

Topikal Antiglokomatöz Ajanların Gangliyon Hücre Apoptozuna Etkileri

The Effects of Antiglaucomatous Topical Medications on Retinal Ganglion Cell Apoptosis

Sarper Karaküçük

Prof., M.D.
Department of Ophthalmology
Faculty of Medicine, Erciyes University
Sarperkarakucuk@gmail.com
sarper@erciyes.edu.tr

Yudum Yüce

M.D.
Department of Ophthalmology
Faculty of Medicine, Erciyes University

Narin Liman

Prof., Ph. D.
Department of Histology and Embryology,
Faculty of Veterinary Medicine
Erciyes University

Hatice Ulusal

Asist. Prof., M.D.
Department of Ophthalmology
Faculty of Medicine, Erciyes University

Ayşe Öner

Assoc. Prof., M.D.
Department of Ophthalmology
Faculty of Medicine, Erciyes University
aoner@erciyes.edu.tr

Koray Gümüş

Assist. Prof., M.D.
Department of Ophthalmology
Faculty of Medicine, Erciyes University
drkoray@hotmail.com
kgumus@erciyes.edu.tr

Emel Alan

Assistant
Department of Histology and Embryology,
Faculty of Veterinary Medicine
Erciyes University

Ertuğrul Mirza

Prof., M.D.
Department of Ophthalmology
Faculty of Medicine, Erciyes University
gemirza@mynet.com

Metin Müjdecı

M.D.
Department of Ophthalmology
Faculty of Medicine, Erciyes University

Submitted : November 10, 2006
Revised : September 25, 2009
Accepted : October 27, 2009

Özet

Amaç: Bu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan glokomda antiglokomatöz ilaçların retina gangliyon hücre ölümü üzerine etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Üç episkleral veni oftalmik koterle yakılarak göziçi basınçları yükseltileen 36 adet Wistar albino erkek rat çalışmaya alındı ve beş grup oluşturuldu. Tüm ratlara koterizasyon uygulandıktan sonra 1nci gruptakilere (n=6) ilaç tedavisi verilmedi; ikinci grup ratlara (n=8) latanoprost 3. grup ratlara (n=6) brimonidine, 4ncü gruptakilere (n=9) dorzolamid ve 5. gruptakilere (n=7) betaxolol uygulandı. Operasyondan hemen önce ve sonra, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftada ölçülen göz içi basınçları kaydedildi. Dördüncü hafta sonunda ratların gözleri enükle edildi. TUNEL işaretleme tekniği ile pozitif boyanan hücreler sayılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Dördüncü hafta ölçümlerinde, latanoprost uygulanan ratlarda göziçi basıncı, kontrol gurubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$; Mann WhitneyU testi). Tüm tedavi gruplarındaki apoptotik hücre sayıları, tedavi almayan-kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$, Mann-Whitney U testi). Tedavi grupları birbirleriyle kıyaslandıklarında, apoptotik hücre sayıları açısından bir farklılık görülmedi.

Sonuç: Deneysel rat modelinde topikal olarak uygulanan latanoprost, brimonidin, dorzolamid ve betaxolol, apoptozu önlemede eşit derecede etkili bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: **Apoptoz; Deneysel Hayvan Modeli; Glokom.**

Abstract

Purpose: It was aimed to determine the effects of topically applied latanoprost, brimonidine, dorzolamide and betaxolol on ganglion cell apoptosis in an experimental rat model.

Material and Methods: Intraocular pressure (IOP) was increased by episcleral vein cauterization in 36 Wistar male albino rats. Rats were divided into 5 sub-groups as follows: Group 1 received no medication (n=6), group 2 received latanoprost treatment once daily (n=8), group 3 received brimonidine treatment twice daily (n=6), group 4 received dorzolamide treatment 3 times daily (n=9), and group 5 received betaxolol treatment twice daily (n=7). IOP was recorded before and immediately after the cauterization, on the 1st, 2nd, 3rd and 4th weeks. All eyes were enucleated after four weeks after medication. Apoptosis was determined using the TUNNEL method.

Results: IOP was observed as increased after cauterization. The eyes were found to have higher rate of apoptosis in group-1. There was not a statistically significant difference among the groups in terms of rate of apoptosis.

Conclusion: In an experimental rat model of glaucoma, latanoprost, brimonidine, dorzolamide and betaxolol was found as equally effective in reducing IOP and these agents similarly lowered the rate of ganglion cell apoptosis when compared to group 1.

Key words: **Apoptosis; Experimental animal rat models; Glaucoma.**

Corresponding Author:

Prof. Dr. Sarper Karaküçük
Department of Ophthalmology
Faculty of Medicine, Erciyes University

E- mail: sarperkarakucuk@gmail.com

Giriş

Glokom, optik sinir başında çukurlaşmaya yol açan, retina gangliyon hücrelerinin dejenerasyonu ile karakterize, özel görme alanı kayıpları oluşturan, tedavi edilmediği zaman optik atrofi yaparak tam görme kaybına neden olan ve özel bir optik nöropati meydana getiren kompleks bir göz hastalığıdır (1).

Yirmi birinci yüzyıl başlarında tüm dünyada 70 milyonu aşkın glokomlu olduğu bilinmektedir. Bunların yaklaşık % 53'ü primer açık açılı glokom (PAAG), % 36'sı primer açı kapanması glokomu ve geri kalan % 11'i sekonder glokomlardır. Her yıl 2 milyondan fazla insanda PAAG gelişmektedir. Gokomdan kör olanlar ise 7 milyondan fazladır. Görmeyenlerin yarısından çoğu PAAG olup bunların da çoğu bilateralidir. Epidemiyolojik çalışmalarda beyaz erişkinlerde glokom prevalansı % 1-2 iken, siyahlarda 4 kez daha yüksektir. Yaş arttıkça glokom prevalansı da hızla artar. İnsidans çalışmaları daha az olmakla, beş yıllık kesin sonuçlar 40-49 yaş arası % 0,5, 80 yaş ve üzerinde % 11 olarak saptanmıştır (2-5).

Çeşitli glokom türleri için farklı sınıflamalar önerilmiştir. İridokorneal açının durumuna göre açık açılı ya da açı kapanması, göz içi basıncının (GİB) yükselmesine neden olabilecek başka faktörlerin varlığına göre primer ya da sekonder ya da glokomun başlangıç yaşına göre konjenital, çocukluk çağı ya da erişkin glokomu olarak sınıflandırılabilir (6-9).

Primer açık acılı glokom tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında; parasempatometik ilaçlar (kolinerjik ilaçlar), sempatomimetik ilaçlar, beta blokerler, hiperozmotik ilaçlar, kalsiyum kanal blokerleri, prostaglandin analogları, karbonik anhidraz inhibitörleri yer alır (6-9).

Glokomda erken dönemde sinir lifi harabiyeti ve ileri dönemde RGH ölümü tek bir mekanizma ile açıklanamayacak birçok faktörün rol oynadığı karmaşık olaylar dizisidir. Apoptozisin önlenmesi ve nöron koruyucu yanıt için ilk unsur akson basısının azaltılması yani GİB'in düşürülmesidir. Glokomda retrograd nörotrofik faktör akımının olmaması ölümü için önemli bir nedendir. Bunun dışında nitrik oksit sentez enzim inhibitörleri dışarıdan, ilave nörotrofik faktörler, caspase sistem inhibitörleri, glutamat reseptör antagonistleri (NMDA) gibi potansiyel nöron koruyucu ajanlar araştırma safhasındadır (10-14).

Glokomda tedavinin primer amacı retina gangliyon hücre harabiyetini azaltmaktır. Retina gangliyon hücre kaybı yıllık 10 bin civarında olup 80 yaşında yaklaşık % 30'u kaybolmaktadır. GİB yüksekliği ve diğer faktörlerle kayıp daha da artar (15).

Asıl nöron koruma GİB düşürücü etkiden bağımsız glukomatöz optik nöropatinin potansiyel tedavisidir. Amaç retina gangliyon hücrelerinin devamının sağlanmasıdır, bunun için nöron koruyucunun hedef dokuya yeterli oranda geçmesi gerekir. Şu anda müdahale edebildiğimiz tek risk faktörü GİB'dir. Bu da indirekt bir nöron koruma olarak değerlendirilebilir (16-18).

Glokomda kullanılan çeşitli göz damlalarının apoptozis üzerine etkileri konusunda henüz yeterli ve güvenilir bilgi mevcut değildir. Bu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan glokomda antiglukomatöz ilaçların retina gangliyon hücre ölümü üzerine etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yetiştirilen 60 adet wistar albino erkek rat çalışmaya alındı. Ratların ağırlığı ortalama 300-350 gram arasında idi. Ratlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde sirkadiyen ritme uygun olarak, 23 santigrat derece oda ısısında, kafesler içinde, sürekli serbest yem ve su verilmek suretiyle beslendi. Ratlara 50mg/kg ketamin, 5mg/kg xylazine intraperitoneal olarak enjekte edilerek anestezi sağlandı ve derin anestezi olması için intraperitoneal enjeksiyondan 8 dakika sonra topikal %1'lik proparacaine hydrochloride damlatılarak operasyon uygulandı. Tüm hayvanların sağ gözüne operasyon yapıldı. Limbus hizasında nazal kadran hariç diğer 3 kadranı da içine alacak şekilde vasküler ark ve episkleral venler "disposable" oftalmik koterle koterize edildi ve operasyon sonrasında gözler serum fizyolojik ile yıkanıp, antibiyotikli damla tatbik edildi. Operasyonun hemen öncesinde ve operasyondan hemen sonra GİB'leri "Tonopen XL" ile ölçüldü. Hata payı % 5'in altında olan ortalama 10 ölçüm alındı ve kaydedildi.

Ratlar rasgele beş gruba ayrıldı. Endoftalmi gelişen ve anesteziden ölen 24 rat çalışmadan çıkarıldı.

1. **grup:** koterizasyon uygulanan ve ilaç tedavisi verilmeyen grup (n=6)
2. **grup:** koterizasyon uygulanan ve latanoprost ile tedavi edilen grup (n=8)
3. **grup:** koterizasyon uygulanan ve brimonidine ile tedavi edilen grup (n=6)
4. **grup:** koterizasyon uygulanan ve dorzolamid ile tedavi edilen grup (n=9)
5. **grup:** koterizasyon uygulanan ve betaxolol ile tedavi edilen grup (n=7)

İlaç tedavileri operasyondan hemen sonra başladı ve enükleasyon zamanına kadar devam edildi. Latanoprost saat 18:00 da tek damla, brimonidine saat 8:00 ve 18:00 da birer damla, dorzolamid saat 8:00, 13:00 ve 18:00 da birer damla, betaxolol saat 8:00 ve 18:00 da birer damla olarak uygulandı.

Ratların 1 ay boyunca haftalık GİB'leri ölçüldü ve kaydedildi. Ölçümler saat 10 ve 14 arasında yapıldı. Operasyondan önce ve sonra, birinci haftada, ikinci haftada, üçüncü haftada, dördüncü haftada ölçülen GİB'leri kaydedildi.

Dördüncü hafta sonunda araştırmadaki 36 adet wistar albino erkek rat Xylazine (50mg/kg canlı ağırlık)- ketamin (15mg/kg canlı ağırlık) ile derin genel anestezi yapıldıktan sonra Lystenon ile solunum kasları deprese edilerek öldürüldü. Ratların sağ ve sol gözleri enükle edilerek %10'luk formaldehid ile 24 saat tespit edildi. Tespit sonrası lensleri çıkarılan gözlerden dorso-ventral pozisyonda kesitler alındı, 24 saat yıkamaya alındı. Daha sonra yıkanan dokular dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden sonra parplast içinde bloklandı.

TUNEL (terminal deoxiribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin end labeling) işaretleme tekniği ile boyanmak üzere bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon işleminden sonra kesitler Proteinaz-K çalışma solüsyonu (10–20 mg/ml, 10mM Tris/HCL içinde Ph =7,4-8) ile 15 dakika oda ısısında bekletildi. İki kez Phosphate buffer saline (PBS) ile yıkandıktan sonra örnek üzerine TUNEL reaksiyon karışımı eklendi ve nemli karanlık ortamda 37 derecede 60 dakika inkübe edildi. Üç kez PBS ile yıkandıktan sonra kesitler converter-POD (in situ cell death detection kit) ile 37 derecede 30 dakika nemli ortamda inkübe edildi. Tekrar üç kez PBS ile yıkandıktan sonra 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid substrat (DAB) ile 15–25 derecede 10 dakika muamele edilen kesitler, Gill'in hematoksileni ile 1 dakika zıt boyanıp alkoller ve ksilen'den geçirilip kapatılarak ışık mikroskopta incelenmeye hazır hale getirildi. TUNEL

pozitif hücrelerin sayımları mikroskopta 100 objektif büyütmesi ve kare taksimatlı oküler mikrometrik lam kullanılarak gerçekleştirildi. Her grubun tüm hayvanlarında bir kesit üzerinde en az 10 farklı sahada TUNEL pozitif hücreler belirlendi ve her bir örnek için retinanın 0.5 mm² lik alanındaki hücre sayıları hesaplandı. Çalışma öncesinde yerel etik komisyonundan etik onay alındı.

TUNEL pozitif hücre sayısının gruplara göre değişimleri arasında farklılık bulunup bulunmadığı nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ile belirlendi. Farklılığın önemliliği ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Sonuçlar, medyan (ortanca) ve dağılım aralığı ile verildi. Göz içi basınçlarının haftalara göre değişimleri arasında farklılık bulunup bulunmadığı ise nonparametrik testlerden Friedman testi ile belirlendi. Farklılığın önemliliği ise Wilcoxon T testi ile analiz edildi. Göz içi basınçlarının gruplara göre değişimleri arasında farklılık bulunup bulunmadığı nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ile belirlendi. Farklılığın önemliliği ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Sonuçlar, ortanca ve dağılım aralığı ile verildi. Tüm testlerde, anlamlılık derecesi, $p \leq 0,05$ olacak şekilde belirlendi.

Bulgular

Tüm gruplarda koterizasyonun hemen sonrasında GİB'in koterizasyon öncesi değerlere göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. (Tablo1; $p < 0,05$; Kruskal-Wallis testi).

Tablo I. Grupların operasyon öncesi ve sonrası GİB ortalaması.

	İlk ölçüm	Operasyon sonrası	Birinci hafta	İkinci hafta	Üçüncü hafta	Dördüncü Hafta
Grup 1 (n: 6)	9,12 (9,0-14,50)	19,60 (15,9-23,07)	12,50 (10,44-15,40)	14,87 (10,71-18,60)	10,53 (5,12-21,87)	16,71 (11,70-21,50)
Grup 2 (n: 8)	11,10 (10,10-14,10)	26,60 (21,16-30,23)	14,15 (9,77-16,10)	17,85 (12,22-23,40)	19,35 (5,57-23,0)	*12,14 (10,5-16,62)
Grup 3 (n: 6)	9,89 (6,40-12,22)	25,56 (21,0-33,69)	12,78 (6,11-19,75)	19,31 (10,7-29,0)	20,88 (16,66-24,42)	14,49 (9,87-15,90)
Grup 4 (n: 9)	10,75 (10,2-18,0)	29,20 (21,90-45,57)	12,20 (9,40-24,90)	18,0 (14,0-21,75)	20,75 (14,75-25,28)	13,77 (12,0-19,55)
Grup 5 (n: 7)	14,40 (7,11-18,0)	27,60 (15,84-40,37)	18,33 (12,66-22,0)	15,50 (10,77-21,77)	19,33 (13,0-34,42)	13,0 (10,33-17,77)

Değerler ortanca (dağılım aralığı) ölçüde verilmiştir. Grup 1: kontrol, Grup 2: latanoprost, Grup 3 brimonidine; Grup 4: dorzolamid ve Grup 5: betaxolol ile tedavi edilen grup. *p=0,014 (Grup 1/Grup2).

Birinci hafta sonuçları incelendiğinde tüm gruplardaki değerler, koterizasyon öncesi değerlere göre anlamlı derecede yüksek seviyelerde kalmaya devam etti. Bununla birlikte gruplar kendi aralarında kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05; Kruskal-Wallis testi).

İkinci hafta sonuçları incelendiğinde tüm gruplardaki değerler, koterizasyon öncesi değerlere göre anlamlı derecede yüksek seviyelerde kalmaya devam etti. Gruplar arasında, GİB değerleri açısından anlamlı bir fark görülmedi. (p>0,05; Kruskal-Wallis testi).

Üçüncü hafta sonuçları incelendiğinde tüm gruplardaki değerler, koterizasyon öncesi değerlere göre anlamlı derecede yüksek seviyelerde kalmaya devam etti. Gruplar arasında, GİB değerleri açısından anlamlı bir fark görülmedi. (p>0,05; Kruskal-Wallis testi).

Dördüncü hafta sonuçları incelendiğinde tüm gruplardaki değerler, koterizasyon öncesi değerlere göre anlamlı derecede yüksek seviyelerde kalmaya devam etti. Gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, 2. grubun GİB değerleri (medyan=12,14; range=10,5-16,62), birinci gruba göre (medyan=16,71; range=11,70-21,50) anlamlı derecede düşük bulundu p<0,05). Diğer gruplarda herhangi bir anlamlı farka rastlanmadı (Tablo I).

Histopatolojik değerlendirme. Dördüncü hafta sonunda TUNEL tekniği ile yapılan hücre sayımlarına göre gruplar birbirleriyle karşılaştırıldı. Buna göre, glokom oluşturulan ancak ilaç uygulanmayan gruba ait apoptotik hücre sayısının diğer gruplardan anlamlı derecede farklı olduğu görüldü (p<0,05; Mann Whitney U). İlaç uygulanan gruplar arasında apoptotik hücre sayıları açısından anlamlı bir farklılık görülmedi.

Tablo II. Apoptotik Hücre Sayısı (n/0.5mm²)

Gruplar	Ortanca	± Dağılım aralığı
1	15,50*	14-29
2	13,00	11-17
3	13,50	10-16
4	13,50	12-15
5	13,00	10-14

Grup 1: kontrol, Grup 2: latanoprost, Grup 3 brimonidine; Grup 4: dorzolamid ve Grup 5: betaxolol ile tedavi edilen grup. *: diğer gruplardan farklı (p<0,05; Mann Whitney U).

Tartışma

Retina Gangliyon Hücrelerindeki azalmanın, yüksek GİB'in sinir lifleri üzerinde oluşturduğu iskemi nedeniyle olduğuna inanılır. Retina gangliyon hücresindeki azalma ve eş zamanlı olan sinir aksonlarındaki bozulmanın; hücre içi elektrolit dengesizliğine, gliyal hücrelerin fagositozuna, aksonlardaki retrograd beslenmenin blokajına bağlı olabileceği öne sürülmektedir. Sinir hücrelerinin nörotrofinlerin azalması sonucu apoptozis yolu ile öldüğü bilinmektedir. Bu bilgi ışığında glokomatöz gözdeki retina gangliyon hücrelerin de bu tür bir apoptozis sonucu azaldığı düşünülmektedir (19). Her şeye rağmen glokomun patofizyolojisi ve optimal tedavisi tam olarak aydınlatılmamıştır ve hala araştırmalar devam etmektedir (20).

Fare ve ratlar diğer memelilere göre kontrolü kolay ve maliyeti ucuz hayvanlardır. Daha da önemlisi bu hayvanların gözleri yapısal özellikleri bakımından insan gözüne çok benzer. Trabeküler ağ, schlem kanalı, siliyer cisim ve retina vaskülarizasyonu insan gözüne benzerlik gösterir. Biz de bu çalışmada, ucuz, tekrara uygun, insan glokomuna benzer glokom oluşturulabilen ratları kullandık (20).

Ratlarda göz içi basıncı; episkleral ven koterizasyonu, translimbal fotokoagülasyon, limbal hipertonic "salin" enjeksiyonu, ön kamaraya hint mürekkebi, hyaluronik asit, latex mikrosfer, mikrosfer + hidroksiropilmetilselüloz (HPM) karışımı enjeksiyonu gibi yöntemler kullanılarak artırılabilir (21-25).

Birçok çalışmada episkleral ven koterizasyonu ile ratlarda başarılı bir şekilde GİB artışı sağlanmıştır. Yapılan bir çalışmada ratlarda iki veya üç veni koterize ederek elde edilen modellerin, primer açık açılı glokom oluşturmada mükemmel, ucuz ve tekrarlanabilen bir metot olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada GİB yüksekliğinin yaklaşık üç ay devam ettiği görülmüş. GİB artışından 20 saat sonra RGH kaybı tespit edilmiştir ve sonrasında bu kayıp devam etmiştir. Aynı çalışmada 3. haftada %14, 5. haftada %27, 10 haftada %41 kaybı tespit edilmiştir (25). Çalışmamızda ketamin ve xylazin ile uyutulan ratların GİB'leri, pilli oftalmik koterle üç episkleral ven koterize edilerek başarılı bir şekilde yükseltilmiştir.

Literatürde GİB ölçümü için; tonopen, pnömotometre, kanülasyon tekniğinin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur (21-25). Bu çalışmada Tonopen, GİB

ölçümünde başarılı olarak kullanıldı. Özellikle tonopenin ince uçlu olması ratlarda kolay kullanılmasını sağladı. Hata payı %5'in altında olan 10 ölçümün ortalaması alındı. Böylece daha güvenilir sonuçlar elde edildi.

Ratlarda GİB sirkadiyen ritimle değişiklik gösterir; akşam karanlıkta yükselir, sabah aydınlıkta düşer (26). Çalışmamızda ışığın etkilerini kaldırmak için diüurnal paterne uygun olarak ışık ritmi ayarlanmıştır. Tüm ratlar 12 saat karanlıkta 12 saat aydınlıkta tutulmuştur.

Son çalışmalarda GİB yükseltilmiş ratlarda TUNEL bulguları apoptotik ölümünü desteklemektedir. Gross ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, gangliyon hücre tabakasında, deneysel gözlerde daha belirgin, kontrol grubunda nadir olmak üzere TUNEL pozitif hücreler görülmüştür. Bu çalışmada ilginç olarak, santral retinayla karşılaştırıldığında periferik retinada daha fazla TUNEL pozitif hücre olduğu tespit edilmiştir (20). Çalışmamızda, literatürle uyumlu şekilde kontrol grubunda daha fazla olmak üzere tüm gruplarda TUNEL metodu ile apoptozis gösterilmiştir.

Glokomun neden olduğu görme kaybı, RGH' leri ve aksonlarının dejenerasyonunun bir sonucudur. Yüksek GİB' in bu hastalık sürecindeki risk faktörlerinden biri olduğu saptanmış olsa da dejenerasyon mekanizması belirsizdir. GİB kontrolüne rağmen, glokomlu gözlerde sürekli olan görme kaybı, nöron koruma tedavi ihtiyacını öne çıkarmaktadır (24,27).

Yapılan bir çalışmada kronik oküler hipertansiyon modelinde $\alpha 2$ adrenerjik agonisti brimonidinin nöron koruyucu etkisi incelenmiş. Sistemik brimonidin veya timolol uygulanmasının GİB üzerindeki etkisinin az olduğu görülmüş. Timolol değil de brimonidinin GİB yükseltildiği zaman uygulandığında RGH' lerde anlamlı bir koruma gösterdiği ve GİB yükseltildikten sonra verildiğinde de, daha ileri hücre kaybını önlediği tespit edilmiş. Bu da brimonidinin oküler hipotansiyon etkisinden bağımsız olan nöron koruma aktivitesinin olduğunu göstermektedir (28).

Brimonidinler için nöron koruyucu olduğu ileri sürülmekte. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), bulunan güçlü bir nöron koruma faktördür. RGH'de brimonidinin nöron koruma mekanizmasının endojen BDNF ekspresyonu up-regülasyonu yoluyla olma olasılığı test edildi. İntravitreal tek doz düşük konsantrasyonda brimonidin de endojen BDNF ekspresyonunu anlamlı

şekilde artırmaya yeterlidir. Bu sonuçlar brimonidin nöron korumasına RGH' deki BDNF up-regülasyonun aracılık ettiğini göstermektedir. BDNF brimonidin ile bildirilen nöron koruma etkisindeki rolü açısından daha da araştırılmalıdır (29).

Brimonidin nöron koruma etkisi rat glokom modelinde bakılmış, geçici iskemiden 7 gün sonra yaklaşık yarısında kayıp olmuş, iskemi öncesi verilen topikal %0.1-%0.5'lik brimonidin iskemiye bağlı ölümünü önlemiştir (30).

Deneyisel glokom oluşturulan ratlarda timolol ve dorzolamide topikal olarak uygulanmış ve her ikisinin de anlamlı derecede GİB' i düşürdüğü görülmüş, ilaç verilmeyen grupta sayısı azalmış olarak bulunmuş, GİB ve sayısı arasındaki korelasyon dorzolamide verilen grupta anlamlı diğerinde anlamsız çıkmış. Bu deneyde timolol ve dorzolamide GİB' i düşürmekte ve RGH'lerini korumakta, fakat timololün koruyucu etkisinin GİB düşürmekten başka mekanizmalarla olduğunu düşündürmez (31).

Prostaglandinler (PG) nöronal hücreleri glutamatın toksik etkisinden korumakta. PGF 2 α glutamatın neden olduğu nörotoksitesiteyi inhibe etmede en potent PG olarak bulunmuş. Latanoprostun nöron koruma etkisi retina hücrelerinde siklooksijenaz 2 aktivasyonu ve nitrik oksit sentez inhibisyonu yoluyla olabilir (32).

Glutamat agonistlerinin etkisi, hipoksi, deneysel iskemi modellerinde GABA immünreaktivitesi, laktat dehidrogenaz, hücre içi kalsiyum düzeyleri; tavşan retinası, rat kortikal kültürü, tavuk retina hücre kültürlerinden izole edildi, betaxolol verilip nöron korumaya bakıldı. Betaxolol'ün kalsiyum alımını azaltıp retinayı iskemiden koruduğu, yalnız GİB' i düşürmekle kalmayıp aynı zamanda da oküler kan akımını artırdığı, iskemik hasarı önleyerek nöron koruyucu olduğu görülmektedir (33).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde yorumlanabilir:

Uygulanan koterizasyon tekniği ile deneysel olarak tüm rat gruplarında GİB, 4 haftalık deney süresince bazal değerlere göre yüksek seyretmiştir. GİB değerleri açısından, latanoprost uygulanan grup dışında diğer gruplarda anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Çalışmada uygulanan tüm medikasyonlar (latanoprost, brimonidin, dorzolamid ve betaxolol) RGH apoptozunu

kontrol grubuna göre anlamlı derecede engellemiş ve bu apoptotik hücreler de uygun teknik ve boyamalarla gösterilebilmiştir.

Dört medikasyon, birbirleriyle kıyaslandıklarında latanoprost, brimonidin, dorzolamid ve betaxolol arasında apoptozu engelleme açısından bir fark bulunmamıştır.

Gruplardaki GİB değerleri ile apoptoz oranları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Bu sonuç, antiglukomatöz medikasyonların, apoptozu önleyip glokomatöz hasarı engellerken sadece GİB' i düşürmekle kalmayıp, henüz tam olarak bilinmeyen, belki de son zamanlarda araştırma konusu olan göz dışı (örneğin santral sinir sistemi) mekanizmalarla apoptozu engelleyebildiğini akla getirmektedir.

Apoptoz, yani programlanmış hücre ölümü, güncel olan bir araştırma konusudur; organizmada pek çok sistemde gösterilebilmekte ve henüz tam olarak aydınlatılamamış çoğu hastalığındaki rolü netleştirilmeye çalışılmaktadır. Günümüzde çok önemli bir görmezlik ve sosyoekonomik kayıp nedeni olan glokom hastalığında da patogeneizde, bu çalışmada da gösterildiği gibi, apoptozun rolü vardır ve halen kullanılmakta olan antiglukomatöz ilaçlar, apoptozu, henüz tam olarak belirlenememiş bir mekanizma ile önleyebilmektedir.

Glokom hastalığına yönelik olarak bundan sonra araştırma konusu olacak antiglukomatöz ilaçların, daha etkili olacak şekilde geliştirilerek apoptozu hücresele olarak her düzeyde engellemesi uygun olacaktır.

Kaynaklar

1. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 774–786.
2. Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J. Racial variations in the prevalence of primary open angle glaucoma: the Baltimore Eye Survey. *JAMA* 1991; 266:369-374.
3. Klein BE, Klein R, Sponsel WE, et al. Prevalence of glaucoma: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992; 99:1499-1504.
4. Tielsch JM, Katz J, Singh K, et al. A population based evaluation of glaucoma screening: the Baltimore Eye Survey. *Am J Epidemiol* 1991; 134:1102-1110.
5. Mukesh BN, Mc Carty CA, Rait JL, Taylor HR. Five year incidence of open angle glaucoma: the visual impairment project. *Ophthalmology* 2002; 109:1047–1051.
6. Yanoff M, Duker JS. *Glaucoma (Section 12)*. In: *Ophthalmology (CD-ROM Edition)*. Mosby, St. Louis 1998.
7. Kanski JJ. *Glaucoma*. In: Kanski JJ, editor. *Clinical Ophthalmology. Third edition*. London: Butterworth-Heinemann; 1999.
8. Bengisu Ü. *Glokom. Göz Hastalıkları 3. Basım. İstanbul: Nurdoğan Matbaası; 1990. p.138.*
9. Hoskins Jr HD, Kass M. *Introduction and Classification of the Glaucomas*. In: Klein EA, editor. *Becker-Shaffers Diagnosis and Therapy of the Glaucomas. Sixth Edition*. Baltimore: The CV Mosby Company; 1989. pp.1–9.
10. Caprioli J. Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 1997;75:364–367.
11. Schwartz M. Neuroprotection as a treatment for glaucoma: pharmacological and immunological approaches. *Eur J Ophthalmol* 2003;13 Suppl 3:S27–S31.
12. Osborne NN, Chidlow G, Wood J, Casson R. Some current ideas on the pathogenesis and the role of neuroprotection in glaucomatous optic neuropathy. *Eur J Ophthalmol* 2003; 13 Suppl 3:S19–S26.
13. Tempestini A, Schiavone N, Papucci L, et al. The mechanisms of apoptosis in biology and medicine: a new focus for ophthalmology. *Eur J Ophthalmol* 2003; 13 Suppl 3:S11–S18.
14. Huang X, Wu DY, Chen G, Manji H, Chen DF. Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:347–354.
15. Frisen L. High-pass resolution perimetry and age-related loss of visual pathway neurons. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991; 69:511–515.
16. Girkin CA. Strategies for neuroprotection. *J Glaucoma* 2001;5 suppl 1:S78–S80.
17. Ritch R. Neuroprotection: is it already applicable to glaucoma therapy. *Curr Opin Ophthalmol* 2000; 11:78–84.
18. Naskar R, Dreyer EB. New horizons in neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 2002; 45 suppl 3: S250–S255.
19. Okisaka S, Murakami A, Mizukawa A, Ito J. Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. *Jpn J Ophthalmol* 1997; 41:84-88.
20. Gross RL, Ji J, Chang P, Pennesi ME, et al. A mouse model of elevated intraocular pressure: Retina and Optic nerve findings. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003; 101:163-169.
21. Levkovitch-Velin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal Laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:402-410.
22. Urcola JH, Hernandez, M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res* 2006; 83:429-437.
23. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 1997; 64: 85-96.

24.Naskar R, Wissing M, Thanos S. *Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial reponses in the retina of a rat model of glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:2962-2968.

25.Morone MC, Marcos HC, Croxatto J, et al. *A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injection of hyaluronic acid. Exp Eye Res* 2005; 81:71-80.

26.Krishna R, Mermoud A, Baerveldt G, Minckler DS. *Circadian rhythm of intraocular pressure: a rat model. Ophthalmic Res* 1995;27:163-167.

27.Garcia-Valenzuela E, Shareff S, Walsh J, Sharma SC. *Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. Exp Eye Res.*1995;61:33-44.

28.WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. *Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2849-2855.

29.Gao H, Qiao X, Cantor LB, WuDunn D. *Up regulation of brain derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells. Arch Ophthalmol* 2002; 120:797-803.

30.Vidal-Sanz, M, Lafuente MP, Mayor-Torroglosa S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP. *Brimonidine's neuroprotective effects against transient ischaemia-induced retinal ganglion cell death. Eur J Ophthalmol* 2001; 11 suppl 2: 36-40.

31.Seki M, Tanaka T, Matsuda H, et al. *Topically administered timolol and dorzolamide reduce intraocular pressure and protect retinal ganglion cells in a rat experimental glaucoma model. Br J Ophthalmol* 2005; 89: 504-507.

32. Drago F, Valzelli S, Emmi I, Marino A, Scalia CC, Marino V. *Latanaprost exerts neuroprotective activity in vitro and in vivo. Exp Eye Res* 2001;72:479-486.

33.Osborne NN, Cazeveielle C, Carvalho AL, Larsen AK, DeSantis L. *In vivo and in vitro experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. Brain Research* 1997; 751: 113-123.