

**T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

TRİPAN MAVİSİNİN KORNEA ENDOTELİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN GEÇİRMELİ ELEKTRON MİKROSKOBİSİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

**UZMANLIK TEZİ
Şeyhmus ARI**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. İhsan ÇAÇA**

163328

DİYARBAKIR-2005

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	1
Kısaltmalar.....	2
Giriş.....	3
Genel Bilgiler.....	5
Amaç.....	17
Materyal ve Metod.....	18
Bulgular.....	20
Tartışma.....	33
Sonuç.....	38
Özet.....	39
Summary.....	40
Kaynaklar.....	41

KISALTMALAR

BSS : Dengeli tuz solüsyonu

GİL : Göz içi lens

EKKE : Ekstrakapsüler katarakt ekstraksiyonu

İKKE : İntrakapsüler katarakt ekstraksiyonu

KKK : Kontinu kurvilineer kapsüloreksis

TEM : Geçirmeli (Transmission) elektron mikroskobu

1.GİRİŞ

Katarakt toplumda yaş ile birlikte artan insidansa sahip önemli bir sağlık problemidir. İleri yaş grubunda körlük nedenleri içinde ilk sırada yer almaktadır. Günümüze gelinceye kadar kataraktın cerrahi tedavisinde önemli gelişmeler olmuştur. 1940'lı yıllardan sonra katarakt ekstraksiyonu ve göz içi lens (GİL) implantasyonu gündeme gelmiş ve hızla ilerleme göstermiştir. Günümüzde modern katarakt cerrahisinde fakoemülsifikasyon ve GİL implantasyonu en sık kullanılan yöntemdir.

Fakoemülsifikasyon cerrahisi sırasındaki en önemli aşamalardan biri olan kapsüloreksis'in başarılı bir şekilde uygulanması cerrahinin daha sonraki aşamalarının başarısı için çok önemlidir. Bu amaçla ön kapsülün görünür hale getirilmesi için çeşitli uygulamalar yapılmıştır. Otolog serum, fluorescein, kristal viyole, indosiyenin yeşili, tripan mavisi değişik çalışmalarda ön kapsülün daha iyi görünmesini sağlamak için kullanılmıştır. Özellikle fakoemülsifikasyon ile katarakt cerrahisine yeni başlayan cerrahların kapsüloreksis öğrenme aşamasının kolaylaştırılması ve matür katarakt nedeni ile fundus reflexinin alınamadığı olgularda ön kapsülün daha iyi görünmesini sağlamak için günümüzde en sık olarak tripan mavisi kullanılmaktadır.

Boyama tekniklerindeki gelişmelere rağmen fakoemülsifikasyon yöntemi ile katarakt cerrahisinde ön kapsülün görünür hale getirilmesi için tripan mavisi çok sık tercih edilmektedir. Kısa süreli olarak uygulanması, göz içine uygulanma sonrasında hemen yıkanması nedeni ile göz içi dokularla temasının toksik olmadığı belirtilmiş olmakla beraber karsinojenik kimyasal maddeler listesinde yer alan bir maddedir. Ayrıca uzun dönem etkileri konusunda bilgilerimiz bulunmamaktadır.

Dokularda meydana gelen ultrastrüktürel ve morfolojik değişimlerin ortaya konması amacıyla histopatolojik incelemelerin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla çok değişik

teknikler kullanılmaktadır. Hücresel düzeyde meydana gelen etkilerin incelenmesi için en detaylı bilgi hücresel yapının ve hücre organellerinin büyük büyütmelelerde incelenmesi ile ortaya konabilmektedir. Bu amaçla son 50 yıldır tıbbi uygulamalarda kullanımı artmış olan geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) hücresel düzeyde meydana gelen değişiklikleri incelemeye imkan veren bir yöntemdir.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Katarakt terimi şelale anlamına gelen latince 'cataracta' ve yunanca 'katarraktes' sözcüklerinden türetilmiştir. Katarakt görme azalması ile seyreden, insan lensinin içinde veya lens kapsülünün üzerinde meydana gelen kısmi yada tam opasifikasyondur (1). Katarakt görme azalmasına ve körlüğe neden olan hastalıklar içinde ilk sırada yer almaktadır. Tedavisinde 3 aşamalı bir yaklaşım uygulanmaktadır.

1) Cerrahi olarak katarakt gelişen lensin çıkarılması ve GİL implantasyonu

2) Metabolik veya ilaç kullanma nedeni ile katarakt gelişmesi durumunda cerrahi olarak lensin çıkarılması ile beraber GİL implantasyonuna ilave olarak sebep olan etken maddenin kullanımının kesilmesi ve metabolik nedene yönelik tedbirlerin alınması.

3) Risk faktörlerinin belirlenmesi ve ortadan kaldırılması (2).

Katarakt ve ona yönelik tedavilere milattan önce (M.Ö) 25 ve milattan sonra (M.S) 50 yılları arasındaki tarihi kayıtlarda bulunmaktadır. Katarakt terimi ilk kez milattan sonra 1018 yılında Constantinus Africanus tarafından kullanılmıştır. 1753'te Sharp tarafından intrakapsüler katarakt ekstraksiyonu (İKKE) gerçekleştirilmiştir. 1961'de İKKE ile beraber krio kullanılmaya başlanmıştır. Cerrahi tekniğin komplikasyonlarının yüksek olması nedeni ile daha sonra EKKE ile katarakt cerrahisi gerçekleştirilmesine geçilmiştir.. Ekstrakapsüler katarakt ekstraksiyonu (EKKE) ile katarakt cerrahisi ilk kez Jacquel Daviel tarafından kullanılmıştır. 1967'de Kelman tarafından ilk kez fakoemülsifikasyon yöntemi ile katarakt cerrahisi uygulanmış ve 1980'li yıllardan sonra hızla gelişim göstererek ilerleme kaydetmiştir (3).

1967'den bu yana konjonktiva ve korneanın vital boyanması için değişik boyalar oftalmolojide kullanılmaktadır (4). 1980'li yıllardan sonra ön kapsülün boyanmasında

boyaların kullanımını gündeme gelmiş ve ilk olarak Melles tarafından lens ön kapsülünün tripan mavisi ile boyanması ve fakoemülsifikasyon cerrahisi gerçekleştirilmiştir (5).

2.2.GÖZÜN YAPISAL VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ

2.2.1.GÖZÜN HISTOLOJİK TABAKALARI

TUNİKA FİBROZA: Beyaz renkte sağlam bir tabakadır, organa şekil verir ve korur.

TUNİKA VASKÜLOZA = UVEA: Damardan zengindir, gözün beslenmesini sağlar. Ayrıca bu tabakadaki düz kaslar göz uyumunda rol oynar.

TUNİKA NERVOZA = RETİNA: Işık reseptörlerinin yer aldığı ışığa duyarlı sinirsel tabakadır, nervus optikusla devam eder (6).

Gözdeki yapısal ve fonksiyonel ilişkiyi anlayabilmek için embriyoda nasıl oluştuğunu ve farklılaştığı germ yapraklarını bilmek gereklidir. Gözün dokuları, nöroektoderm, yüzey ektoderm ve mezodermden farklılaşır. Gelişmenin 22. gününde, gözler embriyonun kranial kısmında nöral katlantının içinde sıg iki oluk olarak gözlenir ve bunlara optik sulkus ya da optik çukur adı verilir. Nöral tüp kapanınca bir çift oluk da iyice girintilenir ve optik vezikülleri yapar. Her optik vezikül lateralde büyür, ön beyinle bağlantısı sadece optik sap ile kalır ve üzerindeki yüzey ektoderm kalınlaşarak lens plakoidlerini yapar. Bu olay lens plakoidlerinin ve optik vezikülün invaginasyonu sonucu iki tabakalı optik kupanın oluşumuyla sonlanır. İç tabaka nöral retina pigment epiteline dönüşür. Dış tabaka retina pigment epiteline dönüşür. Her lens plakoidinin orta bölgesindeki invaginasyon lens veziküllerinin oluşumuyla sonuçlanır. Gelişmenin 5. haftasında, lens vezikülleri yüzey ektoderm ile ilişkisini yitirir. Lens vezikülleri yüzey ektodermden koptuktan sonra, aynı bölge yeniden kalınlaşmaya başlar ve kornea epitelinin yapar. Daha sonra periferdeki mezenşim hücrelerinden kornea endoteli ve kornea stroması gelişir. Mezenşimden farklılaşan kan damarları, her bir optik kupa ve sapının alt yüzeyi boyunca gelişir (6-9).

Korneoskleral tabaka, transparan kornea ve beyaz opak sklerayı içerir. Kornea kan damarı ve pigment içermez. Korneayı içeren inflamatuvar cevaplar sırasında, limbustaki kan damarlarından çok sayıda nötrofil lökosit ve lenfosit göçü olur ve stromanın lamellaları arasına penetre olurlar (10).

Sklera, sıkı fibröz bağ dokusu yapısındadır böylece gözün ekstraoküler kaslarının tutunmasını sağlar. Skleranın yüzeyine paralel tip I kollagen demetleri tabakalar halinde çeşitli yönlerde seyreder (7).

Kollagen demetler arasında ince elastik fibril ağı ve orta miktarda ara madde bulunur. Demetleri yapan fibriller, düzenlenimleri ve çapları yönünden düzensizdir. Skleranın opasitesi, diğer sıkı bağ dokularındaki gibi yapısındaki bu düzensizliğe bağlıdır. Korneaskleral tabaka, optik sinirin çıktığı bölge hariç diğer bölgelerde içteki iki tabakayı sarar. Limbusta yani sklerokorneal birleşkede stromanın iç yüzeyi endotelle döşeli boşluklar içerir bu trabeküler ağ olarak isimlendirilir. Bu da Schlem kanalına açılır (7,8).

2.2.2..KORNEA ANATOMİSİ

Kornea gözün saydam olan dış kısmıdır. Sferiktir fakat limbusta periferik bölge öne doğru hafif eliptik görünür. Korneanın çapı 11,5-12,5 mm olup santral bölge en ince bölgedir. Korneanın 1/3 santral bölümü optik zon adını alır. Anterior santral korneal kurvatür ortalama 7,7 mm, posterior santral korneal kurvatür ortalama 6,9 mm dir. Bu değerlere göre kornea ön yüzünün refraktif değeri +48,8 D iken arka yüzde -5,8 D dir. Bu durumda korneanın toplam kırıcılığı 43,0 D olup gözün toplam kırma gücünün %70'ini teşkil eder. Bu kırıcılık ortam önde preoküler gözyaşı filmi, arkada humör aköz ile bağlantılıdır ve kırma gücü üzerine bunların ayrı ayrı etkileri söz konusudur. Korneanın bir diğer özelliği yüzeyinin sferik değil, asimetric asferik yapıda olmasıdır (7,10).

Anatomik olarak kornea 4 zona ayrılır :

1- Santral optik zon: Korneanın 4 mm çaplı daha sferik, simetrik ve optik olarak önemli bir bölgesidir. Optik olarak pupiller aksın bu zonun merkezinden geçtiği kabul edilir.

2- Parasentral zon: 4-7 mm lik bölgeye tekabül eder. Santral zondan daha yassıdır, fakat genel anlamda sferiktir.

3- Periferal zon: 7-11mm arası bölgedir. Kornea daha düz ve asferik hale gelir.

4- Limbal zon: Korneanın sklera ile devam ettiği 0,5 mm'lik kısımdır.

Kornea duyu sinirlerinden çok zengindir. N. Trigeminiun oftalmik dalı ile innerve olur (11).

Kalınlığı merkezde 0.5-0.6 mm. olup, periferde doğru kalınlaşarak 0.9 mm.'ye ulaşır (10).

2. 2.3.. KORNEA HİSTOLOJİSİ

Kornea histolojik olarak 5 tabakadan oluşur (8).

1. Epitel Tabakası: Rejenerasyon yeteneği hızlı 5-6 sıralı, keratinize olmayan çok katlı yassı epiteldir. Ön yüzü gözyaşı ile kaplanmıştır. Bowman membranı düzeyinde seyreden duyu sinirleri epitel hücreleri arasında sonlanır. Altındaki Bowman membranına bazal membranı ile sıkıca yapışmıştır. Korneanın sürekli yenilenen bu en üst tabakası korneal kırıcılığın büyük kısmından sorumludur. Gözyaşı film tabakasının katkısı ile mükemmel bir optik yüzey oluşturur. Kornea epiteli üç tip hücreden oluşur. En üstte farklılaşmış yassı yüzey epitelyum hücreleri, ortada kanatsız hücreler ve en içte bazal hücreler bu üç tabakayı oluşturmaktadır. Mitoz gösteren bazal hücreler yüzeye doğru ilerlerken yavaş yavaş farklılaşırlar, çekirdekleri küçülür, organellerini yitirirler ve dejenere olup kornea yüzeyinden dökülürler. Bu süreç her yedi günde tüm epitelyumin yenilenmesi ile sonuçlanır (9,10).

2. Bowman Tabakası: Stroma lamellerinin kondanese olmuş ön kısmıdır. Tip I ve Tip V

kollajen ile bunların arasını dolduran Tip IV kollajen flamanları ve proteoglikanlardan oluşmuştur. Yaralanmalardan sonra yenilenemez, yaralanma yerinde görme bozukluğuna neden olabilen opasiteler gelişir (9).

3. Stroma: Kornea kalınlığının %90'nını oluşturur. Stromayı oluşturan kollajen lifler uniform yapıdadır. Birbiri ile kesişmeden limbustan limbusa seyreder. Mukopolisakkaridlerden oluşan ara madde içinde yerleşmişlerdir. Stroma hücreden fakirdir. Stromanın kuru ağırlığının %70'ini oluşturan kollajen, dokunun sağlamlığından ve göz içi basıncına dirençten sorumlu olan temel yapısal makromoleküllerdir. İnsan kornea stromasında bulunan esas kollajen Tip I olup az oranda Tip V ve Tip III bulunmaktadır. Bu kollajen liflerin arasında bağlantılar kuran ve korneanın şeffaflığını sağlamaktan sorumlu olan Tip IV ise az oranda ve dağınık olarak bulunmaktadır. Keratositler stroma hacminin %3-5'ini oluşturur. Bu hücreler, yaralanmalarda fibroblastlara dönüşerek yara onarımı sağlar (9,10).

4. Descement Membranı: Kornea endotel hücreleri, erişkin insanda bu membran üzerinde yerleşmişlerdir. Endotel hücrelerinden sentezlenen bu membran önde bantlı ve arkada bantsız olmak üzere iki tabakadan oluşur. Gebeliğin 4. ayında sentezi başlar ve bantsız kısmın sentezi doğumdan sonrada devam eder. Bu tabaka Tip IV kollajen, laminin ve fibronektinden oluşmuştur. Fibronektinin endotel hücrelerini descement membranına bağladığı düşünülmektedir. Descement membranını proteolitik enzimlere karşı oldukça dayanıklı olduğu ve stromanın hızlı bir şekilde bozulduğu ağır nekrotizan keratitlerde bile sağlam kalabildiği görülmüştür. Endotel hücrelerinin bazal membranıdır. Korneanın diğer katlarına göre elastisitesi fazladır. Stromaya yapışık değildir. Kolayca sıyrılabilir. Stroma ile aralarında bulunan tek bağlantı descement membranına uzanan ve bir mikrondan daha küçük boyutlarda olabilen fibrillerden ibaret olmaktadır.

5. Endotel Tabakası: Korneanın arka yüzünde bulunan, tek sıra halinde dizilmiş yaklaşık 400000 adet poligonal hücreden oluşan tabakadır. Çoğu hegzagonal olan hücrelerin çapı 20 mikron kalınlığı ise 4-6 mikron arasındadır. Endotel hücrelerinin sayısı erişkinde 3500 hücre/mm²'dir. Elektron mikroskopik kesitlerde küboid olarak izlenen hücrelerin yan yüzeylerinde bulunan girinti ve çıkıntılar (interdijitasyonlar), yan yüzlerinin boyunun hücre boyunun yaklaşık 10 katı olmasına neden olur. Bunlara ilaveten apikal yüzeye yakın yerleşmiş sıkı bağlantı noktaları bulunur. Hem interdijitasyonlar hemde sıkı bağlantı noktaları sayesinde endotel, epitelyum kadar olmasa da, sıvı geçişine karşı bir bariyer görevi yapar. Endotel hücreleri büyük nükleusları, çok sayıda mitokondri ve diğer organelleri içeren stoplazmaları ile aktif hücrelerin karakteristik özelliklerini taşırlar. Yan yüzeylerde bulunan çok sayıda gap-junction'lar hücrelerarası iletimde temel rol oynarlar. Kornea ödemeine yol açan endotelial travmanın sıkı bağlantı bölgelerinin hasarından çok gap-junction hasarı nedeni ile geliştiği gösterilmiştir. Klinik açıdan endotel hücreleri kornea fonksiyonları için vazgeçilmezdir. Bu hücreler fizyolojik koşullarda oldukça iyi korunmuş özelliklerini travma veya göz içi cerrahisi sırasında kolayca kaybedebilirler. Santral sinir sistemi hücreleri gibi bu hücrelerde doğumdan sonra çoğalamazlar. Ancak genişleme yetenekleri sayesinde, doğumdan sonra kornea çapındaki artma, yaşa bağlı kayıplar, travma ve göz içi cerrahiye bağlı kayıplar kompanse edilebilmekte ve korneanın bütünlüğü korunmaktadır. İnsan erişkin endotel hücresinde neredeyse hiç mitoz izlenmez. Yaşlanma, cerrahi, travma yada inflamasyon nedeni ile kaybolan endotel hücrelerinin yerini etrafındaki hücreler göç ederek ve genişleyerek doldururlar (12,13).

2.2.4.KORNEANIN FİZYOLOJISI

Epitel tabakası: Kornea tabakaları arasında en fazla oksijen ve glikoz ihtiyacı olan tabakadır. Metabolizması için gerekli oksijeni, aminoasitleri ve glikozu gözyaşı aracılığı ile atmosferden, limbus çevresindeki kapiller ağdan, aköz hümörden diffüzyon yoluyla sağlar (12-14). Epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlar mikroorganizmalara karşı bariyer görevi görür. İntakt epitelden difteri basili, gonokoklar, hemofilus ve listeria türleri dışında mikroorganizmalar penetre olarak enfeksiyon oluşumuna neden olamaz (15).

Stroma tabakası: Ekstrasellüler matriks içinde bulunan proteoglikanlar sayesinde diğer tabaklara göre daha fazla su çekme potansiyeline sahip bir dokudur. Stromada bulunan su miktarı korneal kalınlık ile doğru orantılı olarak artar. Stroma bir gram kuru ağırlık başına 3.45 gr su tutma özelliğine sahiptir. Stromal şişme basıncı olarak adlandırılan kuvvet sayesinde stromal ödemin engellenmesi sağlanır. Bu basınç değeri in vitro koşullarda 55 mmHg düzeyindedir. Kornea kalınlığı, epitelyum ve endotel fonksiyonları normal olmak koşulu ile 50 mmHg'ye kadar olan göz içi basıncı değerlerine kadar korunur. Stromal şişme basıncıda bu değerlerdedir. Göz içi basıncı bu değerleri aşarsa veya endotel fonksiyon bozukluğu nedeni ile stroma kalınlığı artmış ise kornea ödemlenir (16).

Endotel tabakası: Stromanın su çekmesini engelleyen ve su içeriğini %78'de tutan önemli faktörlerden ikisi endotel tabakasının bariyer ve pompa fonksiyonudur. Endotelin pompa fonksiyonu, iyonların, aminoasitlerin ve şekerlerin ön kamaraya pompalanmasını sağlar, aktif metabolik pompa fonksiyonu ile kornea su içeriğini dengede tutar (13). Kornea su içeriği %70-75'dir. Kornea hidrasyonun korunmasında Na-K ATP'az pompa sisteminin önemli rolü oynar. Endotel geçirgenliğinin bozulduğu veya endotel hücre sayısının azaldığı patolojilerde olay yavaş seyirli ise adaptasyon geliştirilerek pompa sayısı artırılır ve denge korunmaya çalışılır. İnflame ve ödemli bir korneada geçirgenlik artmasına rağmen pompa

sayısı artmaz. Kornea endotel sayısı azalıp, korneal stresin ortaya çıktığı 800-1500 hücre/mm² seviyesinde kornea endoteli artmış aköz kaçağına karşı bir kompensasyon geliştirir ve yan yüzlerdeki pompa sayısını artırır. Progressif endotel hücre kaybı durumunda kritik seviye olan 500 hücre/mm² altına inme durumunda ise yan yüzlerde yeni pompalar için yer kalmaz ve endotel permeabilitesi iyice artarak korneal ödem ve dekompensasyon gelişir. Ön segment cerrahisi sırasındaki travmalar, bazı kornea distrofileri ve ön segment inflamasyonları endotel fonksiyonunu bozarak kornea ödeme neden olabilir. Bu durumda kornea bulanıklaşır ve görme azalır (12,14).

Kornea endotelinin mozaik yapısının ve endotel hücre yoğunluğunun değerlendirilmesi için ilk kez 1968 yılında speküler mikroskop kullanılmaya başlanmıştır. Speküler mikroskop yardımı ile kornea endotelinin kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu amaçla kullanım özellikle keratoplasti öncesinde donör korneanın değerlendirilmesi için oldukça önem arz etmektedir (17).

2.3. GEÇİRMELİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu yaklaşık 35 yıldır tıpta ve endüstride kullanımda olan bir cihazdır. Bazı cihazlarda 0,2 nm'nin altına inen mükemmel ayırma gücü TEM'in en önemli avantajlarından biridir. TEM hem difraksiyon modunda hem de görüntü modunda çalışabilme becerisine sahiptir (18,19).

TEM'de taramalı elektron mikroskopisine (SEM) göre çok daha yüksek enerjili elektronlar kullanılır ve bu elektronların ion milling, electro thinning gibi yöntemlerle folyo haline getirilmiş numuneyi delip geçmesi sağlanır. Numune içinden geçen elektronların kırılmasıyla numunenin kristal yapısı da belirlenebilir. Ultrahigh resolution turu yardımı ile TEM'lerde numunenin atomik yapısı da görüntülenebilir (18,20).

TEM'de, odaklanmış bir elektron ışını, ince (200 nm den daha ince) bir film numune üzerine gönderilir. TEM'de, numuneyi geçen hem etkilenmemiş hem de etkilenmiş elektronlardan elde edilen sinyaller değerlendirilir. Elektron ışını numunenin önünde ve arkasındaki bir seri manyetik mercek vasıtasıyla bir flouresan ekran, bir plaka film veya bir video kamera olabilen bir dedektöre ulaştırılır. Bu sinyal, elektron ışınının dalga boyuna bağlı olarak 0-1.000.000 kez büyütülmüş olabilir. TEM cihazı 100-1000 keV'de çalışır. 100 keV'de kullanılan elektron ışınının dalga boyu 0.0037 nm olup ışık ışını, x-ışını ve nötron radyasyonu gibi ışınların dalga boylarından çok daha küçüktür. Yüksek voltaj altında hızlandırılmış elektronlar bir numune üzerine gönderilirse, elektronlar ile numune atomları arasında çeşitli etkileşimler olur ve numuneden değişik enerjide elektronlar ve x-ışınları çıkar. Bu etkileşimlerden yararlanılarak numunenin incelenmesi elektron mikroskobunun prensibini oluşturur. Eğer hızlandırılmış elektronlar ince numune üzerine gönderilmiş ise, elektronların bir kısmı etkileşmeden diğer kısmında Bragg şartları sonucu kırınımına uğrayarak numunenin alt yüzünden dışarı çıkar. Bu tür elektronları kullanarak numunenin iç yapısının incelenmesi geçirim elektron mikroskobunda yapılır (20).

2.3.1.GEÇİRMELİ ELEKTRON MİKROSKOBİSİ İÇİN NUMUNE HAZIRLAMA

TEM'de incelenecek numunelerin, elektron ışınının numunenin içinden geçmesine izin verecek kadar ince olmaları gerekmektedir (birkaç 100 nm kalınlığında). Atom numarası düşük elementleri içeren numunelerde bu kalınlık biraz daha artırılabilir. Çoğu TEM deneylerinde, numune kalınlığı 200 nm'den daha incedir. Böylece, elektronların numune içinde daha az nokta tarafından saçılmaları sağlanır (21).

2.3.2.GEÇİRMELİ ELEKTRON MİKROSKOBU İÇİN DOKU HAZIRLAMA İŞLEMLERİ

1. TAZE TESPİT: %2.5'lik gluteraldehid solüsyonunda 2 saat bekletilir.

2. I.YIKAMA: 0.1 molar Cacodilat tampon solusyonu ile 15 dakika süre ile rotatuarda döndürülmek suretiyle 3 kez yıkama uygulanır.

3. OSMİK ASİT İLE TESPİT: %2'lik O204 (osmiumtetraoksit) ile rotatuarda döndürülmek suretiyle 2 saat süre ile uygulama yapılır.

4. II.YIKAMA: 0.1 molar Cacodilat tampon solusyonu ile 10 dakika süre ile rotatuarda döndürülmek suretiyle 2 kez yıkama uygulanır.

5. I. DEHİDRATASYON: Alkol kullanılmak suretiyle yapılmaktadır.

%30'luk alkol ile 15 dakika (2 defa)

%50'luk alkol ile 15 dakika (2 defa)

%70'lik alkol ile 15 dakika (1 defa)

%70'lik alkolde24 saat süre ile bekletilir.

6. KONTRASTLAMA (Uranilasetat ile boyama): Dokular bu karışım içinde buzdolabı şartlarında 2 saat süre ile bekletilir.

7. II.DEHİDRATASYON VE BERRAKLAŞTIRMA

%90'lık alkol ile30 dakika (2 defa)

Absolü alkol ile 30 dakika (2 defa)

Propilen oksid ile berraklaştırma 30 dakika (2 defa)

8. ARALDİT PROPİLEN OKSİT UYGULAMASI: Bu karışım içinde dokular 24 saat süre ile buzdolabında bekletilir.

9. GÖMME: Dokular aralditli gömme kapsüllerine alındıktan sonra iki gün süre ile etüvde bekletilir. Bu işlem sırasında birinci gün etüvün ısısı 45 C, ikinci gün ise 60 C olmalıdır.

10. Bloklar haline getirilmiş doku örneklerinden yarı ince kesit alma işlemi uygulanır ve yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanır.

11. Hazırlanmış olan yarı ince kesitlerden mikroskopta incelenecek kısım işaretlendikten sonra işaretlenmiş olan bu alandan ince kesitler alınır.

12. İnce kesitler incelenmek üzere gridlere alınır ve TEM ile görüntülenir.

2.4. KATARAKT CERRAHİSİNDE KONTİNÜ KURVİLİNEER KAPSÜLOREKSİS

Kontinü kurvilineer kapsüloreksisi uygulanması metodu ile katarakt ekstraksiyonu ve GİL implantasyonu oldukça güvenli ve etkin bir cerrahi yöntemdir. Bu tekniğin uygulanması ile güçlü bir kapsül kenarı oluşturularak lens aspirasyonu ve GİL implantasyonu sırasında kapsül yırtıklarının oluşması engellenmiş olur. Bu şekilde kapsüller bag içine güvenli bir şekilde GİL implante edilmesi kolaylaşır. Matür veya entümesan kataraktlı olgularda bu şekilde bir kapsüloreksisin gerçekleştirilmesi güç olabilmektedir. Özellikle kırmızı retinal refleksinin alınmadığı katarakt olgularında cerrah kapsüloreksis sırasında kapsül kenarını iyi

bir şekilde göremeyebilir. Kapsülün iyi seçilememesi sonucu olarak kapsüloreksis riskli olabilmekte ve cerrahi işlem güçleşebilmektedir. Kapsüloreksis sırasında radial yırtıkların gelişmesi, zonülere ve arka kapsüle kadar uzanabilen radial yırtıkların gelişimi izlenebilmektedir. Bu olayların gelişmesinin bir sonucu olarak vitreus kaybı gelişebilmekte ve katarakt ekstraksiyonu ve GİL implantasyonu işlemi oldukça güçleşmektedir (22).

Son zamanlarda kırmızı refletin olmaması nedeni ile ön kapsülün iyi görülemediği olgularda cerrahinin risklerini ortadan kaldırmak için arayışlarda bulunulmuştur. Bu amaçla otolog kan ve çeşitli boyalar kullanılmıştır (23). Bu işleme yönelik kullanılmış başlıca boyalar, indosiyanın yeşili (24), fluorescein (25), gention viyole (26), metilen mavisi (5) ve tripan mavisidir (27). Bu boyalardan biri olan tripan mavisi kornea endotelinin değerlendirilmesinde de kullanılan bir vital boyadır.

2.5. TRİPAN MAVİSİ

Tripan mavisi biyolojik laboratuarlarda, hücre kültürlerinde canlı-ölü hücre ayırımında kullanılan vital bir boyadır. Bu amaçla genellikle % 0.4'lük konsantrasyonda ve fosfat tamponunda kullanılmaktadır. Oftalmolojide uzun yıllar katarakt cerrahisinde ön kapsülün boyanması için kullanılmıştır. Bu uygulamalar sırasında genellikle %0.1 konsantrasyonu kullanılmıştır (28). Ayrıca kornea bankalarında endotel hücrelerinin canlılığının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Son yıllarda, vitreoretinal cerrahide, epiretinal membranları ve internal limitan membranı boyayarak görünür hale getirmek için kullanılmaktadır (28,29).

3.AMAÇ

Bu çalışmada amaç fakoemülsifikasyon yöntemiyle katarakt cerrahisinde kapsüloreksis sırasında lensin ön kapsülünün daha iyi görüntülenmesi ve güvenilir bir kapsüloreksis yapılmasını sağlayan tripan mavisi boyasının, ratların ön kamarasına farklı konsantrasyonlarda injeksiyonu sonrasında kornea endotelinde meydana gelen erken (1.gün) ve geç dönem (1.ay) histopatolojik değişikliklerin TEM ile değerlendirmektir.



4.MATERYAL VE METOD:

Bu deneysel çalışmada 20 adet Wistar albino rat'ın 40 gözü kullanıldı. Çalışmada kullanılan Wistar albino ratların tümü sağlıklı idi ve herhangi bir göz hastalıkları söz konusu değildi. Deneysel çalışma yapılmaya başlanmadan önce Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde faaliyet gösteren deney hayvanlarının bilimsel çalışmalarda kullanımı ile ilgili Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı.

Tüm ratlara 30 mg/kg kas içi ketamin hidroklorür enjeksiyonu ile anestesi sağlandı. Göz kapaklarının temizliği % 10'luk povidon iyodür, konjonktival floranın temizliği %5'lik povidon iyodür ile sağlandı. İngilterede hizmet veren Sigma-Aldrich şirketi tarafından üretilen ve pazarlanan Sigma marka %0.4'luk tripan mavisi dengeli göz içi sıvı kullanılarak beş ayrı doz olacak şekilde seyreltildi. Öncelikle %0.4 lük konsantrasyondan 0.1 ml alındı. Daha sonra bu konsantrasyon sırasıyla ikiye, dörde, sekize ve onaltıya dengeli göz içi sıvısı (BSS) ile seyreltilerek %0.2, %0.1, %0.050 ve %0.025'lik konsantrasyonda hazırlanmış olundu. Operasyon mikroskobu kullanılarak superotemporal kadrandan 28 gauge'lik bir insülin enjektörü yardımı ile limbal tünel oluşturulacak şekilde ön kamaraya girildi. Ratların sağ gözlerine farklı konsantrasyonda 0.05 ml tripan mavisi, sol gözlerine 0.05 ml dengeli tuz solüsyonu (BSS®) (kontrol grubu) enjekte edildi. Ratlardan dört tanesinin sağ gözüne %0.4, dört tanesinin sağ gözüne %0.2, dört tanesinin sağ gözüne %0.1, dört tanesinin sağ gözüne %0.05, diğer dört tanesinin sağ gözüne %0.025 konsantrasyonlarında 0.05 ml tripan mavisi enjekte edildi. Tüm ratların sol gözlerine ise 0.05 ml BSS enjekte edildi. Enjeksiyondan 1 gün ve 1 ay sonra her tripan mavisi konsantrasyonundan iki rat yüksek doz pentotal (80 mg/kg) ile sakrifiye edilerek gözler enükle edildi. Operasyon mikroskobu yardımı ile kornealar bütün olarak çıkarıldı. Limbustan itibaren bir bütün olarak çıkarılmış kornealar endotel yüzü üstte kalacak şekilde kauçuk materyal üzerine fikse edilerek %2.5'lik gluteraldehid

solüsyonu içine kondu. TEM ile incelenmek üzere hazırlık aşamalarından geçirildi. İnce kesitlerin alınması aşamasının ardında gridlere alınan incelenecek örnekler TEM ile incelenmek üzere incelenmenin yapılacağı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalına götürüldü. Kornea endotelinde meydana gelen histopatolojik değişiklikler TEM ile incelendi.



5.BULGULAR

Kontrol grubu kornea endotelinin TEM ile incelenmesi sonucu erken dönemde (1.günde) aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Endotel hücrelerine ait hücre çekirdekleri ökramatik yapıları ve yassı şekilleri ile normal görünümde izlendi. Hücrelerarası yan yüzey bağlantıları ve hücre organelleri normal ultrastrüktür yapısında idi (Resim1).

Geç dönemde (1.ayda) incelenmiş olan kontrol grubu endotel hücrelerinin akut dönemdeki gibi normal yapıda oldukları izlendi.

%0.4'lük konsantrasyonda tripan mavisinin kornea endoteli üzerine erken dönem etkilerinin TEM ile incelenmesi sonucu aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Kornea endotel hücresinde irili ufaklı vakuoller, genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum, piknotik nükleus ve mitokondiyonlarda yaygın kristalizis saptandı. Hücre çekirdeklerinin hiperkromatik yapıda olduğu ve hücre organellerinde dejenerasyon saptandı. Hücrelerarası yan yüzey bağlantıları ve descement membranında ayrılmaların olduğu tespit edildi (Resim2).

%0.4'lük konsantrasyonda tripan mavisinin kornea endoteli üzerine geç dönem etkilerinin TEM ile incelenmesinde aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Hücrelerin ileri düzeyde yassılaştığı, çekirdeklerin ökramatik yapıda olduğu, hücre içinde vakuolizasyon olmakla birlikte akut dönemde izlenenden belirgin şekilde daha az vakuolizasyon görüldüğü izlendi. Hücrelerarası yan yüzey bağlantılarının normal olduğu ve descement membranından hücre ayrılmalarının olmadığı saptandı (Resim 3).

%0.2'lik konsantrasyonda tripan mavisinin kornea endoteli üzerine erken dönem etkilerinin TEM ile incelenmesi ile aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Hücre çekirdeklerinin heterokromatik ve piknotik yapıda olduğu izlendi. Hücre boyutunun normal olduğu, hücrelerde vakuolizasyon ve hücrel organellerde dejenerasyon olduğu saptandı. Hücreler arası yan yüzey bağlantıları normal olup, mitokondriyonlarda az oranda kristalizis tespit edildi. GER ve golgi organelleri aktif olduğu saptandı (Resim 4).

%0.2'lik konsantrasyonda tripan mavisinin kornea endoteli üzerine geç dönem etkilerinin TEM ile incelenmesi ile aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Hücrelerarası yan yüzey bağlantıları yer yer ayrılmış olarak izlense de, hücreler ileri derecede yassı, çekirdekler normal morfolojide, çekirdekçiğin belirgin olduğu saptandı. Bazı alanlarda çekirdeklerin piknotik yapıda olduğu ve az sayıda mitokondriyonlarda minimal düzeyde kristalizis olduğu tespit edildi. Hücre şekli ve boyutu normal yapıda olduğu saptandı (Resim 5).

% 0.1'lik konsantrasyonda tripan mavisinin kornea endoteli üzerine erken dönem etkilerinin TEM ile incelenmesi ile aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Kornea endotel hücresinde, mitokondiyon ve çekirdek normal olarak izlenmekte, granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği aktif olup mitokondiyal kristalizis saptandı. Hücre şekilleri ve çekirdek şekilleri normal olarak izlendi. Çekirdeklerin ökromatik olduğu, çekirdekçiklerin belirgin olarak görüldüğü izlendi. Hücrelerde minimal düzeyde vakuolizasyon saptandı. Descement membranından hücre ayrılmalarının olmadığı ve hücrelerarası yan yüzey bağlantılarının normal olduğu saptandı (Resim 6).

Geç dönemde görülen değişikliklerin bu konsantrasyonun akut döneminden farklı olmadığı tespit edilirdi (Resim 7).

%0.05'lik konsantrasyonda tripan mavisinin kornea endoteli üzerine erken dönem etkilerinin TEM ile incelenmesi ile aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Hücre çekirdekleri ve hücre boyutunun normal olduğu izlendi. Hücrelerde descement membranından ayrılma olmadığı ve hücrelerarası yan yüzey bağlantılarının normal olduğu, minimal düzeyde hücrel organellerde dejenerasyon ve vakuolizasyon olduğu saptandı (Resim 8).

Geç dönemde ise hücre çekirdekleri ve hücre boyutunun normal olduğu, hücrelerde descement membranından ayrılma olmadığı izlendi. Hücrelerarası yan yüzey bağlantılarının normal olduğu, minimal düzeyde hücrel organellerde dejenerasyon ve vakuolizasyon olduğu saptandı (Resim 9).

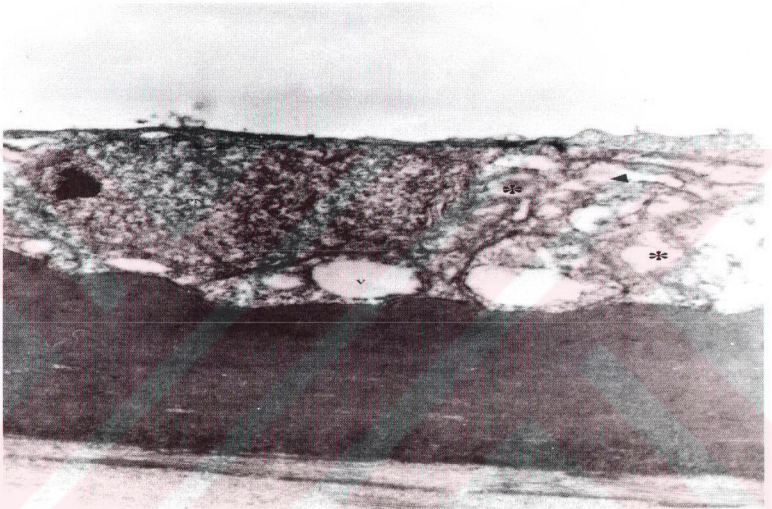
%0.025'lik konsantrasyonda tripan mavisinin kornea endoteli üzerine olan erken dönem etkilerinin TEM ile incelenmesi ile aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Endotel hücrelerine ait hücre çekirdekleri ökramatik yapıları ve yassı şekilleri ile normal görünümde izlendi. Hücrelerarası yan yüzey bağlantıları normal yapıda olduğu, hücrel organellerde degenerasyon ve vakuolizasyon olmadığı izlendi. Hücre organellerinin normal ultrastrüktür yapısında olduğu saptandı (Resim 10).

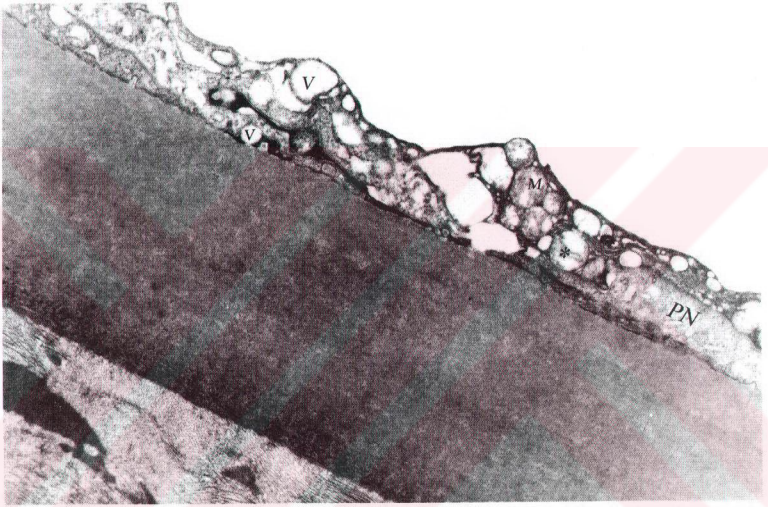
Geç dönemde bu konsantrasyon için elde edilmiş bulgular akut dönem için saptanmış olan bulgulardan farklılık göstermemekteydi.



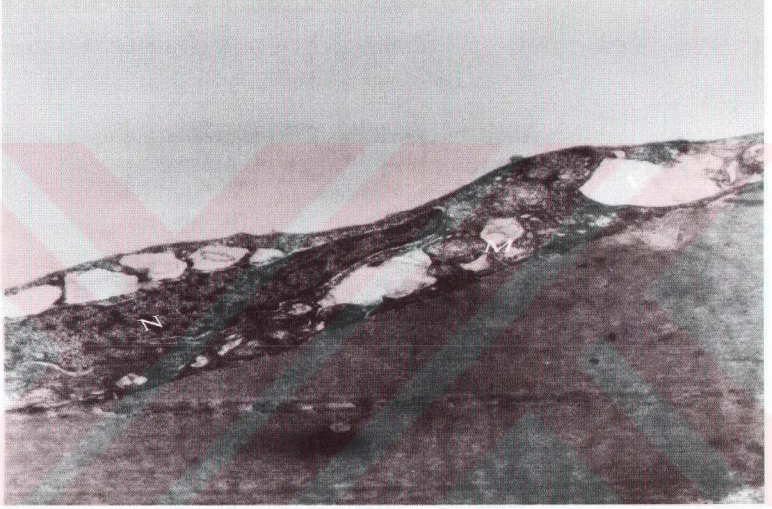
Resim 1) Kontrol grubu kornea endotelinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Hücre çekirdekleri ökramatik yapıda, hücrelerarası yan yüzey bağlantıları ve hücre organelleri normal yapıda izleniyor. Mitokondriyon (M), granüllü endoplazmik retikulum (GER), nükleus (N) (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



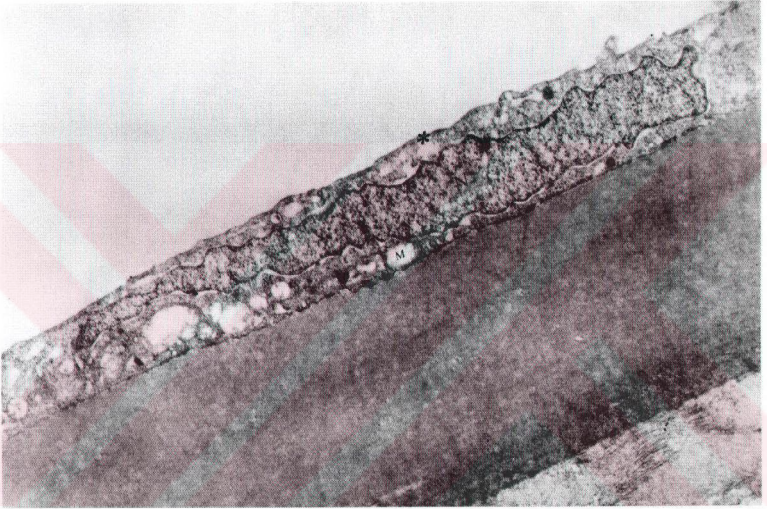
Resim 2). Ön kamaraya %0.4 konsantrasyonda tripan mavisi verilmesinden 1 gün sonra korneal endotel hücrelerinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Kornea endotel hücrelerinde irili ufaklı vakuoller (V), genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (►), piknotik nükleus (PN) ve mitokondiyonlarda yaygın kristalizis (*) görülmekte (Uranyl asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



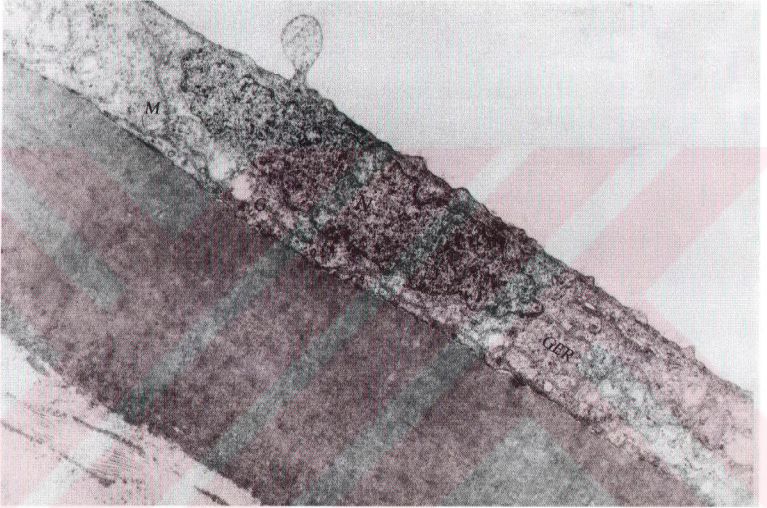
Resim 3) Ön kamaraya %0.4 konsantrasyonda tripan mavisi verilmesini takiben 1. ayda korneal endotel hücre yüzeyinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Kornea endotel hücrelerinde irili ufaklı vakuoller (V), piknotik nükleus (PN) ve mitokondiyonlarda yaygın kristalizis (*) görülmekte (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



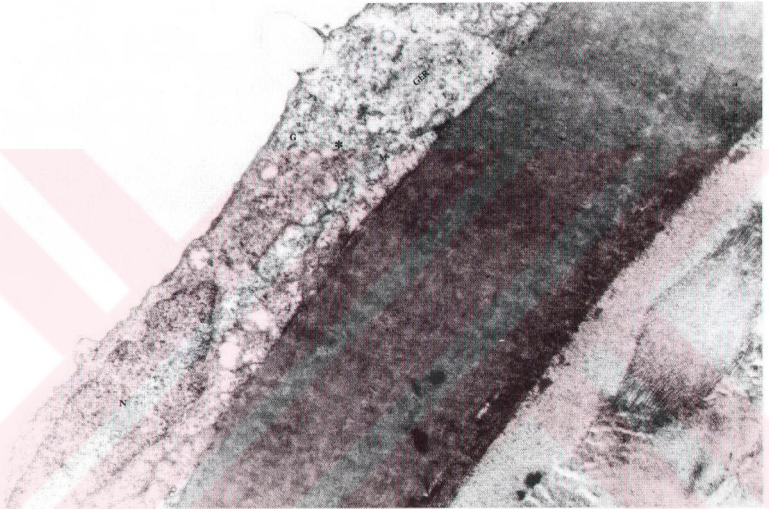
Resim 4) Ön kamaraya %0.2 konsantrasyonda tripan mavisi verilmesini takiben 1. günde korneal endotel hücre yüzeyinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Hücrelerde vakuolizasyon (V), piknotik nucleus (N), normal büyüklükte mitokondriyonlar (M) görülmekte (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



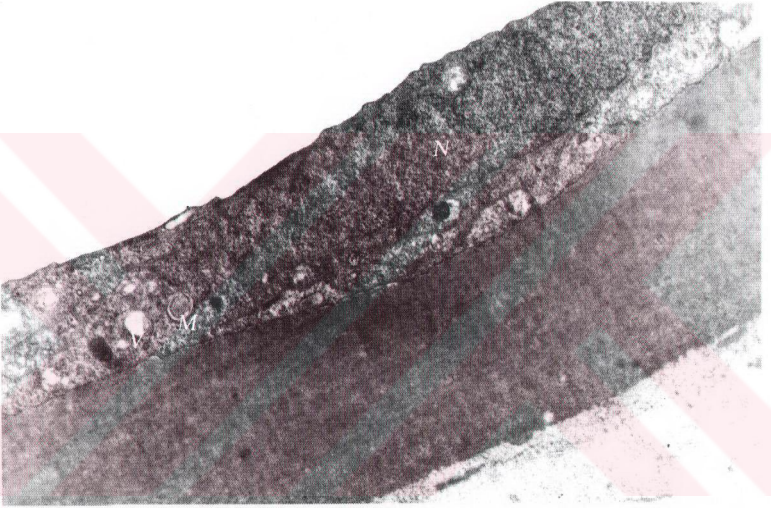
Resim 5) Ön kamaraya %0.2 konsantrasyonda tripan mavisi verilmesini takiben 1. ayda korneal endotel hücre yüzeyinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Piknotik nucleus (N), minimal düzeyde mitokondiyal kristalizis (*) ve vakuolizasyon görülmekte (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



Resim 6) Ön kamaraya %0.1 konsantrasyonda tripan mavisi verilmesini takiben 1.günde korneal endotel hücre yüzeyinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Kornea endotel hücresinde mitokondiyon (M) ve nucleus (N) normal, granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve golgi cisimciği (G) aktif olarak görülmekte (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



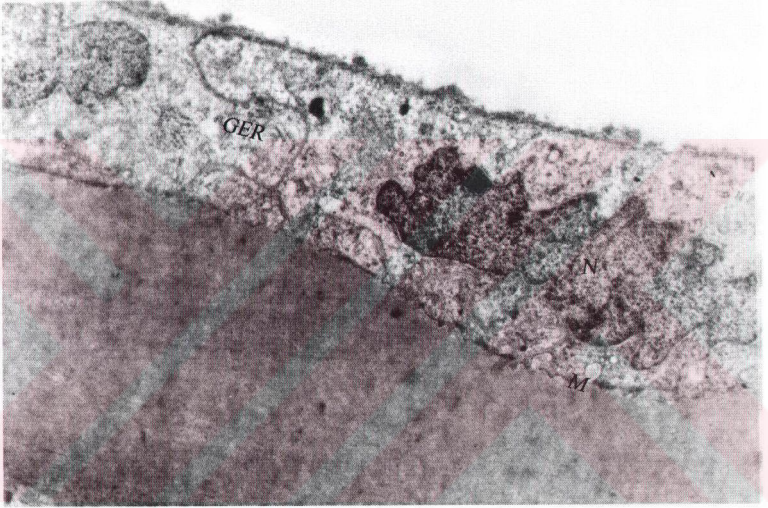
Resim 7) Ön kamaraya %0.1 konsantrasyonda tripan mavisi verilmesini takiben 1.ayda korneal endotel hücre yüzeyinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Kornea endotel hücresinde mitokondiyon (M) ve nucleus (N) normal, granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve golgi cisimciği (G) aktif, mitokondiyal kristalizis (*) görülmekte (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



Resim 8) Ön kamaraya %0.050'lik konsantrasyonda tripan mavisi verilmesini takiben 1.gün korneal endotel hücre yüzeyinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Kornea endotel hücrelerinde nükleus (N), mitokondriyon (M) normal, sitoplazmada vakuolizasyon (V) görülmekte (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



Resim 9) Ön kamaraya %0.050'lik konsantrasyonda tripan mavisi verilmesini takiben 1.ayda korneal endotel hücre yüzeyinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Kornea endotel hücrelerinde nükleus (N), mitokondriyon (M) normal, GER aktif olarak izlenmekte (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).



Resim 10) Ön kamaraya %0.025'lik konsantrasyonda tripan mavisi verilmesini takiben 1.günde korneal endotel hücre yüzeyinin geçirmeli elektron mikroskobu ile incelenmesi. Kornea endotel hücre organelleri normal yapıda izlenmekte, mitokondriyon (M), granüllü endoplazmik retikulum (GER), nükleus (N) (Uranil asetat-Kurşun sitrat, x 4400).

6.TARTIŞMA:

Katarakt cerrahisinde fakoemülsifikasyon pek çok cerrahın çok sık tercih ettiği bir yöntemdir. Kontinü kurvilineer kapsüloreksisin (KKK) ile ön kapsülün çıkarılması fakoemülsifikasyon ile katarakt cerrahisinde önemli bir aşamadır. Bu aşamanın başarılı bir şekilde yapılması ile düşük komplikasyon ve yüksek başarı oranları bildirilmektedir. Bu olay KKK ile sağlanmış olan kapsül elastikiyetinin artışı ve gerginliğin eşit dağılımı ile ilişkilendirilmektedir (22,30).

Fundusun kırmızı reflexinin alınamaması nedeni ile entümasan katarakt ve matür katarakt gibi bazı olgularda güvenli bir kapsüloreksis yapmak güçtür. %0.1'lik konsantrasyonda tripan mavisi ön kapsülün boyanması ve korteks ile kontrast oluşumunun sağlanması için yeterli olmaktadır (24). Lens ön kapsülün görünürlülüğünün kötü olması KKK işleminin sağlıklı olarak yapılmasını zorlaştırır, bu da lens kapsülünde radial yırtıkların gelişimine ve bu yırtıkların lens ekvatorunun arkasına doğru uzanmasına neden olabilir. Buna bağlı olarak zonüllerin ayrışması, arka kapsül yırtıkları, vitreus kaybı ve GİL desantralizasyonu gibi komplikasyonların gelişme riski artar (22,32).

Son zamanlarda otolog serum ve çeşitli boyalar kullanılarak ön kapsülün daha iyi görüntülenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu şekilde KKK işleminin daha sağlıklı olarak yapılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak otolog serum ve çeşitli boyalar kullanılmıştır (23). Bu işleme yönelik kullanılmış başlıca boyalar, indosiyenin yeşili (24,25), fluorescein (26-30), gention viyole (33), metilen mavisi (34) ve tripan mavisidir (35-40).

Bu boyaların kullanımı ile kapsüloreksis işleminde kapsül kenarının (41), travmatik kataraktlı olgularda kapsül yırtıklarının (42), korneal opasitesi olan kataraktlı olgularda

kapsüloreksisin (43), pediatrik hastalarda arka ve ön kapsülotominin kolayca yapılabilmesine (44-46) imkan vermiştir.

%0.1 gention violet ve %1 metilen mavisinin toksik etkilerine bağlı olarak kornea ödemi meydana geldiği saptanmıştır (5). Fluorescein ile yapılan boyamalarda ise kapsül altına verilen boyanın korteksi de boyaması nedeni ile korteks ve kapsül ayırımının zor olduğu bildirilmiştir (47). Nahra ve ark. (29) %2'lik fluoresceini hava altında kapsül ön yüzüne enjekte etmişler, bu konsantrasyonda fluoresceinin endotele toksik olabileceğini belirtmişlerdir. Melles ve ark. tripan mavisi ile ilgili çalışmaları sonrasında tripan mavisi katarakt cerrahisinde en çok tercih edilen boya olarak kullanılmaya başlanmıştır. %0.1'lik konsantrasyonda tripan mavisinin matür kataraktlı olgularda ön kapsülün boyanması için tercih ettikleri konsantrasyon olmuştur. Bu konsantrasyonda tripan mavisi kapsüloreksis sırasında kapsül kenarının görünebilirliğini ve kapsüloreksisin güvenli olarak yapılmasını sağlamaktadır (5).

Lens ön kapsülün görünürlüğünün daha iyi olması fakoemülsifikasyon ile katarakt cerrahisine yeni başlayan cerrahlar için önemlidir. Bu cerrahiye yeni başlayanlara tripan mavisi ile ön kapsülün görünürlüğünün artırılması öğrenme süresi ve komplikasyon oranını azaltmaktadır. (48,49).

Tripan mavisi bir bis-azo boyasıdır. Tripan mavisi iki azo bağı ile bağlı bulunan üç parçadan oluşmuş simetrik bir molekül içermektedir. 1967'den bu yana konjonktiva ve korneanın vital boyanması için oftalmolojide kullanılmaktadır (4). Katarakt cerrahisi sonrasında endotelial hücrelerin incelenmesi ve keratoplastide donör korneal greftin değerlendirilmesinde kullanılmış, bu uygulamalara ait herhangi bir yan etki izlenmemiştir (50).

Bis-azo boyaları, tripan mavisinde olduğu gibi, az hidrate dokuları daha hidrate dokulara göre daha iyi boyamaktadır (51). Lens korteksi içerdiği lens fibrilleri sayesinde asellüler yapıda olan bazal membrana göre daha fazla sıvı içermektedir (52). Bu olay tripan mavisinin niçin bazal membranı lens korteksine göre daha iyi boyadığını açıklamaktadır. Tripan mavisi bu özelliği sayesinde lens ön kapsülü ile lens korteksi arasında kontrast farklılığı oluşturarak ön kapsülün görünürlüğünün artmasına neden olmaktadır. Bu şekilde cerrahinin daha başarılı bir şekilde yapılmasını sağlayacak bir kapsüloreksis gerçekleştirilmiş olmaktadır (53).

Tripan mavisinin ön kamaraya steril hava verildikten ve kornea endoteli bu şekilde en az zarar görecektir şekilde önlem alındıktan sonra uygulanması, kısa süreli uygulanması ve uygulanma sonrasında hemen yıkanması nedeni ile göz içi dokulara kısa süreli temas olması nedeni ile toksik olmadığı belirtilmiş olmakla beraber, tripan mavisi karsinojenik kimyasal maddeler listesinde yer alan bir maddedir (54). Ayrıca uzun dönem etkileri konusunda bilgiler yoktur. Gebeler ve çocuk hasta grubunda da dikkatli olarak kullanılması gerektiği bildirilmektedir.

Yetik ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ön kapsülün boyanabileceği ve kapsüloreksisin güvenli olarak yapılabileceği en düşük boya konsantrasyonunu saptanmaya çalışmışlar. %0.0125'lik konsantrasyona kadar yapılan seyreltmelerde ön kapsülün boyanarak güvenli bir kapsüloreksisin yapılabildiğini bildirmişlerdir (55).

Van Dooren ve ark. %0.06 konsantrasyonunda tripan mavisi kullandığı fakoemülsifikasyon hastaları ile tripan mavisi kullanmadığı fakoemülsifikasyon yaptığı hastaların kornea endotel hücrelerini speküler mikroskopisi ile incelemişler, iki grup arasında fark olmadığını ve %0.06 tripan mavisi'nin kornea endoteline toksik etki oluşturmadığını bildirmişlerdir (56). Veckeneer ve ark. tavşanlarda vitreus kavitesine farklı

konsantrasyonlarda tripan mavisi enjeksiyonu sonrasında retinayı histolojik ve elektrofizyolojik olarak incelemişler, tripan mavisinin %0.06 konsantrasyonunda retinaya toksik olmadığını, fakat daha yüksek konsantrasyonlarda ise güvenli olmayabileceğini belirtmişlerdir (57).

Chang ve ark. tavşanlar üzerinde yaptığı deneysel çalışmada farklı konsantrasyonlarda boyaları ön kapsülü boyamak için in vitro olarak kullanılmışlar ve ön kapsülü boyanmak için yeterli olabilecek konsantrasyonu saptanmaya çalışmışlardır. %1'lik konsantrasyonda tripan mavisinin ön kapsülün görünmesini sağlamada yeterli konsantrasyon olduğunu ve bu konsantrasyonda kullanımın elverişli olduğu sonucuna varmışlardır (58).

Chang ve ark. yaptığı başka bir çalışmada katarakt cerrahisinde ön kapsülün boyanmasında kullanılan farklı boyaların, in vitro olarak tavşanların kornea endoteli üzerine 1 dakika süre ile uygulanması ve sonrasında dengeli göz içi sıvısı ile yıkanması sonucu oluşan değişiklikleri ışık mikroskobu ve geçirmeli elektron mikroskobu ile incelemişler, %0.25 indosiyanın yeşili, %0.20 metilen mavisi, %0.01 gention viyole, %0.40 tripan mavisi ve %10 fluorescein sodyum ve daha düşük konsantrasyonların kullanılması durumunda kornea endotel hücre hasarının oluşmadığı gösterilmiştir. %0.50 indosiyanın yeşili, %0.50 metilen mavisi, %0.10 gention viyole ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise endotel hücrelerinde azalma ve hücresel organellerde harabiyet saptamışlardır (59).

Chung ve ark. kataraktlı olgularda %1'lik tripan mavisi ile %0.5'lik indosiyanın yeşilini intarakamaral olarak iki dakika uygulamış ve sonrasında ön kamarayı dengeli tuz solüsyonu ile yıkamışlar, her iki boyanında endotel hücre sayısı ve korneal berraklık açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark olmadığını bildirmişlerdir (60).

Bizim çalışmamızda tripan mavisinin kornea endoteli üzerindeki etkilerin TEM ile incelenmesinde, %0.4 ve %0.2 konsantrasyonlarda tripan mavisinin ön kamaraya verilmesinin değerlendirilmesinde hücrelerde vakoulizasyon, genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum, intrastoplazmik ödem, piknotik nükleus ve mitokondriyal kristalizis saptandı. Geç dönemde ise bu etkilerin azalarak devam ettiği görüldü. %0.1 ve %0.050'lik konsantrasyonlarda ise erken dönemde kornea endotel hücre çekirdeklerinin normal yapıda olduğu, granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciğinin aktif olduğu tespit edildi. Mitokondrilerde minimal düzeyde kristalizis saptandı. %0.025'lik konsantrasyonda ise kontrol grubu ile karşılaştırılınca hem erken hemde geç dönemde kornea endotel hücre yapıları arasında fark olmadığı saptandı.

Klinik kullanımda sıklıkla ön kapsülün boyanması için uygulanan tripan mavisi konsantrasyonunun %0.1 olmasına rağmen, Yetik ve arkadaşları %0.025'lik konsantrasyonda kullanılan tripan mavisinin güvenli bir kapsüloreksis sağlamak için yeterli olduğunu belirtmişler. Biz de bu konsantrasyonda histopatolojik olarak erken ve geç dönem bulgularımızın kontrol grubu ile farklı olmadığını saptadık. %0.025'lik konsantrasyonda ön kamaraya uygulanmasının güvenli bir ön kapsülotomi için yeterli olması, kornea endotelinde elektron mikroskopisi düzeyinde histopatolojik değişiklikler izlenmemesi nedeni ile bu konsantrasyonda kullanılmasını önermekteyiz.

7.SONUÇ

Farklı konsantrasyonlarda tripan mavisinin kornea endoteli üzerine olan etkilerinin TEM ile incelendiği bu çalışmada tripan mavisinin %0.4 ve %0.2 konsantrasyonlarında erken dönemde kornea endotel hücrelerinin ultrastrüktürel yapısını bozduğu, bu etkinin geç dönemde azalarak devam ettiği görüldü. %0.1 ve %0.05'lik konsantrasyonlarda ise hem erken hem de geç dönemde endotel hücrelerinin ultrastrüktürel yapısının minimal düzeyde etkilenmiş olduğu saptandı. %0.025'lik konsantrasyonda ise endotel hücre ultrastrüktürel yapısının kontrol grubu ile farklılık göstermediği saptandı. %0.025'lik konsantrasyonda ön kamaraya uygulanmasının güvenli bir ön kapsülotomi için yeterli olması, kornea endotelinde elektron mikroskopisi düzeyinde histopatolojik değişiklikler izlenmemesi nedeni ile bu konsantrasyonda kullanılmasının daha güvenli olacağını ve bu konsantrasyonun kullanılmasını öneriyoruz.

8.ÖZET

Amaç: Ratların ön kamarasına farklı konsantrasyonlarda tripan mavisi injeksiyonu sonrasında kornea endotelinde meydana gelen histopatolojik değişiklikleri değerlendirmek.

Materyal ve Metod: Bu experimental çalışmada 20 adet Wistar albino rat'ın 40 gözü kullanıldı. Ratların sağ gözlerine farklı konsantrasyonda tripan mavisi, sol gözlerine 0.05 ml dengeli tuz solüsyonu (kontrol group) injekte edildi. Ratların 4 gözüne %0.4, 4 gözüne %0.2, 4 gözüne %0.1, 4 gözüne %0.05, 4 gözüne %0.025 konsantrasyonlarında 0.05 ml tripan mavisi injekte edildi. İnjesiyondan 1 gün, 1 ay sonra her tripan mavisi konsantrasyondan iki rat gözleri enükle edildi. Kornea endotel hücreleri geçirmeli elektron mikroskopisi (TEM) ile incelenerek kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Bulgular: %0.4 ve %0.2'lik konsantrasyonlarda tripan mavisinin ön kamaraya verilmesinin kornea endoteli üzerindeki etkilerinin TEM ile değerlendirilmesinde hücrelerde vakoulizasyon, genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum, intrastoplazmik ödem, piknotik nükleus ve mitokondriyal kristalizis izlendi. Geç dönemde ise bu etkilerin azalarak devam ettiği görüldü. %0.1 ve %0.050'lik konsantrasyonlarda ise erken dönemde çekirdek normal idi, granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği aktif idi. Mitokondride minimal düzeyde kristalizis mevcut idi. %0.025'lik konsantrasyonda ise kontrol grubu ile karşılaştırılınca hem erken hemde geç dönemde kornea endotel hücre yapıları arasında fark olmadığı saptandı.

Sonuç: Tripan mavisi %0.4 ve %0.2 konsantrasyonlarda daha belirgin olmak üzere %0.1 ve %0.05 konsantrasyonlarında kornea endotel hücrelerinde yapısal değişikliklere neden olmaktadır. %0.025'lik konsantrasyonda, endotel hücre yapısının kontrol grubu arasında fark olmadığı saptandı .

SUMMARY

Purpose: To evaluate histopathological changes occurring in corneal endothelium after injection of trypan blue in different concentration into anterior chamber of rats.

Methods: In this experimental study, 40 eyes of 20 Wistar albino rats were used. Trypan blue in different concentrations were injected into right eyes of the rats and 0.05 ml balanced salt solution (BSS) into left eyes (control group). Right eyes were grouped into 5, each consisting 4 eyes. Each group received 0.05 ml trypan blue in 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.025% concentrations respectively. One day and one month after injection two rat from each trypan blue concentration were sacrificed and their eyes were enucleated. Corneal endothelial cells of enucleated eyes were analysed with transmission electron microscopy (TEM) and the results were compared with the control group.

Results: Trypan blue, more evidently in 0.4% and 0.2% concentrations, vacuolisation in cells, intracytoplasmic edema, extensive granulated endoplasmic reticulum, nucleus picnotic, and crystalalysis in mitokondrions. In the late period, these changes persisted in a decreasing manner. In 0.1% and 0.05% concentrations, nucleus was seen normal, granulated endoplasmic reticulum and golgi were seen actively, at minimal levels crystalalysis in mitokondrions were observed. No differance in both early and late periods was determined between 0.025% concentration and control group.

Conclusion: : Trypan blue markedly in 0.4% and 0.2% concentrations and in 0.1% and 0.05% concentrations causes structural changes in corneal endothelial cells. In 0.025% concentration, ultrastructural building of endothelium was not different from control group.

9.KAYNAKLAR

1. Dorland's Illustrated Medical Dictionary, WB Saunders; Philadelphia: 2000:276.
2. Taylor A. Nutritional and Environmental Influence on the Eye, CRC Pres; London: 1999:1-5.
3. American Academy of Ophthalmology, Basic and Clinical Science Course Lens and Cataract, 11.Section, Chapter VIII, 1999-2000:77-80.
4. Norn MS. Trypan blue vital staining of cornea and conjunctiva. Acta Ophthalmol 1967;45:380-9.
5. Melles GR, de Waard PW, Pameijer JH, Beekhuis WH. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. J Cataract Refract Surg 1999;25:7-9
6. Riordan-Eva P, Vaughan D, Asbury T. Anatomy and Embryology of the Eye, General Ophthalmology, Appleton and Lange 1995:1-28.
7. Snell RS. Development of the Eye and the Ocular Appendages, Clinic Anatomy of the Eye, Blackwell, Boston: 1989:1-15.
8. Newell FW. Anatomy and Embryology in Ophthalmology, The C.V. St. Louis, Mosby, 1986:65-75.
9. Sadler TW. Embryonic Period (Third to Eighth Week) Langman's Medical Embryology, Williams and Wilkins, Baltimore, 1990:64-84.
10. Dawson DG, Kramer TR, Grossniklaus HE, Waring GO 3rd, Edelhauser HF. Histologic ultrastructural and immunofluorescent evaluation of human laser-assisted insitu keratomileusis corneal wounds. Arch Ophthalmol 2005;123:741-56.
11. Berry MM, Strandring SM, Bannister LH. Nervous System Peripheral Visual Apparatus .The Anatomical Basis of Medicine and Surgery, 38th.edition,Churchill-Livingstone, Newyork: 1995:1321-1367.

12. Hart WM. ADLER'S Physiology of the Eye, Mosby Year Book, Mosby Company , St. Louis, 1992:345-349.
13. Ganong WF. Review of Medical Physiology, Prentice-Hall International London: 1995:412-413.
14. Slamovits TL. Fundamentals and Principles of Ophthalmology , Basic and Clinical Science Course, American Academy of Ophthalmology, 1996:319-324.
15. Ng EW, Golledge CL. The management of common ocular infections. Aust Fam Physician 1996;25:1831-9
16. Kontakt lensler ve uygulanması, TOD eğitim yayınları, No:4, 2005:17-20.
17. Patel SV, Hodge DO, Bourne WM. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. Am J Ophthalmol 2005;139:311-9.
18. Thomas, G. and Goringe, M.I. Transmission Electron Microscopy of Live Tissue and Metals. 1996;25-29.
19. Fujita H. History of Electron Microscopes, Business Center for Academic Societies. Japan: 1986;317-24.
20. Watt I.M. The Principles and Practice of Electron Microscopy, Cambridge University Pres. New York :1985:345-54.
21. Anderson R.M., Specimen Preparation For Transmission Electron Microscopy of Materials, II. Material Research Society Symposium Proceedings 199, MRS, Pittsburgh, Pennsylvania;1990:132-133
22. Gimbel HV, Neuhan T. Development, advantages, and methods of the continuous circular capsulorhexis technique. J Cataract Refract Surg 1990;16:31-7.
23. Cimetta DJ, Gatti M, Labianco G. Haemocoloration of the anterior capsule in white cataract CCC. Eur J Implant Refract Surg 1995;7:184-5.

24. Horiguchi M, Miyake K, Ohta I, Ito Y. Staining of the lens capsule for circular continuous capsulorhexis in eyes with white cataract. *Arch Ophthalmol* 1998;116:535–7.
25. Sharma N, Pangtey MS, Data VK. Experience with indocyanine green dye . *J Cataract Refract Surg* 2001;27:1342.
26. Nahra D, Castilla M. Fluorescein-stained capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24:1169-70.
27. Hoffer KJ, McFarland JE. Intracameral subcapsular fluorescein staining for improved visualization during capsulorhexis in mature cataracts . *J Cataract Refract Surg* 1993; 19:566.
28. Fritz WL. Fluorescein blue, light-assisted capsulorhexis for mature or hypermature cataract. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:19–20.
29. Gotzaridis EV, Ayliffe WH. Fluorescein dye improves visualization during capsulorhexis in mature cataracts. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:1423.
30. Assia EI, Apple DJ, Tsai JC, Lim ES. The elastic properties of the lens capsule in capsulorhexis. *Am J Ophthalmol* 1991;111:628-32.
31. Gamal Eldin SA, el Mehelmy EM, el Shazli EM, Mostafa YM. Experimental staining of the anterior lens capsule in albino rabbits. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:1289-94.
32. Assia EI, Apple DJ, Barden A, Tsai JC, Castaneda VE, Hoggatt JS. An experimental study comparing various anterior capsulectomy techniques. *Arch Ophthalmol* 1991;109:642-7.
33. Unlu K, Aksunger A, Soker S, Kilinc N, Karaca C, Erdinc M. Gentian violet solution for staining the anterior capsule. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:1228–32.

34. Dada VK, Sharma N, Sudan R, Sethi H, Dada T, Pangtey MS. Anterior capsule staining for capsulorhexis in cases of white cataract: comparative clinical study. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:326-33.
35. Horiguchi M, Miyake K, Ohta I, Ito Y. Staining of lens capsule for circular continuous capsulorrhexis in eye with white cataract. *Arch Ophthalmol* 1998;116:535-37.
36. Feron EJ, Veckeneer M, Parys-Van Ginderdeuren R, Van Lommel A, Meles GR, Stalmans P. Tripan mavisi staining of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 2002;120:141-4.
37. Melles GRJ, de Waard PWT, Pameyer JH, Beekhuis WH. Staining the lens capsule with trypan blue for visualizing capsulorhexis in surgery of mature cataracts. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1999;215:342-4.
38. Kayıkçıoğlu O , Erakgun T, Güler C. Trypan blue mixed with sodiumhyaluronate for capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:970.
39. Laureano JS, Coroneo MT. Crystalline lens capsule staining with trypan blue. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:2046-9.
40. Jacob S, Agarwal A, Agarwal A, Agarwal S, Chowdhary S, Chowdhary R, Bagmar AA. Trypan blue as an adjunct for safe phacoemulsification in eyes with white cataract. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28:1819–25.
41. de Waard PWT, Budo CJ, Melles GRJ. Trypan blue capsular staining to “find” the leading edge of a “lost” capsulorhexis. *Am J Ophthalmol* 2002;134:271–72.
42. Newsom TH, Oetting TA. Indocyanine green staining in traumatic cataract. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:1691–93.
43. Bhartiya P, Sharma N, Ray M, Sinha R, Vajpayee RB. Trypan blue assisted phacoemulsification in corneal opacities. *Br J Ophthalmol* 2002;86:857–59.

44. Sharma N, Gupta V, Vajpayee RB. Trypan-blue-assisted posterior capsule plaque removal. *J Cataract Refract Surg* 2002;28:916–17.
45. Pandey SK, Werner L, Escobar-Gomez M, et al. Dyeenhanced cataract surgery. Part 3: posterior capsule staining to learn posterior continuous curvilinear capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:1066–71.
46. Wakabayashi T, Yamamoto N. Posterior capsule staining and posterior continuous curvilinear capsulorhexis in congenital cataract. *J Cataract Refract Surg* 2002;28:2042–44.
47. Fritz WL. Fluorescein blue, light-assisted capsulorhexis for mature or hypermature cataract. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:19-20.
48. Dada T, Ray M, Bhartiya P, Vajpayee RB. Trypan-blue-assisted capsulorhexis for trainee phacoemulsification surgeons. *J Cataract Refract Surg* 2002 ;28:575-6.
49. Sharma N, Bhartiya P, Sinha R, Vajpayee RB. Trypan blue assisted phacoemulsification by residents in training. *Clin Experiment Ophthalmol* 2002;30:386–87.
50. Georgiadis N, Kardasopoulos A, Bufidis T. The evaluation of corneal graft tissue by the use of trypan blue. *Ophthalmologica* 1999;213:8-11.
51. Horobin RW. The theory of staining and its practical implications. In: Bancroft JD, Stevens A . *Theory and Practice of Histological Techniques*, 4th edn. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1996;81-98.
52. Patterson C, Delamere N. The lens. In: Hart Jr WM (ed). *Adlers Physiology of the Eye*, 9th edn. Mosby Yearbook Inc.: St Louis, MS, 1992; 349-90.

53. Singh AJ, Sarodia UA, Brown L, Jagjivan R, Sampath R. A histological analysis of lens capsules stained with tripan mavisí for capsulorrhexis in phacoemulsification cataract surgery. *Eye* 2003;17:567-70.
54. Windhole M . *The Merck Index; an Encyclopedia of Chemicals and Drugs*. Rahway, NJ, Merck Co, 1976.
55. Yetik H, Devranoglu K, Ozkan S. Determining the lowest tripan mavisí concentration that satisfactorily stains the anterior capsule. *J Cataract Refract Surg* 2002;28:988-91.
56. Van Dooren BT, de Waard PW, Poort-van Nouhuys H, Beekhuis WH, Melles GR. Corneal endothelial cell density after tripan mavisí capsule staining in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2002;28:574-5.
57. Veckeneer M, van Overdam K, Monzer J, Kobuch K, van Marle W, Spekrijse H, van Meurs JOcular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:698-704.
58. Chang YS, Tseng SY, Tseng SH. Comparison of dyes for cataract surgery. Part 2: efficacy of capsule staining in a rabbit model *J Cataract Refract Surg* 2005;31:799-804.
59. Chang YS, Tseng SY, Tseng SH, Chen YT, Hsiao JH. Comparison of dyes for cataract surgery. Part 1: cytotoxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg* 2005;31:792-8.
60. Chung CF, Liang CC, Lai JS, Lo ES, Lam DS. Safety of trypan blue 1% and indocyanine green 0.5% in assisting visualization of anterior capsule during phacoemulsification in mature cataract. *J Cataract Refract Surg* 2005;31:938-42.