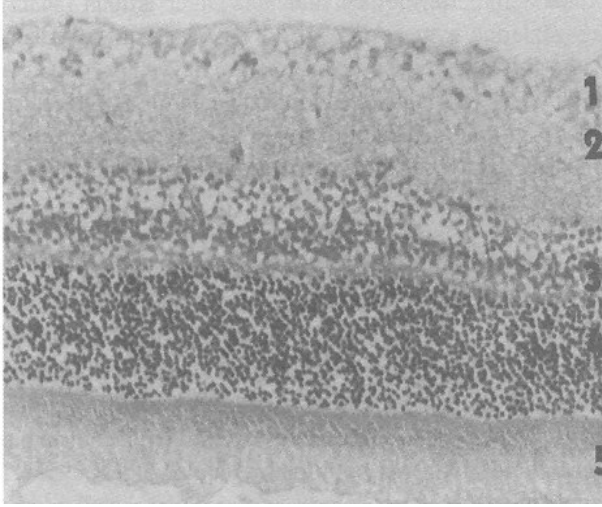
Elektron Mikroskopik Yöntem

Elektron mikroskopik inceleme için alınan doku örnekleri %1 gluteraldehit içinde 4 saat tespit edildi. Osmik asit ile ikinci tespit işleminden sonra epon bloklar haline getirildi. Ultramikrotom ile alınan yarı ince kesitlerden incelenecek alanlar belirlendi ve bu alanların ince kesitleri alındı. Kesitler uranyl asetat ve kurşun sitrat ile boyandı; Zeiss 9A elektron mikroskobu ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

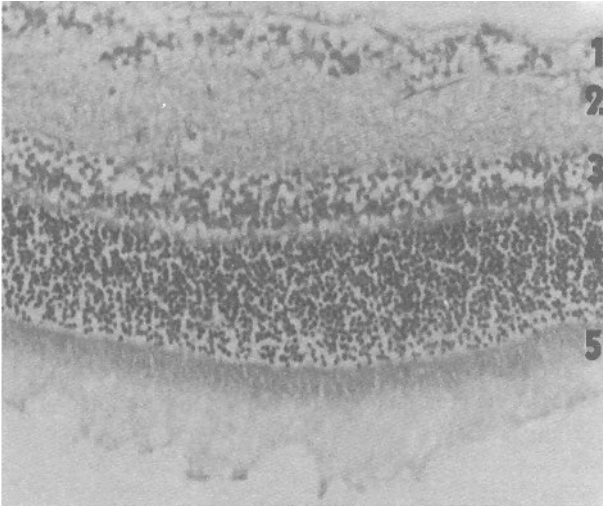
Bulgular

Işık Mikroskopi

Kontrol, sham ve iskemi uygulanmış dokuların HE ile boyanmış preparatlarının optik sinire komşu olan retinanın merkezi bölgesinin incelenmesinde, iç pleksiform tabakada incelleme dışında, retinayı oluşturan iç sınırlayıcı membran (İSM), ganglion hücre tabakası (GHT), iç çekirdek tabakası (İÇT), dış pleksiform tabakası (DPT), dış çekirdek tabakası (DÇT), fotoreseptör hücre tabakası (FRT) ve retina pigment epitel tabakasının (RPE) normal histolojik yapılarını korudukları gözleendi (Şekil 1, 2, 3). Aynı preparatların corpus siliare'ye yakın periferik bölgelerinin incelenmesinde iç pleksiform tabakada incelleme dışında, normal yapılarını korudukları tespit edildi. (Şekil 4, 5, 6). Her iki grupta da doku ödemi ve nekrotik belirtiler bulunmuyordu. Her üç gruba ait retinaların periferik ve merkezi bölgesinden yapılan ölçümlerin ortalamalarının istatistiksel karşılaştırılmasında



Şekil 1. Kontrol grubuna ait doku örneklerinin optik sinire yakın (merkez) bölgesinde, retina tabakalarının normal yapılarını koruduğu görülmektedir. Ganglion hücre tabakası (1), iç pleksiform tabaka (2) iç çekirdek tabakası (3), dış çekirdek tabakası (4), fotoreseptör hücre tabakası (5). H.E Orijinal büyütme X100.



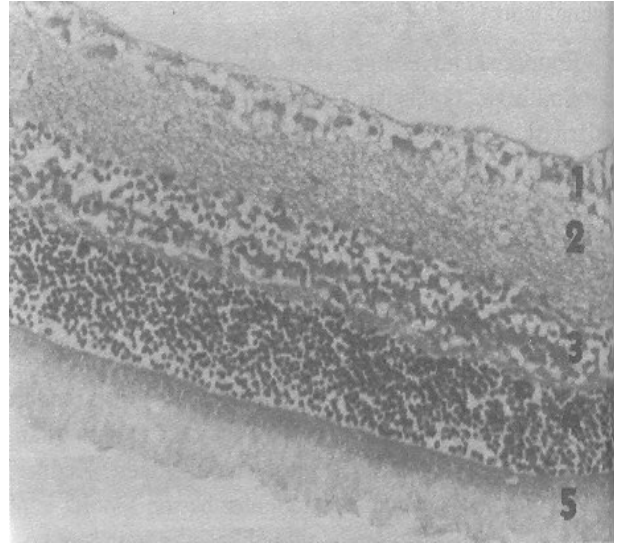
Şekil 2. Sham grubuna ait doku örneklerinin optik sinire yakın (merkez) bölgesinde, retina tabakalarının normal yapısını koruduğu ve kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ganglion hücre tabakası (1), iç pleksiform tabaka (2), iç çekirdek tabakası (3), dış çekirdek tabakası (4), fotoreseptör hücre tabakası (5). H.E Orijinal büyütme X100.

IPT dışındaki tabakalarda anlamlı bir fark tespit edilemedi. İPT'nın karşılaştırılmasında ise kontrol grubu (25.3 ± 2.6) ile sham grubu (24.8 ± 3.1) arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, bu grupların iskemik grupla karşılaştırılmasında (17.7 ± 2.1) anlamlı bir incelmeye tespit edildi ($p < 0.05$). Retinanın periferik ile merkezi bölgelerinin ölçümlerinin değerlendirilmesinde, retinanın merkezi bölgesinde,

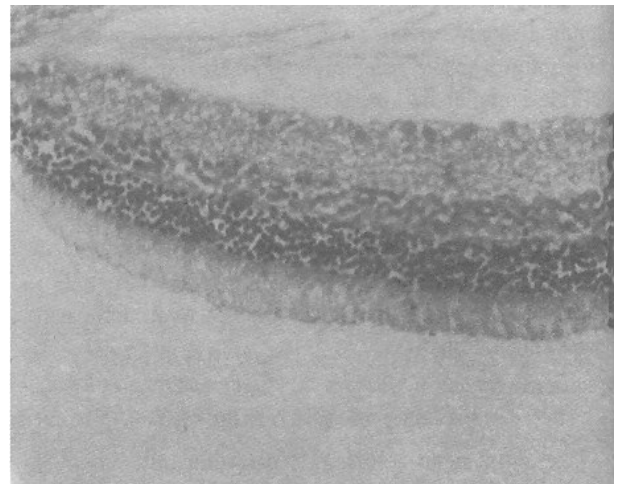
iskemik gruptaki İPT'daki incelmeye (Kontrol 25.4 ± 2.4 , Sham 22.8 ± 2.4 , İskemi 19.3 ± 2) $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olduğu, ancak periferik bölgede (Kontrol 25.0 ± 2.9 , Sham 22.7 ± 3.2 , İskemi 16.7 ± 2.6) $p < 0.001$ düzeyinde çok anlamlı olduğu tespit edildi (Tablo 1).

Elektron Mikroskopi

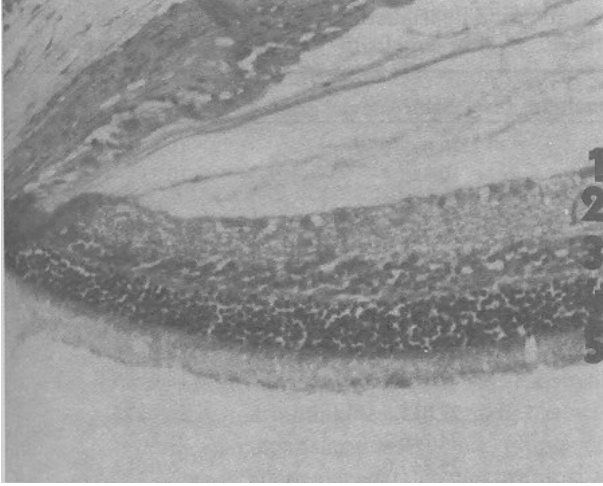
Kontrol ve sham grubuna ait doku örneklerinin ince yapı düzeyindeki incelenmesinde hücrelerin normal yapılarını korumuş oldukları gözlemlendi. İskemik gruba ait doku örneklerinde nekrotik hücrelere rastlanmadı ancak, az



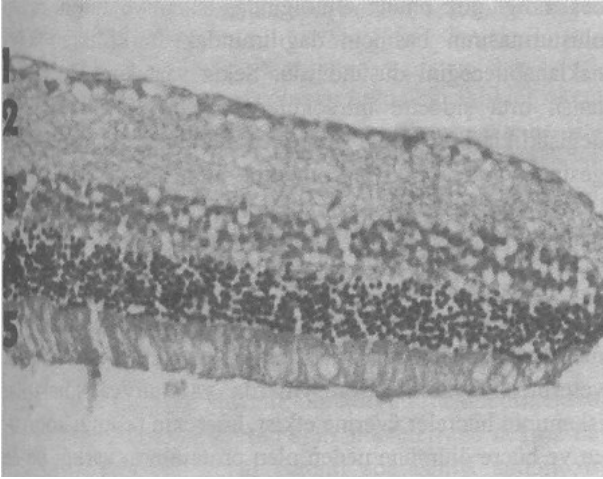
Şekil 3. Optik sinire yakın (merkez) bölgeden alınan iskemik uygulanmış grupta iç pleksiform tabakada (2) incelmeye görülmektedir. Ganglion hücre tabakası (1), iç çekirdek tabakası (3), dış çekirdek tabakası (4), fotoreseptör hücre tabakası (5). H.E. Orijinal büyütme X100.



Şekil 4. Corpus siliareye yakın (perifer) bölgeden alınan kontrol grubunda retina tabakalarının normal yapılarını koruduğu görülmektedir. Ganglion hücre tabakası (1), iç pleksiform tabaka (2), iç çekirdek tabakası (3), dış çekirdek tabakası (4), fotoreseptör hücre tabakası (5). H.E. Orijinal büyütme X100.



Şekil 5. Corpus siliareye yakın (perifer) bölgeden alınan sham grubunda retina tabakalarının kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği izlenmektedir. Ganglion hücre tabakası (1), iç pleksiform tabaka (2), iç çekirdek tabakası (3), dış çekirdek tabakası (4), fotoreseptör hücre tabakası (5). H.E. Orijinal büyütme X100.



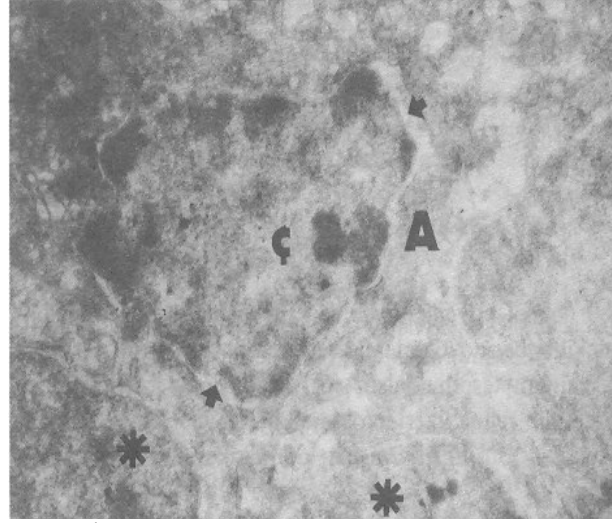
Şekil 6. Corpus siliareye yakın (perifer) bölgeden alınan iskemik grupta iç pleksiform tabakanın (2) incelmış olduğu izlenmektedir. Ganglion hücre tabakası (1), iç çekirdek tabakası (3), dış çekirdek tabakası (4), fotoreseptör hücre tabakası (5). H.E. Orijinal büyütme X200.

sayıda hücrede kromatin içeriğinde yoğunlaşma, perinükleer sisternalarda genişleme görüldü. Hücre zarı bütünlüğünün korunduğu bu hücrelerin apoptotik hücrelerin morfolojik kriterlerini gösterdiği tespit edildi (Şekil 7). Ayrıca sinir liflerinin bazılarında fokal myelin kılıf bozulmalarının varlığı izlendi (Şekil 8).

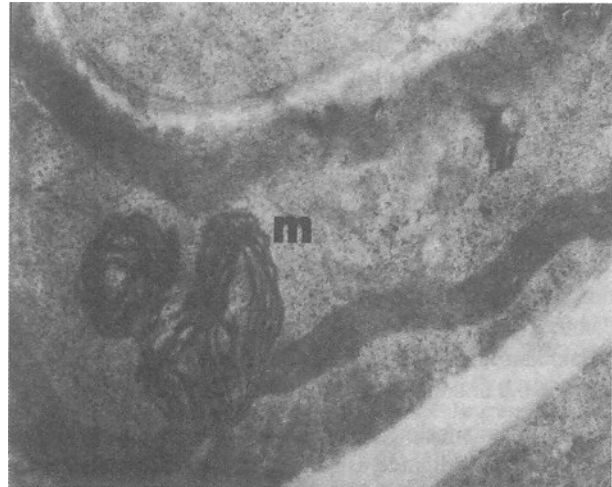
Tartışma ve Sonuç

Retinada iskemik değişikliklerin mekanizmalarının bilinmesi, şüphesiz iskemiden korunmayı ve ortaya çıkan

hasarın azaltılmasını sağlayacaktır. Yapılan çalışmalarda, retinadaki hasarın iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir (3,5,13). Sinir doku iskemiyeye en hassas doku grubunu oluşturur, ancak retinada iskemik değişiklikler 30-60 dakikadan sonra başlarken (6,7,14), serebral kortekste bu tür değişiklikler 2. dakikada başlamaktadır (4). Iijima ve arkadaşlarının iskemiyeye sonrası retina ve serebral korteksi karşılaştırdıkları çalışmalarında, retina hasarının daha geç ortaya çıktığını ve retinadan yavaş glutamat salınımının iskemik hasarın geç ortaya çıkmasının nedeni olduğunu ileri sürmüşlerdir (1). Hughes sıçan gözlerinde hasarın oluşum süresini kesin olarak saptamak için yaptığı çalışmada, 30, 60, 80, 90, 120,



Şekil 7. İskemik grubunun elektron mikroskopik incelenmesinde iç çekirdek tabakasını oluşturan bipolar nöronlar (*) arasında apoptotik hücre görülmektedir (A). Bu hücrenin hücre zarının bütünlüğünün korunduğu çekirdek kromatinin arttığı (ç), perinükleer sisternaların genişlediği (Ok) izlenmektedir. Orijinal büyütme X4800.



Şekil 8. İskemik grubun elektron mikroskopik incelenmesinde miyelini sinir liflerinde iskemiyeye sonucu ortaya çıkan miyelini kılıfta bozulmalar (m) görülmektedir. Orijinal büyütme X 9500.

Tablo 1. İskeminin retinada oluşturduğu değişikliklerin kontrol ve sham grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırılması (Tabaka kalınlığı/Total kalınlık)

		KONTROL	SHAM	İSKEMİ
GHT	MERKEZ	10.2±2.0	10.0±2.5	10.9±2.2
	PERİFER	9.9±1.7	10.3±3.4	10.3±1.7
	ORTALAMA	10.3±1.8	9.4±2.5	9.1±1.9
IPT	MERKEZ	25.4±2.4	22.8±2.4	19.3±2.2*
	PERİFER	25.0±2.9	22.7±3.2	16.7±2.6**
	ORTALAMA	25.3±2.6	24.8±3.1	17.7±2.15**
İÇT	MERKEZ	17.7±2.6	22.2±3.1	22.4±4.3
	PERİFER	18.0±2.6	22.2±6.	20.5±4.6
	ORTALAMA	16.6±2.2	19.9±3.4	18.4±3.5
DÇT	MERKEZ	26.8±5.9	27.0±5.5	26.4±3.3
	PERİFER	25.9±5.8	24.1±6.2	25.8±2.7
	ORTALAMA	24.8±4.6	25.8±7.0	26.0±4.6
FRT	MERKEZ	27.6±5.9	22.7±4.0	24.9±3.1
	PERİFER	26.2±5.0	23.4±5.3	21.5±2.7
	ORTALAMA	27.5±6.6	21.2±4.5	22.9±3.9

* : p<0.05

** : p<0.001

180 dakika boyunca sistolik kan basıncının üzerinde intraoküler basınç uygulamış ve iskemik hasarın 60 dakikada başladığını tespit etmiştir (6). Bu nedenle çalışmamızda iskeminin retina üzerine olan etkilerini incelemek için, intraoküler 150 mmHg basıncı 60 dakika süre ile uygulanmıştır.

İskemik, sham ve kontrol grubuna ait retinaların istatistiksel karşılaştırılmalarda standardizasyonu sağlayabilmek için ölçülen her retina kat kalınlığının değeri, total kalınlığa bölündü ve elde edilen oranlar değerlendirmeye alındı. Oranların incelemesinde, sadece iskemik grubun İPT'da istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) incelmeye tespit edildi (Tablo 1). İPT'yi İNT'da bulunan hücrelerin uzantılarının oluşturdukları göz önüne alındığında İPT'da incelenen İNT'ki hücrelerin kaybına bağlı olabileceği düşünüldü. Anatomik olarak İPT'yi da içine alan retinanın iç bölgesinin retinal damarlardan, dış bölgesinin ise koroidde bulunan damarlar tarafından beslendiği Lovasik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (20). Uygulanan intraoküler basıncın, iki tip damar üzerine aynı şiddete baskı yapmadığı, basınç ile ilk karşılaşan retina damarlarının daha fazla etkilenecek iç bölgede hasar oluşturduğu ileri sürülebilir. İntroaküler basıncın damarlar üzerine yansımalarını kediler üzerinde inceleyen Roth ve Pietrzyk, intraoküler basınç uygulamasından sonra retinadaki kan akımının % 6, koroiddeki kan akımının ise yalnızca % 0.6 oranında azaldığını tespit etmişlerdir (5).

İPT'daki incelmeye merkezi ve periferik bölgeler için ayrı ayrı incelendiğinde, iskemik grubun periferinde ortaya çıkan incelmeye (p<0.001), ortalama değerlerden daha (p<0.05) belirgin olduğu dikkat çekici bulundu (Tablo 1). İPT'yi oluşturan hücrelerin merkezde ve periferde aynı tip nöron ve destek hücrelerden oluştuğu ve aynı damarlardan

beslendiği göz önüne alındığında, iskemiyeye farklı cevap oluşturmasının basıncın dağılımındaki farklılıktan kaynaklanabileceğini düşündürdü. Sekiz saat süre ile uygulanan orta şiddette intraoküler basınç sonrası, iskemik değişikliklerin corpus siliare ve retinanın periferik bölgesinde ortaya çıktığı, bununla beraber ancak yüksek basınç uygulaması sonrasında, retinanın merkezi bölgesini ve optik siniri etkilediği bildirmiştir (10).

İntroaküler basınç sonrası retinadaki iskemik değişikliklerin, periferik ve merkezi bölgelerde farklı sonuçlar vermesini sadece basınç dağılımındaki farklılık ile açıklamak yeterli olmayabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, iskeminin hücreler üzerine etkisi, hücrenin taşıdığı koruyucu ve hücre ölümüne neden olan proteinlerin varlığı ile de ilişkilendirilmektedir. İç retina hücrelerinde tespit edilen apoptozisi indükleyen p53 proteininin bu bölgede ortaya çıkan hasardan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (11).

İskemi uygulanmış sıçanların retinalarının elektron mikroskopik incelenmesinde, İNT'da bazı hücrelerin, hücre zar ve organellerinin normal yapılarını korudukları ancak çekirdekte heterokromatin içeriğinin yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 7) ve bu tip hücrelerin apoptozise giden hücreler (14) olabileceği düşünüldü. Apoptotik hücreleri tanımak için günümüzde çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Apoptotik hücrelerin ışık mikroskopik düzeyde tanınması için, Nile Blue Sülfate, Nötral Red, Acridine Orange gibi vital boyalar kullanılmakla birlikte bu boyalar apoptotik hücrelerin tanınması için spesifik değildir. Apoptotik hücrelerdeki DNA fragmantasyonunun ISEL (In situ end labeling), ISNT (In situ nick translation) ve TUNEL (Terminal transferase mediated bio-dUTP-biotin nick end labeling) teknikleri ile oldukça hassas biçimde tespit

edilebilmekle birlikte apoptotik hücreleri en iyi tanımlayan tekniğin elektron mikroskopik inceleme olduğu bildirilmiştir (11). Ancak bu yöntemle, örnek sayısının yetersizliği nedeni ile apoptotik hücrelerin sayısal değerleri hesaplanmamaktadır.

İç nükleer tabakadaki hücrelerin apoptozis yolu ile ortadan kalkması, ışık mikroskopik preparatlarda istatistiksel olarak tespit ettiğimiz İPT'daki incelenen nedeni olabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda da iskemiden sonra ortaya çıkan değişikliklerin ilk olarak iç retinada ortaya çıktığı, bu olaydan glutamat reseptörlerinin yüksek aktivasyonunun sorumlu olduğu bildirilmiştir (8). Katsuyuki ve arkadaşları, sıçanlarda intraoküler 130 mmHg basıncını 45 dakika uyguladığı çalışmalarında iskemik grupta çok sayıda TUNEL pozitif hücre ile agar jel elektroforezi ile DNA da tipik merdiven manzarası (laddering) tespit etmişler, iskemiden sonra Bax gen ekspresyonunun arttığını ve iskemiden sonra bu geni aktive ederek apoptozise neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (9). Rosenbaum ve arkadaşları da sıçanlarda intraoküler basınç uygulanmasından 7 gün sonra retinaları incelediklerinde, iç retinada belirgin inceleme, yaygın TUNEL pozitif hücreler ve iç retina hücrelerinde p53 immünoaktivitesinde artış rapor etmişler ve iskemik hasardan apoptozisin sorumlu olduğunu belirtmişlerdir (11).

İskeminin dokularda oluşturduğu değişiklikler iskemiden şiddetine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Hafif iskemide nekroz ortaya çıkmaktadır (4,14). Bizim çalışmamızda iskemik gruba ait preparatların ışık ve elektron mikroskopik incelemelerinde, retinayı oluşturan tabakalarda nekrotik hücrelere ve enflamasyona rastlanmadı, bu durum 60 dakika süre boyunca 150 mm Hg basıncı uygulayarak oluşturduğumuz iskemiden sonra dokusunda yaygın nekroza yol açacak şiddette olmadığını düşündürmektedir. Choi, iskemiden sonra oluşan sinir hücrelerinde nekroz beklenirken genel ve lokal iskemiden sonra apoptozisin gözlemlendiğini ve anti-apoptotik tedavilerin sinir dokuyu iskemiden etkisinden koruyabileceğini ileri sürmüştür (21).

Sonuç olarak intraoküler basınç uygulayarak oluşturulan iskemiden sonra, İNT'daki hücrelerin apoptozis ile ortadan kalkmasına İPT'da incelmeye neden olduğu, İPT'daki incelenen retinanın periferik bölgesinde daha belirgin olarak ortaya çıktığı tespit edildi. Bu nedenle, gözde herhangi bir nedenle oluşan iskemiden sonra, özellikle retinanın periferik bölgesinin incelenmesinin, iskemiden sonra çıkabilecek komplikasyonların erken tanısı için önemli olabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Iijima T, Iijima C, Iwao Y, Sankawa H. Difference in glutamate release between retina and cerebral cortex following ischemia. *Neurochem Int* 2000; 36(3):221-4.
- Kaufman PL, Gabelt BT, Cynaber M. Introductory comments on neuroprotection. *Survey of Ophth* 1999; 43:1:89-91.
- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Childlow G et al. Neuroprotection in relation to retinal Ischemia and its relevance to glaucoma. *Survey of Ophth* 1999; 43:1:102-1271.
- Smith ML, Auer RN and Siesjo BK. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 1984; 64:319-32.
- Roth S, Pietrzyk Z. Blood flow after retinal ischemia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:8:3209-17.
- Hughes WF. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res* 1991; 53: 573-82.
- Katai N, Yoshimura N. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; Oct; 40(11):2697-705.
- Ju W, Kim K, Park S, Park D, Park C, Oh S, Chung J, Chun M. Nitric oxide is involved in sustained and delayed cell death of rat retina following transient ischemia. *Brain Res* 2000; Oct 27; 881(2):231-6.
- Katsuyuki K, Satoshi K, Takayuki K, Shuji K, Akinori A, Yoshihito H, Masabumi M, Masamichi S. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Research* 1999; 15 (1) 11-20.
- Anderson DR, Davis EB. Sensitivities of ocular tissues to acute pressure-induced ischemia. *Arch Ophthalmol* 1975; 93(4):267-74.
- Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta H, Singh M, Aggarwal A, Hall DH, Roth S and Kessler JA. The role of the P53 protein in the selective vulnerability of the inner retina to transient ischemia. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:2132-39.
- Peng YW, Blackstone CD, Hagan RI, Yau KW. Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neuroscience* 1995; 66: 483-97.
- Brandstatter JH, Hartveit E, Sasoe-Pognetto M, Wassle H. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci* 1994; 6:1100-12.
- Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C and Braquet P. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:1471-77.
- Haddad GG, Xia Y, Banasiak KJ. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Neurobiology* 2000; 62,(3): 215-49.
- Trump BF, Berezsky IK and Cowley RA. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In: Cowley R.A. and Trump BF eds. *Pathophysiology of shock, anoxia, and ischemia*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1982: 6-46.
- Wyllie AH. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen I.D. and Lockshin RA eds. *Cell Death in Biology and Pathology*. London: Chapman and Hall 1981; 9-34.
- Tezel GM, Seigel GM, Wax MB. Density-dependent resistance to apoptosis in retinal cells. *Curr Eye Res* 1999 Nov; 19(5):377-88.
- Chung HS, Harris A, Halter PJ, Kagemann L, Roff EJ, Garzoni HJ, Hosking SL, Martin B. Regional differences in retinal vascular reactivity. *J Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 Sep; 40:10 2448-53.
- Lovaski JV, Gagnon M, Kergoat H. A novel noninvasive videographic method for quantifying changes in the chromaticity of the optic nerve head with changes in the intraocular pressure, pulsatile choroidal blood flow and visual neural function in humans. *Surv Ophthalmol* 1994 May; 38 Suppl: 35-51.
- Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996 Oct; 6(5):667-72.