

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA İNTRAPERİTONEAL MEDİKAL OZON İLE
YAPILAN ÖN KOŞULLAMA TEDAVİSİNİN RETİNAL
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI ÖNLEMEDE ETKİSİ**

Dr. Başak DOĞU

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2010

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA İNTRAPERİTONEAL MEDİKAL OZON İLE
YAPILAN ÖN KOŞULLAMA TEDAVİSİNİN RETİNAL
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI ÖNLEMEDE ETKİSİ**

Dr. Başak DOĞU

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Levent KARABAŞ

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR

Etik Kurul Onayı: 26.05.2009/ KOÜ HADYEK- 9/1-2009 / PROJE NO: 22

2010

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Retina Anatomisi | 3 |
| 2.1.1. Makroskopik Anatomi | 3 |
| 2.1.1.1. Makula | 3 |
| 2.1.1.2. Ekvator ve Ora Serrata | 4 |
| 2.1.2. Mikroskopik Anatomi | 4 |
| 2.2. Nörosensöryal Retina | 5 |
| 2.2.1. Nöral Elemanlar ve Nörosensöryal Retina Tabakaları | 5 |
| 2.2.2. Glial Elemanlar | 7 |
| 2.2.3. Aksesuar Glial Hücreler | 7 |
| 2.3. Retina Pigment Epiteli | 8 |
| 2.4. Vasküler Elemanlar | 8 |
| 2.5. Retina Vaskülarizasyonu ve Kan Dolaşımı | 9 |
| 2.6. Retina Oksijenasyonu | 9 |
| 2.7. Retinanın Oksidatif Metabolizması | 10 |
| 2.8. Reaktif Oksijen Ürünleri ve Antioksidanlar | 11 |
| 2.8.1. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Hücresel Kaynakları | 11 |
| 2.8.2. Retinanın Reaktif Oksijen Ürünlerine Olan Duyarlılığı | 14 |
| 2.8.3. Retinadaki Antioksidanlar | 14 |
| 2.9. Retinal İskemi-Reperfüzyon | 15 |
| 2.9.1. Santral Retinal Arter Tıkanıklığında İskemi Histopatolojisi | 16 |
| 2.9.2. Santral Retinal Arter Tıkanıklığında İskemi Fizyopatolojisi | 16 |
| 2.9.3. Retinal İskemiye Bağlı Apoptozis | 19 |
| 2.10. Ön Koşullama Uygulaması ve Ön koşullama Tedavisi | 21 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.11. | Retinal Arter Tıkanıklığı | 22 |
| 2.11.1. | Retinal Arter Tıkanıklığında Klinik | 24 |
| 2.11.2. | Santral Retinal Arter Tıkanıklığı | 24 |
| 2.11.3. | Oftalmik Arter Tıkanıklığı | 25 |
| 2.11.4. | Retinal Arter Tıkanıklığında Tedavi | 26 |
| 2.11.5. | Santral Retinal Arter Tıkanıklığı Tedavisinde Oksijenin Kullanımı | 27 |
| 2.12. | Ozon Etki ve Tedavisi | 29 |
| 2.12.1. | Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları | 36 |
| 3. | GEREÇ VE YÖNTEM | 37 |
| 3.1. | Denekler ve Deney Grupları | 37 |
| 3.2. | Ön Koşullama Tedavisi | 38 |
| 3.3. | Santral Retinal Arter Tıkanıklık Modeli | 39 |
| 3.4. | Sakrifikasyon ve Enükleasyon | 44 |
| 3.5. | Retina Kalınlığı Ölçümü | 45 |
| 3.6. | TUNEL Metodu ile Apoptoz Analizi | 46 |
| 3.7. | İstatistiksel Değerlendirme | 47 |
| 4. | BULGULAR | 48 |
| 4.1. | Histomorfolojik Değerlendirme | 49 |
| 4.2. | Retinal Kalınlık Ölçümleri | 51 |
| 4.3. | Apoptoz Değerlendirmesi | 55 |
| 5. | TARTIŞMA | 60 |
| 6. | SONUÇ | 72 |
| 7. | ÖZET | 73 |
| 8. | ABSTRACT | 75 |
| 9. | KAYNAKLAR | 77 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| APD | Afferent pupilla defekti |
| atm. | Atmosfer |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| Ca²⁺ | Kalsiyum |
| CO₂ | Karbon dioksit |
| ÇDYA | Çoklu doymamış yağ asiti |
| DETAB | Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DNT | Dış nükleer tabaka |
| DPT | Dış pleksiform tabaka |
| ERG | Elektroretinografi |
| Fe | Demir molekülü |
| FFA | Fundus floressein anjiografi |
| FRDS | Fotoreseptör dış segment |
| FRİS | Fotoreseptör iç segment |
| FRT | Fotoreseptör tabaka |
| GHT | Ganglion hücre tabakası |
| GSH | Glutasyon |
| GSH-Px | Glutasyon peroksidaz |
| GSH-R | Glutasyon redüktaz |
| GUP | Görsel uyarılmış potansiyel |
| H₂O₂ | Hidrojen peroksit |
| HBO | Hiperbarik oksijen |
| HBOT | Hiperbarik oksijen tedavisi |
| HO-1 | Hem oksijenaz-1 |
| İG | İskemi grubu |
| İLM | İç limitan membran |
| İNT | İç nükleer tabaka |
| İPT | İç pleksiform tabaka |

| | |
|-----------------------------------|---|
| K | Kontrol grubu |
| K_{ATP} | Potasyum ATP |
| KOÜ HADYEK | Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu |
| LOÜ | Lipit oksidasyon ürünü |
| Mn | Magnezyum |
| Na | Sodyum |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |
| Nd:YAG | Neodymium:yitrium alüminyum garnet |
| NO | Nitrik oksit |
| O₂^{•-} | Superoksit serbest radikali |
| O₂ | Oksijen |
| O₂G | Oksijen tedavi grubu |
| O₃ | Ozon |
| O₃G | Ozon tedavi grubu |
| OAT | Oftalmik arter tıkanıklığı |
| OH• | Hidroksil radikali |
| OHT | Otohemoterapi |
| PBS | Fosfat tampon salin solüsyonu (phosphate-buffered saline) |
| pCO₂ | Parsiyel karbon dioksit basıncı |
| pO₂ | Parsiyel oksijen basıncı |
| RADT | Retinal arter dal tıkanıklığı |
| RAT | Retinal arter tıkanıklığı |
| RNA | Ribonükleik asit |
| ROÜ | Reaktif oksijen ürünleri |
| RPE | Retina pigment epiteli |
| RSLT | Retina sinir lifi tabakası |
| SAT | Siliyoretinal arter tıkanıklığı |
| SOD | Superoksit dismutaz |
| SRAT | Santral retinal arter tıkanıklığı |
| TKR | Tam kat retina |
| TNFR | Tümör nekroz faktör reseptör |
| TUNEL | 'Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling' |

TUNEL-HRP
YBMD

TUNEL-Horseradish peroksidaz boyama
Yaş a bağlı makula dejeneresansı

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 1A. Moleküler oksijenin superoksit radikaline indirgenmesi. | 12 |
| 1B. Superoksit radikalinin hidrojen peroksitine indirgenmesi. | |
| 1C. Hidrojen peroksitten su ve hidroksil radikali oluşumu. | |
| Şekil 2. Enzimatik serbest radikal yakalayıcılarının girdiği oksido-redüksiyon tepkimeleri. | 13 |
| Şekil 3. Retinal iskemik hasar şeması. | 18 |
| Şekil 4. Optik sinirin ortaya çıkarılması. | 40 |
| Şekil 5. Optik sinir ligasyonu. | 40 |
| Şekil 6A. Sıçan gözünde normal iris görünümü. | 41 |
| Şekil 6B. Arter tıkanıklığı sırasında iris görünümü. | 41 |
| Şekil 6C. Sıçana ait normal fundus görüntüsü. | 42 |
| Şekil 6D. SRAT oluşturulan sıçanda fundus görüntüsü. | 42 |
| Şekil 7. Reperfüzyon sonrasında iris damarlarının dolumu. | 43 |
| Şekil 8. Reperfüze olmuş sıçan retinasının görüntüsü. | 44 |
| Şekil 9. Hematoksilen-eozin boyalı kesitlerde optik sinir başlangıcından itibaren 125 ve 350 µm'lik mesafenin belirlenmesi. (Hematoksilen-eozin, ışık mikroskobu, X100.) | 46 |
| Şekil 10. Optik sinirden 125 µm uzaklıkta retinal kesitler. (Hematoksilen-eozin, ışık mikroskobu, X400.) | 50 |
| Şekil 11. Optik sinirden 350 µm uzaklıkta retinal kesitler. (Hematoksilen-eozin, ışık mikroskobu, X400.) | 51 |
| Şekil 12. Kümeleşmiş TUNEL-pozitif apoptotik hücreler siyah oklarla gösterilmektedir. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı) | 56 |
| Şekil 13. Tek olarak bulunan TUNEL-pozitif apoptotik hücre. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı) | 56 |
| Şekil 14. Retinanın katları derinlemesine odaklandığında retinal damarların (siyah ok) ve apoptotik bir hücrenin (mavi ok) farklı görünimleri şekilde gösterilmektedir. (TUNEL-HRP, | 57 |

| | | |
|------------------|---|-----------|
| | ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı) | |
| Şekil 15. | K grubuna ait ‘whole-mount’ sıçan retinasından örnekler. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı) | 57 |
| Şekil 17. | İG grubuna ait ‘whole-mount’ sıçan retinasından örnekler. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı) | 58 |
| Şekil 18. | O2G grubuna ait ‘whole-mount’ sıçan retinasından örnekler. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı) | 58 |
| Şekil 19. | O3G grubuna ait ‘whole-mount’ sıçan retinasından örnekler. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı) | 59 |

TABLolar DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Tablo 1. Retinanın histolojik tabakaları | 4 |
| Tablo 2. RAT nedenleri | 23 |
| Tablo 3. Santral retinal arter ve oftalmik arter tıkanmasında klinik farklar | 26 |
| Tablo 4. Retinal kesitlerdeki ortalama skleral kalınlıklar ve gruplar arası karşılaştırılması | 48 |
| Tablo 5. Optik sinirden 125 µm uzaklıkta ortalama retinal kalınlıklar. | 51 |
| Tablo 6. Optik sinirden 125 µm uzaklıkta ortalama retinal kalınlıklara ait istatistik veriler. | 52 |
| Tablo 7. Optik sinirden 350 µm uzaklıkta ortalama retinal kalınlıklar. | 53 |
| Tablo 8. Optik sinirden 350 µm uzaklıkta ortalama retinal kalınlıklara ait istatistik veriler. | 54 |
| Tablo 9. Whole-mount yöntemiyle ayrılmış sıçan retinalarında TUNEL-HRP ile boyanmış mm ² başında düşen ortalama apoptotik hücre sayıları. | 59 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Santral retinal arter tıkanıklığı (SRAT) ani başlangıcı ve ileri derecede görme kaybına neden olmasıyla oftalmik acil olarak kabul edilen bir göz hastalığıdır . SRAT sonucunda tıkanıklık gelişen damarda rekanalizasyon sağlanmadığı takdirde iskemi nedeniyle retinada kalıcı hasar gelişmektedir. Günümüzde tıkanıklığın ve iskeminin etiyojisine yönelik yapılan tedavilerin, örneğin retinal oksijenlenmenin sağlanmasının, daha çok iskemik hasarın gelişmesinde erteleyici rolleri olduğu bilinmektedir (1). Damar tıkanıklığından sonra gelişen doku hasarının iskemiye bağlı olduğu düşünülürken, reperfüzyon sonrasında doku hasarının arttığı gözlenmesi üzerine iskemi- reperfüzyon hasarı tanımlanmıştır (2). İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir. Özellikle reaktif oksijen ürünleri (ROÜ), polimorf nüveli lökositler, kompleman sistemi, endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör iskemik kaskadda etkili nedenler arasında yer almaktadır (3).

SRAT tedavisi için birçok konvansiyonel ve alternatif yöntem denenmişse de günümüzde halen görme keskinliğini artıran ve retinada gelişen iskemi-reperfüzyon hasarını önleyecek ya da en aza indirgeyecek geçerli bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (1). Dolayısıyla yeni tedavi yaklaşımları daha çok iskemik kaskadın basamaklarını hedeflemelidir (2).

Medikal ozon (O₃) tedavisi antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal etkileri nedeniyle tıpta tedavi amacıyla geniş alanda kullanılmaktadır (4). Farmakolojik ilaçlarla tedaviden farklı olarak ozon tedavisi ilaç-reseptör ilişkisi ile değil, vücudun kendi güçlü potansiyelleri olan antioksidan ve antiinflamatuvar yolları kullanarak yarattığı alarm reaksiyonu ile vücudu hastalıklar karşısında güçlendiren bir tedavi yöntemidir (5, 6). Ozonun tedavi edici etkisi özellikle ROÜ, hidrojen peroksit ve lipit oksidasyon ürünü (LOÜ) üzerinden olmaktadır (7). Dolayısıyla ozon, iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede etkili olabileceği düşünülerek iskemi-reperfüzyon çalışmalarında tedavi amaçlı kullanılmıştır (8-9). Ozon ön koşullama tedavisinin karaciğer, kalp, böbrek gibi çeşitli organlarda iskemi-

reperfüzyon hasarını önlemede etkili olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (8-10). Ozon tedavisinde ozon toksisitesi nedeniyle ozon saf verilememekte oksijen/ozon karışımı şeklinde uygulanmaktadır (4).

Çalışmamızda, ozon ve oksijen (O₂) ön koşullaması uygulanmış olan sıçanlarda SRAT oluşturularak retinal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuş ve retinada gelişecek bu hasarı önlemede ozon ve tampon madde olan oksijenin etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla deneklerin retina dokularının histomorfolojik değerlendirmesi, ortalama retinal kalınlık ölçümleri ve TUNEL-HRP (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling - Horseradish peroksidaz boyama) ile işaretlenmiş apoptotik hücre sayımları yapılmıştır. Bu çalışmada, ozon ve oksijen ön koşullama tedavilerinden elde edilen sonuçlar birbirleriyle, kontrol grubu ve yalnız iskemi uygulanmış gruptaki deneklerin bulgularıyla karşılaştırılarak, ozon ön koşullamasının iskemi-reperfüzyon hasarını önleyici etkisi araştırılmıştır.

:2. GENEL BİLGİLER

2.1. Retina Anatomisi

2.1.1. Makroskopik Anatomi

Retina; içte duyuşal retina ve dışta pigment epiteli olmak üzere iki esas bölümden oluşan ve optik sinirden ora serrataya kadar uzanarak vitreus boşluğunun arka kısmını çevreleyen transparan bir dokudur. Ön tarafta siliyer cismin epiteli olarak devam eder. Dışta koroid, içte vitreus ile komşudur. Retinanın alttaki dokulara en sıkı bağlantı yaptığı bölgeler optik disk ve ora serrata sınırlarıdır (11). Retina önemli bölgesel değişiklikler gösterir. Retinanın kalınlığı optik disk kenarında 0,56 mm, papillomakular demette 0,23 mm, ora serratada 0,11 mm'dir. Fovea merkezi yaklaşık 0,1 mm kalınlık ile en ince olduğu bölgedir. Retina oftalmoskopik olarak üç bölgeye ayrılabilir: makula, ekvator, ora serrata (12).

2.1.1.1. Makula

Anatomik olarak makula lutea, retinanın arka bölümünün iç kısmında, optik aksın geçtiği 3 mm çapında oval, sarı renkli bir alandır (13). Klinik retina uzmanları makulayı temporal vasküler arkadlar arasındaki bölge olarak adlandırırılar. Bu bölge 5-6 mm çapındadır. Optik diskten temporale uzanan üst ve alt temporal retinal arter ve venler arasında bulunur. Makulanın merkezinde, konilerden zengin, renkli görmeden ve yüksek görme keskinliğinden sorumlu 1,5 mm çapında çukur alan olan fovea vardır. Bipolar ve ganglion hücrelerinin yanlara itilmiş olmasından dolayı retina foveada incelmıştır (12).

Fovea etrafında, ganglion hücre tabakası (GHT), iç nükleer tabaka (İNT) ve dış pleksiform tabakanın (DPT) en kalın olduğu 0,5 mm genişliğinde parafoveal alan bulunur; bu bölgeyi çevreleyen makulanın en perifer bölgesi perifovea 1,5 mm genişliğindedir. Foveanın 0,4-0,5 mm'lik merkez alanında kapillerler yoktur ve bu bölge foveal avasküler zon olarak adlandırılır. Bu bölgenin beslenmesi sadece koroiddendir (12).

Foveola, optik diskin merkezinden yaklaşık 4 mm temporal ve 0,8 mm inferioruna yerleşen fovea içerisindeki santral çukurluktur. Yaklaşık 0,35 mm çapında ve merkezde 0,1 mm kalınlıktadır. Foveolanın sınırları fovea ile belli belirsiz birleşmiştir. Genelde bu bölgede sadece fotoreseptörler, Müller hücreleri ve diğer glial hücreler bulunur (12,14). Fundusun kırmızımsı rengi, ışığın posterior skleradan, koroidin kapiller yatağından geçerek yansımaları sonucu oluşur (12).

2.1.1.2. Ekvator ve Ora Serrata

Retinanın en periferdeki ön ucu ora serratadır ve retina ile pars plananın birleştiği yerdir. Arka kutup (makula) ile ora serrata arasında kalan retina bölgesi ekvator olarak adlandırılır (12).

2.1.2. Mikroskopik Anatomi

Histolojik kesitlerde dıştan içe doğru 10 retina tabakası görülmektedir (Tablo 1). Retina pigment epitel (RPE) tabakası hariç diğer tabakalar nörosensöryal retinayı oluşturmaktadır (11,15).

| | |
|----|--|
| 1 | Retina pigment epiteli ve bazal laminası |
| 2 | Fotoreseptör tabaka (FRT) |
| 3 | Dış limitan membran |
| 4 | Dış nükleer tabaka (DNT) |
| 5 | Dış pleksiform tabaka |
| 6 | İç nükleer tabaka |
| 7 | İç pleksiform tabaka (İPT) |
| 8 | Ganglion hücre tabakası |
| 9 | Retina sinir lifi tabakası (RSLT) |
| 10 | İç limitan membran (İLM) |

Tablo 1. Retinanın histolojik tabakaları

2.2. Nörosensöryal Retina

Nöronal, glial ve vasküler elemanlardan oluşur. Burada ışık sinyalleri sinir uyarısına dönüştürülür; horizontal, bipolar, amakrin ve ganglion hücreleri arasındaki

devrelerle entegre edilip, sinir lifleri tabakası ve optik sinir yoluyla beyine iletilir. En göze çarpan glial eleman Müller hücresi olup, retinanın hemen hemen tüm kalınlığı boyunca uzanır ve retinanın iskelet desteğini sağlar. Bu hücreler glikojen sentez ve depolama kapasitesine sahip hücrelerdir ve komşu nöronları besleyici fonksiyonu üstlenirler. Diğer glial elemanlar olan astrositler kan damarları ile ilişkilidir (12).

2.2.1. Nöral Elemanlar ve Nörosensöryal Retina Tabakaları

FRT; koni ve rod hücrelerinin dış kısımları veya periferik uzantılarından oluşur. Bu hücrelerin gövdeleri görme yollarının 1. nöronudur. Rod hücreleri alaca karanlıkta, koni hücreleri ise aydınlıkta görmeyi sağlarlar. İnsan retinasında yaklaşık olarak 100-120 milyon rod, 6-7 milyon kadar koni hücresi bulunur. Rod ve koni fotoreseptör hücreleri koroide ait kapiller ağdan beslenirler (14,15). Her fotoreseptör hücresi bir dış, bir de iç segmentten oluşur. Dış segmentler RPE'nin apikal uzantılarıyla temas halindedir. Sıkı bağlantılar veya hücreler arası ilişkiler RPE ve fotoreseptör dış segmentleri arasında bulunmaz (12).

Dış limitan membran; Müller hücrelerinin dış uzantıları ile koni ve rodların iç segmentleri arasındaki zonula adherenslerin meydana getirdikleri bir tabakadır ve bundan dolayı gerçek bir membran değildir. Periferik retinada dış limitan membran, ora serrata'daki pigment epiteli ile birleşir. Oldukça gözenekli bir yapıya sahiptir (12,14,15).

DNT, koni ve rod hücrelerinin hücre çekirdekleri ile hücre gövdelerini içerir. Histolojik boyama ile rod hücrelerinin nükleusları daha yuvarlak olup küçüktür ve daha koyu boyanır. Koni hücrelerinin nükleusları ise daha kalın ve daha açık renkte boyanırlar (14,15).

Rod hücreleri 50x3 µm boyutlarında uzun hücrelerdir. Sadece soluk ışık kaynağı ile uyarılırlar. Parlak ışık ve renge duyarlı değildir. Koni hücreleri 60x1,5 µm boyutlarında uzun hücrelerdir (15). Parlak ışıkta uyarılır ve renge duyarlıdır. Foveolanın FRT'si, bu küçük alanın yüksek görme keskinliğinden sorumlu olmasından dolayı tamamen konilerden oluşur (14). Fovea total retinanın % 0,02'sini

oluşturmasına rağmen retinanın tüm koni hücrelerinin % 0,3'ü ve ganglion hücrelerinin % 25'i bu alanda bulunmaktadır (16).

DPT, retinanın 1. sinaptik tabakasını oluşturur. Horizontal hücreler, birçok rod sferülü ve koni pedikülü ile sinaptik bağlantılar yaparlar ve uzantıları yatay olarak tüm DPT boyunca ilerler (12). Bu tabakada koni ve rod hücrelerinin aksonları ile bipolar hücre nöronların dendritleri arasında sinapslar vardır. İçinde amakrin ve horizontal hücrelerin uzantılarını barındırır (14,15). DPT, makular bölgede daha kalındır ve daha fazla lif içerir. Bu bölgedeki DPT Henle lif tabakası olarak bilinir (15).

İNT'de, bipolar, amakrin ve horizontal hücrelerin çekirdekleri ile destek hücreleri olan Müller hücreleri bulunmaktadır. Bu tabakada üç bölge ayırt edilir. En dış kısımda horizontal hücreler, ortada bipolar hücreler, en iç kısımda amakrin hücreler yer alır (14,15). Müller hücre nükleusları bu tabakanın merkezinde yerleşmişlerdir (14). Bipolar hücreler dikey olarak yönelirler. Bipolar hücreler bir yandan sinir iletisini fotoreseptörlerden ganglion hücrelerine taşırlar, bir yandan da amakrin hücrelerle bağlantı kurarlar. Dolayısıyla, fotoreseptör hücrelerinin sinaptik cisimlerinin oluşturduğu desmozoma benzer bağlantı zonu bölgesi bu bölgeye komşudur. Retinal kan damarları normalde bu noktaya kadar uzanmaz (12).

İPT, bipolar hücrelerin aksonları, ganglion hücrelerinin dendritleri ve amakrin hücrelerinin uzantılarının sinaps oluşturduğu bir tabakadır (14,15).

GHT, tek katlı büyük multipolar ganglion hücre nükleuslarından oluşur. Sadece makulada çok katlıdır (12,14). Ganglion hücreleri dendritlerine göre iki tipe ayrılır: Monosinaptik (cüce) ganglion hücreleri tek bir bipolar hücre ile, polisinyaptik ganglion hücreleri ise birkaç bipolar hücre ile sinaps yaparlar. İnsanlarda GHT'de 1-1,6 milyon kadar ganglion hücresi olduğu tahmin edilmektedir. Ganglion hücrelerinin aksonları sinir lifi tabakası oluşturmak üzere retinanın iç yüzey tabakasına paralel hale gelirler ve sonra optik sinir aksonlarını oluştururlar (12).

RSLT myelinsiz liflerden oluşmuştur. Bu tabaka GHT'deki multipolar ganglion hücrelerinin aksonlarından meydana gelmiştir (15).

Dış limitan membran gibi, İLM de gerçek bir membran değildir. Retina ile vitreus arasındaki ara yüzeyde zor görülebilen bir bazal membrandır. Bu tabaka retinadan koroide doğru sıvı alışverişinde rol alır. Bu tabaka Müller hücrelerinin uzantılarından ve bazal laminayla olan bağlantılarından meydana gelir (15).

Retinada tüm hücreler ve uzantıları orta ve dış tabakalarda RPE'nin düzlemine dik uzanırken iç tabakalarda retinal yüzeye paralel seyrederek (12).

2.2.2. Glial Elemanlar

Müller hücreleri, dış limitan membrandan içe, İLM'ye doğru dikey olarak uzanan glial hücrelerdir. Çekirdekleri İNT'de yer alır. Müller hücreleri diğer glial elemanlarla beraber (fibröz ve protoplazmik astrositler ve mikroglialar) retinaya yapısal destek ve beslenme sağlarlar (12).

2.2.3. Aksesuar Glial Hücreler

Bu hücrelerden astrositler ve oligodendrositler yalnızca RSLT, GHT ve İPT'de bulunurlar. Astrositler yıldızlı hücreler olup uzantılarını sinir hücreleri ve kan damarlarının etrafına gönderirler. İki tiptedirler: Uzun ve stellat astrositler. Müller hücreleri ve RPE ile birlikte astrositler retinal glioziste rol oynarlar. Mikroglialar, makrofajlara eşdeğer fagositik hücrelerdir ve perisitlerden kaynaklanırlar. Serbest migrasyon, fagositoz vb. işlevleri vardır (11,17).

2.3. Retina Pigment Epiteli

Optik diskten ora serrataya kadar uzanır, önde siliyer epitelin pigmentli katı olarak devam eder. Tek katlı hegzagonal hücrelerden oluşmuştur. Bu hücrelerin bazal membranları Bruch membranına sıkıca yapışık olup apekslerinde villöz

uzantıları vardır. Bu uzantılar mukoid bir ortam içinde olup koni ve rod dış segmentlerini çevrelerler. Komşu RPE hücreleri birbirleriyle bir seri lateral ve hücrearası bağlantı kompleksleri ile sıkıca yapışırlar. Hücrelerin apeksleri hem zonüla okludens hem de zonüla adherenslerle sıkı sıkıya birbirine bağlıdır ve kan-retina bariyerinin oluşmasına katkıda bulunur. RPE'nin nörosensoryal retinadan ayrılmasına retina dekolmanı denir. RPE'nin, önündeki nörosensoryal retina ile anatomik bağlantısı yoktur (12,15).

2.4. Vasküler Elemanlar

Santral retinal arter, optik çanaktan girer ve superior, inferior dallarına ayrılır. Normalde arterlerde pulsasyon yoktur. Santral retinal ven ise arterin tersine optik çanaktan optik sinir içine girerek ortamı terkeder (18). Gözlerin % 30'u ve insanların % 50'sinde siliyer dolaşımdan ayrılan bir siliyoretinal arter iç retinanın bir kısmını besler (19). Bu siliyoretinal arter mevcut olduğunda retinanın herhangi bir yerini besleyebildiği gibi yaklaşık % 15 oranında makular dolaşıma katkıda bulunur (12).

Retinal kan damarları, serebral kan damarlarına benzer ve iç kan-retina bariyerinin devamını sağlarlar. Bu fizyolojik bariyer, sıkı bağlantıları ile floressein gibi elementlere geçirgen olmayan, tek tabakalı gözeneksiz endotelial hücreleri sayesinde oluşturulur. Bazal lamina endotelin dış yüzeyini kaplar. Bazal membran; kendilerine ait bazal membran materyali ile çevrelenen, aralıklı tabaka oluşturan perisit veya duvar hücrelerini içerir (12).

Müller hücreleri ve diğer glial elemanlar genellikle retinal kan damarlarının bazal laminasına tutunur. Retinal kan damarları, vücudun diğer damarlarında bulunan internal elastik laminadan ve düz kas hücre tabakasından yoksundurlar. Düz kas hücreleri bazen optik sinir başı yakınlarındaki damarlarda bulunabilirler. Retinal arteryoller periferik retinaya doğru ilerledikçe daha kesintili bir tabaka oluştururlar. Retinal kan damarları genellikle İNT'nin dış sınırından daha derine inmezler. Venüller ve arteryoller çaprazlandıkları yerde, aynı bazal membranı paylaşırlar. Venöz oklüzif hastalıklar arteryovenöz çaprazlaşma bölgelerinde daha sıktır (12).

2.5. Retina Vaskülarizasyonu ve Kan Dolaşımı

Gözün ana arteri, oftalmik arterdir. Oftalmik arterin bazı dalları orbital yapıları kanlandırırken bazı dalları da (santral retinal arter, kısa ve uzun posterior siliyer, anterior siliyer arterler) glob dokularını kanlandırır. Santral retinal arter globa optik sinir içinde girer ve retinanın iç tabakalarını dalları ile besler (20).

Uzun posterior siliyer arterler koroid ve retinanın dış tabakalarını kanlandırırken, kısa posterior siliyer arter koroidi kanlandırır (20).

Optik sinir damarlanması, optik diskten optik sinirin orbital kısmına kadar farklı damarlarla gerçekleşir (santral retinal arter dalları, posterior siliyer arter ve oftalmik arter dalları). Optik sinir başı, daha çok koroidden ve aynı zamanda retinal damarlardan kaynaklanan, anastomoz oluşturmuş küçük damarlardan meydana gelen pleksusu ile beslenir (20).

Retina beslenmesi iki sistem tarafından gerçekleştirilir. DPT'ye kadar olan iç tabakalar retinal kan dolaşımı tarafından beslenirken, diğer kısım koroidal dolaşım tarafından beslenir. Normoksik koşullarda retina oksijen ihtiyacının yaklaşık % 60'ı koroidal dolaşımdan gelir (21).

2.6. Retina Oksijenasyonu

Gözün vasküler sisteminde otoregülasyonun önemli etkisi, oksijen kaybı durumlarında kaybın minimize edilmesidir. Oftalmik arteriyel basınçta büyük oranda düşüş olmasına rağmen, görmenin korunması için mitokondrilere gerekli olan oksijenin kaybı bu yolla en aza indirgenir (22).

Sağlıklı erişkin insanda koroide yakın olan retina bölgesindeki arteriyel kandaki oksihemoglobin düzeyi 100 mmHg civarındadır. Retinanın orta tabakalarında koroid kaynaklı oksihemoglobin düzeyi neredeyse sıfıra düşer. Dolayısıyla sağlıklı bir gözde eğer retina iç tabakalarında oksijen rezervi yoksa koroid damarlarının sağladığı oksijen basıncı ve oksijen difüzyonu minimaldir. Buna

karşılık, arka kamaradan retinal yüzeye ve vitreusa doğru akımı olan aköz humordaki oksijenin difüzyonu mevcuttur. Arka kamaradan retina yüzeyine doğru olan devamlı ve stabil oksijen difüzyonu GHT'nin aerobik metabolizmasının devamını sağlayarak muhtemel rölatif iskemi olasılığını azaltır. Tamamen oksijenlenmiş retinal kan akımı retinanın aerobik metabolizmasının % 25-30'unu karşılar ve retinal kan akımında gelişebilecek bir bozukluk GHT'yi risk altına sokar. Bununla birlikte bu proses, aköz ve vitreus humordaki parsiyel oksijen basıncının (pO_2) belli düzeyde kalmasını sağlayan koroidal dolaşımın otoregülasyonundan az etkilenir (22).

Oksijen ve karbon dioksitin (CO_2) lokal düzeylerinin değişmesi, küçük damarlarda kontraktilite ve otoregülasyon üzerinde stimülasyon etkisi oluşturmaktadır. Gözdeki kan akımı engellenmeden göze gelen oksijen miktarında azalma olursa, hipobarik hipoksi durumunda olduğu gibi, buna karşı oluşan cevap retinal damarların dilatasyonu ve oküler kan akımının belirgin şekilde artması şeklinde olur. Normalde göz dokularında aktif aerobik glikolitik metabolizma hakimken pO_2 azalmasında glikoliz ve laktik asit üretimi artmaktadır (22).

2.7. Retinanın Oksidatif Metabolizması

Nükleusları DNT'de bulunan fotoreseptör hücreler başlıca fototransdüksiyonda görev alırlar. Sadece iç segmentin mitokondri içermesi ve dış segmentte mitokondri bulunmaması nedeniyle fotoreseptör dış segmentinde reaksiyonların gelişmesi için adenozin trifosfata (ATP) ihtiyaç vardır. Dolayısıyla oksidatif metabolizma sınırlanmıştır. Dış segment, ATP ve guanozin trifosfat üreten ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı (NADPH) dönüştüren heksos monofosfat yolu ve fosfokreatin mekiğini kapsayan glikolizden sorumludur. NADPH, RPE'ye izomerizasyon amacıyla dönmeden önce retinalin retinole indirgenmesinde ve glutasyonun (GSH) indirgenmesinde kullanılır. Retinol fototransdüksiyon basamaklarında kullanılırken GSH oksidatif strese karşı koruma sağlar (23).

Oksidatif metabolizma sırasında ROÜ oluşabilir. ROÜ'ye karşı iki defans yolu mevcuttur. Birinci yol superoksit dismutaz (SOD), katalaz ve peroksitler; bunların kofaktörleri olan çinko, kobalt, manganez ve selenyum kapsar (24). Bu

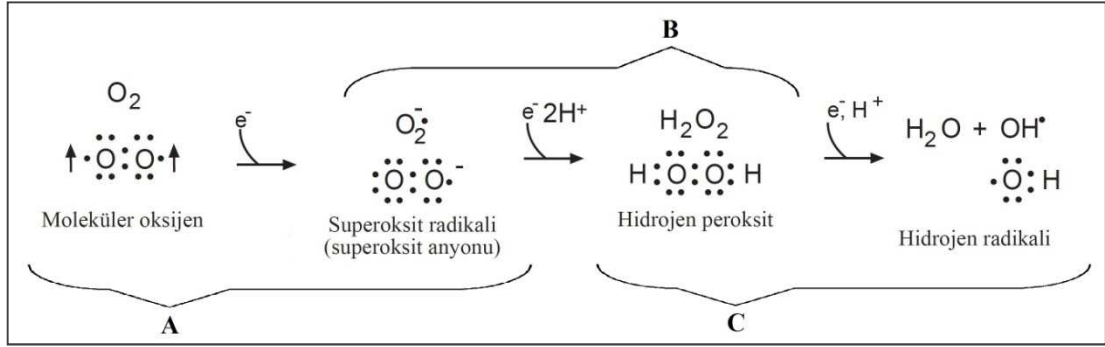
enzimler ROÜ'yü yıkarlar. İkinci yol α -tokoferol, β -karoten ve askorbat gibi besinsel komponentleri içerir. Bu komponentler lipit peroksidasyonunun başlamasını inhibe edebildikleri gibi oksidatif zincir reaksiyonunun yayılımını da önlerler. Günümüzde halen diyetteki antioksidanların etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır (23). Bunların yanı sıra lutein ve zeaksantin denilen makular pigmentlerin oksidatif hasarını sınırlandırmada rolleri olduğu tespit edilmiştir (25).

2.8. Reaktif Oksijen Ürünleri ve Antioksidanlar

ROÜ tek elektrona sahip atom veya moleküllerdir. Bu özellik onları diğer molekül türlerine göre oldukça reaktif yapmaktadır. ROÜ biyolojik sistemlerde radyoliz, fotoliz, organik materyalin termal yıkımı, metal iyonlarının ve enzimlerin katalize ettiği redoks reaksiyonu gibi çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşur (26,27). Örneğin ROÜ, oksijen varlığında doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmektedir (23). ROÜ'nün neden olduğu oksidan yıkım; iskemi, hiperoksijenizasyon ve doku inflamasyonu gibi birçok olayda yer alarak hastalıkların patogenezinde rol oynar (28).

2.8.1. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Hücresel Kaynakları

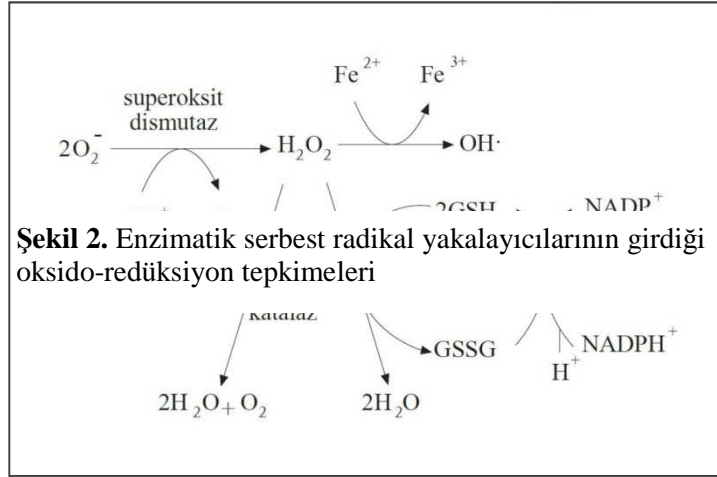
Oksijen bir oksidan ajandır. Normal koşullarda moleküler oksijenin çoğu, mitokondrilerdeki sitokrom oksidaz gibi, hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğrar. Sonunda reaktif ara sızıntı olmaksızın su olarak atılır. Bununla beraber % 1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu, ROÜ denen birçok reaktif ürün açığa çıkar. Bu yolda, metabolize olmuş oksijen, dörtlü bağlarına her basamakta birer elektron alarak univalan redüksiyona uğrar ve oldukça reaktif ara ürünler oluşur: superoksit serbest radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH\bullet$). (Şekil 1A-C) (28).



Şekil 1A. Moleküler oksijenin superoksit radikaline indirgenmesi. **1B.** Superoksit radikalinin hidrojen peroksitine indirgenmesi. **1C.** Hidrojen peroksitten su ve hidroksil radikali oluşumu

Oksiradikaller veya univalan oksijen molekülleri doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girdiğinde lipid peroksitler oluşmaktadır. Bu da yağ asit hidroperoksitlerinin hızlı oluşumuna sebep olur ve dolayısıyla membranların geçirgenliği arttığından elektrolit bozukluğuna sebep olmaktadır. Bazı serbest radikal reaksiyonlar normal hücre fonksiyonunda da görülürken diğerleri doku tahribinin önemli sebepleri olarak düşünülmektedir. ROÜ ve onların metabolitleri birçok şekilde aerobik organizma içinde üretilmektedir (23). ROÜ yüksek reaktiviteye sahip çok kısa yarı ömürleri bulunan yapılar olup, hızla doku komponentleri ile reaksiyona girebilirler ve moleküler düzeyde birçok biyolojik etkiye neden olurlar: Deoksiribonükleik asit (DNA) yıkımı, proteinlerin yıkımı ve enzim aktivitelerinde değişiklik, hücre membran lipitleri ve hücre organellerinin yıkımı, lipofusin pigmentlerin yıkımı (28). Superoksit ve hidrojen peroksit radikalleri biyolojik sistemlerde nispeten sabittir (23). Superoksit radikali, yalnızca mitokondriyal elektron transport sistemleri içinde üretilmez aynı zamanda ksantin ve ksantin oksidaz sistemleri gibi bazı enzimatik reaksiyonlar içinde de oluşur. En reaktif radikal hidroksil radikali ve fazla miktarda nonspesifik oksijen hasarı oluşturma kapasitesindedir. Bununla beraber, ROÜ normal hücre fonksiyonlarını sağlayan mitokondri ve mikrozom elektron taşıma sistemi gibi birçok biyolojik reaksiyonda da önemlidir. Enzimle katalize olan superoksit dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit bunun yanı sıra peroksizomlar tarafından doğrudan üretilir. Hidroksil radikalleri Şekil 2’de gösterilen mekanizma ile oluşabilir. Ayrıca, mevcut serbest demir (Fe), superoksit ve hidrojen peroksitten hidroksil radikal oluşumunu katalize edebilir. Demir ve bakır gibi diğer katalitik metaller, GSH’yi de içeren birkaç

molekülün enzimatik olmayan oksidasyonunu hızlandırır. Organizmada normalde oksidatif olaylara karşı korunma mekanizmaları olmasına karşın endojen superoksit radikal yapımında artış, metal komplekslerinin (hem proteinleri ve metalloproteinler gibi) ayrılması ve radikallere karşı savunmalarda eksiklik olması durumunda dokuda artmış oksidatif yıkım görülebilir (28).



Şekil 2. Enzimatik serbest radikal yakalayıcılarının girdiği oksido-redüksiyon tepkimeleri

ROÜ'nün diğer kaynakları prostaglandinler, lökotriyenler ve tromboksanların enzimatik sentezi ile üretilen ürünlerdir. Bu bileşiklerin sentezi lipoksijenaz enzimi ile araşidonik asit hidroperoksit oluşumu veya siklooksijenaz enzimi ile siklik peroksit oluşumu ile başlar. Fagositlerin NADPH oksidaz sistemi özellikle iltihabi reaksiyonlarda ROÜ açığa çıkarır. ROÜ üretimi iyonizan radyasyon ve karsinojenik bileşikler dahil birçok kimyasal ve ilacın metabolizması ile ilgilidir (23).

2.8.2. Retinamın Reaktif Oksijen Ürünlerine Olan Duyarlılığı

Deneyisel veriler, retina fotoreseptörlerinin hiperbarik oksijen, demir yüklemesi veya vitreus içine yağ hidroperoksiti enjeksiyonu gibi oksidatif ortamlarda dejenere olduklarını göstermiştir. Ayrıca oksidatif stres olmasa da retina, yağ peroksidasyonu seviyesini yükselten antioksidatif savunmaların zayıfladığı durumlarda dejenere olur. Retina yağ peroksidasyonuna, birkaç karakteristik özelliğine bağlı olarak daha hassastır, bunlardan önemli olanları şunlardır (23):

- Vertebralılarda retina rod dış segmentleri çoklu doymamış yağ asiti (ÇDYA) miktarının fazla olmasından dolayı oksijen hasarına uğrarlar.
- Rod iç segmenti aktive oksijen türlerinin sızıntısının görülebildiği mitokondrilerden zengindir.
- Koroid ve retina damarlarındaki mükemmel oksijenasyon oksidatif hasar riskini artırır. Oksijen basıncı koroidde en yüksektir ve mitokondrinin yüksek metabolik ihtiyacından dolayı iç segmentlerde düşer.

RPE test edilen tüm türlerde endoplazmik retikulum ile doludur ve antioksidan enzimlerden zengindir. Pigmente hayvanlarda RPE ışık tuzağı olarak fonksiyon gören melanin granülleri içerir. Melanin genellikle fotoprotektif olarak düşünülse de göz dokusunda ışık hasarından korunmadaki rolü anlaşılmamıştır. Bulgulara göre RPE diyetdeki antioksidan eksikliğine hassastır ve ışıkla aktifleşen melanin fototoksiteyi artırabilir. Eğer bir RPE hücresi ölürse, o RPE hücresi tarafından desteklenen çok sayıda fotoreseptör hasarlanır veya ölür (23,29).

2.8.3. Retinadaki Antioksidanlar

Biyolojik sistemlerde serbest radikal temizlenmesi, univalan oksijenin yok edilmesi ve hidroperoksitlerin enzimatik indirgenmesi gibi birkaç antioksidan mekanizma gösterilmiştir. Nonenzimatik olanlar; askorbik asit (C vitamini), melanin, selenyum, vitamin E ve karotenoidlerdir (lutein, zeaksantin). Enzimatik olanlar ise SOD, katalaz ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon transferaz, GSH ve glutatyon redüktazdan (GSH-R) oluşan glutatyon sistemidir (23,30).

2.9. Retinal İskemi-Reperfüzyon

İskemi, bir dokuya kan akımının yetersizliğini ve hücrel enerji ihtiyacının karşılanmasındaki yetersizliği ifade eden patolojik bir durumdur. İskemi, dokuları üç gereksinimden yoksun bırakır: oksijen, metabolik substratlar ve atık ürünlerin uzaklaştırılması. Bunun sonucunda homeostatik cevap azalır ve zamanla doku hasarı artar. Eğer bu durum uzun sürerse doku infarktüsü gelişir. Retinada ortaya çıkan değişiklikler iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir (2).

Retina iskekiye diğer sinir dokulardan daha dirençlidir. Karotisin oklüzyonu ile oluşturulan iskekiye, beyinde 2. dk.da yapısal değişikliklere neden olmasına rağmen retinada iskemik değişiklikler 30-60 dk.lık iskemiden sonra ortaya çıkmaktadır (31-34). 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. Bu yöntemle oluşturulan iskemide, en önemli değişikliğin iç pleksiform tabakada inceleme biçiminde gözleendiği rapor edilmiştir (35). Anderson ve Davis maymunlar üzerinde yaptıkları çalışmada hafif derece iskemide retinanın periferik kısmının daha fazla etkilendiğini bildirmişlerdir (36).

Foveası olmayan hayvanlarda, örneğin sıçanlar, retinal iskekiye sonucunda Japon bayrağı görülmemekte ve fundusta yaygın beyazlaşma izlenmektedir. Memeli hayvan modellerinde yapılan çalışmalar sonucunda insanlardaki retinal iskekiye modeline en uygun hayvan modeli belirlenmeye çalışılmıştır. Vasküler paternlerin türler arasındaki farklılığı da göz önüne alınacak olursa, yüksek primatlar dışında, retinal iskekiye modeli için sıçanlar en uygun deney hayvanı olarak kabul edilmiştir, çünkü retinal ve koroidal kan dolaşımı insanlara en yakın olandır (37). Holanjiyotik vasküler paternli hayvanlarda (örneğin sıçan, kedi, köpek, domuz ve koyun) tüm retinal alan direkt olarak kanlanma özelliğine sahiptir (2). Sıçanda başlıca kanlanmayı sağlayan damar tek bir posterior siliyer arterdir ve bu arter optik sinir başı seviyesinde santral retinal arter, medial ve lateral uzun posterior siliyer arter dallarına ayrılır. Bu ana damarın tıkanması insanlardaki SRAT'ye benzemeyen şekilde retinanın tüm katlarını içerebilen hasara neden olur (2).

İskemi oluşmuş dokuda kan akımı yeniden sağlandığında ortaya çıkan hasara reperfüzyon hasarı denmektedir (2). İskemiden sonra gelişen reperfüzyon paradoksik olarak hasar prosesini devam ettirir ve bunu ekstraselüler nörotransmitterlerin artmış düzeyi, ROÜ ve reokside olduklarında daha önce hasarlanmamış hücelere hasar veren atık ürünler ile gerçekleştirir (38).

2.9.1. Santral Retinal Arter Tıkanıklığında İskemi Histopatolojisi

SRAT akut dönemde iç retinal tabakalarda ödem gelişir ve dolayısıyla normalde şeffaf olan retina yarı saydam ve gri görünüm alır. Retinal ödem oklüzyondan sonraki birkaç saat içinde gelişmeye başlar ve 24 saat içinde en yüksek düzeye ulaşır. Histolojik olarak iç retinal tabakaların şişmesi İNT'nin dış kısmına kadar ilerler, dış tabakalara ulaşmaz (39). Nöral hücelerde intrasellüler ödem, ganglion hücelerinde piknozis görülür (40).

İskemi kronikleştikçe iç retinal tabakalar ve aralarındaki sınırlar kaybolur ve retinal damarlar hyalinize olur. Glial hüceler diğer retinal elemanlarla birlikte apoptoza uğradığından gliozis görülmeyebilir. Dış retinal tabakalar daha iyi korunmuştur (41). Şiddetli iskemilerde retinal hücelerde nekroz gözlenirken daha hafif iskemilerde apoptozis ortaya çıkmaktadır (42).

İnsanda, genellikle, SRAT sonucunda iç tabakalarda iskemi gelişip dış tabakalar nispeten normal gözükürken; oftalmik arter tıkanıklığında (OAT) tüm tabakalarda iskemik bulgular izlenmektedir (2).

2.9.2. Santral Retinal Arter Tıkanıklığında İskemi Fizyopatolojisi

İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir. Özellikle ROÜ, polimorf nüveli lökositler, kompleman sistemi, endotel hüceleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır (3).

İskeminin başlamasıyla birlikte hücrenin aerobik solunumu etkilenmekte ve ATP düzeyinde azalma olmaktadır. ATP üretimi durduğu halde tüketimi devam ettiğinden, hipoksantin ve ksantin gibi purin metabolitleri ATP yıkımı ile birikmekte ve ksantin dehidrogenaz enzimi, ksantin oksidaz olan aktif formuna dönüşmektedir. İskemide hipoksantin, ksantin oksidaz ile ürik asite dönüşmektedir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanmaktadır (43). Bu nedenle reperfüzyon sırasında aşırı oksijenlenme ile endoplazmik retikulum, mitokondri, plazma membranı ve sitoplazmada aşırı miktarda superoksit anyonu üretilmektedir (3).

İskemi-reperfüzyon sırasında oluşan bir RO \dot{U} olan superoksit anyonu oluşması ile zincirleme reaksiyonlar başlamakta ve endotel hücrelerinde diğer oksijen radikalleri ile birlikte hidrojen peroksit oluşmaktadır. Daha sonra gelişen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşmaktadır. Bunlara karşı başlıca antioksidan enzimler SOD, katalaz ve GSH-Px'tir. Oluşan RO \dot{U} lipit peroksidasyonu, protein ve DNA hasarına neden olmaktadır. Ayrıca anaerobik metabolizma sonucunda laktik asit oluşmakta, hücre membranı boyunca iyon gradienti kaybı ile hücresel mekanizmalar hasara uğramaktadır (2).

İskemi yönteminden bağımsız olarak, hücresel enerjinin kritik bir değerin altına düşmesi hücrelerde bir depolarizasyon dalgasına yol açar ve iskemik kaskad denen bir dizi reaksiyonun gelişmesine neden olur. Bu kritik enerji değeri ve iskemiye bağlı reaksiyonların tipi hücre tipine göre değişmektedir. Günümüzde iskeminin etyolojisine yönelik yapılan tedavilerin, örneğin retinal beslenmenin sağlanmasının, daha çok iskemik hasarın gelişmesinde erteleyici rolleri olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla yeni tedavi yaklaşımları daha çok iskemik kaskadın basamaklarını hedeflemelidir. İskemik kaskad hücresel ve moleküler düzeyde birbiri ile ilişkili birçok patolojik değişiklikleri içeren kompleks bir reaksiyon dizisidir (Şekil 3). İskemide, enerji azlığı ile gelişen membran depolarizasyonu ile glutamat

gibi bazı eksitatör nörotransmitterler salınmaktadır. Glutamat ise hücre içinde kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) salımını artırarak hücre protein ve elemanların yapısal bozulmasına neden olur. Artan anaerobik glikoliz nedeniyle oluşan ilerleyici asidoz mitokondriyal disfonksiyona neden olur. Nitrik oksit birikimi ve membran fosfolipitlerinin yapısal bozulmaya uğraması nörotoksik ROÜ oluşumuna katkıda bulunmaktadır. İnflamatuar mediyatörlerin aktivasyonu ile sitokin, fosfolipaz ve kemokinlerin salınımı sağlanarak ikincil nöronal hasar gerçekleşir. Ek olarak kaspazlar gibi sistein proteazlarının gen ekspresyonu ve büyüme faktörlerinin artırılmasıyla hücre ölümü indüklenir. Bu karmaşık süreçteki basamakların birbiri ile ilgisi ve patolojik bulgularla ilişkisi tam olarak ortaya konamamıştır. Dolayısıyla araştırılmakta olan tedavilerin çoğu bu kaskadın yukarıda bahsedilen basamaklarına yöneliktir (2).

ROÜ iskemi-reperfüzyon sırasında hücre hasar ve yıkıma neden olmaktadır (44,45). Dolayısıyla doğal antioksidan savunma sistemini tetikleyen ve destekleyen her tedavinin bir ölçüde nöroprotektif etkisi bulunmaktadır. Muller ve ark. tavşanlarda göz içi basıncını ile indükledikleri iskemi modelinde ROÜ üretiminin arttığını ve dimetiltiyüöre ya da diğer antioksidanlarla bu ürünlerin azaltılabildiğini göstermişlerdir (46).

Retinayı iskemi-reperfüzyon hasarından korumada etkisi araştırılmış diğer antioksidanlar şunlardır: vitamin E (47), alfa-lipoik asit (47,48), SOD (34,49), katalaz (49), desferoksamin (50), mannitol (51) ve allopürinol (52).

2.9.3. Retinal İskemiye Bağlı Apoptozis

Apoptoz, hasarlı fonksiyon ve yapıya sahip hücrelerin genetik olarak kontrol edilen bir mekanizma ile çevre hücrelere zarar verilmeden programlı ölüm olayıdır. Fizyolojik durumlarda görülebilmemesinin yanı sıra patolojik etkenlerle de ortaya çıkabilir, hücre bütünlüğünü bozarak nekroza neden olan her durum hücre hala yaşıyorsa apoptozla sonuçlanabilir. Yapılan çalışmalarda apoptotik hücreler glokom, retinitis pigmentoza, retinal iskemi reperfüzyon, katarakt oluşumu ve retinablastom gibi oküler hastalıkların patofizyolojisinde de tanımlanmıştır (53)

Organizmada hücreler nekroz ve apoptoz olmak üzere iki farklı yolla ölürlür. Bu iki mekanizma karakteristik morfolojik ve biyokimyasal özellikleriyle birbirinden ayırt edilebilir. Nekrozda hücreler toplu olarak ölürken, apoptozda teker teker ölürlür. Apoptozda tipik olarak sitoplazma ve nükleus büzülür ve yoğunlaşır. Işık mikroskopunda yoğunlaşma bulgusu olarak piknotik nükleus görülür. Elektron mikroskopide nükleustaki kromatin elektron dens olup nükleus iç zarının altında birikir. Hücre içinde, sitoplazma kalıntıları ve/veya yoğunlaşmış nükleus parçalarının oluşturduğu apoptotik cisimler oluşur. Apoptotik cisimler ve hücre parçaları makrofajlarca ya da çevre hücrelerce temizlenir (53,54).

İskemi, bazı toksik elementler, irradasyon, neoplastik transformasyon sonucu gelişen hücresel hasar ya da anormallikler sonucu apoptozis uyarılabilir. Bu durumlarda apoptozis uyarısına neden olan patoloji DNA ve proteinlerde gelişen bozukluklardır (53). DNA apoptotik hücrede büyük parçalara ayrılır. DNA bozulması sürecinde rol oynadığı düşünülen ve kalsiyum tarafından aktive edilen nükleaz apoptotik süreçte önemli yer tutar (55). Ayrıca hücrede gelişen hasar sonucu hücre ve organizma metabolizmasının devamında önemli görevleri olan trofik faktörlerin (örneğin nörotrofin, nörotrofik faktörler, sitokinler ya da büyüme faktörleri) üretilmemesi sonucu yine hücresel apoptosiz uyarılabilir. Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak apoptozisi harekete geçiren sinyaller üretebilirler (56). Apoptozide rol alan membran reseptörleri arasında en önemli grup tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesidir. TNFR ailesi içinde apoptoz oluşturulan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları adaptör proteinlere bağlanır. Bunlar da apoptozis için başlatıcı olan kaspazlara bağlanır. Bir sitokin olan TNFR ile birleşmesi ve etkileşimi sonrasında gelişen bir dizi değişiklik ile prokaspaz-8'i aktifleştirir ve apoptozise neden olur (57,58). Bunun yanı sıra hücre içinden kaynaklanan sinyaller (DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları) hücreyi apoptozise götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir (54).

İskemiye neden olan retinal hastalıklar hücrelerde apoptozise neden olabilir. Retina dekolmanında fotoreseptör hücrelerin beslendikleri koroidal dolaşımdan ayrılması ve RPE desteğini kaybetmesi ile bu hücrelerde kayıp gelişmektedir (53).

Büchi göz içi basınç artışı ile sıçan retinalarında oluşturduğu iskemi- reperfüzyon modeli sonucunda yaygın retinal hücre kaybı olduğunu ve bunlardan bir kısmının apoptotik morfoloji gösterdiğini gözlemlemiştir (59).

İskeminin indüklediği apoptozis glutamat gibi eksitotoksinlerin salınması ile yönetilir. Glutamatın yüksek konsantrasyonlarında nöronlardaki N-metil-D-aspartat reseptörleri aşırı uyarılır ve hızlı kalsiyum iyonu salınımı ve birçok olguda nitrik oksit sentetaz enziminin aktivasyonuna neden olur. Bu enzimin aktivasyonu ile nitrik oksit üretilir ve nitrik oksitin ROÜ ile etkileşimi sonucunda da peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit hem DNA kırılmalarına hem de proteinlerin yapısında değişime neden olur. Ağır iskemik koşullarda glutamatın yüksek oranda salınımı sonucu oluşan hücre ölümü nekroza bağlı iken, orta derecede iskemi sonucu ölüm apoptozise bağlı gerçekleşir (53).

2.10. Ön koşullama Uygulaması ve Ön koşullama Tedavisi

1986'da Reimer ve arkadaşlarının köpek miyokardlarının, dört kısa epizot iskemi ve reperfüzyona maruz kalanlarının, önceden maruz kalmayanlara göre, daha uzun iskemi periyotlarında iskemiye iyi tolere ettiklerinin göstermesi, ön koşullama ('preconditioning') teriminin ileri sürülmesine yol açmıştır (60). Taşikardi, hipoksik perfüzyon ve farmakolojik ajanlar gibi diğer uyaranların, myokarda ön iskemik ön koşullamanın benzeri koruyucu etkiyi taklit ettikleri gösterilmiştir ve dolayısıyla farmakolojik ön koşullama deneysel çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (61). Erken koruma mekanizmasında potasyum-ATP (K_{ATP}) kanallarının farmakolojik ya da iskemi tarafından oluşturulan blokajı ile potasyum dışı aşırı akımının etkileri gibi benzeri etkiler yoluyla koruyucu etki görülmektedir. Oysa geç koruma mekanizmasında etki, uygulamadan ortalama 24 saat (12-72 saat) sonrasında görülmekte ve bu ikincil etkinin oluşmasında koruyucu proteinlerin üretiminin etkili olduğu öne sürülmektedir. Bu proteinlerden olan antioksidan enzimlerin üretimi, iskeminin de içinde bulunduğu bazı stres durumlarında artar (62). Örneğin, Hoshida ve arkadaşları köpek kalbinde yaptıkları bir çalışmada iskemiden 24 saat sonra MnSOD enziminin arttığını tespit etmişlerdir (63). Roth ve arkadaşları iskemi

sırasında adenozinin retinal kan akımını artırdığını göstermişlerdir (64). Larsen, sıçan retinalarındaki iskemik hasarın adenzin deaminaz inhibitörü enjeksiyonu ya da A1 reseptör antagonisti enjeksiyonu ile önlendiğini, elektoretinografi (ERG) bulgularının yardımıyla göstermiştir (65).

Kontrollü kısa bir periyot sublethal iske miyle oluşturulan iskemik ön koşullamaya maruz kalmanın, daha sonraki daha uzun lethal bir iske mi epizotunda oluşan hücre sel hasarı azaltan dokuyu koruyucu bir mekanizma olduğu gösterilmiştir. Literatürde, ön koşullama ile ilişkili diğer bir terim olan farmakolojik ön koşullama, farmakolojik ajanların oklüzyondan önce verilerek infarksiyonu azaltıcı etkisinin araştırılmasını ifade etmektedir. Ön koşullamanın koruyucu etkisinde, iske mi ile tetiklenme sonucu intrasellüler bazı mediyatörlerin rol oynadığı söylenmektedir. Bunlardan en önemli ikisi; K_{ATP} kanalı ve protein kinaz C'nin spesifik izoformlarıdır. Ön koşullamada adenozinin yanında bradikin ve opioidler de tetikleyici rol oynarlar (66).

Yellon ve arkadaşları, ön koşullanmış kalplerde, 24 saat sonra ön koşullamanın oluşturmuş olduğu korumanın yeniden sergilendiğini göstermişlerdir. Buna "gecikmiş ya da geç ön koşullama" denir (67).

2.11. Retinal Arter Tıkanıklığı

Retinal arter tıkanıklığının (RAT) birçok etiyolojik nedeni mevcuttur (Tablo 2). Birçok vakada, ister başka bir bölgeden kaynaklanan emboliye, ister tromboz gelişimine bağlı olsun genelde obstrüksiyon alanında ateroskleroz ile birliktelik vardır. Erkek cinsiyet, ilerlemiş yaş (60 yaş ve üstü), hipertansiyon, kalp ve damar hastalıklarının varlığı, diyabet, kollajen damar hastalıkları, pıhtılaşma bozuklukları, hiperlipemi, şişmanlık, sigara kullanımı, özellikle baş-boyun bölgesindeki travmalar, cerrahi ve radyolojik işlemler, retrobulber enjeksiyon, retina dekolmanı cerrahisinde olduğu gibi ani göz içi basıncı yükselmeleri, prepapiller arteryel lup ve optik disk druzeninin varlığı RAT için risk faktörleridir (68,69).

Sirkülasyonun proksimal kısmından kaynaklanan emboli retinal arteryel ağa gelir ve kan akımında obstrüksiyon oluşturur. Embolinin durduğu nokta rölatif olarak damarın çapına bağlıdır. Retinal embolinin en önemli kaynağı karotid arterlerin aterosklerotik hastalığıdır (68).

| |
|---------------------------------|
| Emboli |
| Tromboz ± aterosklerozis |
| Vazospazm |
| Artmış göz içi basıncı |
| Vaskülitler |
| İnfeksiyöz hastalıklar |
| İatrojenik |
| Oküler anomaliler |
| Travma |
| Konjenital trombofilik durumlar |
| Akiz trombofilik durumlar |

Tablo 2. RAT nedenleri

RAT esas olarak üç mekanizma ile gelişir (68): embolizasyon, vazoobliterasyon ve damar rüptürü, göz içi basıncı yükselmeleri.

RAT'nin en sık nedeni embolizasyondur (1,68). Bazı kardiyak anomaliler (70,71), erkek cinsiyet, ilerleyen yaş, hipertansiyon, sigara kullanımı ve hiperkolesterolemi emboli için risk faktörleridir. Embolik materyal tipi olarak kolesterol, trombüs, kalsifikasyon, yağ, bakteriyel vejetasyon, tümör, amniyotik sıvı örnek verilebilir. En sık üç tür emboli ile karşılaşılır: kolesterol, trombüs embolileri ve kalsifik emboliler (68,72). En sık emboli türü, parlak sarı renkli kolesterol embolisidir (% 75) (Hollenhorst plakları). Kolesterol plaklarının en sık kaynağı, karotis arterdeki ya da aortadaki nekroz ve ülserasyona giden aterosklerotik plaklardır. Trombüs embolileri; aterom plağının yer aldığı bölgelerde bulunur. Bunlar kolesterol plaklarına oranla daha büyükçe ve çok sayıdadırlar. Kalsifik emboliler; seyrek görülen ama büyüklük olarak diğer embolilere göre daha iri olan ve bu nedenle de arter tıkanma olasılığı yüksek olan kalsifik embolilerdir. Vazoobliterasyon geniş anlamda, arteryel tıkanma olarak ele alınsa da burada başlıca üç ayrı

mekanizma düşünölmelidir: vazospazm; primer vasköler duvar patolojileri; dolaşımı engelleyen travma, kitle ya da anomaliler. Ani göz içi basıncı yükselmelerinde tansiyonun çok uzun süre yüksek kalması halinde oluşan optik sinir başı ödemi ve iskemik retina değişiklikleri tam bir retinal arter tıkanıklığı yaratmasa bile ciddi dolaşım bozukluklarına yol açarak aynı prognoza giden değişimlere neden olur (68,72).

2.11.1. Retinal Arter Tıkanıklığında Klinik

RAT ani ağrısız görme kaybı ile şikayeti ile karakterizedir. Görme alanı kaybı genelde bir gözde izole olmakla beraber o göz için parsiyel (retinal arter dal tıkanıklığı [RADT] ve siliyoretinal arter tıkanıklığında [SAT] göröldüğü gibi) ya da total (SRAT ya da oftalmik arter tıkanıklığı) olabilir. Noktörmal hipotansiyona bağlı sabah görme defekti, öyküsünde önceki döneme ait geçici görme kayıpları, amorozis fugaks epizotları mevcuttur (72,73).

Hastalık sık görölmemesine karşın önemi; ani ve ağır görme kaybı oluşturması, tıkanıklığın kısa sürede kalıcı görme kaybına neden olabilecek geri dönüşümsüz hasar bırakması ve dolayısıyla hastalık durumunun acil durum olarak kabul edilmesinden kaynaklanmaktadır (72,73).

RAT'de tıkanan arterin yerine göre 4 klinik tablo vardır: SRAT, RADT, SAT ve OAT (73).

2.11.2. Santral Retinal Arter Tıkanıklığı

SRAT'nin insidansı konusunda değişik veriler olmasına karşın son yayınlara göre insidansın yılda 0,85/100.000 civarında olduğu tahmin edilmektedir (74). Hastalık genelde yaşlı popölyasyonda ve erkeklerde sık görölmektedir ve ortalama tanı yaşı 60 yıldır. % 1-2 dolayında bilateral gelişim olabilir. Santral retinal arterin lamina kribrozayı deldiğı noktada ateroskleroz gelişebilir ve bu bölgede tam ya da parsiyel oklüzyon gelişebilir (72). SRAT'de ani ağrısız görme kaybı tipiktir. % 90

olguda ışık hissi ve el hareketi düzeyindedir. Siliyoretinal arterin bulunduğu ve korunduğu vakalarda görme nispeten korunmuştur (1,72). Afferent pupilla defektinin (APD) varlığı ilk önemli belirtidir (73). Akut fazda retina arteryollerinde difüz daralma, damar çaplarında düzensizlik, kan sütununda segmentasyon, retinal beyazlaşma görülür. Bu bölgenin sınırları net olarak izlenebilir ve beyazlaşma, iskemik retina alanındaki aksoplazmik akımın durması ile ilgili olarak gelişir. Emboli vakaların 1/4'ünde görülür. 4-6 hafta sonra fundus normal görünümüne dönebilir. Ancak iç retinal hücre kaybı nedeniyle optik atrofi gelişebilir. Geç dönemde difüz iç retinal ödem ve gliosis, optik diskte solukluk ve atrofi, damarlarda difüz incelleme, rubeosis iridis, nadiren retina ve disk neovaskülarizasyonları ve RPE değişiklikleri görülür (72,73). Total arteryel oklüzyon 1,5 saatten uzun sürdüğünde irreversibl retinal hasar gelişebilir (1). Retina ve iriste neovaskülarizasyon nadiren görülür çünkü etkilenen doku iskemikten çok nekrotik haldedir (72).

2.11.3. Oftalmik Arter Tıkanıklığı

Klinik olarak, SRAT düşünülen hastalarda % 5'lik bir kesimin aslında OAT olduğu düşünülür. Gerek akut, gerekse geç evrede izole SRAT ile OAT'ı ayırt etmek her olguda kolay değildir. Oftalmik arter, santral retinal arter yanı sıra, koroidal dolaşımın da kaynağını oluşturduğu için, aradaki fark, koroidal dolaşım bozukluğu ile anlaşılmaya çalışılır. Bu fark Tablo 3'te özetlenmeye çalışılmıştır (68).

Koroidal dolaşım yetersizliği, retinanın dış tabakalarının da akut olarak bozulmasına yol açmaktadır. Bu nedenle salt SRAT'de izlenen ve koroidal dolaşım varlığının, makular alandaki bir yansıması olan Japon bayrağı görünümü, OAT'ta akut evrede izlenmez. Ancak geç evrede, koroidal dolaşımın tekrar teşekkül ettiği hallerde ortaya çıkabilir. Tipik olarak Japon bayrağı görünümünün değişik şiddette izlendiği OAT sıklığı % 50'lerin üzerindedir. Koroidal dolaşım bozulmasının önemli belirtilerinden birisi de dış retinal tabakalar ve RPE'de beslenme kusurunun oluşması ve bunun sonuçlarıdır (68).

| Klinik görünüm | SRAT | OAT |
|--|---------------------------|----------------------------------|
| Görme keskinliği | Parmak sayma, el hareketi | Sıklıkla absolü |
| Japon bayrağı | Var | Var/Yok |
| Retinal solukluk | Hafif | Ağır |
| Pigment düzensizliği | Yok | Var |
| Optik atrofi | Hafif | Ağır |
| Fundus floressein anjiyografisi (FFA) | Retinal dolaşım bozuk | Retinal + koroidal dolaşım bozuk |
| ERG | b dalgası silik | a ve b dalgası silik |

Tablo 3. Santral retinal arter ve oftalmik arter tıkanmasında klinik farklar

OAT’da erken evrede, salt retinal arter tıkanıklıklarına oranla daha belirgin bir retinal solukluk oluşması dış tabakaların da ödemlenmesi ile ilgilidir. Geç evrede ise RPE’deki pigment migrasyonu ve düzensizliği, bu tabakanın beslenme bozukluğunu yansıtan geç bir belirtidir. Salt SRAT olduğunda RPE düzensizliği oluşmamaktadır. Bu değişimlere bağlı bulgular ERG’de gözlenebilir. OAT’ta toplam olarak retinal tabakaların hepsi etkilendiği için hem ‘a’ hem de ‘b’ dalgası silinmektedir. Oysa SRAT’de salt ‘b’ dalgasının bozulması izlenir. Bu bulgu iki durumun ayırımında önemlidir. FFA’da ise, erken koroidal ‘flush’ olarak tanımlanan koroid dolmasında belirgin azalma, soluklaşma ve gecikme izlenebilir (34,68,73).

OAT tablosunda görme kaybı çok ciddidir, % 90 ışık hissi kaybolmuştur ve APD alınmaz (73). OAT ile SRAT etiyolojik açıdan benzerlik taşırlar. Etkili bir tedavisi yoktur. Görme prognozu iyi değildir (1).

2.11.4. Retinal Arter Tıkanıklığında Tedavi

RAT tedavisi acildir. Bir yandan sistemik nedenler araştırılırken hastalığın süratle tedavisinin başlatılması gerekir. Hayvan deneylerine göre 90-100 dk.da retinada geri dönüşümsüz hasar gelişmektedir (75). Buna rağmen akut görme kaybını

izleyen ilk 24 saatte tedaviye başlanması önerilmektedir (68). Acil tedavinin zamanında başlatılmasına karşın elde edilen sonuçlar genelde tatminkar değildir. Bu tedavide, esas olan nokta göz içi basıncının ani olarak düşürülmesi ve bu ani düşmeye bağlı olarak, santral arterdeki damar perfüzyon basıncı ile tıkalı noktadaki embolinin ileriye atılabilesidir (1). Bu amaçla konvansiyonel tedavi olarak başlıca dört yöntem tek tek ya da birlikte uygulanmalıdır (1,68): İntravenöz % 20 mannitol solüsyonu verilmesi, intravenöz (ya da oral) asetazolamid verilmesi, ön kamara ponksiyonu (parasentez) yapılması, oküler masaj yapılması (73).

Bunun dışında uygulanan tedaviler temporal arteritte erken dönemde yüksek doz intravenöz kortikosteroid tedavisi; sistemik yan etkileri olan ve etkisi tartışmalı olan sistemik antifibrinolitik ajanlar (69,70); retina dolaşımını düzenlemeye yönelik yaklaşımlar (aspirin, kalsiyum kanal blokerleri, retrobulber ve sistemik vazodilatatör ilaçların verilmesi, izovolemik hemodilüzyon, vitreoperfüzyon) ve retinayı toksik metabolik hasardan korumaya yönelik tedavilerdir (1,69,73,76-79).

Geleneksel SRAT tedavisi reperfüzyon gelişene kadarki iskemi döneminde gelişen retinal hasarı en aza indirmekle ilgileniyordu. Hastaların erken dönemde başvurmasına ve erken tedaviye başlanmasına rağmen kişilerde doku hasarının artmaya devam etmesi ile reperfüzyon hasarının tanınması sonucunda tedavide yeni bakış açısı gelişmeye başladı (21).

2.11.5. Santral Retinal Arter Tıkanıklığı Tedavisinde Oksijenin Kullanımı

1 atmosfer (atm.) basınçta hava solunduğunda normal kişilerde arteryel kanda pO₂ 100 mmHg iken, 3 atm.de bu oran hacmin % 6'sına çıkar. 3 atm. oksijen verilmeden de metabolik ihtiyaç hemoglobinden karşılanarak artırılmış olur (21). Hiperoksijenasyon ile koroidal dolaşımdan tüm retinanın oksijen ihtiyacı karşılanabileceğinden, SRAT geçici olduğu durumlarda bu fenomen sayesinde retinanın kan akımının durmuş olduğu dönemde bu yolla yaşaması sağlanabilir. Landers kedi ve rhesus maymununda yaptığı çalışmasında bunun olabilirliğini göstermiştir (80). Hiperbarik oksijenin (HBO) retinal vazokonstriksiyona neden olduğunun bilinmesine rağmen hiperoksik maruziyetin erken döneminde damar

çaplarının orjinal çaplarına yakın değerlere döndüğü (21,81) ve yüksek pO₂'de vazokonstriksiyondan çok, hiperoksijene olmuş koryokapillarisin retina oksijen ihtiyacını karşıladığı gösterilmiştir (21,82). 3 atm.den yüksek basınçta teorik olarak oksijenasyon ve iskemiye dayanma süresinin artabileceği düşünülse de merkezi sinir sistemi toksisitesi gelişme riskinden dolayı uygulanmamaktadır (83). Bu etikilere ek olarak 1 atm. ve 3 atm.de yapılan bir çalışma sonucuna göre HBO' nun göz içi basıncını düşürücü etkisinin de olduğu gösterilmiştir (84). SRAT'den sonra rekanalizasyon çoğunlukla görülse de az sayıda vakada görme keskinliğinde iyileşme ile sonuçlanır, çünkü iskemik periyotta geri dönüşümsüz hasar gelişmiştir. (1). Organizmada retina dokusu en fazla oksijen harcayan organdır (13 ml/100g/dk) ve dolayısıyla iskemiye çok duyarlıdır (21). Konvansiyonel tedavilerin görme keskinliğini düzeltmede başarısız olması üzerine denenen 1 atm.de oksijen tedavisi uygulanan bazı SRAT olgularında görme keskinliğinde düzelme, bazı çalışmalarda da retinal hipoksi önlenmesinde başarısızlık olduğu bildirilmiştir (21,85).

Hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT) için bazı koşullar gereklidir. Hasta basınç odasında tedavi süresince kapalı kalabilecek uyumda olmalıdır. Bunun dışında diğer gözünde gözenekli orbital protezi olan hastalar kollaps riski nedeniyle, intraoküler gaz/hava varlığında barotravma ve göz içi basıncı artışı riskinden dolayı kontrendikasyon oluşturur (21).

Özellikle uzamış ve tekrarlayan tedavilerde vital kapasitenin azaldığı, göğüs ağrısı ve öksürük ile giden pulmoner toksisite HBOT'nin sistemik komplikasyonlarından biridir. 1 atm.de devamlı oksijen solumada toksik etki 18 saattten sonra ortaya çıkar. Diğer bir sistemik komplikasyon mmerkezi sinir sistemi toksisitesidir. En önemli bulgusu konvülzyondur. Kas fasikülasyonu, kusma, tinnitus, konfüzyon, disfori konvülzyondan önce görülebilir (21). Kardiyovasküler toksisitede ise periferik rezistans arttığından hipertansiyon, kardiyak outputta azalma, kalp hızında azalma görülür (81).

HBOT'ta merkezi sinir sisteminde gelişen oksijen toksisitesinin oküler manifestasyonları olarak oküler toksisite görülür. Göz kapağında seyirme, bulanık görme, görme alanı daralması, vizüel halüsinasyonlar, geçici unilateral görme keskinliği azalması toksisite bulguları arasındadır. Oksijen göze direkt toksik olabilir

ve retinal oksijen toksisitesi gelişebilir. 1 atm.de oksijenin pulmoner toksisitesi daha önce ortaya çıktığından oküler toksisite görülmemektedir (21).

HBO'nun ağır maruziyetinde ERG'de atenuasyon ile sonuçlanan fotoreseptör hücre ölümü, retina dekolmanı, korneal haze, kemozis ve hifema gelişebilir (21). Retinal oksijen toksisitesine neden olabilecek faktör olarak Na-potasyum ATPaz'ın HBO tarafından inhibe edilmesi gösterilmiştir (86).

1980'de Ausberger ve Magargal konvansiyonel tedavi yanı sıra % 5 CO₂ ve % 95 O₂ karışımından oluşan karbojenin inhalasyonunu tedaviye ekleyerek görme keskinliğinde iyileşme sağlamış ve iskeminin devam ettiği durumlarda tedavinin en geç 72 saatte başlaması durumunda iyi sonuç alınabildiğini vurgulamıştır (87). Karbojenin SRAT tedavisinde konvansiyonel tedaviye ek olarak başarılı ya da başarısız olduğu sonuçları bildiren çalışmalar mevcuttur (21,88). Karbojen tedavisinin prensibinde hiperoksik vazokonstriksiyonun oksijene eklenen karbon dioksitin vazodilatasyon etkisi ile aşılması yatmaktadır. Fakat SRAT durumunda retina koroidal difüzyon ile besleniyorsa karbon dioksit eklenmesinin oksijenasyonu artırıcı etkisi olmadığı düşünülmüştür, çünkü retinal kan akımının tersine koroidal kan akımı oksijen basıncının değişiminden etkilenmemektedir (89). Oksijenin hiperbarik ortamda verilip kandaki parsiyel basıncını ve miktarını artırmak yoluyla oksijen tedavisinin etkinliği artırılmaya çalışılmıştır. HBOT uygulanan SRAT hastalarında elde edilen olumlu görme keskinliği sonuçları ile HBOT, SRAT'de kabul edilen bir tedavi haline gelmiştir (21).

2.12. Ozon Etki ve Tedavisi

Ozon ismi yunanca "koku yayan" anlamındaki ozein'den gelir (4). Ozon, 1840 yılında Christian Friedrich Schönbein tarafından keşfedilmiştir. İlk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır. Ozonun bu dezenfekte edici etkisi güçlü okside edici özelliğinden kaynaklanmaktadır. Sadece virüs ve bakterileri öldürmekle kalmaz tüm mikroorganizmalar ve toksinlerini de okside edebilir. Ozon, Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin kangren ve benzeri ciddi yaralanmalarını tedavi amacıyla ilk olarak tıbbi alanda kullanılmıştır. Ozon doğal, yüksek oranda

reaktif, üç oksijen atomundan oluşan gaz molekülüdür ve elektrik deşarjı ve/veya ultraviyole radyasyonu yoluyla, tek başına ya da nitrojen oksitleri ile birlikte üretilir . Ozon kimyasal yapı olarak radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir (90).

Hiçbir zaman solunmamalıdır çünkü ozonun toksik etkilerine karşı solunum yollarını kaplayan sıvının koruyucu etkisi ihmal edilebilir derecede düşüktür. Akciğer ve gözler ozonun toksik etkisine en hassas organlardır. Gözdeki irritasyonu ve akciğere etkileri konsantrasyon, sıcaklık, nem ve maruz kalınan süreye bağlı olarak değişir. Düşük konsantrasyonda inhalasyon ile boğazda irritasyon olabilir. Yüksek konsantrasyonlardaki inhalasyon ise bronşiyal mukoza ve pnömosit hücresi hasarına bağlı akciğer ödemeine kadar varabilir (4,90).

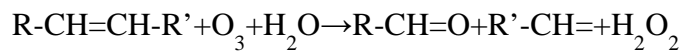
Ozon tedavisi belirli bir miktarda oksijen/ozon karışımının vücut boşluklarına ya da dolaşım sistemine uygulanmasıdır. Karışım intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraperitoneal, intrarektal vb uygulanabildiği gibi cilde topikal olarak uygulanabilir. İntravenöz uygulama olan majör otohemoterapi (OHT) en sık kullanılan yöntemdir. Ozon reaktif bir molekül olduğu için tıbbi uygulamada hiçbir zaman saf olarak verilmemeli ve belli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Dolayısıyla daima saf ozon ve saf oksijenin karışımı şeklinde kullanılır. Bu karışımında ozon en fazla % 5 ve oksijen en az % 95 oranında bulunur. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Çünkü ozonun reaktif özelliğinden dolayı hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan nitrojen dioksit oluşabilmektedir. Ayrıca emboliye sebep olmaması için ozon gaz olarak damar sistemi içerisine verilmemelidir. Tüm işlemler sırasında ozona dayanaklı malzemenin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekmektedir (5).

Ozon, diğer gazlar (O_2 , CO_2) gibi suda çözünebilir. Ozon oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Suda çözünmesi ısıya, basınca ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda oksijenden farklı olarak biyomoleküller ile hızlıca reaksiyona girer (90).

Ozonun biyolojik etkilerini açıklamak için yapılan çalışmalarda daha çok OHT model alınmıştır (91,92). OHT esnasında uygulanan oksijen/ozon

karışımındaki ozon plazmada hızla çözünür. Afinite sırasıyla ÇDYA; askorbik asit ve ürik asit gibi antioksidanlar; sistein gibi –SH içeren tiyol bileşikleri; indirgenmiş GSH ve albumin ile etkileşime girer. Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler (dolayısıyla da enzimler), DNA ve ribonükleik asit (RNA) de bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler ozon karşısında elektron vericisi gibi davranarak oksitlenirler. Ozon, plazmadaki antioksidanlar ile reaksiyona girmesi sonucu bunların miktarlarını azaltır. Sonuçta superoksit, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi ROÜ oluşur. Ozon ve ROÜ'nün yarı ömrü çok kısadır ve saniyelerle sınırlıdır. OHT sonucu ortaya çıkan ROÜ artışı ve antioksidanların azalması geçici bir durumdur (7,90). Bocci ve Carlo, yaptıkları çalışmada değişik dozlarda (20, 40, 60, 80 µg/ml) ozon uygulanmış kanlarda dozla doğru orantılı olarak GSH ve total antioksidan seviyesinde azalma, lipit peroksidasyonu ve okside GSH düzeyinde artma olduğunu göstermiş, uygulamadan 20 dk. sonrasında ise antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmişlerdir (93).

ROÜ oluştuktan sonra hızla membran lipitleri ile tepkimeye girerek LOÜ oluştururlar. Bu nedenle, daha kan hastaya geri verilemeden, yani ototransfüzyondan önce ozon ve ROÜ ortadan kaybolarak yerlerini LOÜ'ye bırakırlar. Bu ürünler, büyük oranda kanda en çok bulunan hücre olan eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur (7,90).



Bu reaksiyonda her hidrojen peroksit ile iki LOÜ oluşmaktadır. LOÜ için iyi bilenen örnekler lipoperoksil radikalleri, hidroperoksitler, malondialdehit, izoprostan, alkenaller ve 4-hidroksi-2,3-transnonenaldir (7,90).

Bu reaksiyonlardan anlaşıldığı üzere ozonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkması için ROÜ varlığı önemlidir. ROÜ, organizmada aerobik solunum sırasında mitokondride ve fagositlerde solunum patlaması gibi çeşitli fizyolojik durumlarda da oluşabilmektedir. Aerobik canlılar serbest radikallerin toksik etkilerinden korunmak için enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemlerden yararlanırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif stresin bilinen yıkıcı etkilerinin tersi etkilerinin de

olabileceği görülmüştür. Bu çalışmalarda oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarının başta hücre içi haberleşme olmak üzere biyolojik mekanizmalarda rol aldığı gösterilmiştir. Buna göre, gerek reaktif moleküller gerekse bunların çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan ROÜ düşük konsantrasyonlarda (fizyolojik düzeylerde) hücrede önemli roller üstlenmektedir (7,90).

LOÜ ve LOÜ'nün oluşumunu takiben ortaya çıkan ÇDYA'nın yarı ömürleri nispeten daha uzundur, LOÜ yarı ömrü saatlere varabilmektedir, fakat bunlar vücutta böbrek ve karaciğer tarafından çabuk elimine edilirler. Dolayısıyla etki beklenen organa çok az miktarları ulaşabilmektedir. Kandaki LOÜ temizlenme nedeniyle submikromolar düzeylere düşer fakat tedavi edici konsantrasyonların bu düzeylerde olduğu ve bunun üstündeki değerler toksik etki gösterebilmektedir. Eğer hastalığın evresi çok ileri değilse bu moleküller SOD, GSH-Px, GSH-R ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin "upregülasyonunu" tetiklemektedirler. Bu nedenle LOÜ, ozonun gecikmiş etkilerinden sorumlu tutulmaktadır (5).

Ozonlanmış kan tekrar dolaşıma verildiğinde LOÜ tarafından endotelial hücrelerde geniş sahada aktivasyon geliştirilmektedir ve nitrik oksit, plazma S-nitrozotiyol ve S-nitrozohemoglobin üretilmektedir. Nitrik oksitin yarı ömrü 1 sn.den kısadır fakat proteine bağlı nitrik oksitin yarı ömrü uzun olacağından uzak bölgelerde de vazodilatasyona neden olabilir (5).

Hidrojen peroksitin, ozonun tedavi edici etkinliklerinin bazılarında sorumlu, ikincil habercisi gibi davrandığı düşünülmektedir. İlk etkilerinden biri eritrositlerde 2,3-difosfogliserat düzeyini artırma yoluyla oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına neden olmasıdır. Bu sayede ozon her tür zor iyileşen yara, damar tıkanıklığı ve dolaşım bozukluklarından kaynaklanan "yeterli kanlanamama" kaynaklı sorunların çözümünde büyük bir yardımcıdır. Bu tür hastalarda dolaşım yetersizliğinden dolayı enfeksiyon-iltihap riski de çok artmıştır. Gerek kan yolu ile ozon uygulamaları gerekse ozonlu su gibi yara üzerine yapılan uygulamalar, mikropların öldürülmesinde büyük avantaj sağlar. Tıbbi ozon; bakterisidal, fungusidal ve virostatik özellikleri ile enfekte olmuş yaraların dezenfeksiyonunda ve ayrıca bakteri ve virüslerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılır. Ozon en potent dezenfektanlardan biri olmasına rağmen mikroorganizmalara etkisi direkt

temas mekanizması ile olmamaktadır, çünkü mikroorganizmaların güçlü antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Ozonun etki mekanizması daha çok nötrofil aktivasyonu ve sitokin sentezinin artırılması yoluyla bağışıklık sisteminin aktive edilmesi yoluyla olmaktadır. Buradaki önemli haberci yine hidrojen peroksittir (7,90). Plazmada konsantasyonu artan hidrojen peroksit kolayca hücrelerin içine difüze olarak; mononükleer hücrelerin içine girdiklerinde tirozin kinazı aktifleyerek bir dizi olaylara neden olmakta ve sonuçta lökosit ve endotel hücrelerde akut faz reaktanı, interferon ve interlökin yapıda olan birçok proteinin sentezinin başlatılmasına ve transforme edici büyüme faktörü yapımını artıran uyarıları tetikler (94). Lökositler salgıladıkları sitokinlerle lenf dokusunda parakrin etki geliştirilerek bağışıklık sisteminde reaktivasyon sağlamaktadırlar (5). Tekrarlayan ozon tedavisi seansları sayesinde oluşan bu aktivasyona cevap olarak, immün sistem hücrelerinin ürettiği sitokinler ile zincirleme reaksiyon başlatılarak diğer bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu sağlanır. Bu şekilde özellikle bağışıklık sisteminin zayıf veya bozuk olduğu hastalara uygulanmasında çok başarılı sonuçların alınmasına yol açar (90).

Ozonun doza bağlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmasından dolayı OHT yapılmadan önce ozonla karıştırılacak miktarda kanın antikoagülan verilerek hazırlanması gerekir. Trombosit fonksiyonlarındaki artışın bazı yararlı sonuçları da olmaktadır. Aktive olmuş trombositler içlerinde bulunan büyüme faktörlerini salarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu katkı sağlar (7,90,95).

Özetle iskemik bir organa uygulanan ozon tedavisi; eritrosit kümelerinin oluşmasına, bu eritrositlerin daha fazla oksijen alma kapasitesine sahip olmasına ve endotel hücrelerinden ve trombositlerden nitrik oksit, karbon monoksit ve büyüme faktörleri salınımı ile yine oksijenasyon artışına neden olmaktadır (5).

Hidrojen peroksitin suya indirgenmesini GSH, katalaz ve GSH-Px katalizlemektedir. Hidrojen peroksit çeşitli hücrelerde farklı yollarla hücre içi sinyal molekülü olarak görev görmektedir (96). Bu yollarda NADPH önemli elektron verici olarak rol oynamaktadır. Dolayısıyla gelişen bir dizi reaksiyon sonucunda ortamda belirgin ATP sentezi artışı olur (7).

Ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak artan kuvvetli okside edici özelliği nedeniyle belli bir orandan sonra vücut için de toksik etkisi olabileceği gerçeğini unutmamak gerekmektedir. OHT uygulaması sırasında kanın toplam antioksidan gücünün tedavinin etkinliğini belirlediğini söylemek mümkündür. Kanın antioksidan kapasitesi düşük, ozonun konsantrasyonu fazla olursa şiddetli membran oksidasyonu sonucu eritrositler hemolize olur, tam tersi olduğuunda ise ozondan beklenen ROÜ ve hidrojen peroksit yanıtı yeterli olmayabilir ve istenen terapötik etki görülemeyebilir. Ozon uygulamaları sonucunda oluşması beklenen ROÜ ve LOÜ'nün terapötik etki gösterebilmesi için belli bir konsantrasyonda olması gerekir (5). Yapılan çalışmalarda ozonun terapötik konsantrasyonu 10-80 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu ozon konsantrasyonu total antioksidan kapasiteyi % 25'ten fazla düşürmediği gibi azalan antioksidanlar 20 dk. sonra eski haline gelmektedir (91,92).

Ozon uygulaması ile oksidatif stres enzimlerinden olan hem oksijenaz-1 (HO-1) enziminin de uyarıldığı bildirilmiştir. Bu enzimin artışından gerek ROÜ, gerekse ılımlı eritrosit hemolizi ve dolayısıyla LOÜ sorumlu olabilir. HO-1, hem halkasının yıkım yolunda görev alan mikrozomal bir enzimdir ve yapımı oksidatif stres artışı, proinflamatuvar sitokinler ve nitrik oksit ile uyarılabilmektedir. Bu enzim hem molekülünü bilirubin ve karbon monoksit parçalar. Bilirubinin kendisi lipofilik bir antioksidan olduğu gibi, yıkımı ile ortaya çıkan karbon monoksit nitrik oksit ile etkileşerek siklik guanozin monofosfat uyarımı üzerinden vazodilatasyon düzenlenmesinde rol oynar. Son yıllarda HO-1 ile yapılmış çalışmalarda bu enzimin antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ozon uygulaması sonucu görülen en etkin HO-1 artışının aynı zamanda ozonun terapötik doz aralığı olarak da vurgulanan 20-80 µg/ml arasında ortaya çıktığı gösterilmiştir (7,90,97).

Yakın zamana kadar tedavi yöntemleri OHT ve etkisi kesin kanıtlanmamış rektal insüflasyon tedavisi üzerine yoğunlaşmaktaydı. Günümüzde yarı- total sistemik dolaşım uygulaması, ekstrakorporal dolaşım uygulaması ve daha yeni çeşitli yöntemler gündeme gelmiştir. İntraperitoneal ve intraplevral yolla tedavi, ilk olarak Rus araştırmacılar tarafından kavite içi pürülan materyalin temizlenmesinde kullanılmıştır (98). Ampiyem, peritonit gibi ciddi komplikasyonlar nedeniyle klinikte çok tercih edilen yöntemler olmayıp daha çok hayvan deneylerinde, OHT'nin teknik

açından yapılamaması nedeniyle, tercih edilmektedir. Dolayısıyla hayvanda intraperitoneal yolla uygulanan tedavilerin etkileri ile klinikte insan üzerinde OHT ile uygulanması sırasında çıkacak etkiler arasında fark bulunabilmektedir (5,98).

HBOT ile ozon tedavisinin benzer sonuçları ve etki mekanizmalarında ortak yönler olmasına rağmen aralarında belirli farklar ve buna bağlı farklı endikasyon alanları bulunmaktadır. HBO'nun vücut üzerinde iki temel etkisi bulunmaktadır. Bunların birincisi, vücut içinde çözülmüş gazların parsiyel basıncı üzerine olan mekanik etkisi; diğeri ise, kanda parsiyel oksijen basıncını artırıcı etkisidir. HBO'nun tedavi edici etkileri genel olarak bu iki ana temel üzerinden gelişmektedir. Hiperbarik odada 2,6 atm. basınç altında solunan saf oksijenin plazmadaki çözünürlüğü 5ml/dl kadar artmaktadır. Bu yolla iskemik dokulara gereken oksijen miktarı sağlanmaktadır. Dolayısıyla kronik bacak iskemisi olan, diyabetik ayaklı ya da yaşa bağlı makular dejeneresansı (YBMD) olan hastalarda HBO uygulanabilmektedir. Fakat bu palyatif tedavi olmaktan ileri gidememektedir çünkü basınç ortadan kalkar kalkmaz iskemik alanlarda tekrar hipoksi gelişecektir. Ozon tedavisinde ise oksijen/ozon ile karıştırılmış kanın vücuda soktuğu oksijen miktarı ihmal edilebilir düzeyde olmakla birlikte ozon bir seri biyolojik olayı tetikleyerek oksijen dağılımını normal düzeye getirmeyi ve bu yolla etkisini göstermeyi hedefler (5).

Hava embolisi, dekompresyon hastalığı, karbon monoksit zehirlenmesi ve klostridyal miyonekrozda HBOT'nin yüksek tedavi edici etkinliği mevcuttur. Kronik bacak iskemisi, beyin ve kalp iskemileri, otoimmün kolitlerde, orak hücreli anemide, kronik osteomyelitte, YBMD'de, diyabetik ayakta, termal yanıklarda, geniş kronik ülserlerde ve dekübitis ülserinde ise HBOT'nin etkili olabileceği fakat buna dair kanıtların yetersiz olduğu öne sürülmüştür. Ozon etki mekanizması ve endikasyonları dolayısıyla bu hastalıklarda daha uygun bir seçenek oluşturabilir (5).

Ozon tedavisi iskemik vasküler kaynaklı hastalıkların tedavisinde (örn. miyokard infarktüsü ve serebral iskemide) geçerli bir yöntemdir çünkü daha önce bahsedilen mekanizmalarla oksijen, glukoz ve ATP ihtiyacını düzenlemekte, antioksidan cevabın tetiğini çekmekte ve antioksidan enzimler, HO-1 ve ısı şok proteinlerinin sentez ve salımını artırarak iskemide benzeri ön koşullama etkisi

yaratmaktadır (133). Ozonla ilgili çalışmalarda n koşullama tedavisi yöntemi sık olarak kullanılmıştır. Ozon n koşullaması aynı zamanda oksidatif n koşullama olarak adlandırılmaktadır. Burada amaç iskemi öncesi ozon verilerek iskemik n koşullama benzeri ortam yaratıp vücudun savunma sistemini uyarmaktır.

Sonuç olarak, farmakolojik ilaçlarla tedaviden farklı olarak ozon tedavisi insan vücudunun ilaç-reseptör ilişkisi ile değil vücudun kendi güçlü potansiyelleri olan “antioksidan” ve “antiinflamatuvar” etkileri kullanarak ve tüm vücutta bir alarm reaksiyonuna neden olarak vücudu hastalıklar karşısında güçlendiren bir tedavi yöntemidir (5,6). Ozon uygulamaları yara iyileşmesi, YBMD, iskemik ve enfeksiyöz hastalıklarda yapılan çalışmalarında olumlu etkiler göstermiştir. Bunun yanında basit diş ve ağız enfeksiyonlarından hepatitlere kadar uzanan geniş bir aralıktaki çeşitli enfeksiyon hastalıklarında etkin olarak uygulanmaktadır (99).

2.12.1. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları

Ozon tedavisinin yan etkisi yok denecek kadar azdır. şimdiye kadar bildirilen yan etkiler uygulama hatalarına bağlı lokal komplikasyonlardır. Bazı durumlarda ozon terapisi uygulanması sakıncalı olabilir. Bu durumlar: glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği (favizm), özellikle erken dönem olmak üzere hamilelik, anjiotensin çevirici enzim inhibitörü tedavisi görenler, hipertiroidi, kanama bozukluğu, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler hastalıklar ve ozona reaksiyon gösteren astım hastaları olarak sıralanabilir (90).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; deneysel SRAT modeli, tedavi ve kontrol grubu için gereken tüm işlemler, sakrifikasyon işlemi Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde (DETAB) yapılmıştır. Patolojik retina kesitlerinin hazırlanması, hematoksil-eozin boyanması ve incelenmesi işlemi Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Apoptotik hücre boyama işlemleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma 26.05.2009 tarihli ve Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KOÜ HADYEK) 9/1-2009 nolu etik kurulu onayı ile Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

3.1. Denekler ve Deney Grupları

Çalışmada toplam 44 adet genç erişkin erkek Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Deneklerin ortalama ağırlığı 450 ± 40 gram olarak hesaplandı. Denekler, standart kafeslerde 11'li gruplar halinde, ad libitum standart yem ve su verilerek, ısısı (21 ± 2 °C) ve nem oranı % 60 civarında kontrol altında tutulan odalarda barındırıldı. Albino sıçanlar ışığa duyarlı olduğundan ve ışığa akut maruziyet sonucunda ya da kronik ışık maruziyetinin kümülatif etkisi ile retinopati geliştirebildiklerinden (100) çalışma ortamında ve bakım odalarındaki ışık düzeyinin önerilen düzeylerde olması flüoresan ışık ile sağlandı. Yerden 1 m yüksekte 325-400 lux arasında olacak ve ışık kaynağı kafes seviyesindeyse maksimum 130 lux olacak şekilde ayarlandı. Odanın aydınlatması için vücut ve retina için gerekli sirkadiyan ritm (101) nedeniyle her 12 saatte bir (06:00 – 18:00) açıp kapama ile aydınlık/karanlık döngüsü gerçekleştirildi.

Denekler, SRAT uygulanan (33 adet denek) ve kontrol grubu (K) denekleri (11 adet denek) olarak önce iki gruba ayrıldı. SRAT yapılan denekler şu şekilde gruplandı:

1. Yalnız SRAT uygulanan ve ön koşullama tedavisi uygulanmayan denekler grubu (İskemi Grubu – İG; 11 adet denek)
2. SRAT öncesi intraperitoneal yolla oksijen ön koşullama tedavisi verilen denekler grubu (Oksijen tedavi grubu - O₂G; 11 adet denek)
3. SRAT öncesi intraperitoneal yolla ozon ön koşullama tedavisi verilen denekler grubu (Ozon tedavi grubu – O₃G; 11 adet denek)

K grubu; hem iskemi modelinin etkinliğinin gösterilmesi hem de tedavi gruplarına ait bulgularda normalden sapma miktarının belirlenmesi amacıyla oluşturuldu. K grubuna herhangi bir cerrahi ya da medikal müdahalede bulunulmadı. K grubu denekleri intrakardiyak 200 mg/kg tiyopental (Pental, İ.E.Ulagay, Türkiye) uygulaması ile sakrifiye edildikten sonra birer gözlerine enükleasyon gerçekleştirildi.

İG grubu; bu gruptaki bulguların tedavi gruplarına ait bulgularla karşılaştırılması ile, tedavi yöntemlerinin iskemi-reperfüzyon hasarını önlemedeki etkisini araştırmak amaçlı oluşturuldu. Ozon yüksek konsantrasyonlarda toksik bir molekül olduğundan rutin uygulamada medikal ozon tedavisinde oksijen/ozon karışımları kullanılmaktadır. Bu çalışmada ozon tedavisi uygulamasında kullanılan ozon miktarının düşük düzeylerde ve oksijen/ozon karışımındaki oksijenin ise yüksek miktarda olması nedeniyle, ozon tedavi grubunda iskemi-reperfüzyon hasarını önlemedeki etkinin oksijene bağlı mı yoksa ozondan mı kaynaklandığının ortaya koyulması amacıyla oksijen tedavi grubu oluşturuldu ve bu iki tedavi grubu da birbiriyle karşılaştırıldı.

3.2. Ön Koşullama Tedavisi

Ön koşullama tedavisi O₂G ve O₃G gruplarına uygulandı, İG ve K gruplarına herhangi bir medikal tedavi uygulanmadı. O₂G ve O₃G gruplarındaki deneklere ardışık 3 gün, her gün aynı saatte (saat 10:00), intraperitoneal yolla ön koşullama tedavileri uygulandı. Ön koşullama tedavisi olarak, O₃G grubundaki deneklere intraperitoneal yoldan 0,7 mg/kg dozunda O₃ gazı verildi. Bunun için ozon jeneratörünün (Ozonosan photonik, Dr. J. Hänslers GmbH, Iffezheim Germany) konsantrasyonu 75 µg/ml'ye ayarlandı. Ağırlığı 420-550 g arasındaki sıçanlar için

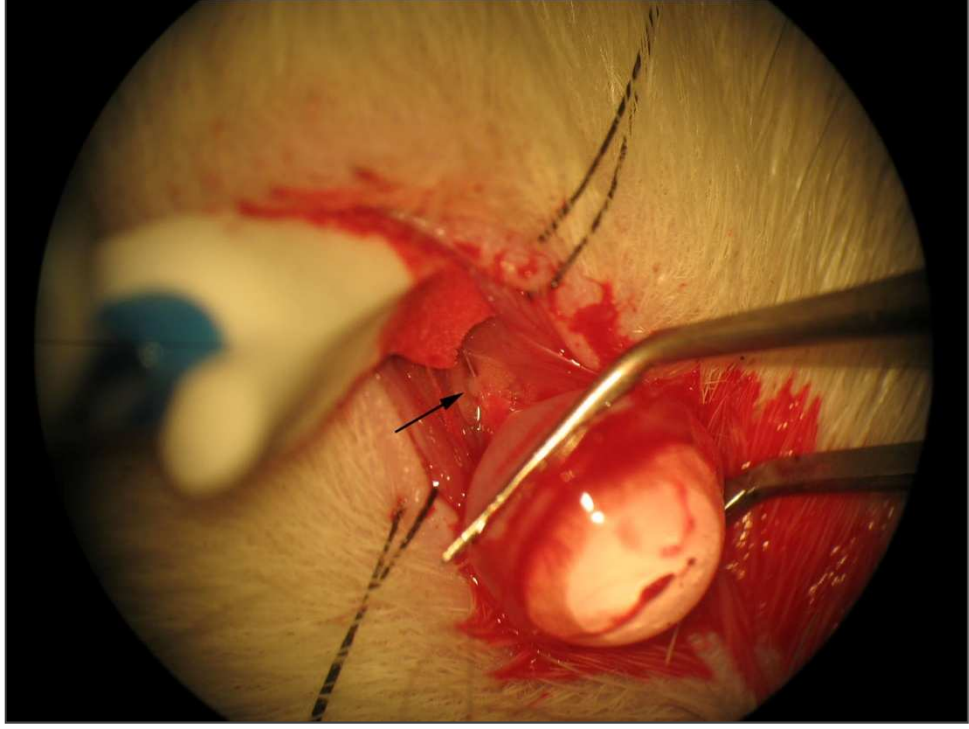
0,7 mg/kg dozunda O₃ gazı içeren oksijen/ozon gaz karışımı hacmi ortalama olarak 5ml bulundu ve karışımdaki O₃ gazının hacmi ihmal edilerek O₂G grubundaki deneklere verilecek oksijen gazının eşdeğer hacmi belirlendi. Böylece O₂G grubundaki deneklere intraperitoneal yolla 5 ml % 100 oksijen gazı verildi.

3.3. Santral Retinal Arter Tıkanıklık Modeli

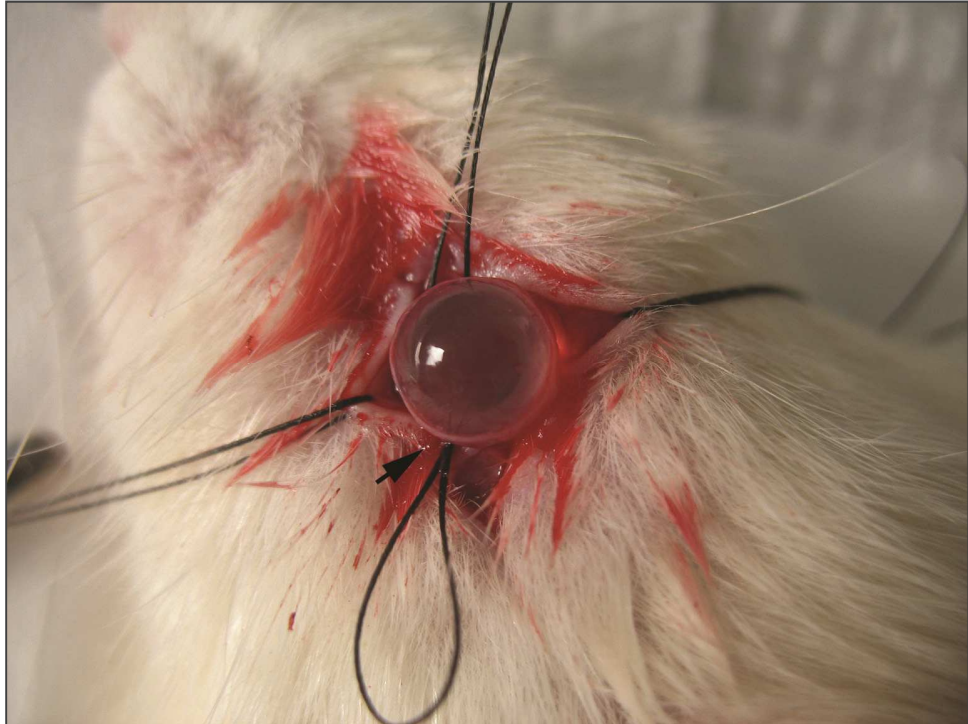
SRAT; İG, O₂G ve O₃G gruplarına uygulanıp K grubuna uygulanmadı. O₂G ve O₃G gruplarına ardışık 3 gün uygulanan ön koşullama tedavisinden sonra 4. gün, tedavi ile aynı saatte (saat 10:00'da); İG grubunda ise tedavi uygulamaksızın SRAT gerçekleştirildi.

Stefánsson ve ark. (102) çalışmasında tarif ettiği yönteme benzer şekilde SRAT şöyle uygulandı:

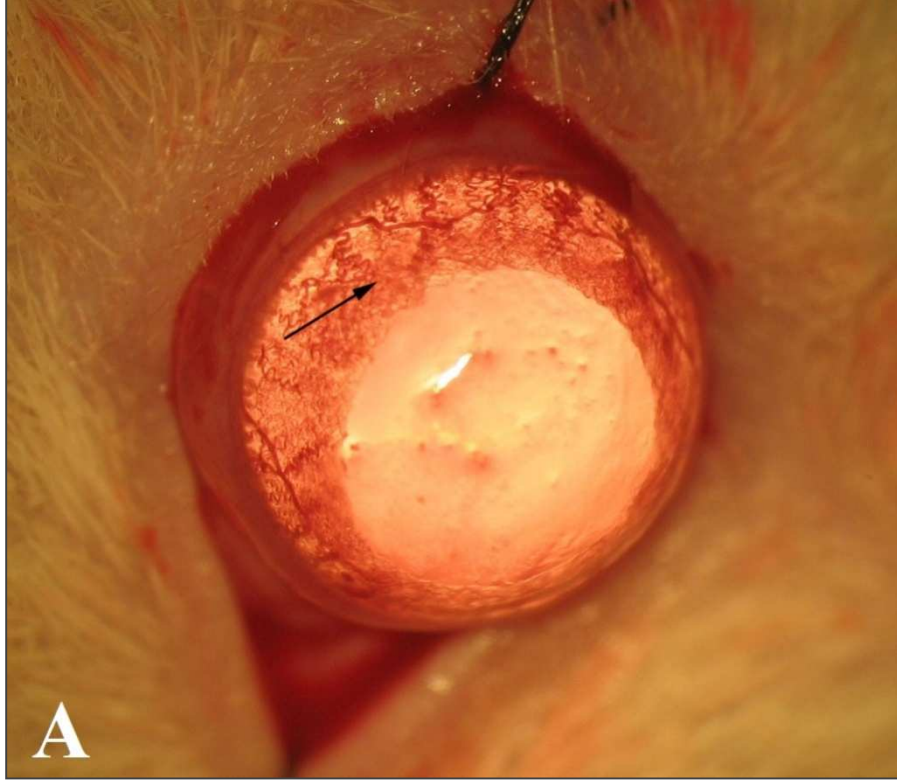
Sıçanlara ketamin hidroklorid (70 mg/kg) (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye), ksilazin hidroklorid (7 mg/kg) (Rompun, Bayer, Türkiye) intraperitoneal yolla enjekte edilerek genel anestezi uygulandı. Anestezinin gerçekleştiği onaylandıktan sonra sıçanların boynu ve ön ekstremiteleri kesim panelleri üzerine geniş yapışkan bantlarla tespit edildi. Üst ve alt göz kapaklarına 4/0 geçici ipek sütürler geçirildi, klemp ve sütür yardımı ile kapaklar ekarte edildi. Cerrahi mikroskop olarak Topcon OMS-75 kullanıldı. Cerrahi mikroskopu altında 360° konjunktival peritomi sonrası lateral rektus kası bulundu ve insersiyonundan kesildi. Glob etrafındaki bağ dokusu künt diseksiyonla uzaklaştırıldıktan sonra optik sinir görüldü (Şekil 4). 4/0 ipek sütür ile optik sinirin etrafından geçildi ve bağlandı (Şekil 5). 0° rijit endoskop (Karl Storz GmbH & Co., Tuttlingen, Germany) yardımıyla fundus muayene edilirken ipek sütürle oluşturulan bağlama retinal damarlarda kan akımının durduğu görülene kadar sıkılaştırıldı (Şekil 6A-D) ve bu noktada sütüre geçici düğüm atıldı.



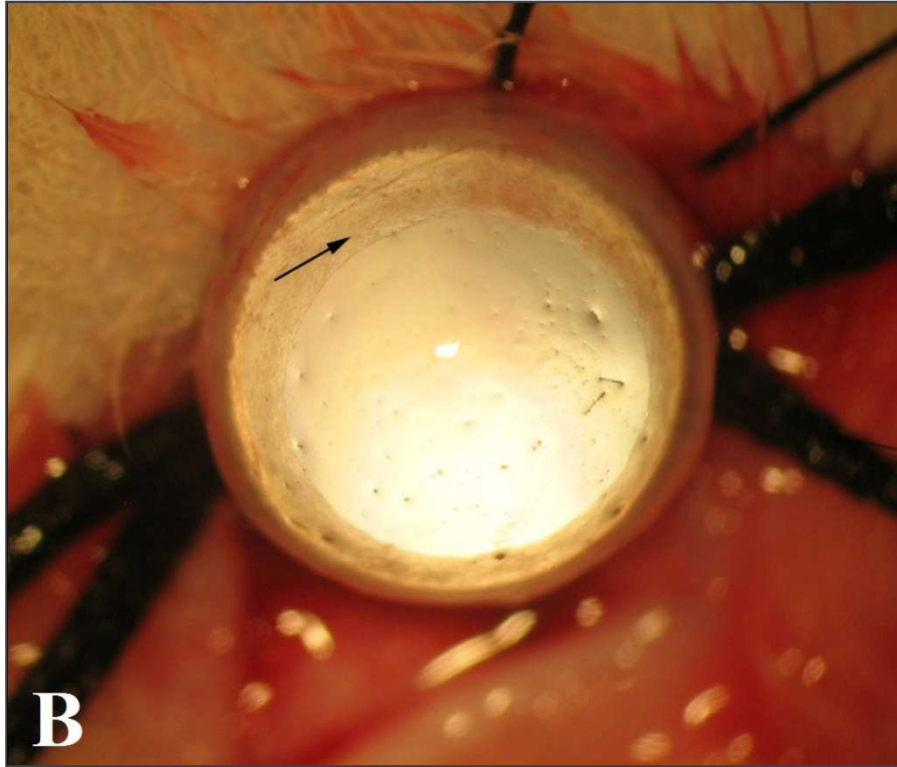
Şekil 4. Optik sinirin ortaya çıkarılması. 360 ° peritomi ve künt diseksiyon sonrası glob arkasında bulunan optik sinir siyah okun ucu ile gösterilmektedir.



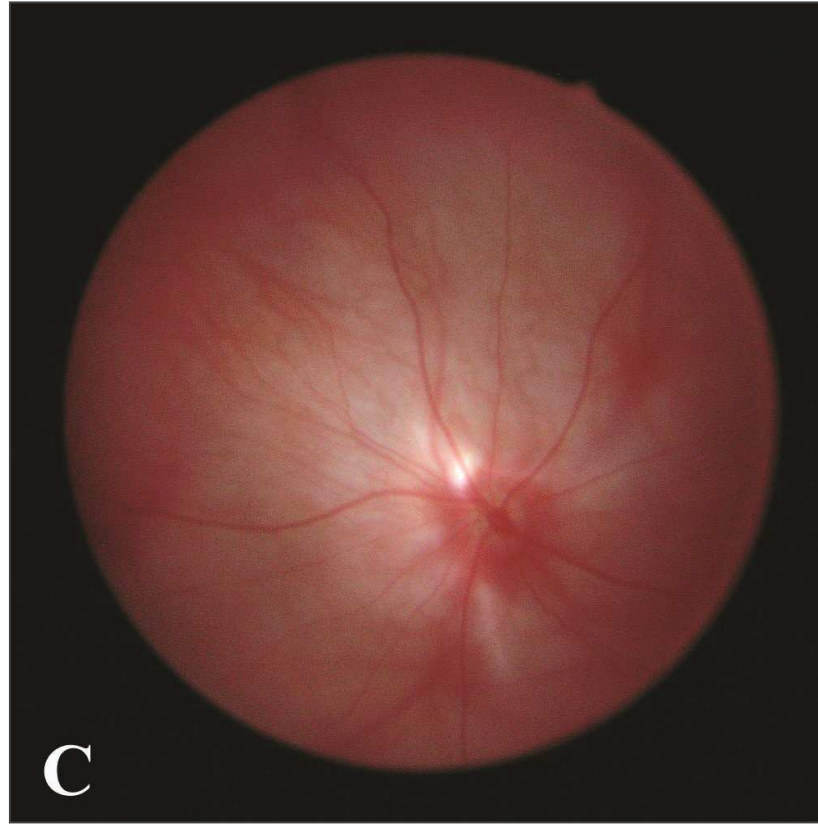
Şekil 5. Optik sinir ligasyonu. Optik sinirin etrafından 4/0 ipek suturele geçilerek bağlanmış gözde siyah okun ucu suturen düğümlenen ucunu işaret etmektedir.



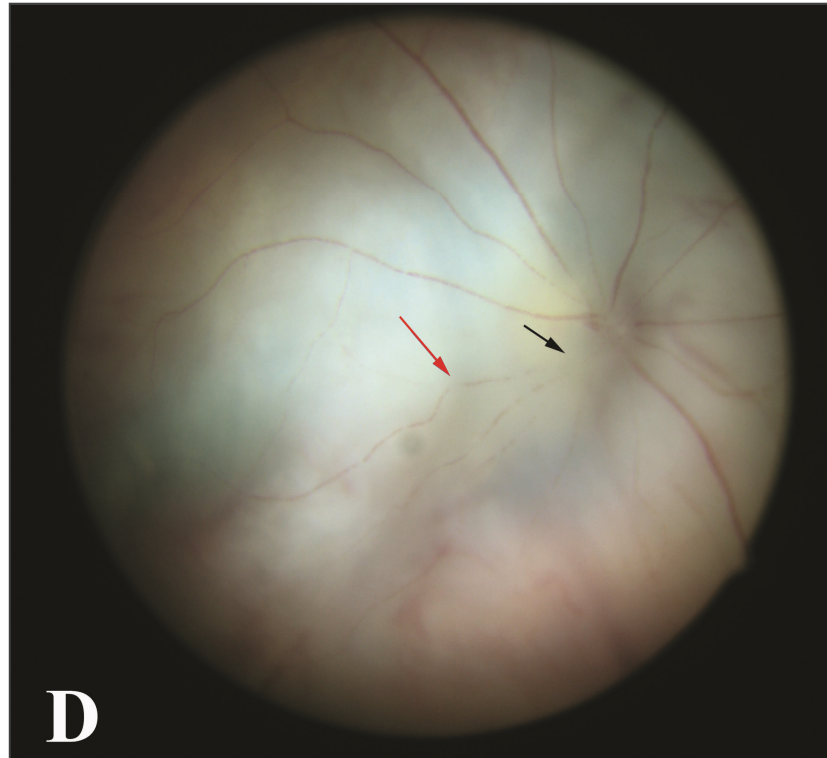
Şekil 6A. Sıçan gözünde normal iris görünümü. İris dokusu siyah okun bulunduğu alanda gözlenmektedir.



Şekil 6B. Arter tıkanıklığı sırasında iris görünümü. Optik sinir ligasyonu sonrasında sıçan iris damarlarının boşalması ve iris beyazlaşması siyah okun bulunduğu alanda gözlenmektedir.

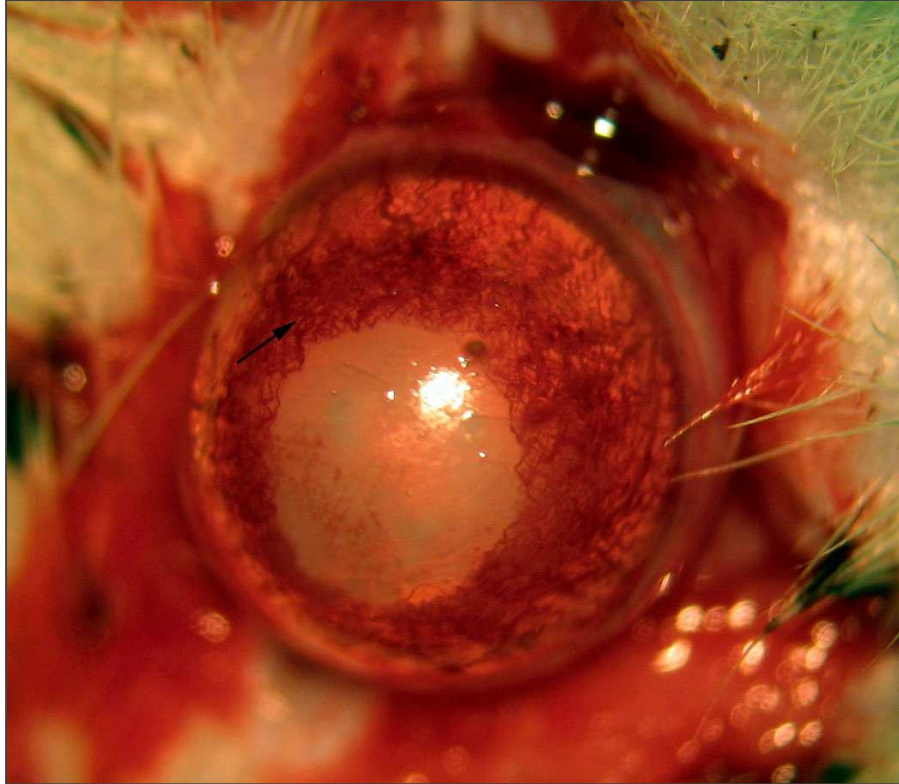


Şekil 6C. Sıçana ait normal fundus görüntüsü.

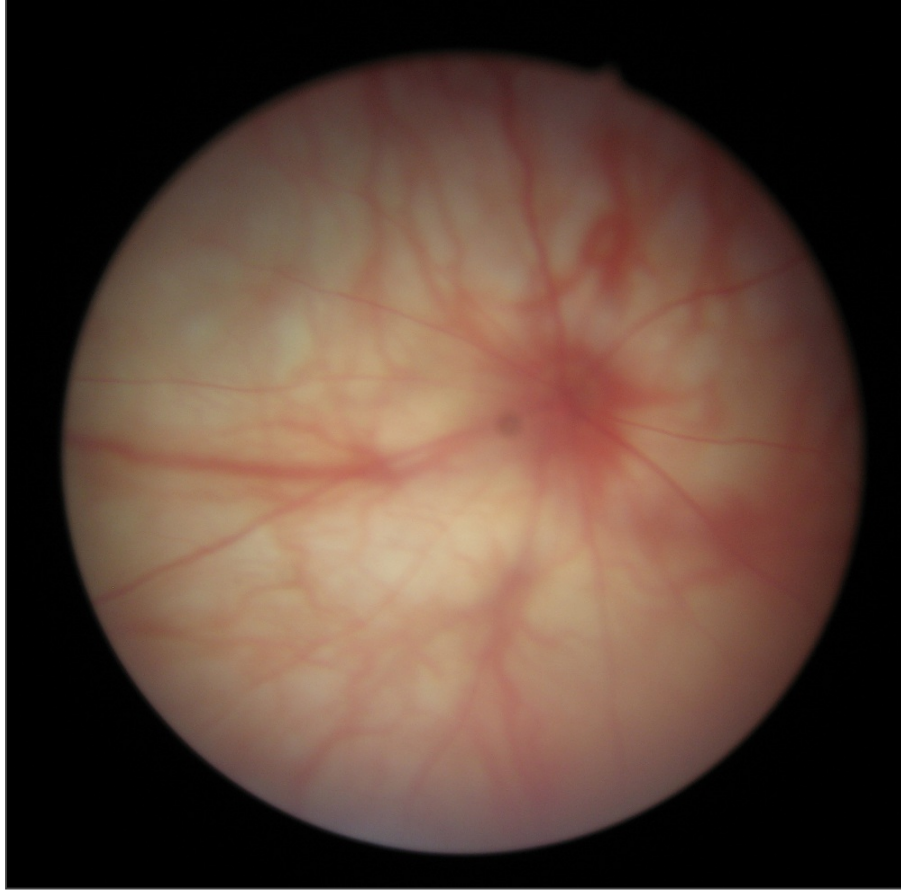


Şekil 6D. SRAT oluşturulan sıçanda fundus görüntüsü. Siyah renkli okun ucu ana damarlardaki tıkanıklık bölgesini, kırmızı okun ucu damarlarda segmenter kan akımı kesintisini göstermektedir.

Oluşturulan geçici santral retinal arter tıkanıklığının 90 dk.lık idamesi sağlandı. 90 dk.lık iskemi sonunda fundus tekrar endoskop ile muayene edilerek retinal arter tıkanıklığının tüm deneklerde devam etmiş olduğu doğrulandıktan sonra geçici ipek sütür çözülerek oklüzyon kaldırıldı. Endoskop yardımıyla fundus muayene edildi ve tüm retinalarda retinal damarların dolduğu ve reperfüzyonun gerçekleştiği teyit edildi (Şekil 7, 8). Deneklerin opere edilen gözleri, göz kapaklarına koyulan 4/0 ipek sütürler ile kapatıldı ve anestezi altındaki deneklerin opere edilen gözlerinde 4 saatlik reperfüzyon sürecinde gelişebilecek travmatik hasar açısından önlem alındı. Denekler daha sonra anestezi derlenmesi sırasında ve 4 saatlik reperfüzyon sürecinde normal barınma koşullarındaki kafeslerine alındı.



Şekil 7. Reperfüzyon sonrasında iris damarlarının dolumu. Siyah okun bulunduğu bölge iris dokusunu göstermektedir.



Şekil 8. Reperfüze olmuş sıçan retinasının görüntüsü. Retinal ve koroidal damarlar belirginleşmiş, retinal solukluk azalmış olarak gözlenmektedir. Fundus, iskemiye sekonder gelişen korneal ödem nedeniyle bulanık görülmektedir.

3.4. Sakrifikasyon ve Enükleasyon

Sakrifikasyon ve enükleasyon işlemi tüm deneklere aynı yöntemle uygulandı. Kontrol grubu dışındaki denekler retinal iskemi sonrası 4 saatlik reperfüzyon sürecini tamamladıklarında, kontrol grubu denekleri ise herhangi bir cerrahi işlem uygulanmaksızın sakrifikasyon işlemine alındı. İntrakardiyak 200 mg/kg tiyopental uygulaması ile denekler sakrifiye edildi. Daha sonra operasyon mikroskobu altında saat 12 hizasındaki limbal konjunktivaya 6/0 ipek sütür ile işaret koyuldu. Limbusun hemen gerisinden 27 Gauge enjektör ile girilerek glob içine doku fiksatif enjekte edildi. Doku fiksatif olarak % 10'luk formalin çözeltisi verildi. Optik sinirin yaklaşık 2-3 mm'lik retrobulber kısmını da içine alacak şekilde globlara enükleasyon

uygulandı. Globlar, aynı derişimdeki eş fiksatif çözeltilerin içine alınarak doku fiksasyonu için bu çözeltiler içinde en az 3 gün süre ile bekletildi.

3.5. Retina Kalınlığı Ölçümü

Fiksasyon süresi sonunda denek gözlerinin korneaları korneal limbal peritomi ile kesilerek çıkarıldı. Lens ve vitreus uzaklaştırıldı. Saat 12 hizasındaki işaret sütürü ve optik sinirden geçecek şekilde glob sagittal düzlemde kesilerek ikiye ayrıldı. Patolojik inceleme için hazırlanacak gözler doku kasetlerine yerleştirildi. Önce dehidratasyon işleminde sırasıyla % 70, % 80, % 90, % 96 ve % 100'lük alkollerden her birinde birer saat bekletildikten sonra ksilol ile 2 saat şeffaştırma işlemi gerçekleştirildi. 58-60°C sıcaklıktaki parafin içinde 4 saat bekletildi ve sonrasında parafin bloklara gömüldü. Soğutma işleminden sonra parafin bloklardan gözün 4 µm kalınlığındaki sagittal kesitleri Leica SM 2000 R model mikrotom ile hazırlandı. Lam- lamel arasına alınan kesitlere rutin hematoksil-eozin boyama yapıldı. Retina kesitleri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Olympus BX 51 model ışık mikroskobu ile X400 büyütmede görüntüledi. SPOT Insight Firewire kamerayla görüntülenen mikrofotografılar üzerinde, SPOT Advanced Software Windows: Version 4.1 ile, gerekli kalibrasyonlar yapıldıktan sonra, retinal kalınlık ölçümleri yapıldı.

Retinanın topografik olarak farklı bölgelerinde farklı kalınlığa sahip olması nedeniyle, ölçümleri standardize edebilmek amacıyla her gözde retinanın saat 6-12 hizasından ve optik sinirden geçen vertikal hat üzerindeki kesitinde inceleme yapıldı. Kalınlık ölçümü, optik sinir kenarından başlayan üst kadrana ait retinanın, optik sinir başlangıcından 125 µm ve 350 µm uzaklığındaki bölgelerden yapıldı (Şekil 9).



Şekil 9. Hematoksilen-eozin boyalı kesitlerde optik sinir başlangıcından itibaren 125 ve 350 μm 'lik mesafenin belirlenmesi. (Hematoksilen-eozin, ışık mikroskobu, X100.)

3.6. TUNEL Metodu ile Apoptoz Analizi

Gözlerin bir kısmında fiksasyon işlemi sonrasında kornea, lens ve vitreus disseksiyonla uzaklaştırıldı ve globlar, saat 12 hizasındaki işaret sütürü ve optik sinirden geçen hatta uyan şekilde, sagittal düzlemde, optik sinirin giriş bölgesi intakt kalacak şekilde alt ve üst bölgelerden kesilerek ikiye ayrıldı. Daha sonra retinalar bütün olarak, “whole-mount” yöntemi ile tam kat sıyrılarak ayrıldı ve fosfat tampon salin solüsyonu (phosphate-buffered saline - PBS) içine alındı.

İmmünohistokimyasal boyama için in situ hücre ölümü belirleme kiti (TUNEL Universal Apoptosis Detection Kit (Biotin-labeled POD), GenScript, USA) kullanıldı. Polilizin kaplı lamalar üzerinde havada kurutularak fikse edilen retina dokuları, taze hazırlanmış fiksasyon solüsyonunda (PBS içinde % 4 paraformaldehit, pH 7.4) 15-25°C'de 1 saat bekletildi. Retina dokuları PBS solüsyonu ile yıkandı, metanol içinde % 3'lük hidrojen peroksit içeren bloklama solüsyonunda 15-25°C'de 10 dk. inkübe edildi, ardından tekrar PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra lamalar

taze hazırlanmış permeabilizasyon solüsyonu ile (su içinde % 0,1 Triton X-100 ve % 0,1 sodyum sitrat) buz üzerinde (2-8°C) 2 dk. inkübe edildi ve retina dokuları işaretleme aşaması için hazırlanmış oldu. İşaretleme aşamasında retinal dokular fosfat tamponlu salin yıkamalarının ardından 37°C etüvde 60 dk. 50 µl TUNEL reaksiyon karışımı ile (45 µl eşitleme tamponu, 1 µl biotin-11-dUTP ve 4 µl TdT karışımı) inkübe edildi. PBS ile 3 kez 2'şer dk. yıkandı. Ardından 37°C etüvde 30 dk. 50 µl Streptavidin-HRP ile inkübe edildi. PBS ile 3 kez 2'şer dk. yıkandı. Daha sonra dokular 50-100 µl diaminobenzidin kromojeni ile 15 dk. işaretlenme için inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkandıktan sonra lamalar bir lamelle kapatılarak ışık mikroskopta incelendi. Işık mikroskopik analizde retinadaki TUNEL pozitif hücreler (TUNEL yöntemi ile boyalı apoptotik hücreler) immersiyon yağı ile X1000 büyütmede sayıldı. Apoptotik hücre sayımları Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında Olympos BX 51 model ışık mikroskobu ile gerçekleştirildi. SPOT Insight Firewire kamerayla görüntülenen mikrofotografılar, SPOT Advanced Software Windows: Version 4.1 ile analiz edilerek, apoptotik hücre sayımı yapıldı.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi "SPSS for Windows version 16.0" yazılımı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde, iki grubun ortalamalarının karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile; ikiden fazla grubun ortalama karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistik veriler olarak median, ortalama (ortanca), standart sapma, minimum, maksimum değerler hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Sıçan globlarının saat 12 ve 6 hizasından sagittal düzlemde alınmış, optik sinir kesitini içeren ve hematoksilin-eozin ile boyanan kesitlerinde retinal kesitlerin ölçümleri yapıldı. Mikrotom ile kesit alınması sırasında, retina tabakalarının sagittal düzleme oblik açıda kesilmesinden kaynaklanabilecek kalınlık farklılıklarını önlemek amacıyla tüm globlarda ölçülen retina bölgeleri ile aynı lokalizasyondaki skleral kalınlıklar ölçüldü. Skleral kalınlıkların tüm gruplar için ortalaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlendi (Tablo 4) ve tüm deneklerin retinaları çalışma kapsamına alındı. Retinal kalınlık ölçümü, farklı retinal bölgelerde retinal kalınlığın farklı olmasından ve bundan kaynaklanabilecek ölçüm ve yorum yanlışlarının önüne geçmek amacıyla her gözde aynı lokalizasyonda gerçekleştirildi. Bunun için retinal kalınlık ölçümleri, globun merkezinden saat 6-12 hizasından alınan ve optik sinir kesitini içeren kesitlerde, optik sinirin üst kısmındaki retinada, optik sinir başlangıcından 125 µm ve 350 µm uzaklıktaki retina bölgelerinde yapıldı.

| Gruplar | N | Ortalama kalınlık | Gruplar arası anlamlılık farkı (p) |
|------------------|----|-------------------|------------------------------------|
| K | 11 | 23,86 µm | 0,652 |
| İG | 11 | 24,14 µm | |
| O ₂ G | 11 | 23,77 µm | |
| O ₃ G | 11 | 18,77 µm | |

Tablo 4. Retinal kesitlerdeki ortalama skleral kalınlıklar ve gruplar arası karşılaştırılması. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

Retinalarda RSLT, GHT, İPT, İNT, DPT, DNT, fotoreseptör iç segment (FRİS), fotoreseptör dış segment (FRDS), total FRT, tam kat retina (TKR) histomorfolojik olarak incelendi ve kalınlık ölçümleri yapıldı.

Tüm retina tabakaları incelendiğinde RSLT ve RPE hariç diğer tabakaların yapılarının patoloji slaytlarında iyi korunmuş oldukları görüldü. Hemen hemen tüm örneklerde, RSLT tabakasında düzensizlik ve sinir liflerinde ayrışma olduğu gözlemlendi. Bu bulgunun patolojik örnek hazırlama aşamasında vitreusun ayrılması sırasındaki travmaya sekonder gelişmiş olabileceği düşünüldü ve RSLT tüm örneklerde değerlendirme dışı bırakıldı.

4.1. Histomorfolojik Değerlendirme

Hematoksilen-eozin ile boyanan ve optik sinir başlangıcından 125 µm ve 350 µm uzaklıktan alınan kesitler histomorfolojik açıdan değerlendirildi (Şekil 10 ve 11). K grubuna ait preparatlarda retina tabakalarının normal histomorfolojik görünüm sınırları içinde olduğu gözlemlendi.

GHT tabakası incelendiğinde, İG grubuna ait preparatların biri hariç tümünde, O₂G ve O₃G gruplarına ait tüm preparatlarda vakuolizasyon olduğu görüldü. İG grubu ve tedavi gruplarındaki vakuolizasyonun şiddetinde belirgin fark olmadığı gözlemlendi.

İPT tabakası incelendiğinde, İG grubuna ait preparatların çoğunda, O₂G grubunun yarısından fazlasında ve O₃G grubunun yarısından azında kalınlaşma ve tabaka içinde ayrışma, ödem olduğu görüldü. İG grubunda bu bulgular orta şiddette izlenirken, O₂G grubunda orta ve O₃G grubunda ise hafif şiddette olduğu izlendi. K grubu hariç diğer gruplarda İPT tabakasında tek tük lökosit infiltrasyonu olduğu gözlemlendi.

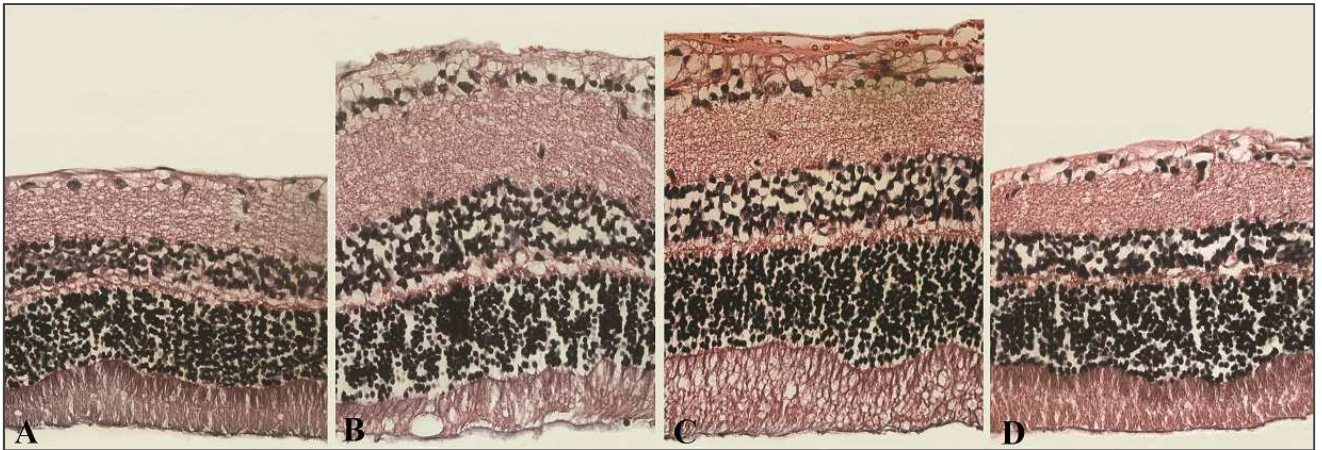
İNT tabakaları incelendiğinde, İG grubuna ait preparatların tamamına yakınında orta ve ağır şiddette vakuolizasyon ve yaklaşık yarısında ek olarak İNT'de hafif kalınlaşma; O₂G grubuna ait preparatların yarısından fazlasında hafif şiddette

vakuolizasyon ve hafif kalınlaşma; O₃G grubuna ait preparatların yarısında orta şiddette vakuolizasyon ve ikisinde orta şiddette kalınlaşma olduğu gözlemlendi.

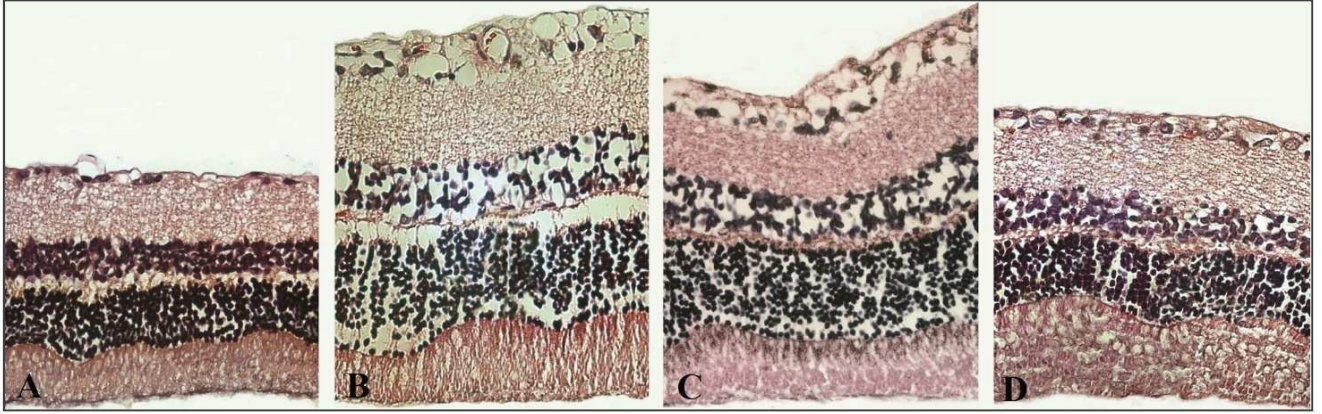
DPT tabakaları incelendiğinde, K grubu hariç tüm grupların tüm preparatlarında hafif şiddette ödem ve tabaka içinde ayrışma gözlemlendi.

DNT tabakaları incelendiğinde; İG grubuna ait preparatların yarısından fazlasında orta şiddette vakuolizasyon ve ileri derecede kalınlaşma; O₂G grubuna ait preparatların yarısından fazlasında hafif vakuolizasyon ve orta şiddette kalınlaşma; O₃G grubuna ait yarısından azında hafif vakuolizasyon ve hafif kalınlaşma olduğu gözlemlendi.

FRT tabakaları incelendiğinde; İG grubuna ait yarısından fazlasında hafif vakuolizasyon ve orta şiddette kalınlaşma; O₂G grubuna ait preparatların yaklaşık yarısında hafif vakuolizasyon ve yarısından azında orta şiddette kalınlaşma; O₃G grubuna ait preparatların yaklaşık yarısında hafif vakuolizasyon, yarısından azında hafif kalınlaşma olduğu gözlemlendi.



Şekil 10. Optik sinirden 125 µm uzaklıkta retinal kesitler. **A:** K grubunda normal histolojik görünüm izlenmekte. **B:** İG grubunda TKR, İPT ve İNT’de diğer gruplara göre belirgin artış, GHT, İPT, FRT’de daha belirgin olmak üzere tüm katlarda vakuolizasyon gözlenmektedir. **C:** O₂G grubunda TKR, DNT, İPT ve FRT’de kalınlık artışı; GHT, İNT, FRT’de vakuolizasyon gözlenmektedir. **D:** O₃G grubunda kalınlaşma ve vakuolizasyon bulguları bulunmakla birlikte retinal kesit K grubununkine benzer özellikler göstermektedir. (Hematoksilen-eozin, ışık mikroskobu, X400.)



Şekil 11. Optik sinirden 350 μm uzaklıkta retinal kesitler. **A:** K grubunda normal histolojik görünüm izlenmekte. **B:** İG grubunda TKR, İPT ve DNT’de diğer gruplara göre belirgin artış, tüm tabakalarda belirgin vakuolizasyon gözlenmektedir. **C:** O₂G grubunda TKR, DNT, İPT’de kalınlık artışı; GHT, İPT, DNT’de vakuolizasyon gözlenmektedir. **D:** O₃G grubunda kalınlaşma ve vakuolizasyon bulguları bulunmakla birlikte retinal kesit K grubununkine benzer özellikler göstermektedir. (Hematoksilen-eozin, ışık mikroskopu, X400.)

4.2. Retinal Kalınlık Ölçümleri

Optik sinir başlangıcından 125 μm uzaklıktan yapılan retinal kalınlık ölçümlerine ait bulgular (Tablo 5, 6):

| Grup Tabaka | K | İG | O ₂ G | O ₃ G | p |
|----------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------|
| N | 11 | 11 | 11 | 11 | |
| TKR | 175 ± 9,26 μm | 259,09 ± 25,76 μm | 234 ± 21,86 μm | 207,45 ± 17,24 μm | 0,000 |
| GHT | 11,63 ± 2,90 μm | 17,54 ± 6,23 μm | 16 ± 2,14 μm | 12,45 ± 2,54 μm | 0,004 |
| İPT | 43,18 ± 6,04 μm | 62,63 ± 12,24 μm | 58,09 ± 11,57 μm | 54,36 ± 11,51 μm | 0,003 |
| İNT | 28,27 ± 4,14 μm | 43,36 ± 6,07 μm | 42,45 ± 4,65 μm | 35,36 ± 8,93 μm | 0,000 |
| DPT | 9,81 ± 2,18 μm | 13,54 ± 2,91 μm | 12,63 ± 3,47 μm | 10 ± 3,70 μm | 0,023 |
| DNT | 44,45 ± 3,72 μm | 68,09 ± 13,44 μm | 64,72 ± 11,18 μm | 51,90 ± 10,71 μm | 0,000 |
| FRİS | 17,18 ± 4,53 μm | 26,63 ± 7,97 μm | 25,09 ± 8,15 μm | 19 ± 3,54 μm | 0,002 |
| FRDS | 15,27 ± 3,63 μm | 27,36 ± 6,65 μm | 24,54 ± 5,78 μm | 22,63 ± 3,82 μm | 0,000 |
| FRT | 32,45 ± 6,83 μm | 54,09 ± 11,97 μm | 49,63 ± 12,68 μm | 41,81 ± 6,52 μm | 0,000 |

Tablo 5. Optik sinirden 125 μm uzaklıkta ortalama retinal kalınlıklar. Retinal kalınlıkların ortalaması μm cinsinden ve (\pm) standart deviasyon değerleriyle birlikte verilmiştir.

| Grup Tabaka | K, İG, O ₂ G, O ₃ G | İG, O ₂ G, O ₃ G | İG, O ₂ G | İG, O ₃ G | O ₂ G, O ₃ G | K, İG | K, O ₂ G | K, O ₃ G |
|----------------|---|--|----------------------|----------------------|---------------------------------------|-------|---------------------|---------------------|
| TKR | 0,000 | 0,000 | 0,045 | 0,000 | 0,010 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| GHT | 0,004 | 0,019 | 0,717 | 0,073 | 0,002 | 0,038 | 0,001 | 0,486 |
| İPT | 0,003 | 0,323 | 0,450 | 0,158 | 0,374 | 0,001 | 0,003 | 0,030 |
| İNT | 0,000 | 0,030 | 0,894 | 0,019 | 0,027 | 0,000 | 0,000 | 0,038 |
| DPT | 0,023 | 0,086 | 0,407 | 0,034 | 0,146 | 0,005 | 0,063 | 0,716 |
| DNT | 0,000 | 0,008 | 0,392 | 0,010 | 0,007 | 0,000 | 0,000 | 0,052 |
| FRİS | 0,002 | 0,041 | 0,692 | 0,032 | 0,029 | 0,002 | 0,005 | 0,112 |
| FRDS | 0,000 | 0,230 | 0,292 | 0,100 | 0,468 | 0,000 | 0,001 | 0,001 |
| FRT | 0,000 | 0,044 | 0,340 | 0,014 | 0,130 | 0,000 | 0,001 | 0,005 |

Tablo 6. Optik sınırdan 125 µm uzaklıkta ortalama retinal kalınlıklara ait istatistik veriler. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

K, İG, O₂G ve O₃G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri Tablo 5’te gösterilmiştir. Ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında tüm retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

K grubu hariç; İG, O₂G ve O₃G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında İPT, DPT, FRDS hariç tüm retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

İG ve O₂G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında yalnızca TKR’de istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu ve diğer kalınlıklarda anlamlı fark olmadığı görüldü.

İG ve O₃G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında TKR, İNT, DPT, DNT, FRİS ve FRT kalınlıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu ve diğer kalınlıklar için anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tedavi grupları olan O₂G ve O₃G’nin gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında TKR, GHT, İNT, DNT ve FRİS tabaka kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu, diğer kalınlık ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark olmadığı görüldü.

K ve İG gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında tüm retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

K ve O₂G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında DPT hariç diğer retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

K ve O₃G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında GHT, DPT, DNT ve FRİS tabakalarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ve diğer retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

Optik sinir başlangıcından 350 µm uzaklıktan yapılan retinal kalınlık ölçümlerine ait bulgular (Tablo 7, 8):

| Grup Tabaka | K | İG | O ₂ G | O ₃ G | p |
|----------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------|
| N | 11 | 11 | 11 | 11 | |
| TKR | 180,54 ± 8,15 µm | 264,63 ± 22,45 µm | 237,00 ± 21,82 µm | 210,00 ± 6,57 µm | 0,000 |
| GHT | 11,27 ± 3,06 µm | 16,72 ± 3,52 µm | 15,18 ± 2,04 µm | 12,63 ± 3,47 µm | 0,002 |
| İPT | 45,27 ± 6,08 µm | 66,90 ± 11,67 µm | 57,27 ± 11,59 µm | 54,72 ± 8,00 µm | 0,000 |
| İNT | 29,72 ± 3,92 µm | 43,00 ± 5,11 µm | 42,36 ± 5,95 µm | 34,54 ± 9,25 µm | 0,000 |
| DPT | 9,63 ± 2,06 µm | 13,81 ± 2,08 µm | 11,81 ± 4,14 µm | 8,72 ± 3,00 µm | 0,001 |
| DNT | 47,54 ± 5,14 µm | 72,36 ± 18,62 µm | 63,36 ± 9,14 µm | 48,36 ± 10,11 µm | 0,000 |
| FRİS | 18,09 ± 3,83 µm | 24,90 ± 5,50 µm | 28,00 ± 8,61 µm | 19,27 ± 3,71 µm | 0,001 |
| FRDS | 18,45 ± 4,67 µm | 27,90 ± 5,43 µm | 26,00 ± 4,42 µm | 22,09 ± 4,5 µm | 0,001 |
| FRT | 34,63 ± 10,81 µm | 52,72 ± 9,67 µm | 54,00 ± 10,77 µm | 41,54 ± 6,89 µm | 0,000 |

Tablo 7. Optik sinirden 350 µm uzaklıkta ortalama retinal kalınlıklar. Retinal kalınlıkların ortalaması µm cinsinden ve (±) standart deviasyon değerleriyle birlikte verilmiştir.

K, İG, O₂G ve O₃G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri Tablo 7’de gösterilmiştir. Ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında tüm retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

| Grup Tabaka | K, İG, O ₂ G, O ₃ G | İG, O ₂ G, O ₃ G | İG, O ₂ G | İG, O ₃ G | O ₂ G, O ₃ G | K, İG | K, O ₂ G | K, O ₃ G |
|----------------|---|---|----------------------|----------------------|---------------------------------------|-------|---------------------|---------------------|
| TKR | 0,000 | 0,000 | 0,014 | 0,000 | 0,002 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| GHT | 0,002 | 0,016 | 0,233 | 0,011 | 0,032 | 0,002 | 0,006 | 0,337 |
| İPT | 0,000 | 0,047 | 0,075 | 0,019 | 0,532 | 0,000 | 0,015 | 0,014 |
| İNT | 0,000 | 0,021 | 0,869 | 0,015 | 0,019 | 0,000 | 0,000 | 0,223 |
| DPT | 0,001 | 0,004 | 0,526 | 0,000 | 0,051 | 0,000 | 0,128 | 0,465 |
| DNT | 0,000 | 0,002 | 0,188 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,000 | 0,717 |
| FRİS | 0,001 | 0,009 | 0,576 | 0,019 | 0,004 | 0,004 | 0,001 | 0,467 |
| FRDS | 0,001 | 0,016 | 0,405 | 0,009 | 0,031 | 0,002 | 0,003 | 0,051 |
| FRT | 0,000 | 0,004 | 0,948 | 0,008 | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,075 |

Tablo 8. Optik sinirden 350 µm uzaklıkta ortalama retinal kalınlıklara ait istatistik veriler. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

K grubu hariç; İG, O₂G ve O₃G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında tüm retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

İG ve O₂G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında yalnızca TKR’de istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu ve diğer kalınlıklar için anlamlı fark olmadığı görüldü.

İG ve O₃G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında tüm retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de anlamlı fark olduğu görüldü.

Tedavi grupları olan O₂G ve O₃G’nin gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında İPT, DPT hariç diğer kalınlıklar için anlamlı fark olduğu görüldü.

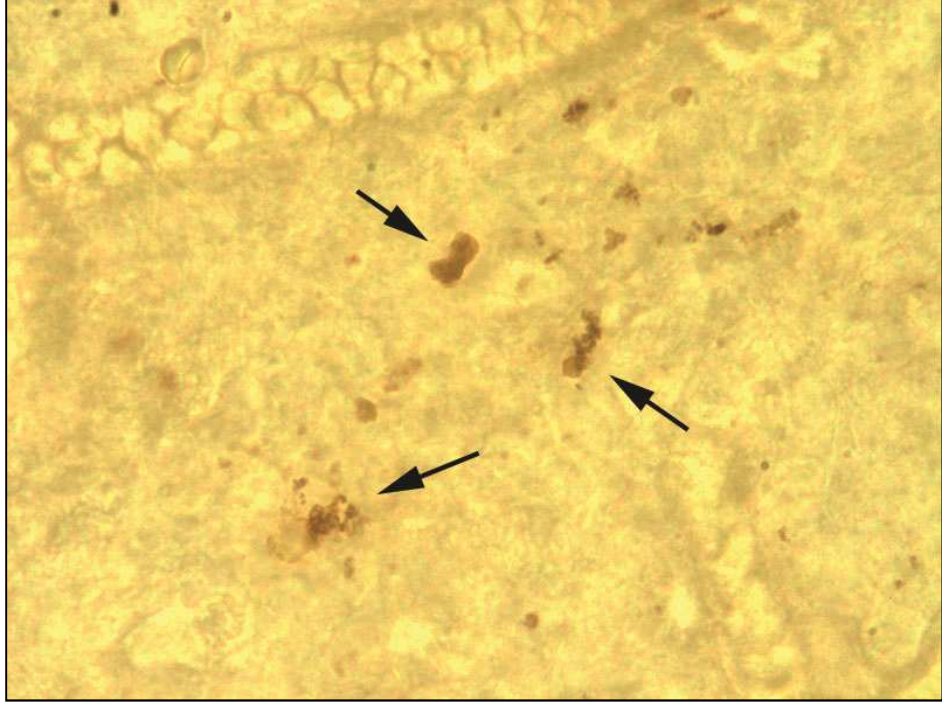
K ve İG gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında tüm retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

K ve O₂G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında DPT hariç diğer retinal tabaka kalınlıklarında ve TKR’de istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü.

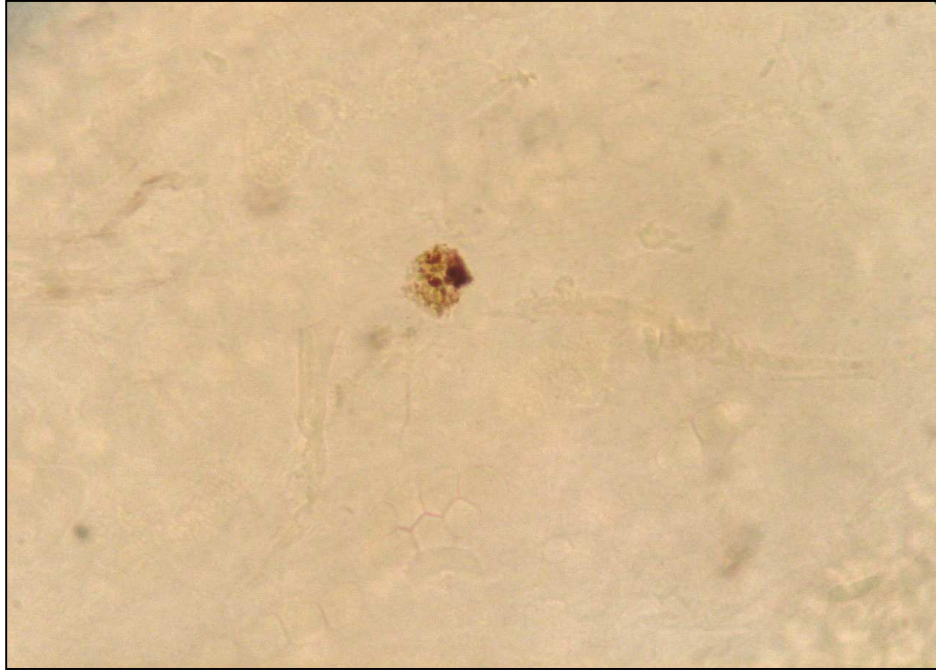
K ve O₃G gruplarının ortalama retinal kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında TKR, İPT kalınlık ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu, GHT, İNT, DPT, DNT, FRİS, FRDS ve FRT kalınlık ölçümlerinde anlamlı fark olmadığı görüldü.

4.3. Apoptoz Değerlendirmesi

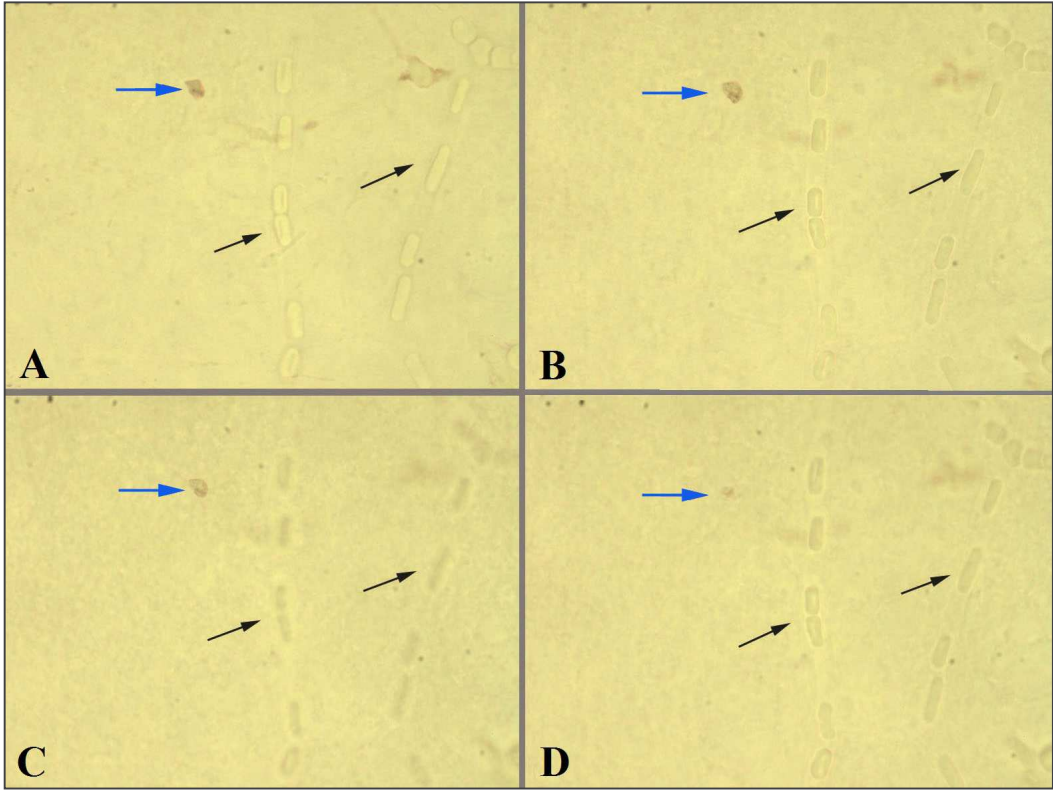
İskemi-reperfüzyon sonucu oluşan retinal hücre ölümünü göstermek için TUNEL yöntemi ile işaretlenen apoptotik retinal hücrelerin sayımı “whole-mount” yöntemi ile ayrılan retinalar üzerinde yapıldı. Uygulanan TUNEL kiti prosedürüne uygun şekilde zemin boyanması yapılmadan TUNEL-pozitif boyanan hücreler, nükleuslarındaki fragmentlerin kahverengi presipitatlar halinde boyanması ile ayırt edildi. Apoptotik hücreler damarlardan belirgin şekilde Tüm gruplarda apoptotik hücrelerin bir kısmının gruplar halinde kümelenmiş olduğu (Şekil 12), bir kısmının ise tek tek bulunduğu gözlemlendi (Şekil 13). Apoptotik hücreler retinanın farklı tabakalarında bulunduğundan mikroskop odaklaması ayarlanarak farklı tabakalardaki retinal hücreler sayıldı (Şekil 14). Apoptotik hücreler, fragmente nükleusları TUNEL-pozitif boyanmış hücreler olarak belirlenerek tüm retina alanı üzerinde sayıldı ve mm² başına düşen hücre sayısı hesaplandı. Apoptotik hücre sayım sonuçları Tablo 9'daki gibidir. Buna göre preparatların sayısındaki azlık nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılamamasına rağmen K grubunda sayılan apoptotik hücrelerin diğer gruplara oranla oldukça az sayıda olduğu (Şekil 15), İG grubunda ise apoptotik hücre sayısının mm² başına en fazla sayıda olduğu gözlemlendi (Şekil 16). O₂G grubunda gözlenen apoptotik hücre sayısı İG grubundan az olmakla birlikte K ve O₃G grubunda tespit edilen hücre sayısına göre fazlaydı (Şekil 17). O₃G grubundaki apoptotik hücre sayısı hem İG hem de O₂G grubundan az sayıda olup K grubundan elde edilen sayım değerlerine yakın olmakla birlikte K grubundaki apoptotik hücre sayısından daha fazla olduğu görüldü (Şekil 19). Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlam taşımaya da hematoksilen-eozin boyama ile yapılan retinal kalınlık karşılaştırmalarından elde edilen bulguları destekler nitelikteydi.



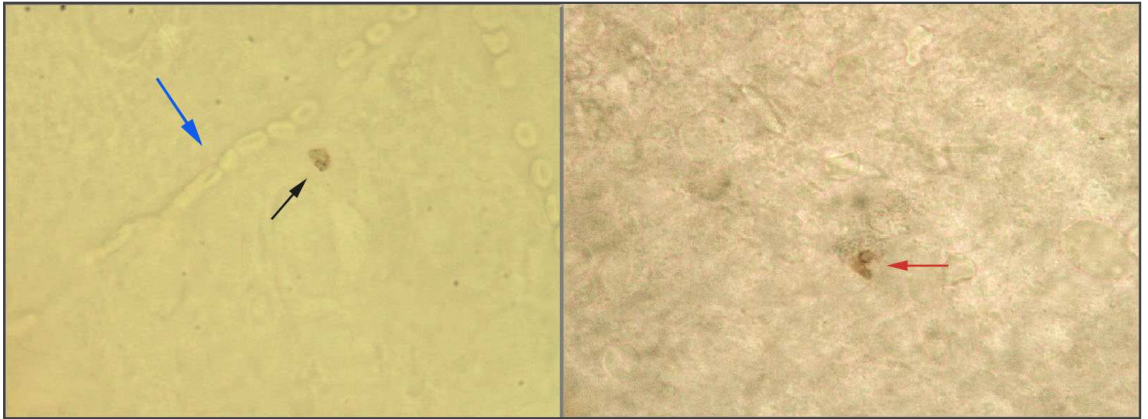
Şekil 12. Kümeleşmiş TUNEL-pozitif apoptotik hücreler siyah oklarla gösterilmektedir. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı)



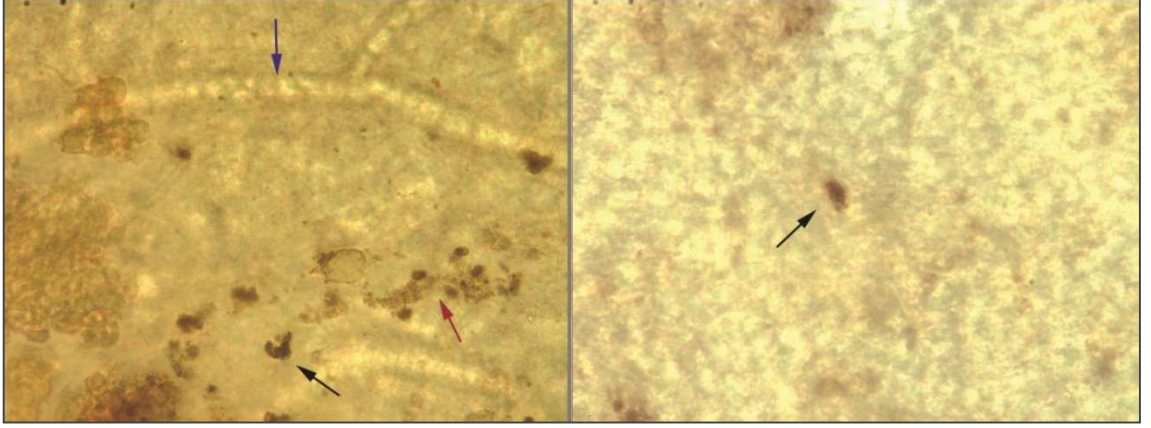
Şekil 13. Tek olarak bulunan TUNEL-pozitif apoptotik hücre. Nükleusta apoptozise sekonder granüler görünüm mevcuttur. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı)



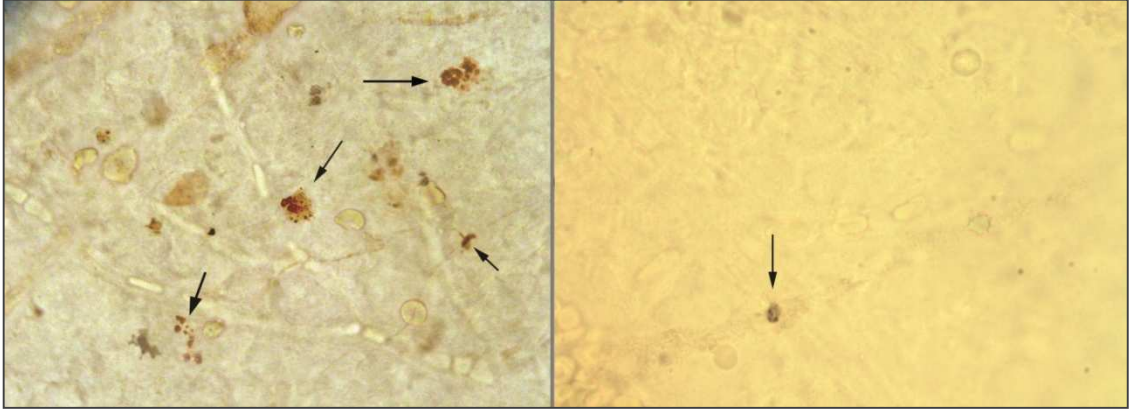
Şekil 14. Retinanın katları derinlemesine odaklandığında retinal damarların (siyah ok) ve apoptotik bir hücrenin (mavi ok) farklı görünüşleri şekilde gösterilmektedir. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı)



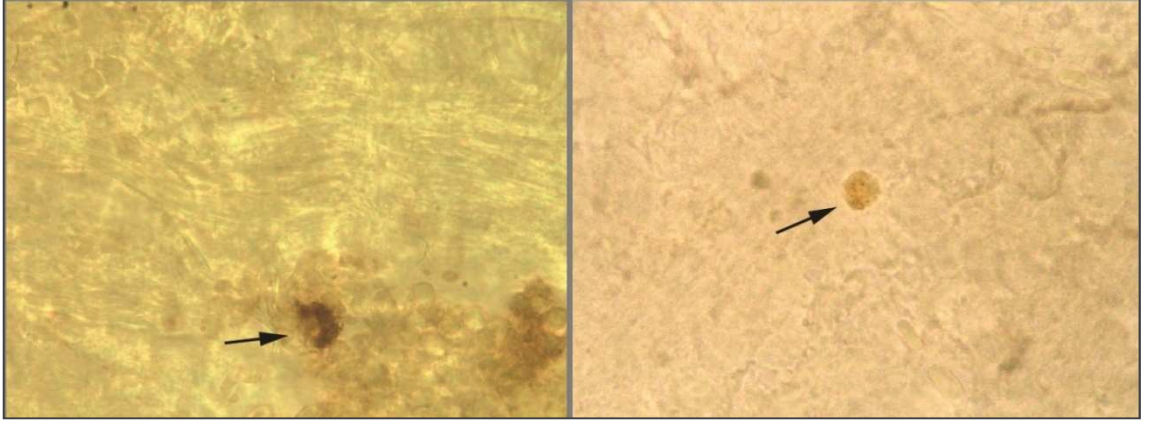
Şekil 15. K grubuna ait 'whole-mount' sıçan retinasından örnekler. Normal vasküler yapı (mavi ok) ve tek tük apoptotik hücre (siyah ve kırmızı ok) görülmektedir. Kırmızı okla gösterilen hücrenin nükleusunda apoptotik hücreye özgü hilal şeklinde boyanma mevcuttur. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı)



Şekil 17. İG grubuna ait 'whole-mount' sıçan retinasından örnekler. Soldaki fotoğrafta TUNEL-pozitif hücrelerin daha yoğun gözleendiği bölge gösterilmektedir. Kırmızı ok kümeleşmiş apoptotik hücreleri, siyah ok tek olarak gözlenen hücreleri, mavi ok odak dışında kalan damar yapısını işaret etmektedir. Sağ fotoğraf apoptotik hücrenin tek olarak gözleendiği bölgeden alınmıştır. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı)



Şekil 18. O₂G grubuna ait 'whole-mount' sıçan retinasından örnekler. Sağ fotoğrafta apoptotik hücrelerin küme ya da tek tek bulunduğu ve daha yoğun olduğu bölge, sol fotoğrafta apoptotik hücrenin tek olarak bulunduğu bölge görülmektedir. Siyah oklar apoptotik hücreleri göstermektedir. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı)



Şekil 19. O₃G grubuna ait ‘whole-mount’ sıçan retinasından örnekler. Apoptotik hücrelerin farklı retina alanlarında seyrek olarak izlendiği görülmektedir. Siyah oklar granüler ve hilal şeklinde boyanan iki apoptotik hücreyi işaret etmektedir. (TUNEL-HRP, ışık mikroskobu, x1000 immersiyon yağı)

| Grup | Ortalama apoptotik hücre (hücre sayısı/mm ²) |
|------------------|--|
| K | 0,59 |
| İG | 3,29 |
| O ₂ G | 2,46 |
| O ₃ G | 0,92 |

Tablo 9. Whole-mount yöntemiyle ayrılmış sıçan retinalarında TUNEL-HRP ile boyanmış mm² başında düşen ortalama apoptotik hücre sayıları.

5. TARTIŞMA

Oftalmik acil olarak kabul edilen ve kalıcı görme kaybına yol açan SRAT tedavisi için birçok konvansiyonel ve alternatif yöntem denenmişse de günümüzde halen görme keskinliğini artıran ve retinada gelişen iskemi-reperfüzyon hasarını önleyecek ya da en aza indirgeyecek bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (1). SRAT ve iskemi-reperfüzyon patogenezinin dayanan hastalıklarda patolojik süreci anlamak ve uygun tedavi seçeneğini oluşturmak amacıyla birçok deneysel ve klinik çalışma gerçekleştirilmiştir (76,102-106). SRAT'nin insanda en sık nedeni emboli olarak bilirse de iskemi-reperfüzyon modeli oluşturmak için, reperfüzyonun gerçekleşmesini garanti altına almak amacıyla, deneysel emboli oluşumu yerine alternatif SRAT modelleri kullanılmıştır. Deneysel retinal iskemi modeli olarak birçok yöntem denenmiştir ve sıklıkla uygulananlar göz içi basınç artışı (79,107), optik sinir ligasyonu (102), oftalmik damarların ligasyonu (108), ortak karotid arterin bilateral oklüzyonu (2 damar oklüzyonu) (109), bilateral vertebral arter ve ortak karotid arter oklüzyonu (4 damar oklüzyonu) (110), fotodinamik ablasyon (111) ve intravitreal glutamat reseptör agonist injeksiyonu (112) yöntemleridir. Bunlardan yüksek göz içi basıncı ile indüklenmiş retinal iskemi metodu en sık kullanılan yöntem olmuştur. Bu yöntemde bir rezervuara bağlı enjektör ucu ile ön kamara parasentezi yapılarak göz içi basıncı sistolik basıncın (110-120 mmHg) üzerine çıkarılarak, oküler perfüzyon engellenmektedir. Bu iskemi modelinde kanülün yerinden çıkması, tıkanması, hayvanın anestezisi altındayken refleks hareketleri sonucu kanülün globta perforasyona yol açması riskleri ve oküler perfüzyon basıncının hayvanın sistemik kan basıncına bağlı olması dolayısıyla her hayvanda aynı iskemik etkinin elde edilememesi sorunu mevcuttur . Gehlbach ve Purple, 90 ve 120 dk.lık iskemi süreleri sonucunda ERG'deki b dalgasında düzelmenin, göz içi basınç artışı ile iskemi elde edilen grupta optik sinir ligasyonu yapılan gruba göre daha geç olduğunu gözlemişlerdir (50,113). Bu gecikmenin hem iskemik hem de basınç artışına bağlı hasarın birbirine eklenmesinden ileri gelebileceğini öne sürmüşlerdir (113). Buna karşılık, yapılan çeşitli iskemi-reperfüzyon çalışmalarında optik sinir ligasyonu ve göz içi basınç artışı modellerinin kalitatif olarak benzer iskemi sonuçları oluşturdukları gösterilmiştir (79,105). Bizim çalışmamızda, optik

sinir ve santral arter birlikte bağlanarak iskemi için gereken süre boyunca stabil bir oklüzyon elde edilmiştir.

SRAT modelinde herhangi bir girişimin etkili olduğunun gösterilebilmesi için, iskemi görmüş fakat tedavi edilmemiş hayvanlarda reperfüzyon süresince retinada şiddetli histolojik değişiklikler sağlanmış olması gerekmektedir. Klinikte, insan için iskemik retinanın hayatta kalma süresi kesin olarak belirlenememiştir (2). Agardh ve ark. sıçan retinasında hücre bazda moleküler değişiklikleri incelemek amacıyla 45 dk.lık iskemi uygulamışlardır (38). Osborne ve ark. çalışmalarında Wistar sıçanlarında 20 dk.lık retinal iskemi uygulamasının geri dönüşümsüz fonksiyonel hasarı göstermede yeterli olduğunu ERG bulgularıyla destekleyerek göstermişlerdir (2). Block ve Schwarz iskemi metodundan bağımsız olarak 30 dk.lık iskeminin ERG'de geri dönüşümlü değişiklikler oluşturduğunu göstermiştir (114), fakat santral retinal arter tıkanıklığında görülen geri dönüşümsüz değişiklikleri indüklemek için en az 60 dk.lık iskemi gerekmektedir (34). Hayreh ve ark. geri dönüşümsüz ERG değişikliklerinin 97-105 dk. uygulanan retinal iskemi sonucunda görüldüğünü tespit etmişlerdir (75). 90-100 dk. arasındaki retinal iskemiden sonra hücre ölüm gerçekleşebilmekte ve hücre içi proseslerin incelenmesini olanaksız kılmaktadır (32,34,105). Stéfansson ve ark. çalışmasında iskemik sürenin 60 dk.ya uzadığı durumda iç retinal tabakalarda ödemin arttığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada 1 ve 2 saatlik reperfüzyon süresi sonrasında maksimum hasarın görüldüğü, iskemi 90 dk.ya çıktığında retinal ödemin ağırlaştığı ve 4 saatlik reperfüzyon süresinde ödemin maksimum değerlere ulaştığı gösterilmiştir. Bu şekilde oluşan ödemin 24 saatlik reperfüzyon sonrasında dahi iskemi öncesi değerlere dönmediği saptanmıştır. Dolayısıyla bu çalışma sonucundaki verilere göre optik sinir ligasyonu ile yapılan iskemi süresinin 90 dk. ve takibeden reperfüzyon süresinin de 4 ve 24 saat olmasının patolojik inceleme için uygun olacağı ileri sürülmüştür (102). Rosenbaum ve ark.nın göz içi basıncı yüksekliği ve optik sinir ligasyonu modellerini karşılaştırdığı çalışmasında retinal yapı ve fonksiyonun en az 60 dk.lık iskemi ile değişiklik gösterdiği ve geçen zamanla değişikliklerin arttığı bildirilmiştir (115). Bizim çalışmamızda, histopatolojik değerlendirme yapılacak olması nedeniyle retinal iskemi süresi 90 dk., reperfüzyon süresi ise 4 saat olarak uygulanmıştır. Reperfüzyon süresi sonunda K ve İG gurubu ortalama kalınlıkları arasında istatistiksel olarak

anlamli fark bulunmasi iskemi modeli ve süresinin uygunluğunu destekler niteliktedir. K grubunun tüm örneklerinin histomorfolojik olarak normal sınırlar içinde oluşu deney basamaklarında, özellikle patolojik incelemeye hazırlık aşamasında gelişebilecek olası teknik sorunların saf dışı tutulduğunu destekler yöndedir. Tüm preparatlarda yalnızca RSLT tabakasında görülen hasar ve kaybın bu nedenle olduğu düşünülerek bu tabakaya ait veriler değerlendirilmeden çıkarılmıştır.

Retinal iskemi-reperfüzyon modelleri üzerinde yapılan çalışmaların bazılarında iskemi yöntemi, patogenez ve etioloji araştırması hedeflenirken, tedavi araştırmasına yönelik yapılan çalışmalar da mevcuttur. İskemik sürecin hem erken hem geç evresi yöntem ve patogenez araştırmalarını ilgilendirmektedir. Dolayısıyla bu tip araştırmalarda hem akut hem kronik iskemi metodolojisi uygulanabilmektedir. Nöral dokunun rejenerasyon yeteneği olmadığından ve iskemi yanı sıra reperfüzyonun da retinal hasar sürecinde etkili olmasından dolayı SRAT tedavisinde iskeminin erken dönemi önem kazanmaktadır. SRAT’de tedavide önemli hedeflerden birinin retinal elemanlarda apopitozis ve nekroz gelişmeden homeostazisin sağlanması olduğu kabul edilmektedir (2). Geç dönemde tedavinin etkili olduğu tek durum diyabete bağlı kronik retinal iskemi ya da bazen glokomdur (116). Bu nedenle SRAT tedavisi üzerine yapılacak deneysel çalışmaların özellikle iskemi-reperfüzyonun erken evresinde gerçekleştirilmesi tercih edilmelidir. Dolayısıyla bu çalışmada akut iskemi-reperfüzyon modelinde 4 saatlik reperfüzyon sonrasındaki erken dönem değişiklikleri incelenerek oksijen ve ozonun tedavide etkinlikleri değerlendirilmiştir.

Retinanın farklı bölgelerde farklı kalınlığa sahip olması nedeniyle, literatürde iskemi-reperfüzyon hasarında retinal kalınlıkların incelendiği çalışmalarda aynı lokalizasyondan kalınlık ölçümü yapılması amacıyla çeşitli yöntemler tercih edilmiştir. Junk ve ark. (117), Luan ve ark. (118) iskemi-reperfüzyon oluşturdukları sıçan retinalarında histomorfolojik değerlendirmeyi, retinal kesitlerde optik diske 1 mm mesafedeki alandan yaptıkları dört ayrı ölçümün ortalamasını alarak gerçekleştirmişlerdir. Lai ve ark. iskemi oluşturulan sıçan retinalarında alfa-2 adreseptör agonistinin hasarı önleyici etkisini gösterdikleri çalışmalarında, retinal tabaka ölçümlerini, optik sinir başından 600-800 µm uzaklıktaki aralıktan gerçekleştirmişlerdir (119). LaVail, rod fotoreseptörlerinin yapısını içeren

çalışmasında ölçümleri optik sinire 200-350 µm mesafeden gerçekleştirmiştir (120). Mukaida ve ark (121). benzer bir iskemi-reperfüzyon çalışmasında sıçan retinal kalınlık ölçümlerini optik sinir başlangıcından 200-400 µm mesafeden, Inokuchi ve ark. (122) 375- 625 µm mesafeden, Unoki ve ark. (123) ise 400-440 µm mesafeden, Rosenbaum ve ark. 200 µm mesafeden (115) yapmışlardır. Yapılan çalışmalarda, retinal kalınlık ölçüm alanı seçimi için benzeri ve çeşitli örnekler bulunsa da, özet olarak anatomik ve histolojik varyasyonlardan kaçınmak amacıyla, genel olarak optik sinirden itibaren 1 mm'lik mesafeyi içeren bölgede ölçümün yapılması tercih edilmiştir. Çalışmamızda, ölçümlerde standardizasyon amacıyla, patolojik preparatlarda retinal kalınlık ölçümleri optik sinir başlangıcından 125 µm ve 350 µm olmak üzere iki farklı uzaklıktan yapılmıştır. Retinal kalınlık ortalamalarının karşılaştırmaları incelendiğinde, gruplar arasındaki farklılıkların 350 µm uzaklıktan yapılan ölçümlerde daha belirgin olarak ortaya çıktığı görülmüştür. Bu sonucun, bahsedilen anatomik varyasyonlar nedeniyle olabileceği düşünülebilir. İnsanlarda glokomdaki görme alan defektlerinin ve diabetik retinopatilerdeki mikroangiopatilerin retinanın üst kadranda gözlenmesini araştıran çalışmasında, Chung ve arkadaşları, üst bölgede bulunan damarların hiperkapni durumunda alt kadranda göre daha güçlü vasokonstriksiyon yaptığını tespit etmişlerdir (124). Vasküler regülasyona bağlı değişiklikler ve hücre yoğunluğu en fazla üst kadranda olduğundan bizim çalışmamızda ölçümler optik sinirin üstündeki alanda gerçekleştirilmiştir.

Belirtildiği gibi retina çift yönlü kanlanmaya sahiptir. DPT'ye kadar olan iç kısım santral retinal arter dallarından beslenirken, dış kısım koryokapillaris tarafından beslenir. Fotoreseptör hücrelerin hücre sitoplazmaları DNT'de bulunmaktadır, dolayısıyla beslenmesi büyük oranda koryokapillaris tarafından yapılır. Klinikte SRAT sonucunda dış retinada iskemi ve yapısal değişiklikler görülmez. Dış retinal tabaka iskemisi, regmatojen retina dekolmanında RPE'den ayrılması ya da koryokapillaris dolaşımının bozulması nedeniyle olabilir. Foveasız hayvanlarda iskemi retinada difüz ödeme yol açar ve Japon bayrağı görünümü görülmemektedir (2). Büchi ve ark.nın (79) önerdikleri yüksek göz içi basıncı ile indüklenmiş iskemi modeli sıçanlarda hem retinal hem de uveal kan akımını bozmaktadır, ERG'de b ve a dalgalarının kaybı da bunu destekler niteliktedir (2). Özden ve ark. 4 damar

oklüzyonu ile sıçan retinalarında oluşturulan çeşitli sürelerde iskemiye takiben uyguladıkları 4 saatlik reperfüzyon modeli ile, 30 dk.lık iskemi grubunda izlenen belirgin histopatolojik değişikliğin özellikle iç retinal tabakalarda fazla olduğunu göstermişlerdir. 90 dk.lık iskemi uygulanan grupta bu bulgular daha ağır izlenmiştir. Çalışma sonuçlarının aynı zamanda daha önce yapılmış benzer deneylerle örtüştüğü belirtilmiştir (104). Özbay ve ark. benzer yöntemle oluşturdukları iskemik ön koşullamanın reperfüzyon hasarına etkisini inceledikleri çalışmalarında kontrol iskemi grubunda DNT ve FRT’de vakuolizasyon, DPT’de ödeme bağlı kalınlaşma ve GHT’de yer yer vakuolizasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu tespit etmişlerdir. İNT ve İPT ortalama kalınlıkları iskemik kontrol grubunda ön koşullama grubuna göre daha fazla bulunmuştur (106). Szabo ve ark. 90 dk.lık iskemi ve 24 saat reperfüzyon sonrası lökosit infiltrasyonu gözlemlemişlerdir (34). Özden ve ark. çalışmasında lökosit infiltrasyonu görülmemesinin nedeni olarak reperfüzyon süresinin kısalığı öne sürülmüştür (104). Lam ve ark. yüksek göz içi basıncı indüksiyonu ile oluşturdukları 60 dk.lık iskemi ve 4 saatlik reperfüzyon sonucunda İNT ve GHT’de bazı hücrelerde nükleer yoğunlaşma, İPT’de kalınlaşma belirlemişlerdir. Reperfüzyon süresi 8 saatlik olan deneklerde İNT’de vakuolizasyon artarken, 48 saatlik reperfüzyon sonunda İPT ve İNT’de atrofi bulgularının gelişmeye başladığını göstermişlerdir (125). Szabo ve ark.nın çalışmasında ise optik sinir ligasyonu ile oluşturulan 30, 60, 90 dk. iskemi ve 30 dk., 1, 2, 4 ve 24 saat reperfüzyon süreci sonrasında 30 dk.lık iskemi grubunda histolojik değişiklik gözlemezlerken 60 dk.lık iskemi grubunda retinal tabakalarda orta şiddette, 90 dk.lık iskemi grubunda ise ağır şiddette ödem bulgularıyla karşılaşmışlardır. Ek olarak bu bulguların 90 dk.lık grupta diğer grupların tersine 24 saatlik reperfüzyon sürecine rağmen düzelme göstermediklerini gözlemlemişlerdir (34).

Bizim çalışmamızda bu bulgularla uyumlu olarak iskemi grubunda kontrol grubuna oranla, özellikle iç retinal tabakalarda belirgin olmak üzere, tüm retinal tabakalarda kalınlık artışı, ödem ve vakuolizasyon gibi akut dönem iskemi reperfüzyon hasarı bulguları gözlenmiştir. İG grubunda tüm retinal tabakalarda, diğer gruplara oranla daha şiddetli vakuolizasyon, kalınlaşma ve tabakalarda ayrışma olduğu görülmüştür. Bu bulgular İG grubunda tüm tabakalarda görülmekle birlikte bazı preparatlarda dış tabakalarda iskemik histopatolojik değişimlerin görülmediği ve

hemen tüm preparatlarda iç retinal tabakalarda dış tabakalara oranla bulguların daha ağır olduğu gözlenmiştir. İstatiksel değerlendirmelere bakılacak olursa, K grubu ve İG grubunun ortalama retinal kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular ışığında, uygulanan iskemi yöntemi ve süresi, ve reperfüzyon süresinin beklenen akut dönem iskemi-reperfüzyon hasarını oluşturabildiği yorumuna varılmıştır. Çalışmamızda reperfüzyon süresi kısa olduğundan mononükleer hücre infiltrasyonunun belirgin olmadığı görülmüştür.

Retinal iskemi-reperfüzyon çalışmalarında retinal fonksiyonun durumunu belirlemek amacıyla ERG'den yararlanılan çalışmalar da mevcuttur. ERG'de azalmış b dalgasının iskemik retinada kötü prognoza işaret ettiği uzun yıllardır bilinmektedir (126). Retinanın dış tabakasının iskemiye direncine bağlı olarak ve uygulanan iskemi yönteminden bağımsız olarak b dalgasının, a ve c dalgalarına göre iskemide daha çok değişiklik gösterdiği görülmüştür (2). Dolayısıyla deneysel retinal iskemi modellerinde b dalgası amplitüdü incelenmesine önem verilmektedir. Yine çeşitli çalışmalarda iskemik retinada histolojik değişiklikler henüz görülmeden b dalgasında azalma olduğu gösterilmiştir (114,115). Osborne ve ark., sıçanda göz içi basıncı artışı ile indüklenen 45 dk.lık iskemiden sonra İPT'de inceleme, ganglion hücrelerinde kayıp tablosu tam oturmadan b dalgasında düşüş olduğunu belirtmişler ve bu nedenle ERG'nin iskemik retinal hasarı saptamada histolojik bulgulara üstün olduğu yargısına varmışlardır (2). Buna karşılık Hayreh ve ark. ERG'nin retinal fonksiyonların geri dönmesinde kusursuz bir belirteç olmadığını ve yalnızca fotoreseptör hücrelerle bipolar hücrelerin fonksiyonu hakkında fikir verdiğini, ganglion hücrelerinin durumunu yansıtmadığını belirtmiştir. Bu tip çalışmalarda ERG ve görsel uyarılmış potansiyelin (GUP) birlikte çalışılmasıyla ganglion hücre fonksiyonunu da işin içine katarak daha duyarlı sonuçlar elde edilmesinin mümkün olacağını bildirmişlerdir. Block ve ark. ise ERG'deki b dalgasında görülen düşüşün uygulanan iskemi modeline göre farklı oranlarda olduğu sonucuna varmışlardır (105). Bizim çalışmamızda histopatolojik bulguların ERG ya da GUP bulguları ile desteklenmemiş olması çalışmanın eksik yönlerinden sayılabilir.

Hayreh ve ark. SRAT konusunda, özellikle tedavisi üzerine, birçok yanlış kabul olduğunu belirtmişlerdir. SRAT, ileri derecede görme kaybı ile giden oftalmik acildir ve genel olarak vizüel düzelme şansının çok az olduğuna inanılmaktadır.

Uzun yıllardır görme keskinliğinde düzelme elde etmek amacıyla uygulanan bazı yaklaşım ve tedaviler mevcuttur. Hayreh ve ark.na göre kanıtlanmış olumlu etkisi olan tedavi bugüne kadar bulunamamıştır bu nedenle hastaların önemli bir kısmı tedavisiz takip edilebilir. Konvansiyonel tedaviler santral retinal arterdeki emboliyi ilerletmek için yapılan oküler masaj; çeşitli medikal ve cerrahi yollarla retinal perfüzyon basıncı artırılarak intraoküler basıncın azaltılması; sublingual izosorbid dinitrat verilmesi; ekspiryum havasındaki CO₂'nin tekrar solutulması; karbojen solutulması ya da retrobulber vazodilatatörler ile santral retinal arterin vazodilatasyonu; antiplatelet tedavisi ve heparin tedavisini içerir. Diğer muhtelif tedaviler intravenöz ya da lokal intraarteryel olarak oftalmik arter içine trombolitik ajan verilmesi, izovolemik hemodilüsyon, HBOT, pentoksifilin verilerek kırmızı kan hücrelerinin rijiditesinin azaltılması, SRAT'yi takiben oluşan vasküler endotelial ödemi azaltmak amacıyla verilen sistemik intravenöz kortikosteroidler, neodmium: yitrium alüminyum garnet (Nd:YAG) lazer arteryotomi ve embolektomi, supraorbital arterin kanülasyonu ve antiplazmotik papaverinin retrograd enjeksiyonunu içerir (1). Özet olarak uygulanmakta olan tedavilerin hedefi arteryel tıkanıklığın giderilmesi ve oksijenasyonun restorasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Tıkanıklığın giderilmesi ve iskemik dokuda oksijenasyonun başlaması sonucu hasarın arttığı ve reperfüzyon hasarının geliştiği, ilk Jennings ve ark. tarafından gösterilmiştir (127). Son yıllarda reperfüzyon hasarının daha iyi tanınması sonucu retinayı toksik metabolik hasardan korumaya yönelik olarak eksitotoksin bloke edici, antioksidan ve serbest radikal temizleyici ajanların kullanılması gündeme gelmiştir (87,128).

Atebara ve ark.nın 89 hasta üzerinde yaptıkları çalışmaya göre tedavi edilmeyen ve konvansiyonel yöntemlerle tedavi edilen gruplardan alınan sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (88). Aynı şekilde Mueller ve ark.nın 102 hastayı kapsayan çalışmasında sıklıkla uygulanan minimal invazif tedavilerin SRAT'nin normal hastalık seyrini değiştirmedeğini vurgulanmıştır (129). Beatty ve Au Eong'un SRAT'de lokal intraarteryel fibrinolizis tedavisi üzerine yapılan literatürü inceleyen çalışmasında, yapılan tüm çalışmaların retrospektif olup randomize olmadıklarını ve metodolojinin genelde başarılı olmadığını, ve bu bulguların bahsedilen tedavinin önerilmesinde yeterli olmayacağını vurgulamışlardır (130). SRAT'ye en sık neden olan embolinin en sık nedeni % 74

oranla kolesterol plakları, % 10,5 oranla kalsifiye materyal ve yalnızca % 15,5'i platelet-fibrin embolisi nedeniyle olmaktadır. Ayrıca fibrinolitik tedavinin felç riskini artırma olasılığından dolayı Hayreh ve arkadaşları bu bilgiler doğrultusunda fibrinolitik tedavinin % 85 olguda bilimsel dayanağının olmadığını öne sürmektedirler (1). Aynı şekilde, Fraser ve Siriwardena'nın araştırmasında literatürdeki çalışmaların kontrol grubu olmayan ve randomize olmayan çalışmalar olmasından dolayı, çalışmalarda önerilen tedavilerin kanıta dayalı başarıları bulunmadığı ve bu nedenle arteritik olmayan SRAT tedavisinde birbirlerine üstünlükleri olmadığı ileri sürülmüştür (131). Bahsedilen çalışmalar genel olarak klinik verileri bildirmekle birlikte bizim çalışmamızda hayvan denekler kullanılmış ve kontrol, iskemik ve ozon tedavisinin kontrolü sayılabilecek oksijenle tedavi edilen grupları içermektedir. Dolayısıyla veriler incelendiğinde ozonun etkisini iskemik, normal ve oksijenle tedavi edilmiş bireylerle karşılaştırmak mümkün olmuştur.

İskemik ön koşullama fenomeni önceleri miyokartta (132) ve beyinde (133) uygulanmış olup, son dönemde retinal iskemik hasara karşı yapısal ve fonksiyonel koruyuculuğu araştıran çalışmalar da mevcuttur. SRAT modellerinde iskemik-reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla çeşitli ön koşullama çalışmaları yapılmıştır. Bunlardan bir kısmında ön koşullama iskemik öncesinde daha hafif ve kısa süreli iskemik tablosu yaratılarak, bir kısmında da iskemik modelini taklit eden etkilere sahip farmakolojik ajanlar verilerek gerçek iskemiyeye ön hazırlık yapılmıştır. Roth ve ark. 60 dk.lık iskemik ön koşullaması ile 1, 24, 72 saat ve 7 gün içerisinde gelişen iskemik-reperfüzyon hasarını engellemedeki etkisini incelemişler ve özellikle ön koşullamanın 24-72 saat önce uygulandığında histolojik hasarı önlediği ve ERG'de a ve b dalgalarını iyileştirdiğini gözlemişlerdir (103). Toprak ve ark. sıçanda SRAT'den 24 saat önce uyguladıkları 5 dk.lık iskemik ile SRAT sonrası oluşan hasarın azaltıldığını retinal kalınlıklardaki histolojik bulgularla göstermişlerdir. Özbay ve ark. iskemiden 48 saat önce 5dk.lık oluşturulan iskemik ön koşullama ile iskemik sonrası oluşan retinal hasarda histopatolojik olarak iyileşme bulguları gözlemişlerdir (106).

İskemik ön koşullama iskemik-reperfüzyon hasarını önlemede etkin gözükse de klinikte insan üzerinde uygulanamayacağından farmakolojik ön koşullama ile ilgili çalışmalar ön plana çıkmıştır. Alınak ve ark. 'guinea pig' deneklerde iskemiden

1 saat önce ve iskemiden sonra intraperitoneal olarak verilen IL-11'in proinflamatuvar etkisi sayesinde iskemik histopatolojik bulgularda ve retina kalınlıklarında iyileşme tespit etmişlerdir (134). Faberowski ve ark. oluşturdukları sıçan retinal iskemi-reperfüzyon modeline, iskemiden 2 gün önce, ROÜ oluşumunu engelleyen ve ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol uygulamışlar ve ek olarak iskemiden 5 dk. öncesinde başlayan ve reperfüzyondan 5 dk. öncesinde kesilen soğuk uygulaması yapmışlardır. Bu çalışmanın sonucuna göre, 48 saatlik reperfüzyon süresi sonrasında, allopürinolün tek başına etkisi olmadığı fakat soğuk uygulaması ile enerji gereksinimi azaltılarak piknotik hücre sayısının azaltıldığı gösterilmiştir (76). Yoon ve ark. potent bir N-metil D-aspartat reseptör antagonisti olan dekstrometorfanın iskemiden önce ve iskemi boyunca verilmesi ile ERG ve histolojik bulgularda iyileşme sağlandığını göstermişlerdir (135). Shibuki ve ark. iskemi-reperfüzyondan hemen önce ve reperfüzyon sonrası sıçanlara intravenöz yolla, IL-2 reseptör indükleyicisi olan rekombinant erişkin T hücreli lösemi türevi faktör vererek ERG ve histolojik bulgularda iskemik hasarın azaldığını göstermişlerdir (136). Özden ve ark. nın antioksidan, antiagregan, antiinflamatuvar etkileri olan trimetazidini, sıçanlarda iskemiden 30 dk. önce ve reperfüzyondan 5 dk. önce intraperitoneal olarak verdikleri çalışma sonucunda iskemi-reperfüzyon hasarının azaldığını histolojik bulgularla göstermişlerdir (104). Ayrıca, eritropoetin (117), E vitamini ve lutein (137), d-alloz (138) ve alfa-2 reseptör agonistinin (119) retinal iskemi-reperfüzyon hasarını önlediklerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bahsedilen çalışmalarda kullanılan ajanların iyileştirici etkileri göz önüne alındığında, iskemi ön koşullamasına benzer etkinin antiinflamatuvar ve antioksidan etkili ajanlarla elde edilebileceği görülmektedir.

Bizim çalışmamızda iskemi ön koşullamasını taklit etmek amacıyla oksijen ve ozon uygulamaları yapılmıştır. İstatiksel değerlendirmelere bakılacak olursa, O₂G grubunun ortalama retinal kalınlıklarının K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği fakat İG grubuna göre belirgin fark göstermediği gözlenmiştir. Histomorfolojik incelemede ise O₂G grubunda; vakuolizasyon, tabakalarda ayrışma ve kalınlık artışı gibi bulguların K grubundan ve O₃G grubundan daha ağır ve İG grubuna daha benzer şiddette olduğu gözlenmektedir. Ek olarak apoptotik hücre sayımında, O₂G grubunda görülen apoptotik hücrelerin kontrol grubundan fazla sayıda ve İG grubuna yakın sayıda olması histolojik bulguları destekler yöndedir.

Buna göre O₂G grubunda oksijen ön koşullama tedavisinin akut iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede belirgin etkisinin olmadığı sonucuna varılabilir.

Ozonun iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Ajamieh ve ark. sıçanlarda oluşturdukları hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik ön koşullama ve ozon ön koşullamasının etkilerini karşılaştırmışlar ve biyokimyasal parametreler açısından iki yöntemin eş sonuçlar verdiğini fakat histopatolojik incelemede ozonun iyileştirme etkisinin üstün geldiğini belirtmişlerdir (8). Stadlbauer ve ark. kardiyak greft vericisi ve alıcısına transplantasyon öncesi intraperitoneal olarak ozon uygulamışlar ve transplantasyon sırasında gelişen iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisini histolojik ve biyokimyasal bulgularla göstermişlerdir (139). Barber ve ark. renal transplantasyondan önce ozon ön koşullamasının sıcak renal iskemi yaratılan sıçanlarda uygulandığı çalışmaları renal hasarın azaltıldığını göstermişlerdir (9). Borrego ve ark. sisplatinle indüklenen sıçan renal iskemisinde gelişen hasarın azaltılmasında ozonun antioksidan sistem üzerinden etkili olduğunu göstermişlerdir (140).

Ozonun iskemi-reperfüzyon hasarına etkisi birçok sistem için araştırılmıştır, buna karşılık araştırmalarımıza göre literatürde oftalmoloji alanında vasküler oklüzif hastalıklara bağlı iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede ozon ön koşullama tedavisi ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra oftalmolojinin diğer alanlarında yapılan çalışmaların sayısı da oldukça azdır.

Berson ve ark. retinitis pigmentozalı hastalarda elektrik stimölasyonu, OHT ve cerrahinin sonuçlarını karşılaştırmışlar ve görme keskinliği, görme alanı ve ERG sonuçları açısından yöntemler arasında anlamlı fark bulamamışlar ve hastalarda hiçbir yöntemle iyileşme saptamamışlardır (10). Buna karşılık Copello ve ark. retinitis pigmentozalı hastalarda rektal insüflasyonla yaptıkları çalışma sonucunda görme alanı sonuçlarında iyileşme saptamışlardır (141). Neroev ve ark. regmatojen retina dekolmanı oluşan hastaları cerrahi öncesi ve sonrası dönemde izlemişler ve uygulamış oldukları ozon tedavisinin tedavide ERG ve hücresel belirteç bulgularıyla fonksiyonel iyileşmeye neden olduğunu göstermişlerdir (142). Iuzhakov ve ark. vitrektomi geçirecek hastalarda infüzyon sıvılarına gentamisin ve ozon ekleyerek

etkilerini karşılaştırmış ve ozonun antimikrobiyal etkisinin daha geniş spektrumda olduğunu bildirmişlerdir (143). Olwin ve ark. çalışmalarında minör OHT ile oftalmik herpes zosterli hastaların tümünde klinik sekelin ortadan kaldırdığını göstermişlerdir (144). Diaori ve ark. çalışmalarında, kuru tip YBMD'nin bulunduğu 90 hastanın, 6 yıl boyunca yılda 14 seans ozon terapisi yapılarak izlenmesi sonucunda hastalarda görme keskinliğinin anlamlı derecede arttığını gözlemişlerdir (145).

Çalışmamızda, sıçanlarda oluşturduğumuz SRAT modelinde görülen iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede ozon ön koşullama tedavisinin etkileri araştırılmıştır. O₃G ve İG gruplarının ortalama retinal kalınlıklarına genel olarak bakıldığında O₃G grubundaki kalınlıkların İG grubuna göre farklı bulunduğu gözlenmektedir. Aynı şekilde O₃G grubunun retinal kalınlık ortalamaları O₂G grubundan farklılık göstermektedir. Buna karşılık O₃G grubunun kalınlık değerleri kontrol grubuna yakın değerlerde tespit edilmiştir. Ek olarak histomorfolojik bulgular olan vakuolizasyon, tabakalarda ayrışma bulguları O₃G grubunda, O₂G ve İG grubuna göre daha hafif şiddette gözlenmekle birlikte bu bulgular kontrol grubu ile benzer özellikler göstermektedir. Apoptotik hücre sayımlarında, O₃G ve kontrol grubu değerlerinin birbirine yakınlığı ve O₂G ile İG grubundan daha az sayıda apoptotik hücre görülmesi histolojik bulguları desteklemektedir. Buna göre retinal iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede ozon ön koşullamasının etkili olduğu sonucuna varılmaktadır. Ozon tedavisinde tampon madde olarak verilen oksijenin bu etkiye katkısının olmadığı gözlenmektedir.

Sonuç olarak ozon ön koşullama tedavisi, SRAT'ye bağlı retinada gelişen iskemi-reperfüzyon hasarının etkilerini azaltır yönde gözükmektedir. İskemi modelimizin literatürde de belirtildiği gibi panretinal iskemi oluşturması, ozon ve oksijen tedavilerinin ön koşullama olarak iskemiden önce uygulanması ve uygulamanın insanlarda tercih edilmeyen intraperitoneal yolla olması çalışma sonuçlarının insanlarda yapılabilecek klinik uygulama sonuçları ile çelişmesine neden olabilir. Ek olarak SRAT'de oklüzyonun kaldırılmaması durumunda dolaşım yoluyla etki eden hiçbir tedavi başarılı olamayacaktır. Dolayısıyla SRAT tedavisinde tedavi planı öncelikle tıkanıklığın giderilmesi ve ek olarak iskemi-reperfüzyon hasarının baskılanmasına yönelik olmalıdır. Antioksidan, antiinflamatuvar ve antienfektif özellikleri ile ozon vazooklüzif hastalıkların tedavisinde yeni bir

alternatif olarak gözükmele birlikte klinikte uygulanabilmesi için uygulama zamanı, dozu, tekrar sayısı ve endikasyonların belirlenmesi ileride yapılacak çalışmalarla mümkün olacaktır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda ozon ve oksijen ön koşullama teavisinin sıçan retinalarında SRAT modeli ile oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarını önlemedeki etkileri araştırılmıştır. Ozonun oksijen tedavisine göre iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede üstünlüğü; ortalama retinal kalınlık değerleri, histomorfolojik bulgular ve apoptotik hücre sayımı bulgularıyla gösterilmiştir. Ayrıca ozona ait bulguların kontrol grubuna ait değerlere yakınlığı tedavi edici etkinliğini destekler niteliktedir. Ozon tedavisinde tampon madde olarak verilen oksijene ait bulgular iskemi grubundan belirgin fark göstermemiştir. Dolayısıyla oksijen/ozon karışımını ile elde edilen iskemi-reperfüzyon hasarını önleyici etkiye oksijenin katkıda bulunmadığı söylenebilir. SRAT tedavisi için günümüzde tıkanıklığın giderilmesi ve reperfüzyonun sağlanması için önerilen ve uygulanmakta olan tedaviler, iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmaya yönelik tedaviler olmadan tek başlarına görme prognozunda belirgin iyileşme sağlayamamakla beraber, tıkanıklık giderilmeden uygulanacak herhangi bir tedavinin etkinliğinin kalıcı olmayacağı da yadsınamaz bir gerçektir. SRAT tedavisinde son dönemlerde denenen iskemik kaskad basamaklarına yönelik tedaviler ile reperfüzyon hasarını engellemede başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Deneysel çalışmamızın sonuçlarına göre, ozon; antioksidan, antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle iskemi-reperfüzyon hasarının oluşum basamaklarında etki gösterebilecek bir ajan olarak gözükmektedir. İnsanlarda ozon tedavisinin retinal vazooklüzif hastalıklarda uygulanabilirliğinin kanıtlanması için ileri düzeyde ve klinik deneyleri kapsayan çalışmalar yapılması gerekmektedir.

7. ÖZET

SIÇANLARDA İNTRAPERİTONEAL MEDİKAL OZON İLE YAPILAN ÖN KOŞULLAMA TEDAVİSİNİN RETİNAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI ÖNLEMEDE ETKİSİ

AMAÇ: Sıçanlarda intraperitoneal medikal ozon ile yapılan ön koşullama tedavisinin retinal iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede etkisinin histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması.

YÖNTEM ve GEREÇLER: 44 adet genç erişkin erkek Wistar albino türü sıçan denekler dört gruba ayrıldı: kontrol grubu (K, n=11), iskemi grubu (İG, n=11), oksijen ön koşullaması grubu (O₂G, n=11), ozon ön koşullaması grubu (O₃G, n=11). İskemiden bir gün öncesine kadar 3 gün boyunca O₂G grubuna oksijen ve O₃G grubuna ozon ön koşullama tedavisi uygulandı. K grubu hariç diğer gruplarda SRAT oluşturuldu. 90dk.lık iskemiye takiben 4 saatlik reperfüzyon süresi sonrasında tüm gözlere enükleasyon uygulandı. Gözlerde histopatolojik yöntemle retinal kalınlık analizi ve TUNEL yöntemiyle retinal apoptotik indeks analizi yapıldı.

BULGULAR: O₃G grubuna ait ortalama retinal kalınlıklar, O₂G ile İG gruplarının ortalama kalınlıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü (p< 0,05), O₃G grubu ve K grubunun ortalama retinal kalınlıkları arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi (p> 0,05). O₂G grubunun ortalama retinal kalınlıkları ile İG grubunun ortalama kalınlıkları arasında anlamlı fark olmadığı görüldü (p> 0,05). Apoptotik hücre sayımı sonucunda K grubundaki TUNEL-pozitif hücre sayısının mm² başına en az, İG grubunda en fazla sayıda olduğu belirlendi. O₂G grubunda TUNEL-pozitif hücre sayısı İG grubuna yakın değerlerde, O₃G grubunun değerleri K grubuna yakın değerlerde bulundu. Buna göre immünohistokimyasal bulguların histopatolojik bulguları destekler yönde olduğu tespit edildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ: Sıçanlarda oluşturulan retinal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı ozon ön koşullama tedavisinin koruyucu etkisinin olduğu buna karşılık oksijen ön koşullamasının etkili olmadığı gözlenmiştir. Medikal ozon tedavisi iskemi-reperfüzyon hasarını önleme etkisi ile retinal vazooklüzif hastalıkların tedavisinde gelecek vaadeden bir ajan olarak görülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Santral retinal arter tıkanıklığı, retina, ozon, ön koşullama, iskemi-reperfüzyon hasarı.

8. ABSTRACT

EFFECT OF INTRAPERITONEAL MEDICAL OZONE PRECONDITIONING IN THE PROTECTION AGAINST RETINAL ISCHEMIC-REPERFUSION INJURY IN RATS

PURPOSE: To investigate the effect of intraperitoneal medical ozone preconditioning in the protection against retinal ischemic-reperfusion injury in rats using histopathologic and immunohistochemistry methods.

MATERIALS AND METHOD: 44 adult male Wistar albino rats were divided in four groups: control group (K, n=11), ischemia group (IG, n=11), oxygen preconditioning group (O₂G, n=11), ozone preconditioning group (O₃G, n=11). Until one day before the ischemia application, O₂G group was treated by oxygen preconditioning and O₃G group by ozone preconditioning during three successive days. Except K group, central retinal artery occlusion was performed in all groups. After 90 min. of ischemia followed by 4 hours of reperfusion, all eyes were enucleated. Histopathologically retinal thickness analysis and TUNEL-labeled retinal apoptotic cell counts were done.

RESULTS: Comparison of mean retinal thickness values between O₃G and O₂G groups and between O₃G and IG groups showed statistically significant differences ($p < 0,05$), and between O₃G and K groups there was no significant difference ($p > 0,05$). Comparison of mean retinal thickness values of O₂G and IG group showed no significant difference ($p > 0,05$). Results of retinal apoptotic cell counts using TUNEL method were compatible with histopathologic analysis. There were fewer apoptotic cells per mm² in O₃G and K groups than IG and O₂G groups. Number of apoptotic cells was similar between IG and O₂G groups, and between O₃G and K groups.

DISCUSSION: Findings demonstrate the protective effect of medical ozone preconditioning in a model of retinal ischemia-reperfusion in rats and oxygen

preconditioning has no effect. In conclusion, with the preventive effect on ischemia-reperfusion injury, medical ozone may become a promising choice of therapy in vaso-occlusive diseases of retina.

KEY WORDS: Central retinal artery occlusion, retina, ozone, preconditioning, ischemia-reperfusion injury.

9. KAYNAKLAR

1. Hayreh SS, Zimmerman MB. Central retinal artery occlusion: visual outcome. *Am J Ophthalmol* 2005;140(3):376-91
2. Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(1):91-147.
3. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim* 2009;22(3):5-14.
4. Bocci V. Physical-chemical properties of ozone. Natural production of ozone. The toxicology of ozone. In: *Ozone. A new medical drug*. Dordrecht: Springer; 2005. vol Chapter 1, p. 5-8.
5. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006;37(4):425-35.
6. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res* 2008;39(1):17-26.
7. Bocci V. How does ozone act? How and why can We avoid ozone toxicity? In: Bocci V, editor. *Ozone. A new medical drug* Dordrecht: Springer; 2005. vol Chapter 4, p. 19-28.
8. Ajamieh HH, Menéndez S, Merino N, Martínez-sánchez G, Re L, León O. Ischemic and ozone oxidative preconditioning in the protection against hepatic ischemic-reperfusion injury. *Ozone: Science & Engineering* 2003;25:241-50.
9. Barber E, Menéndez S, Leon OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, et al. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators of Inflammation* 1999;8:37-41.
10. Berson EL, Remulla JF, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C. Evaluation of patients with retinitis pigmentosa receiving electric stimulation, ozonated blood, and ocular surgery in Cuba. *Arch Ophthalmol* 1996;114(5):560-3.
11. Park SS. *The Anatomy and Cell Biology of the Retina*. Tasman W. Duane's *Clinical Ophthalmology on CD-ROM*. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

12. The Eye. In: Fundamentals and Principles of Ophthalmology. American Academy of Ophthalmology. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2008. vol Section 2, Part I, Chapter 2, p. 43-92.
13. Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. Functional Histology: A text and Colour Atlas Second Edn. Churcill Livingstone Medical Division of Longman Group Ltd. Hong Kong. 1987:318-29.
14. Milam AH, Smith JE, John SK. Anatomy and Cell Biology of the Human Retina. Tasman W. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
15. Malkoç İ. İnsan ve Görme Duyusu Gelişmiş Hayvanların Görme Yollarının Karşılaştırmalı Anatomisi. EAJM 2006;38(3):124-9.
16. Hendrickson A. Organization of the Adult Primate Fovea. In: Philip L. Penfold, Provis JM, editors. Macular degeneration: Springer Verlag Berlin, Heidelberg; 2005. vol Chapter 1, p. 1-2
17. Kaynak S. Retinal Antijenler Ve Retina-immün Sistem İlişkileri. Türkiye Klinikleri J Ophthalmol 1992;1(2):126-37.
18. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. Chapter 7, Head; p.957-977. (Head).
19. Justice Jr. J, Lehmann RP. Cilioretinal arteries. A study based on review of stereo fundus photographs and fluorescein angiographic findings. Arch. Ophthalmol 1976(94):1355–8.
20. Roh S, Weiter JJ, Duker JS. Ocular Circulation. Tasman W. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
21. Butler FK Jr, Hagan C, Murphy-Lavoie H. Hyperbaric oxygen therapy and the eye. Undersea Hyperb Med 2008;35(5):333-87.
22. Langham ME. Homeostasis, Autoregulation, and Relative Ischemia. In: M.E. Langham, editor. Ischemia and Loss of Vascular Autoregulation in Ocular and Cerebral Diseases: A New Perspective. New York: Springer Science+Business Media; 2009. vol Section 1 Chapter 4, p. 19-26.
23. Free radicals and antioxydants. In: Fundamentals and Principles of Ophthalmology. American Academy of Ophthalmology. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2008. vol Section 2, Part IV, Chapter 16, p. 365-76.
24. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. Proc Soc Exp Biol Med 1992;200:248–54.

25. Husain D, Ambati B, Adamis AP, Miller JW. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Ophthalmol Clin North Am* 2002;15(1):87-91.
26. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68(7-8):989-98.
27. Athar M, Abdulla H, Sultana S, Favier A, Pero R. Free radicals and trace elements. *J Trace Elem Exp Med* 1993;6(65-73).
28. Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. *T Klin J Pediatr* 1999;8(1):42-7.
29. Sparrow JR, Vollmer-Snarr HR, Zhou J, Jang YP, Jockusch S, Itagaki Y, et al. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation. *J Biol Chem* 2003;278:18207-13.
30. Yu BP. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-62.
31. Smith ML, Auer RN, Siesjo BK. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1984;64(4):319-32.
32. Hughes WF. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res* 1991;53:573-82.
33. Katai N, Yoshimura N. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11):2697-705.
34. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C, Braquet P. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(5):1471-8.
35. Roth S, Pietrzyk Z. Blood flow after retinal ischemia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(8):3209-17.
36. Anderson DR, EB D. Sensitivities of ocular tissues to acute pressure-induced ischemia. *Arch Ophthalmol* 1975;93(4):267-74.
37. Kalamkarov GR, Tsapenko IV, Zueva MV, Ivanov AN, Konstantinova TS, Bugrova AE, et al. Experimental model of acute ischemia of the retina in rats. *Bull Exp Biol Med* 2008;145(6):688-91.

38. Agardh CD, Gustavsson C, Hagert P, Nilsson M, Agardh E. Expression of antioxidant enzymes in rat retinal ischemia followed by perfusion. *Metabolism Clinical and Experimental* 2006;55:892-8.
39. Zimmerman LE. Embolism of central retinal artery. Secondary to Myocardial Infarction With Mural Thrombosis. *Arch Ophthalmol* 1965;73:822-6.
40. Yanoff M, Fine BS. Ocular pathology: A text and atlas. In. 3rd ed. Philadelphia: J.D. Lippincott; 1989. p. 383-9.
41. Kincaid MC, Yanoff M, Fine BS. Retina. Tasman W. Duane's Clinical Ophthalmology on CD-ROM. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
42. Tezel GM, Seigel GM, Wax MB. Density-dependent resistance to apoptosis in retinal cells. *Curr Eye Res* 1999;19(5):377-88.
43. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 1988;254(5 Pt 1):G768-74.
44. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999;79(4):1431-568.
45. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53(1):135-59.
46. Muller A, Pietri S, Villain M, Frejaville C, Bonne C, Culcas M. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp Eye Res* 1997;64(4):637-43.
47. Block F, Schwarz M. Effects of antioxidants on ischemic retinal dysfunction. *Exp Eye Res* 1997;64(4):559-64.
48. Chidlow G, Schmidt KG, Wood JP, Melena J, Osborne NN. Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemiareperfusion. *Neuropharmacology* 2002;43:1015-25.
49. Yamamoto F, Hiroi K, Honda Y. Effects of intravenous superoxide dismutase and catalase on electroretinogram in the cat postischemic retina. *Ophthalmic Res* 1994;26(3):163-8.
50. Gehlbach P, Purple RL. Enhancement of retinal recovery by conjugated deferoxamine after ischemia-reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(2):669-76.

51. Gupta LY, Marmor MF. Mannitol, dextromethorphan, and catalase minimize ischemic damage to retinal pigment epithelium and retina. *Arch Ophthalmol* 1993;111(3):384-8.
52. Peachey NS, Green DJ, Ripps H. Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(1):58-65.
53. Nickells RW, Zack DJ. Apoptosis in ocular disease: a molecular overview. *Ophthalmic Genet* 1996;17(4):145-65.
54. Turgut B, Demir T, Çeliker Ü. Oftalmolojide apopitoz. *Firat Tıp Dergisi* 2006;11(1):6-11.
55. Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 1999;18(1):39-57.
56. Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, Martinez OM, Krams SM. Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Liver* 2001;21(4):272-9.
57. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84(2):299-308.
58. Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y. TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 1997;7(5):703-13.
59. Buchi ER. Cell death in rat retina after pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: electron microscopic study. II. Outer nuclear layer. *Jpn J Ophthalmol* 1992;36(1):62-8.
60. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986;251(6 Pt 2):H1306-15.
61. Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res* 1993;27(4):542-50.
62. Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth* 1998;45(7):670-82.

63. Hoshida S, Kuzuya T, Fuji H, Yamashita N, Oe H, Hori M, et al. Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Am J Physiol* 1993;264(1 Pt 2):H33-9.
64. Roth S. Post-ischemic hyperemia in the cat retina: the effects of adenosine receptor blockade. *Curr Eye Res* 1995;14(4):323-8.
65. Larsen AK, Osborne NN. Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(13):2603-11.
66. Demiryürek Ş, Ceylan H, Demiryürek AT. İskemik önkoşullamanın klinik uygulamaları. *Genel Tıp Derg* 2004;14(1):31-4.
67. Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? *Circ Res* 2000;87(7):543-50.
68. Kaynak S. Retinal arter tıkanıklıkları. *Oftalmoloji* 1993;2(1):57-65.
69. Sharma S, Brown GC. Retinal artery obstruction. In: Ryan SJ, editor. *Retina: The C.W. Mosby Co*; 2001. vol 2 p. 1350-67.
70. Reimers CD, Williams RJ, Berger M, Wisnicki HJ, Tranbaugh RF. Retinal artery embolization: a rare presentation of calcific aortic stenosis. *Clin Cardiol* 1996;19(3):253-4.
71. Cogan DG, Wray SH. Vascular occlusions in the eye from cardiac myxomas. *Am J Ophthalmol* 1975;80(3 Pt 1):396-403.
72. Sanborn GE, Magargal LE. Arterial Obstructive Disease of the Eye. Tasman W. *Duane's Clinical Ophthalmology on CD-ROM*. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
73. Bürümcek EY. Retina arter tıkanıklıkları ve tedavisi. *Ret-Vit* 2004;Özel sayı:225-32.
74. Rumelt S, Brown GC. Update on treatment of retinal arterial occlusions. *Curr Opin Ophthalmol* 2003;14(3):139-41.
75. Hayreh SS, Zimmerman MB, Kimura A, Sanon A. Central retinal artery occlusion. Retinal survival time. *Exp Eye Res* 2004;78(3):723-36.
76. Faberowski N, Stefansson E, Davidson RC. Local hypothermia protects the retina from ischemia. A quantitative study in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(11):2309-13.
77. Nayak MS, Marmor MF. Post-ischemia ERG recovery is influenced by temperature. *Curr Eye Res* 1995;14(2):81-5.

78. Romano C, Price MT, Almlı T, Olney JW. Excitotoxic neurodegeneration induced by deprivation of oxygen and glucose in isolated retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(2):416-23.
79. Buchi ER, Suıvaızdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica* 1991;203(3):138-47.
80. Landers MB, 3rd. Retinal oxygenation via the choroidal circulation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1978;76:528-56.
81. Vucetic M, Jensen PK, Jansen EC. Diameter variations of retinal blood vessels during and after treatment with hyperbaric oxygen. *Br J Ophthalmol* 2004;88(6):771-5.
82. Jampol LM. Oxygen therapy and intraocular oxygenation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1987;85:407-37.
83. Carlisle R, Lanphier EH, Rahn H. Hyperbaric Oxygen and Persistence of Vision in Retinal Ischemia. *J Appl Physiol* 1964;19:914-8.
84. Gallin-Cohen PF, Podos SM, Yablonski ME. Oxygen lowers intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19(1):43-8.
85. Yu DY, Cringle SJ, Yu PK, Su EN. Intraretinal oxygen distribution and consumption during retinal artery occlusion and graded hyperoxic ventilation in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(5):2290-6.
86. Ubels JL, Hoffert JR. Ocular oxygen toxicity: the effect of hyperbaric oxygen on retinal Na⁺-K⁺ ATPase. *Exp Eye Res* 1981;32(1):77-84.
87. Augsburger JJ, Magargal LE. Visual prognosis following treatment of acute central retinal artery obstruction. *Br J Ophthalmol* 1980;64(12):913-7.
88. Atebara NH, Brown GC, Cater J. Efficacy of anterior chamber paracentesis and Carbogen in treating acute nonarteritic central retinal artery occlusion. *Ophthalmology* 1995;102(12):2029-34; discussion 34-5.
89. Yu DY, Cringle SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res* 2005;80(6):745-51.
90. Özler M, Öter Ş, Korkmaz A. Ozon gazının tıbbi amaçlı kullanılması. *TAF Preventive Medicine Bulletin* 2009;8(1):59-64.
91. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediators Inflamm* 1998;7(5):313-7.

92. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol* 2007;41(5):504-11.
93. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol* 2006;20(3):133-8.
94. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs* 2004;27(3):168-75.
95. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep* 2005;10(3):121-30.
96. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000;486(1):10-3.
97. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 2003;24(8):449-55.
98. Bocci V. How is ozone administered? In: Bocci V, editor. *Ozone. A new medical drug*. Dordrecht: Springer; 2005. vol Chapter 5, p. 29-36.
99. Bocci V. The clinical application of Ozonotherapy. In: Bocci V, editor. *Ozone. A new medical drug*. Dordrecht: Springer; 2005. vol Chapter 9, p. 97-226.
100. Krinke G. *The laboratory rat*. In. London: Academic Press; 2000.
101. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005;24(4):433-56.
102. Stefansson E, Wilson CA, Schoen T, Kuwabara T. Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29(7):1050-5.
103. Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H, Goldstein IM, Maxwell KM, et al. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(5):777-85.
104. Ozden S, Kildaci B, Muftuoglu S, Cakar N, Yildirim C. Effect of trimetazidine on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Ophthalmologica* 2001;215(4):309-17.
105. Hayreh SS, Weingeist TA. Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: Retinal tolerance time to acute ischaemia. *Br J Ophthalmol* 1980;64(11):818-25.

106. Ozbay D, Ozden S, Muftuoglu S, Kaymaz F, Yaylali V, Yildirim C, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Can J Ophthalmol* 2004;39(7):727-32.
107. Smith GG, Baird CD. Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* 1952;35(5:2):133-6.
108. Otori Y, Shimada S, Morimura H, Ishimoto I, Tohyama M, Tano Y. Expression of c-fos and c-jun mRNA following transient retinal ischemia: an approach using ligation of the retinal central artery in the rat. *Surv Ophthalmol* 1997;42 Suppl 1:S96-104.
109. Block F, Schwarz M, Sontag KH. Retinal ischemia induced by occlusion of both common carotid arteries in rats as demonstrated by electroretinography. *Neurosci Lett* 1992;144(1-2):124-6.
110. Osborne NN, Block F, Sontag KH. Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Muller cells. *Vis Neurosci* 1991;7(6):637-9.
111. Mosinger JL, Price MT, Baia HY, Xiaoa H, Wozniaka DF, Olneya JW. Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina *Experimental Neurology* 1991;113(1):10-7.
112. Schwarcz R, Coyle JT. Kainic acid: neurotoxic effects after intraocular injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16(2):141-8.
113. Gehlbach PL, Purple RL. A paired comparison of two models of experimental retinal ischemia. *Curr Eye Res* 1994;13(8):597-602.
114. Block F, Schwarz M. The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. *Gen Pharmacol* 1998;30(3):281-7.
115. Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Singh M, Gupta G, Gupta H, Li B, et al. Functional and morphologic comparison of two methods to produce transient retinal ischemia in the rat. *J Neuroophthalmol* 2001;21(1):62-8.
116. Osborne NN, Melena J, Chidlow G, Wood JP. A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2001;85(10):1252-9.

117. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(16):10659-64.
118. Luan H, Roberts R, Sniegowski M, Goebel DJ, Berkowitz BA. Retinal thickness and subnormal retinal oxygenation response in experimental diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(1):320-8.
119. Lai RK, Chun T, Hasson D, Lee S, Mehrbod F, Wheeler L. Alpha-2 adrenoceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat. *Vis Neurosci* 2002;19(2):175-85.
120. LaVail MM. Kinetics of rod outer segment renewal in the developing mouse retina. *J Cell Biol* 1973;58(3):650-61.
121. Mukaida Y, Machida S, Masuda T, Tazawa Y. Correlation of retinal function with retinal histopathology following ischemia-reperfusion in rat eyes. *Curr Eye Res* 2004;28(6):381-9.
122. Inokuchi Y, Shimazawa M, Nakajima Y, Komuro I, Matsuda T, Baba A, et al. A Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform, NCX1, is involved in retinal cell death after N-methyl-D-aspartate injection and ischemia-reperfusion. *J Neurosci Res* 2009;87(4):906-17.
123. Unoki K, LaVail MM. Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(3):907-15.
124. Chung HS, Harris A, Halter PJ, Kagemann L, Roff EJ, Garzosi HJ, et al. Regional differences in retinal vascular reactivity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(10):2448-53.
125. Lam TT, Abler AS, Tso MO. Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(5):967-75.
126. Karpe G, Rendahl I. Clinical electroretinography in detachment of the retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1969;47(3):633-41.
127. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960;70:68-78.

128. Matzkin DC, Slamovits TL, Sachs R, Burde RM. Visual recovery in two patients after intravenous methylprednisolone treatment of central retinal artery occlusion secondary to giant-cell arteritis. *Ophthalmology* 1992;99(1):68-71.
129. Mueller AJ, Neubauer AS, Schaller U, Kampik A. Evaluation of minimally invasive therapies and rationale for a prospective randomized trial to evaluate selective intra-arterial lysis for clinically complete central retinal artery occlusion. *Arch Ophthalmol* 2003;121(10):1377-81.
130. Beatty S, Au Eong KG. Local intra-arterial fibrinolysis for acute occlusion of the central retinal artery: a meta-analysis of the published data. *Br J Ophthalmol* 2000;84(8):914-6.
131. Fraser S, Siriwardena D. Interventions for acute non-arteritic central retinal artery occlusion. *Cochrane Database Syst Rev* 2002(1):CD001989.
132. Martin HB, Walter CL. Preconditioning: an endogenous defense against the insult of myocardial ischemia. *Anesth Analg* 1996;83(3):639-45.
133. Chen J, Simon R. Ischemic tolerance in the brain. *Neurology* 1997;48(2):306-11.
134. Alınak A, Demir T, Turgut B, Akpolat N, Aydemir O, Demir N. Retinal iskemi-reperfüzyon modelinde rekombinant IL-11'in retinal dokuya etkisi. *Fırat Tıp Dergisi* 2010;15(1):5-9.
135. Yoon YH, Marmor MF. Dextromethorphan protects retina against ischemic injury in vivo. *Arch Ophthalmol* 1989;107(3):409-11.
136. Shibuki H, Katai N, Kuroiwa S, Kurokawa T, Yodoi J, Yoshimura N. Protective effect of adult T-cell leukemia-derived factor on retinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(8):1470-7.
137. Dilsiz N, Sahaboglu A, Yildiz MZ, Reichenbach A. Protective effects of various antioxidants during ischemia-reperfusion in the rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244(5):627-33.
138. Hirooka K, Miyamoto O, Jinming P, Du Y, Itano T, Baba T, et al. Neuroprotective effects of D-allose against retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(4):1653-7.
139. Stadlbauer TH, Eisele A, Heidt MC, Tillmanns HH, Schulz S. Preconditioning with ozone abrogates acute rejection and prolongs cardiac allograft survival in rats. *Transplant Proc* 2008;40(4):974-7.

140. Borrego A, Zamora ZB, Gonzalez R, Romay C, Menendez S, Hernandez F, et al. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm* 2004;13(1):13-9.
141. Copello M, Eguía F, Menéndez S, Menéndez N. Ozone therapy in patients with retinitis pigmentosa. *Ozone: Science & Engineering* 2003;25:223-32.
142. Neroev VV, Sarygina OI, Zueva MV, Tsapenko IV, Egorova EN. [Impact of ozone therapy on the electrophysiological parameters of the retina in patients operated on for its rhegmatogenous detachment]. *Vestn Oftalmol* 2007;123(5):33-6.
143. Iuzhakov AM, Bykov VP, Ziurniaeva ID, Gogodze MG. [New prospects in the treatment of intraocular infection]. *Vestn Oftalmol* 2000;116(2):20-2.
144. Olwin JH, Ratajczak HV, House RV. Successful treatment of herpetic infections by autohemotherapy. *J Altern Complement Med* 1997;3(2):155-8.
145. Diadori A, Nuti A, Ferrari G, Corradeschi F, Bocci V. Ozone therapy: a new perspective in ophthalmology. *Vision Res* 1996;36 (suppl):418.