

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

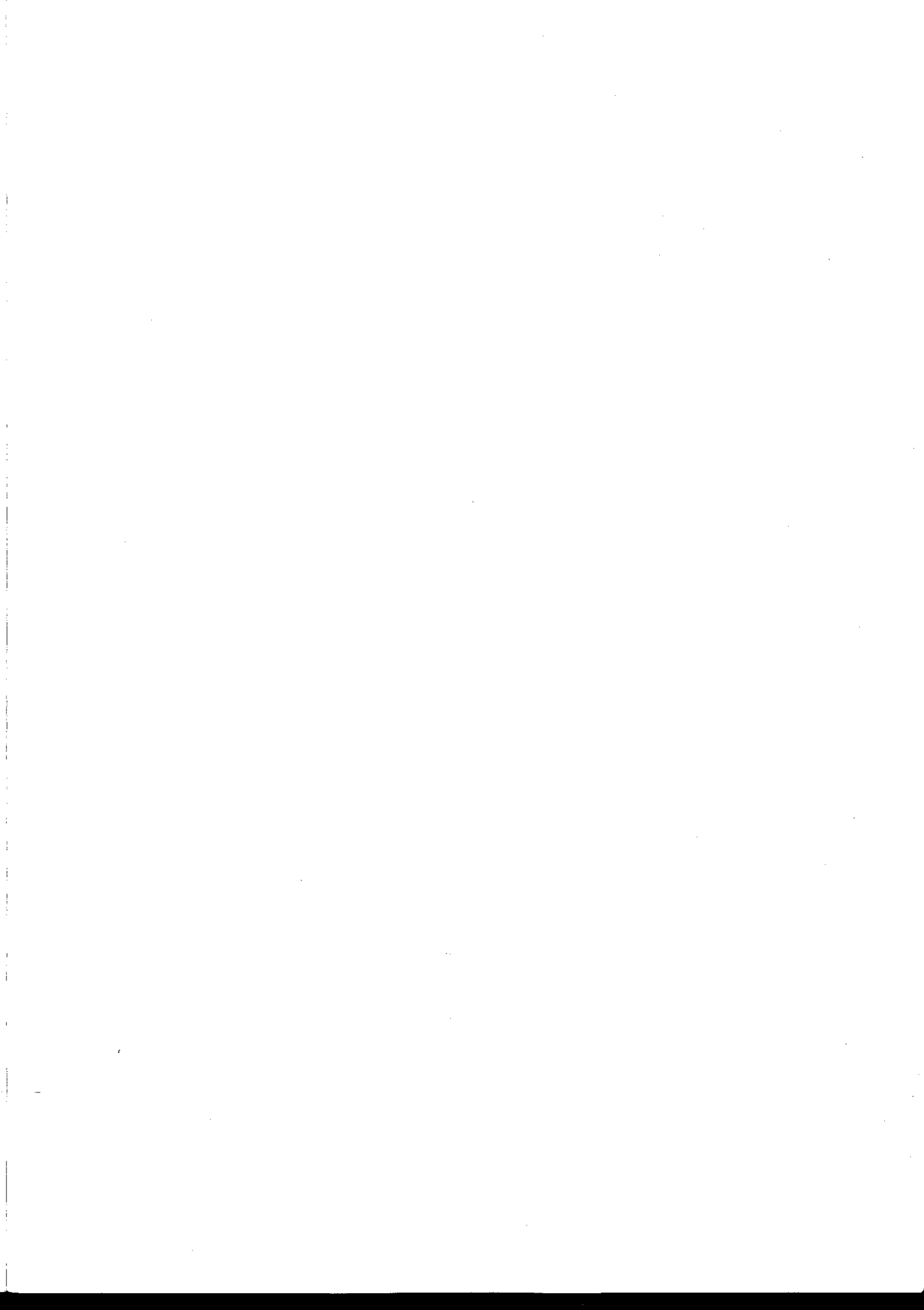
**GLOKOMLU OLGULARDA KONJONKTİVADA APOPTOZİSİN  
KANTİTATİF ANALİZİ VE TOPİKAL ANTİGLOKOM İLAÇLARIN  
APOPTOZİS ORANINA ETKİLERİ**

**Dr. Aysun ŞANAL DOĞAN**

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2002



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**GLOKOMLU OLGULARDA KONJONKTİVADA APOPTOZİSİN  
KANTİTATİF ANALİZİ VE TOPİKAL ANTİGLOKOM İLAÇLARIN  
APOPTOZİS ORANINA ETKİLERİ**

**Dr. Aysun ŞANAL DOĞAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
Prof. Dr. Mehmet ORHAN

**ANKARA**

**2002**

## TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı aşağıda adı geçen kişilere içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. T. Murat İrkeç, tez çalışmasında gerekli çalışma ortamını sağlamış, değerli önerileri ve bilimsel katkılarıyla destek olmuştur.

Sayın Doç. Dr. Figen Söylemezoğlu, tez çalışmasının patoloji ile ilgili bölümlerinin gerçekleşmesi için gerekli ortamı sağlamıştır.

Sayın Erdem Karabulut, çalışmanın istatistiksel analizini gerçekleştirmiştir.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

**Şanal Doğan, A., Glokomlu olgularda konjonktivada apoptozisin kantitatif analizi ve topikal antiglokom ilaçların apoptozis oranına etkileri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Tezi, Ankara, 2002.** Glokom, optik diskte ekskavasyon, sinir lifi demeti tipinde görme alanı defektleri ile karakterize kronik, ilerleyici, multifaktöriyel bir optik nöropatidir. Tedavide göz içi basıncını kontrol altına almak ve glokomun progresyonunu engellemek amacıyla uzun süreli topikal antiglokom ilaçlar kullanılmaktadır. Topikal ilaçlar konjonktiva epitel hücreleri ile direkt temas halindedir. Bu ajanların hücrede hasara yol açıp hücreyi ölüme götürmeleri muhtemeldir. Apoptozis ise genetik olarak kontrol edilen bir hücre ölüm şeklidir. Bu çalışmada topikal antiglokom ilaçların konjonktivada apoptozis oranlarına etkileri araştırıldı. Çalışmaya katarakt veya glokom nedeniyle cerrahi tedavi geçirmiş, 30 hastanın bulber konjonktivadan alınmış spesimenleri dahil edildi. Konjonktiva epitelindeki apoptotik hücreleri tespit etmek için *TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUTP nick-end labeling)* metodu uygulandı ve apoptozis oranları hesaplandı. Spesimenlerden elde edilen kesitler hematoksil-eosin ile boyanarak epitel hücreleri değerlendirildi. PAS (*Periodic acid schiff*) ile boyanarak goblet hücre oranları saptandı. Topikal antiglokom ilaç kullanan glokomlu olgularda, ilaç kullanmayan glokomu olmayan kontrol grubuna göre apoptozis oranlarının artmış olduğu saptandı ( $p=0,013$ ). Glokom ve ilaç tipinin, kullanılan ilaç sayısının ve süresinin apoptozis oranına istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi saptanmadı. Gruplar arası goblet hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı değildi. Histolojik değerlendirmede konjonktivada saptanan kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve skuamoid değişim ile apoptozis oranı, ilaç kullanımı, kullanım süresi, ilaç sayısı arasında istatistiksel anlamlı ilişki mevcut değildi. Skuamoid değişim gösteren olgularda goblet hücre oranlarının daha düşük olduğu gösterildi ( $p=0,05$ ). Apoptozis oranları ile goblet hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. İlaçların konjonktivada apoptozis oranlarını arttırırken, ilaçlar arasında fark olmaması, etken maddeden çok ilaçların ihtiva ettiği prezervanların apoptozisten sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Yapılacak farmakolojik araştırmalar ile klinikte kullanılabilecek prezervan içermeyen antiglokom ilaçların geliştirilmesi, konjonktivadaki hücresel hasarı en aza indirilebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** glokom, topikal antiglokom ilaçlar, apoptozis, TUNEL, goblet hücresi

## ABSTRACT

**Şanal Doğan, A., Quantitative analysis of apoptosis in conjunctiva of patients with glaucoma and effects of topical antiglaucoma drugs on apoptosis rates, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Ophthalmology, Ankara, 2002.** Glaucoma is a chronic, progressive, multifactorial optic neuropathy characterized with excavation of the optic disc and nerve fibre bundle type visual field defects. Long term topical antiglaucoma medications are used to control the intraocular pressure and prevent the progression of disease. The topical drugs are in direct contact with the conjunctival epithelial cells, therefore it is probable that these agents may cause cellular damage, leading to the cellular death. Apoptosis is a type of cellular death that is controlled genetically. This study is designed to observe the effects of topical antiglaucomal drugs on apoptosis rates of conjunctival cells. Specimens taken from the bulbar conjunctiva of 30 patients who underwent cataract or glaucoma surgery were included in this study. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated tUTP nick-end labeling) method was used to define apoptosis rates in conjunctival epithelia. Sections obtained from these specimens were stained with hematoxyline-eosine to evaluate epithelial cells and inflammation. Goblet cell rates were detected with PAS (Periodic acid schiff staining). Increased apoptosis rates were detected in patients with glaucoma using topical antiglaucoma drugs as compared to patients other than glaucoma cases using no topical medications ( $p=0,013$ ). The glaucoma and drug type, number and duration of medication had no statistically significant effect on apoptosis rates. Goblet cell rates had no statistical significant difference regarding the groups. No relation was detected between chronic inflammatory cell infiltration and squamoid diferantiation with apoptosis rates, glaucoma type, number and duration of medications. Cases with squamoid diferantiation had lower goblet cell rates ( $p=0,05$ ). No statistical significant correlation was defined between the rates of goblet cell and apoptosis. The increased apoptosis rates in antiglaucoma medication receiving group was independent from the types of drugs. Therefore, the cause of this increase is thought to be not the active agents themselves but the preservatives they contain. The future pharmacological studies would be necessary to obtain clinically available antiglaucomal agents without preservatives causing the least conjunctival cellular damage

**Key words:** glaucoma, topical antiglaucoma drugs, apoptosis, TUNEL, goblet cells

**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR .....	vii
ŞEKİLLER .....	viii
TABLolar .....	ix
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
GEREÇ VE YÖNTEM .....	13
BULGULAR .....	19
TARTIŞMA .....	27
SONUÇLAR .....	33
KAYNAKLAR .....	35

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

BAK: Benzalkonyum klorid

BE: Betoptic®

DA: Kronik dar açılı glokom

H-E: Hematoksilen-eosin

KONJ: Konjenital glokom

p: Anlamlılık seviyesi

PAAG: Primer açık açılı glokom

PAS: *Periodic acid schiff*

PE: Psödoeksfoliasyon glokomu

PİLO: Pilomin®

r: Korelasyon katsayısı

SD: Standart sapma

TİMO: Timoptic®

TRUS: Trusopt®

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated tUTP nick-end labeling*

XALAT: Xalatan®

v: *value*



**ŞEKİLLER**

Sayfa

- Şekil 3.1.** H-E, PAS, TUNEL ile boyanmış konjonktiva örnekleri..... 16
- A.** Çok katlı kolumnar epitel ve epitel tabakasına ilerlemeyen kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu (H-E, x20)
  - B.** Konjonktiva yüzey epitelinde sitoplazmik eosinofili ve nükleer irileşme ile karakterize skuamoid değişim (H-E, x20)
  - C.** Konjonktiva yüzey epitelinde sitoplazmik PAS pozitivitesi gösteren az sayıda goblet hücresi varlığı (PAS, x20)
  - D.** Konjonktiva yüzey epitelinde sitoplazmik PAS pozitivitesi gösteren çok sayıda goblet hücreleri (PAS, x20)
  - E.** Konjonktiva yüzey epitelinde az sayıda TUNEL pozitif hücre varlığı gösteren ilaç tedavisi almayan bir olgu (TUNEL, x40)
  - F.** Konjonktiva yüzey epitelinde çok sayıda TUNEL pozitif hücre varlığı gösteren, ilaç tedavisi alan bir olgu (TUNEL, x40)

## TABLOLAR

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Glokomun sınıflandırılması .....	4
<b>Tablo 2.2.</b> Topikal antiglokom ilaçların diğer tedavi seçeneklerine göre avantaj ve dezavantajları .....	5
<b>Tablo 2.3.</b> Çalışmada kullanılan topikal antiglokom ilaçlar .....	6
<b>Tablo 2.4.</b> Apoptozisi nekrozdan ayıran morfolojik kriterler .....	9
<b>Tablo 2.5.</b> Apoptozisi nekrozdan ayıran biyokimyasal kriterler .....	9
<b>Tablo 3.1.</b> Olguların dağılımı .....	13
<b>Tablo 4.1.</b> Cerrahi spesimenlerden elde edilen apoptozis ve goblet oranları .....	19
<b>Tablo 4.2.</b> İlaç kullanan ve kontrol grubu arasında cinsiyet dağılımı .....	20
<b>Tablo 4.3.</b> Topikal antiglokom ilaç kullanımının apoptozis oranına etkisi .....	20
<b>Tablo 4.4.</b> Glokom tiplerinin apoptozis oranına etkisi .....	20
<b>Tablo 4.5.</b> Kullanılan topikal antiglokom ilaç sayısının apoptozis oranına etkisi .....	22
<b>Tablo 4.6.</b> Topikal antiglokom ilaçların kullanım süresinin apoptozis oranına etkisi .....	22
<b>Tablo 4.7.</b> Kullanılan ilaç tedavisinde Xalatan®'in bulunmasının apoptozis oranına etkisi .....	23
<b>Tablo 4.8.</b> Beta-blokörler ve Xalatan®'in apoptozis oranları açısından karşılaştırılması .....	24
<b>Tablo 4.9.</b> Topikal antiglokom ilaç kullanımının goblet hücre oranına etkisi .....	24
<b>Tablo 4.10.</b> Kullanılan topikal antiglokom ilaç sayısının goblet hücre oranına etkisi .....	25
<b>Tablo 4.11.</b> Skuamoid değişimin varlığının goblet hücre oranına etkisi .....	26

## GİRİŞ

Glokom, optik diskte ekskavasyon, sinir lifi demeti tipinde görme alanı defektleri, retinal ganglion hücre kaybı ile karakterize kronik, ilerleyici, multifaktöriyel bir optik nöropatidir (1-5).

Glokom tedavisinde primer hedef optik sinir hasarına bağlı görsel fonksiyon kaybını engellemek, geciktirmek ve bazen geri döndürmektir (6). Yüksek göz içi basıncı belirgin bir risk faktörü olmakla beraber, glokoma bağlı görsel fonksiyon kaybını tam açıklayamamaktadır (7). Ancak klinik olarak yapılan tedaviler bu aşamada temel olarak göz içi basıncını düşürmekle sınırlıdır. Böylece önemli bir risk faktörü engellenmiş olur (8, 9). Tedavi ile ilgili yapılan retrospektif çalışmalarda, göz içi basıncını düşürmenin, görme alanı kaybının ilerlemesini engellemekte faydalı olduğunu göstermektedir (10, 11).

Topikal ilaç tedavisinin glokomda önemli yeri vardır. Hastaların çoğunda medikal tedavi ile istenen göz içi basıncı düşüklüğü sağlanmaktadır (12). Tedavi seçeneği olarak laser veya cerrahinin seçildiği hastalarda da, işleme hazırlanıncaya kadar veya sonrasında, ek olarak topikal antiglokom ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır (13-14).

Topikal antiglokom ilaçların kullanıldığı hastalarda konjonktiva, ilaç ile kontakt halindedir ve yarıgeçirgen bir zar gibi işlev görür. Kornea ile birlikte ilacın göz içine ulaşmasına ve göz içi basıncını düşürücü etkisini göstermesini sağlar (15).

İlaçların topikal kullanılması ile konjonktivada istenmeyen etkiler de oluşur (16, 17). Özellikle ilaçlarla direkt temasta bulunan konjonktiva epitel hücrelerinin hasara uğrayıp, ölüme sürüklenmesi muhtemeldir. Apoptozis ve nekroz hücre ölümüne yol açan iki temel mekanizmadır (18). Apoptozis 1972'de tanımlanmış ve yıllar içinde önemi daha iyi anlaşılmıştır (19).

Tanımlanmasından günümüze çeşitli klinik durumlarda apoptozis ile ilgili çalışmalar yapılmış ve mekanizmaları aydınlatılmıştır (20).

Bu çalışmada topikal antiglokom ilaç kullanımının konjonktivada apoptozis oranında artışa sebep olup olmadığı araştırıldı. Glokom ve ilaç

tipinin, kullanılan topikal antiglokom ilaç sayısının ve süresinin apoptozis oranıyla ilişkisi araştırıldı. Ayrıca rutin histolojik kesitlerde konjonktiva epitel hücreleri değerlendirilerek, normalden sapma olarak kabul edilebilecek kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve skuamoid değişimler kaydedildi. PAS (*Periodic acid schiff*) ile boyanan kesitlerde goblet hücre oranları araştırıldı. Konjonktivadaki değişikliklerin ve goblet hücre oranlarının, ilaç kullanımı ve apoptozis oranları ile ilişkisi incelendi.

## GENEL BİLGİLER

Glokom, sözcük kökeni olarak yunanca bir kelime olan "glaukós" dan türemiştir. Kelime anlamı "bulanık" olan glokom, Hipokrat döneminden bu yana bilinmekle beraber, tanımı yıllar içinde evrim geçirmiş ve özellikle son 100 yıl içinde şekillenmiştir (21).

Günümüzde glokom, ganglion hücre kaybının ve optik diskte ekskavasyonun görüldüğü, sinir lifi demeti tipinde görme alanı defektleriyle karakterize, kronik, ilerleyici multifaktöriyel bir optik nöropati olarak tanımlanmaktadır (1-5). Glokom tek bir hastalığı göstermez, değişik klinik prezantasyonları, patofizyolojileri ve tedavileri olan bir grup hastalığın ortak ifadesidir. Glokomu olan hastaların çoğunda 21mmHg'nin üzerinde göz içi basıncı saptanmaktadır. Geçmişte göz içi basıncının yüksekliği glokom ile eşanlamlı olarak kullanılmıştır. Fakat günümüzde, bu bulgunun görsel fonksiyon kaybına yol açan önemli bir risk faktörü olduğu kabul görmeye beraber, glokomu tek başına açıklayamadığı bilinmektedir (7).

Glokom gelişmekte olan ülkelerde körlüğün önde gelen sebeplerindendir (22, 23). Dünyada 100 milyondan fazla insanın göz içi basıncının yüksek olduğu ve yaklaşık 2,4 milyon insanın her yıl primer açık açılı glokom geliştirdiği tahmin edilmektedir (24). Bu nedenle, hastalığın daha iyi anlaşılması, tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve tedavi sonuçlarının değerlendirilmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Glokomun çeşitli sınıflandırmaları yapılmıştır. İridokorneal açının durumunun göz önüne alındığı sınıflandırmalar, değişik oluşum mekanizmaları olan glokom tiplerini gruplandığı için tercih edilmektedir. Bu tür bir sınıflandırmaya göre glokom; dar açılı glokom, açık açılı glokom, iki yada daha fazla formun bir arada görüldüğü kombine glokom ve çocukluk

çağlarında görülen gelişimsel glokom olmak üzere dört ana başlık altında toplanabilir. Alt başlıklar olarak glokomlar primer veya sekonder olarak ayrılabilirler (25) (**Tablo 2.1.**). Psödoeksfolyasyon glokomu, bir sekonder açık açılı glokomdur. Coğrafi farklılıklara göre görülme sıklığı değişen glokomun bu tipine ülkemizde sık rastlanılmaktadır (26).

**Tablo 2.1.** Glokomun sınıflandırılması

1. Açık açılı glokom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer açık açılı glokom</li> <li>• Normal basınçlı glokom</li> <li>• Sekonder açık açılı glokom</li> </ul>
2. Dar açılı glokom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pupil bloğu olan primer dar açılı glokom</li> <li>• Pupil bloğu olan sekonder dar açılı glokom</li> <li>• Pupil bloğu olmayan primer dar açılı glokom</li> <li>• Pupil bloğu olmayan sekonder dar açılı glokom</li> </ul>
3. Kombine mekanizmalı glokom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Açı kapanması ile komplike olmuş açık açılı glokom</li> <li>• Trabeküler hasarın olduğu kombine mekanizmalı açı kapanması glokomu</li> </ul>
4. Gelişimsel glokom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer konjenital glokom</li> <li>• Sekonder glokom</li> </ul>

Glokom, hayat boyu devam eden kronik bir durumdur. Hastanın ele alınmasında; hastanın bilgilendirilmesi ve periyodik kontroller tedavi kadar önemlidir. Tedavide hedeflenen, hastalığın progresyonunu durdurmak, geciktirmek ve bazen görsel fonksiyon kaybını geri döndürmektir (6). Günümüzde klinik olarak yapılan tedaviler temel olarak göz içi basıncını, optik sinir için güvenli olabilecek seviyelere düşürmekle sınırlıdır (8). Göz içi basıncını düşürerek glokomatöz hasarın azaltılacağına ilişkin bazı şüphelerin olmasına rağmen çoğu çalışmada basıncın düşürülmesi ile optik sinir hasarının engellendiği ve progresyonun yavaşladığı gösterilmiştir (27, 28). Her hasta ayrı değerlendirilerek, hedef göz içi basıncı belirlenir. Çoğu hastada yıllarca tek topikal antiglokom ilaç ile istenilen göz içi basıncı düşüklüğü sağlanırken, bazı hastalarda ilaç kombinasyonları gerekmektedir.

Günümüzde, glokomda topikal ilaç tedavisi dışında, sistemik ilaç tedavisi, cerrahi veya laser tedavisi gündemdedir. Sistemik antiglokom tedavi ile etkili şekilde göz içi basıncını düşürmek mümkün olmakla birlikte ciddi sistemik yan etkiler nedeniyle ancak kısa dönem için kullanılmaktadır. Tedavi seçeneği olarak laser ve cerrahinin seçildiği hastalarda da, işleme hazırlanincaya kadar veya sonrasında, ek olarak topikal antiglokom ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır (13, 14). Topikal antiglokom ilaçların avantaj ve dezavantajları **Tablo 2.2.**'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.2.** Topikal antiglokom ilaçların diğer tedavi seçeneklerine göre avantaj ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cerrahisiz GİB düşüklüğü</li> <li>• Ucuz (kısa dönem)</li> <li>• Sistemik yan etkinin minimal olması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hasta uyumu</li> <li>• Pahalı (uzun dönem)</li> <li>• Lokal yan etkilerin görülmesi</li> </ul>

Antiglokom ilaçlar kimyasal yapılarına ve farmakolojik etkilerine göre şu şekilde sınıflandırılabilirler:

1. Beta-adrenerjik antagonistler
2. Adrenerjik agonistler
3. Parasempatometik ajanlar
4. Karbonik anhidraz inhibitörleri
5. Hiperosmatik ajanlar
6. Prostaglandin analogları

Oftalmik ilaçların etkili olması için, hedef dokulara gereken yüksek konsantrasyonda ulaşmaları gerekir. Topikal ilaçlarda tedavi edici etken madde dışında inaktif ajanlar da bulunur. Bunlar; mikroorganizma

kontaminasyonunu engelleyen prezervanlar (benzalkonium klorid, klorobutanol...), viskoziteyi arttırarak gözyaşında kalış zamanını arttıran ajanlar (karboksimetilselüloz sodyum, povidon...), antioksidanlar (sodyum bisulfit, tiyoüre...), yüzey gerilimini azaltıp ilacın yayılımını sağlayan ajanlar (polisorbat 20, tiloksapol...), solusyonu izotonisitesini sağlayan ajanlar (gliserin, propilen glikol...), pH'i 6-8 arasında tutmak için tampon solusyonları (asetik asid, borik asid...)’dır (29). **Tablo 2.3.**de çalışmada kullanılan ilaçlar, etken maddeleri, içerdikleri prezervanlar, konsantrasyonları ve dozajları verilmiştir.

**Tablo 2.3.** Çalışmada kullanılan topikal antiglokom ilaçlar

İlaç grubu	Ticari isim	Doz	Etken madde	Prezervan
Beta-Adrenerjik antagonist	Betoptic®	2x1	Betaksolol HCL %0,5	BAK %0,01
	Timoptic®	2x1	Timolol maleat %0,5	BAK %0,01
Karbonik anhidraz inhibitörü	Trusopt®	3x1	Dorzolamid %2	BAK % 0,0075
Beta-Adrenerjik agonist + Karbonik anhidraz inhibitörü	Cosopt®	2x1	Dorzolamid %2 Timolol maleat %0,5	BAK % 0,0075
Parasempatomimetik	Pilomin®	4x1	Pilokarpin HCL %2	BAK % 0,01
Prostaglandin analogu	Xalatan®	1x1	Latanoprost %0,005	BAK % 0,02

Fizostigminin 1876’da Laqueur tarafından glokomda kullanılmasından bir yıl sonra topikal pilokarpin glokom tedavisindeki yıllarca sarsılmayacak yerini almıştır. Pilokarpinin miyozis etkisi vardır. Asetilkolini taklit ederek, iris sfinkterini ve silyer kası direkt uyarır. Böylece hümör aközün dışı akımındaki rezistans azalır (30).

Pilokarpinin, göz yüzeyinde, irritasyon ve batmaya, vasküler dilatasyona bağlı konjonktivada hiperemiye, allerjik blefarokonjonktivite,



yaşarma, punktum oklüzyonu, oküler psödopemfigoide yol açabilebileceği rapor edilmiştir (31).

Timololün 1978'de topikal kullanıma sunulmasıyla birlikte, beta-adrenerjik blokaj yapan ajanlar glokom tedavisinde popüler olmuştur. Timolol maleat oldukça etkili bir beta-adrenerjik blokör ajandır, etki mekanizması ise hümör aközün sekresyonunu azaltmaktır (32). Timololün göz yüzeyinde yaptığı istenmeyen etkiler; irritasyon, allerjik reaksiyon, punktat keratopati, korneada anestetik etki ve kornea epitel hücre migrasyonunun inhibisyonudur (33, 34).

Betaksolol selektif bir beta-adrenerjik blokördür. Beta<sub>2</sub>-adrenerjik blokaj yapılmaz. Böylece sistemik ve lokal yan etkiler minimuma indirilmiş olur (35). Göz yüzeyinde en önemli istenmeyen etkisi batma semptomudur (36). Betaksolole bağlı oluşan konjonktivit ile ilgili rapor mevcuttur (37).

Topikal bir karbonik anhidraz inhibitörü olan dorzolamid 1990'dan sonra kullanılmaya başlanmıştır. Dorzolamid, silyer epiteldeki karbonik anhidrazı etkileyerek direkt etki ile ve intraselüler tampon sistemini etkileyerek indirekt etki ile hümör aköz yapımını engeller. Oküler yüzeyde batma, punktat keratit, kuruluk, fotofobiye sebep olabilir.

Dorzolamid ile timolol birlikte kullanılıncaya hümör aközü baskılayıcı aditif etki gösterirler. Cosopt® ile dorzolamid ile timololün başarılı kombinasyonu sağlanmıştır (38).

Latanoprost 1996'da FDA onayını almış bir pro-ilaçtır. Yeni bir ilaç olmasına rağmen tek doz ile göz içi basıncını %35'e kadar düşürmesi nedeniyle yaygın kullanımı olmuştur. Göz içi basıncını üveaskleral akımı arttırarak düşürmektedir (39). Oküler yüzeyde görülen yan etkileri, konjonktiva hiperemisi, yabancı cisim hissi, batma, hipertrikozisdir (40).

Benzalkonyum klorid oftalmik solusyonlarda ilk kez karbakolün kornea permeabilitesini arttırmak için kullanılmıştır (41). Islatici etkisi de olan benzalkonyum klorid, oftalmik solusyonlarda asepsiyi sağlayan bir preservan

ajandır (42). Eksperimental çalışmalarda benzalkonyum kloridin %0,0004-%0,001 konsantrasyonlarında kornea epitelinde parsiyel mikrovillus kaybına, %0,01-%0,04 konsantrasyonlarında kornea epitelinde deskuamasyona, %0,5-%2 konsantrasyonlarında ise gros kornea ve konjonktiva hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (43, 44).

Topikal kullanılan oftalmolojik ajanlar göz ön yüzeyindeki ince muköz membran olan konjonktiva ile kontakt halindedirler. Konjonktiva görünür sklerayı ve göz kapaklarının iç yüzeylerini örter. Forniks, palpebral ve bulber konjonktiva olarak üç temel kısma ayrılır. Konjonktivada çok katlı kolumnar epitel bulunur. Epitel keratinize değildir. Yüzeyel tabakada glikokaliks ve müsin ile kaplı çok sayıda mikrovillus mevcuttur. Bazal tabakalarda melanositlere ve Langerhans hücrelerine rastlanılabilir. Goblet hücreleri konjonktiva epitel hücreler arasında dağınık olarak bulunur (45). Yaşla birlikte goblet hücre sayısı azalır (46). Sekresyonu gözyaşının stabilitesini sağlaması ve yüzey gerilimini azaltması nedeniyle önemlidir.

Hücre ölümü, iki temel mekanizma olan nekroz ve apoptozis ile gerçekleşmektedir. Nekroz; iskemi, hipertermi, fiziksel ve kimyasal bir travma gibi şiddetli ve ani gelişen bir hasarın yol açtığı hücre ölümüdür (47). Morfolojik olarak, hücre zarı esas hasar gören organeldir. Hücre zarı osmotik basıncı dengeleyemez ve hücre şişer, parçalanır. Apoptozis ise genetik kontrol altında gerçekleşen, belli morfolojik kriterleri olan programlanmış hücre ölümüdür (47). Programlanmış hücre ölümü embriyolojik gelişim, hemostaz ve multiselüler organizmalarda yaşam için gerekli bir olaydır. Böylece hasarlı hücre çevre dokulara hasar vermeden ortamdan uzaklaştırılır. Konjonktivada özellikle hücre kültürlerinde ilaçların ve prezervan maddelerin apoptozise yol açıp açmadıkları araştırılmıştır (48, 49).

Apoptozisin üç temel adımı vardır (47):

1. Hücre ölümünü indükleyen bir uyaran varlığı
2. Hücre içinde mevcut olan endojen ölüm mekanizmalarının aktivasyonu
3. Hücrenin fagositozu ve ortamdan uzaklaştırılması.

Apoptotik süreçte bazı morfolojik (Tablo 2.4.) ve biyokimyasal değişiklikler (Tablo 2.5.) mevcuttur.

**Tablo 2.4.** Apoptozisi nekrozdan ayıran morfolojik kriterler

Apoptozis	Nekroz
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tek hücre ölümü</li> <li>• Membran intakt</li> <li>• Hücre büzülmesi</li> <li>• Lizozom intakt</li> <li>• Enflamasyon (-)</li> <li>• Kresentik kondansasyon</li> <li>• Komşu hücreler tarafından fagositoz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hücre grubu ölümü</li> <li>• Membran hasarı (+)</li> <li>• Hücre şişmesi</li> <li>• Lizozomal sızıntı</li> <li>• Enflamasyon (+)</li> <li>• Düzensiz kromatin kondansasyonu</li> <li>• Makrofaj fagositozu</li> </ul>

Morfolojik olarak ilk fazda, apoptozise giden hücre komşu hücrelerden ayrılır. Buradaki mekanizma dezmozom gibi hücreler arası bağlantıların kopmasıdır. Sonra hücre büzülmesi başlar. Hücre içi suyun hücre dışı ortama transportu sonucunda sitoplazmada kondansasyon olur ve hücre dansitesi artar. Bu esnada hücre içi organeller intakttır. Eş zamanlı olarak nükleer kromatin de kondanse olur ve nükleer zar altında tipik kresentik tarzda yoğunlaşır. Daha sonra zeiozis adı verilen hücre zarındaki ameboid uzantılar gelişir. Hücrenin fragmentasyonu gerçekleşir ve apoptotik cisimcikler oluşur. Çevredeki hücreler ve makrofajlar açığa çıkan apoptotik cisimcikleri reseptör bağımlı mekanizma ile fagosite ederler (18).

**Tablo 2.5.** Apoptozisi nekrozdan ayıran biyokimyasal kriterler

Apoptozis	Nekroz
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enerji bağımlı</li> <li>• Makromolekül sentezi var</li> <li>• Yeni gen transkripsiyonu var</li> <li>• İnternükleozomal DNA fragmentasyonu</li> <li>• Fizyolojik / patolojik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enerji bağımlı değil</li> <li>• Makromolekül sentezi yok</li> <li>• Yeni gen transkripsiyonu yok</li> <li>• DNA yıkımı düzensiz</li> <li>• Patolojik</li> </ul>

Apoptotik hücrede bazı biyokimyasal değişiklikler gerçekleşir. Apoptotik hücre ölüme gidiyor olmasına rağmen, RNA ve protein sentezine rastlanır. Apoptozis enerji bağımlı aktif bir olaydır. Hücre içi kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) da artış izlenir. Bu şekilde bazı önemli enzim sistemleri aktive olmaktadır. Hücre içi su ve iyonların dış ortama taşınması ile hücre kondanse olur. Hücrede kromatinin internükleozomal fragmantasyonu izlenir. Bundan sorumlu enzim ise  $Ca^{+2}$  -  $Mg^{+2}$  bağımlı endonükleazdır. Bu enzim kromatini 180 baz çifti ve bunun katları olacak şekilde parçalamaktadır. Diğer önemli bir enzim ise  $Ca^{+2}$  bağımlı transglutaminazdır. Bu enzim proteinlerde çapraz bağlar oluşturur ve bu şekilde apoptotik cisimciklerden dış ortama sızıntı olmasını engeller. Apoptotik hücrelerde yüzey değişiklikleri de izlenir (18).

Apoptozisin genetik kontrolü ile ilgili bilgilerin çoğu bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'dan elde edilmiştir (47). *C. elegans*'da apoptozis ile ilgili ced-3, ced-4, ced-9 isimli üç gen tespit edilmiştir (50). Ced-3 ve ced-4 apoptotik genler iken ced-9 apoptozisi inhibe eden bir genidir. Memelilerde yapılan çalışmalarda bu genlerin analogları tespit edilmiştir. Ced-3'ün analogu ICE (interleukin 1 beta converting enzyme) genidir. Ced-9'un analogu ise bcl-2 (B cell lymphoma) genidir (47).

Bcl-2 bir protoonkogen olup, bir iç mitokondrial membran proteinini kodlamaktadır. Bu gen apoptozisi inhibe etmektedir. Memelilerde apoptozisi regüle eden diğer bir gen ise bax'dır. Bu gen apoptozisi indüklemektedir. Tümör söpresör geni TP53 de apoptozisde rol oynar (51). Hücre hasarı sonrası TP53 ve genin protein ürünü (p53) ortamda birikir ve öncelikle hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücrenin kendini tamir için zaman sağlar. Ancak hücre hasarının tamiri mümkün değilse, hücreyi ölüme, apoptozise sürükler. Bunu bax'i indükleyip bcl-2'yi bloke ederek gerçekleştirir. Bcl-2 ve bax, kaspaz sistemini aktive veya inhibe ederek apoptozisi kontrol altında tutmaktadırlar.

Kaspazlar (*caspase; cysteine containing aspartase*) aktif merkezlerinde sistein taşıyan ve proteinleri aspartik asit rezidülerinin

karboksil terminalinden kesen proteazlardır. Bu enzimler hücrede normalde proenzim olarak bulunmaktadır ve aktivasyonları aktif olarak inhibe edilmektedir. Kaspazları çeşitli stimuluslar aktive edebilir. Kendi aralarında yıkımı başlatıcı ve yıkımdan sorumlu olanlar olarak ikiye ayrılabilirler. Kaspaz-8 ve 9 başlatıcı kaspazlardandır. Kaspaz-3, 6, 7 ise yıkımdan sorumlu kaspazlardır. Başlatıcı kaspazların başlattığı iki önemli kaskad tespit edilmiştir. İlki Fas-Fas ligand sisteminin prokaspaz-8'i aktive etmesiyle başlar. Diğerinde ise çeşitli ajanların etkisi ile mitokondriden sitokrom c salınmakta , ve prokaspaz-9 aktive edilmektedir. Antiapoptotik ve apoptotik genlerin apoptozis kontrolünü mitokondriden sitokrom c salınımını regüle ederek sağladığı tespit edilmiştir. Kaspazların aktivasyonu apoptozisdeki terminal olaydır. Bu enzimler birçok hücreiçi proteini yıkıma uğratar (52).

Apoptozisin tespiti üç temel metodla mümkündür. Apoptozisin morfolojik bulgularının mikroskopla gözlenebilir. Ancak subjektif bir methodur. Hücrelerin tespiti güçtür. İkinci yol olarak apoptozisin varlığının araştırıldığı dokudan DNA ekstre edilip, agaroz jel elektroforeze tabi tutulup, 180 baz çifti ve katlarının oluşturacağı merdiven paternini gözlemektir. Ancak bu metodla tek hücrede değil dokuda apoptozis araştırılabilir. Üçüncü yol ise TUNEL (*in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling*) yöntemidir. Bu metodla parafinde tutulan histolojik kesitlerde tek hücre apoptozisini göstermek mümkündür.

Glokomda apoptozis özellikle arka segment dokularında çalışılmaktadır. Glokomda retina ganglion hücrelerinin ve bunlara ait aksonların tahrip olduğu bilinmektedir. Arka segment çalışmalarında glokomun patofizyolojisini aydınlatmak amacıyla retina ganglion hücrelerinde apoptozis araştırılmaktadır (53, 54). Bu dokulardaki apoptozisin tam olarak anlaşılması ile antiapoptotik tedavi ile ganglion hücre ölümünü engellemek ve glokomu tedavi etmek mümkün olabilecektir.

Oftalmolojide çeşitli çalışmalarla ön segmentte apoptozis araştırılmıştır.

Yev ve arkadaşları (55) insan kornea ve konjonktivasında yaptıkları çalışmada, gestasyonun 11-18. haftaları arasında bu dokularda minimal proliferasyon, 28. haftaya kadar oldukça artmış proliferasyon, 28. haftadan sonra proliferasyon artışında azalma izlenmiştir. Ancak 38. haftadan sonra bulber konjonktivada apoptozisin ortaya çıktığı gösterilmiştir. Lensin oluşumu sırasında ektodermden ayrılma aşamasında apoptozis aktif olarak rol oynamaktadır (56).

Korneada yapılan apoptozis çalışmalarında epitel hasarı sonrasında keratositlerde apoptozisin ortaya çıktığı gösterilmiştir (57). Abbasoğlu ve arkadaşları (58) yaptıkları deneysel çalışmada ile mitomitsin-C'nin korneada apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir.

Normal konjonktiva dokusu ile pterijiumun apoptozis açısından karşılaştırıldığı bir çalışmada, apoptotik hücrelerin pterijiumda bazal tabakalarda yerleştiği, normal konjonktivada ise bütün epitel katlarından apoptotik hücrelere rastlandığı gözlenmiştir (59).

Literatüre bakıldığında topikal antiglokom ilaçların konjonktiva epitel hücrelerindeki toksisitesinin araştırıldığı apoptozis çalışmalarının in vitro olarak hücre kültürlerinde yapıldığı izlenmektedir (48, 49, 60).

Bu çalışmada topikal antiglokom ilaçların konjonktiva epitel hücrelerinde toksik etkiler yapabileceği hipotezinden yola çıkılarak, topikal antiglokom ilaç kullanmakta olan glokomlu olgularda konjonktiva biyopsilerinde apoptozis oranının, ilaç kullanmayan glokomu olmayan kontrol olgularına göre artış gösterip göstermediği araştırıldı. Glokom ve ilaç tipinin, kullanılan topikal antiglokom ilaç sayısının ve süresinin apoptozis oranıyla ilişkisi araştırıldı. Ayrıca rutin histolojik kesitler epitel değişiklikleri açısından incelenip, saptanan kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve skuamoid değişimler not edildi. PAS ile boyanmış kesitlerde goblet oranları araştırıldı. Kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu, skuamoid değişim ve goblet oranlarının gruplar arası ve apoptozis oranları ile ilişkisi incelendi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda glokom veya katarakt nedeniyle cerrahi tedavi geçirmiş 30 hasta çalışmaya dahil edildi (Tablo 3.1.). Çalışma için Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu onayı alındı (13.09.2001, LUT 01/8-2).

**Tablo 3.1.** Olguların dağılımı.

No	Cins	Yaş	İlaç kullanımı	Glokom türü	Topikal ilaç	Süre
1	E	74	VAR	PE	BE, TRUS, XALAT	1 HAFTA
2	K	73	VAR	PE	TİMO, TRUS	2 HAFTA
3	E	80	VAR	PE	TİMO,TRUS, XALAT,PİLO	5 YIL
4	K	65	VAR	PAAG	BE, XALAT	3 YIL
5	E	87	VAR	PAAG	TİMO	3 AY
6	E	28	VAR	KONJ	TİMO,XALAT	4 YIL
7	K	50	VAR	DA	XALAT, COSOPT,PİLO	1 YIL
8	K	75	VAR	PAAG	BE	3 YIL
9	K	86	VAR	PE	XALAT	3 HAFTA
10	K	50	VAR	PAAG	BE	1 YIL
11	E	70	VAR	DA	XALAT	1 YIL
12	E	64	VAR	PE	XALAT, COSOPT	3 HAFTA
13	K	75	VAR	PE	XALAT	3 YIL
14	K	69	VAR	DA	TİMO	5 YIL
15	E	54	YOK	YOK	YOK	-
16	E	76	YOK	YOK	YOK	-
17	K	63	YOK	YOK	YOK	-
18	K	75	YOK	YOK	YOK	-
19	K	69	YOK	YOK	YOK	-
20	E	68	YOK	YOK	YOK	-
21	K	77	YOK	YOK	YOK	-
22	E	71	YOK	YOK	YOK	-
23	K	82	YOK	YOK	YOK	-
24	E	65	YOK	YOK	YOK	-
25	K	63	YOK	YOK	YOK	-
26	K	66	YOK	YOK	YOK	-
27	K	70	YOK	YOK	YOK	-
28	E	56	YOK	YOK	YOK	-
29	K	65	YOK	YOK	YOK	-
30	E	72	YOK	YOK	YOK	-

Çalışmaya dahil edilen olgulara cerrahi 2001-2002 yılları arasında uygulandı. Hastaların 13'üne (%43,3) ekstrakapsüler katarakt ekstraksiyonu ve arka kamara intraoküler lens implantasyonu, 9'una (%30) trabekülektomi, 8'ine (%26,7) fakoemulsifikasyon ve arka kamara intraoküler lens implantasyonu yapıldı.

Olguların 17'si (%56,7) kadın, 13'ü (%43,3) erkek olup; yaş ortalaması 67,9 (28-87 yıl) idi. Ondört hastada (%46,7) glokom mevcutken, 16 (%53,3) hastanın glokomu yoktu. Glokomu olan hastaların 6'sında (%42,9) psödoeksfolyasyon glokomu, 4'ünde (%28,6) primer açık açılı glokom, 3'ünde (%21,4) dar açılı glokom, 1'inde (%7,1) konjenital glokom saptandı. Glokomlu olguların hepsi topikal antiglokom ilaç kullanmaktaydı. Topikal ilaç kullanan hastaların 7'si (%50,0) bir ilaç , 4'ü (%28,6) iki ilaç, 2'si (%14,3) üç ilaç, 1'i (%7,1) dört ilaç kullanmaktaydı.

Spesimenler cerrahi sırasında üst bulber konjonktivadan 11 ile 1 saat kadranları arasından, 2x4 mm'lik insizyonel biyopsiler olarak alındı.

Cerrahi spesimenler formalin ile tespit edildi. Parafine gömülen materyalden alınan seri kesitler hematoksilin-eosin ve periodic acid schiff (PAS) ile boyanarak histolojik değerlendirmeye alındı. Hematoksilin-eosin ile boyanan kesitlerde konjonktive epitel tabakası incelendi, kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve skuamoid değişim kaydedildi (**Şekil 3.1.A-B**). PAS ile boyanan kesitlerde goblet hücreleri ışık mikroskopunda x40 büyütme altında sayılarak, kesitteki tüm konjoktiva epitel hücre sayısına bölünerek her spesimen için goblet oranı hesaplandı (**Şekil 3.2.C-D**). İn situ tek hücre apoptozisi tespit etmek için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated tUTP nick-end labeling) yöntemi uygulandı. Apoptozisde DNA 180 baz çifti ve katları olacak şekilde internükleozomal olarak parçalanır. Gavrielli ve ark. (61) parafine gömülmüş rutin histopatolojik preparatlarda DNA kırıklarının in situ tesbiti ile apoptotik hücrelerin gösterilebileceğini ortaya koydular. TUNEL metodunun esası; terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi yardımıyla biotinle işaretlenmiş bir nükleotidin (dUTP) DNA kırıklarının serbest 3' ucuna bağlanması ve daha sonra biotine yüksek afinite gösteren avidin-peroksidazla işaretlenmesidir. Son adımda peroksidaz



tarafından parçalanacak bir boya ortama katılarak apoptotik hücrelerde renk değişikliği oluşturulmakta ve zemin farklı bir boya ile boyanarak apoptotik hücreler daha kolay tanınabilir hale getirilmektedir. Çalışmada kullanılan kit ise (ApopTag®- In situ Apoptosis Detection Kit / Peroxidase; Oncor, Inc. ) biotin-avidin yerine diğoksijenin kullanılmaktadır. Bu sistemde (ApopTag®) kullanılan diğoksijenin avidin-biotine göre daha spesifiktir. Çünkü dokuda normalde varolan biotin yanlış pozitif boyanmaya yolaçabilir.

Formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku kesitlerinde TUNEL boyaması şu şekilde uygulandı: Öncelikle kesitler bir gece 60°C'ye ayarlanmış etüvde bırakıldı.

### **1. Doku kesitlerinin parafinden arındırılması ve hidrasyonu:**

Kesitler her biri 5 dakika olmak üzere 2 kez ksilen, 2 kez de absolu alkolde yıkandı. Daha sonra sırasıyla %95 ve %75'lik alkolde 3'er dakika yıkandı. Son olarak fosfat tamponlu salinde ( PBS) 5 dakika yıkandı.

### **2. Dokudaki proteinlerin sindirilmesi:**

Nükleer proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılması için Proteinaz K ( 20 µg/ml) kesitlere uygulandı ve 30 dakika beklendi. Daha sonra her biri 2 dakika sürecek şekilde kesitler distile suyla 4 kez yıkandı.

### **3. Endojen peroksidazın bloke edilmesi:**

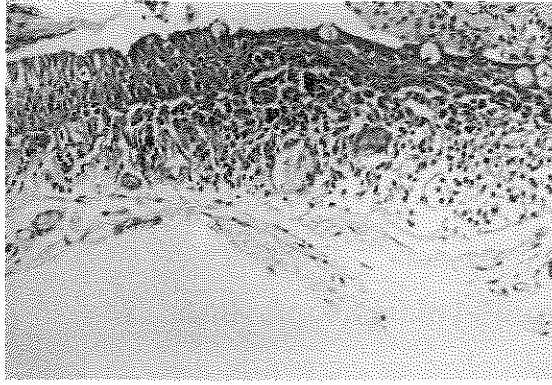
Kesitler %2 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) çözeltisinde 5 dakika tutuldu. Daha sonra PBS ile 5'er dakikadan 2 kez olmak üzere yıkandı.

### **4. Dengeleyici tamponun (Equilibration buffer) uygulanması:**

Kesitlerin üstüne dengeleyici tampondan 2 damla konup lamelle kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

### **5. TdT enziminin uygulanması:**

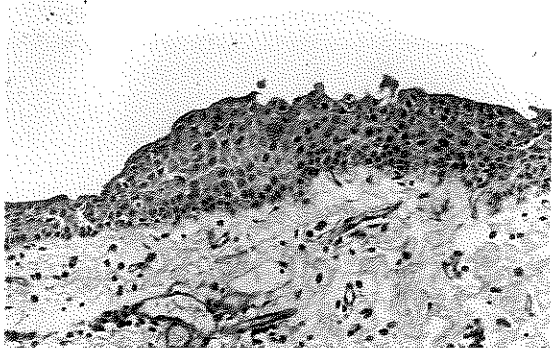
Tdt'lı karışımdan (2 kısım reaksiyon tamponu + 1 kısım TdT enzim karışımı) alınıp kesitin üstünü kapatacak şekilde konuldu. Kesitler nemli kutuya konup 37°C etüvde 1 saat Tutuldu. Negatif kontrol için karışıma TdT konmayıp sadece reaksiyon tamponu konuldu.



a



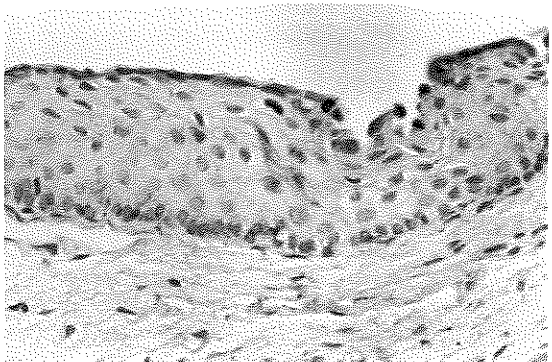
b



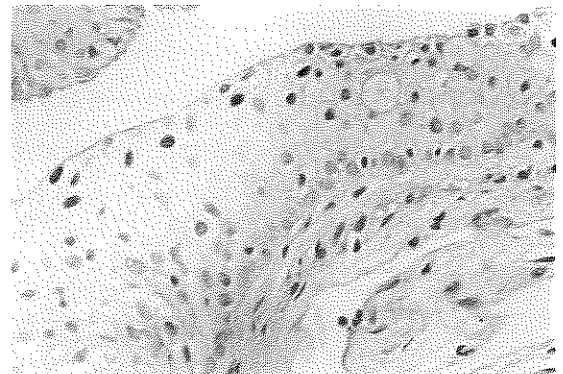
c



d



e



f

**Şekil 3.1.** H-E, PAS, TUNEL ile boyanmış konjonktiva örnekleri

**A.** Çok katlı kolumnar epitel ve epitel tabakasına ilerlemeyen kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu (H-E, x20) **B.** Konjonktiva yüzey epitelinde sitoplazmik eosinofili ve nükleer irileşme ile karakterize skuamoid değişim (H-E, x20) **C.** Konjonktiva yüzey epitelinde sitoplazmik PAS pozitifitesi gösteren az sayıda goblet hücre varlığı (PAS, x20) **D.** Konjonktiva yüzey epitelinde sitoplazmik PAS pozitifitesi gösteren çok sayıda goblet hücreleri (PAS, x20) **E.** Konjonktiva yüzey epitelinde az sayıda TUNEL pozitif hücre varlığı gösteren ilaç tedavisi almayan bir olgu (TUNEL, x40) **F.** Konjonktiva yüzey epitelinde çok sayıda TUNEL pozitif hücre varlığı gösteren, ilaç tedavisi alan bir olgu (TUNEL, x40)

## 6. Reaksiyonun durdurulması (*Stop- Wash buffer uygulanması*)

Dur/yıka tampon karışımı (1 ml Stop/wash tamponu + 34 ml distile su ile hazırlandı.) kesitlere uygulanıp 10 dakika beklendi. Daha sonra 3 kez 5'er dakikadan PBS ile yıkandı.

## 7. Anti- digoksinin / Peroksidaz uygulanması:

Kesitlere 2 damla antidigoksinin / peroksidaz uygulandı ve oda sıcaklığında 30 dk. tutuldu. Daha sonra 5'er dakikadan 3 kez olmak üzere PBS ile yıkandı.

## 8. Renk oluşumu reaksiyonu:

%0.05 DAB solusyonuna  $H_2O_2$  eklendi ve hemen kesitlerin üstünü kapatacak şekilde konuldu. 3 dakika beklendikten sonra 1'er dakikadan olmak üzere 3 kez ve son bir kez 5 dakika distile suyla yıkandı.

## 9. Zemin boyama:

Kesitlere metil yeşili uygulandı ve 10 dakika bekletildi. Daha sonra 3 kez distile su, 3 kez PBS ve 3 kez %90 metanolle yıkandı.

## 10. Mikroskopiye hazırlama:

Doku kesitleri her biri 2'şer dakikadan olmak üzere 3 kez ksilen ile yıkanıp enterlan ile kapatıldı.

Apoptosis oranı şu şekilde hesaplandı: Konjonktiva epitel hücreleri ışık mikroskopunda (Zeiss, Axioskop, Almanya) x40 büyütme altında incelendi. TUNEL pozitif apoptotik hücreler kahverengi olarak diğer hücrelerden kolayca ayrılmaktaydı. Hücrelerdeki nükleer boyanma pozitiflik olarak değerlendirildi (**Şekil 3.1.E-F**). Her preparattaki bütün epitel hücreleri, hastaların tedavi alıp almadıkları ön bilgisine sahip olmadan tarafımda sayıldı. Böylece birden fazla gözlemci nedeniyle doğabilecek hücre sayım değişkenliğinden kaçınıldı. İşlem sırasında dökülen ve yüzey epitel hücresi

izlenmeyen bölgelerdeki hücreler sayıma katılmadı. Apoptotik oran ise apoptotik hücre sayısının toplam konjonktiva epitel hücre sayısına bölünmesiyle bulundu.

Tüm olgularda apoptozis ve goblet hücre oranları hesaplandıktan sonra topikal antiglokoma ilaç kullanan glokoma hastalar, ilaç kullanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kullanılan ilaçların sayısı, kullanım süresi, glokoma ve ilaç tipinin oranlara etkisi araştırıldı.

İstatistiksel analiz *SPSS for Windows (Version 10.0)* adlı *software* paket programı kullanılarak yapıldı. Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi, ki-kare, Spearman'ın korelasyon katsayısı kullanıldı ve 0,05'den küçük veya eşit p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Işık mikroskopisi altında yapılan hücre sayımı sonucunda apoptozis oranının 0,006 ile 0,549 arasında değiştiği, goblet hücre oranının 0,003 ile 0,067 arasında değiştiği saptandı (**Tablo 4.1.**).

**Tablo 4.1.** Cerrahi spesimenlerden elde edilen apoptozis ve goblet oranları

Sıra No	İlaç kullanımı	Apoptozis oranı	Goblet hücre oranı
1	VAR	0,244	0,013
2	VAR	0,036	0,007
3	VAR	0,011	0,016
4	VAR	0,105	0,027
5	VAR	0,549	0,011
6	VAR	0,239	0,007
7	VAR	0,276	0,011
8	VAR	0,132	0,005
9	VAR	0,103	0,004
10	VAR	0,212	0,046
11	VAR	0,072	0,013
12	VAR	0,294	0,030
13	VAR	0,187	0,006
14	VAR	0,462	0,012
15	YOK	0,105	0,003
16	YOK	0,026	0,035
17	YOK	0,005	0,004
18	YOK	0,060	0,010
19	YOK	0,015	0,012
20	YOK	0,175	0,024
21	YOK	0,033	0,017
22	YOK	0,009	0,012
23	YOK	0,382	0,027
24	YOK	0,063	0,024
25	YOK	0,028	0,013
26	YOK	0,007	0,016
27	YOK	0,006	0,067
28	YOK	0,081	0,015
29	YOK	0,113	0,029
30	YOK	0,227	0,004

Topikal antiglokom ilaç kullanan glokomlu olgular, ilaç kullanmayan glokomu olmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, birinci grupta yaşların 28-87, ikinci grupta ise 54-82 arasında değiştiği görüldü. Yaşlar arasında grupların istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptandı ( $p=0,879$ ). Pearson'ın ki kare testi ile karşılaştırıldığında iki grup arasında cinsiyet dağılımının uyumlu olduğu görüldü ( $v=0,125$ ,  $p=0,727$ ) (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** İlaç kullanan ve kontrol grubu arasında cinsiyet dağılımı

Topikal antiglokom ilaç kullanımı	Cinsiyet		Toplam
	Erkek	Kadın	
İlaç kullanıyor	6 (%46,2)	8 (%47,1)	14 (%46,7)
Kontrol	7 (%53,8)	9 (%52,9)	16 (%53,3)
Toplam	13 (%100)	17 (%100)	30 (%100)

Topikal antiglokom ilaç kullanan glokomu olan 14 hasta, ilaç kullanmayan glokomu olmayan kontrol grubundaki 16 hasta ile apoptozis oranları açısından Mann Whitney U testiyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,013$ ) (Tablo 4.3.). İlaç kullanımının olduğu grupta konjonktiva epitel hücrelerinde daha yüksek apoptozis oranları saptandı.

**Tablo 4.3.** Topikal antiglokom ilaç kullanımının apoptozis oranına etkisi

Topikal antiglokom ilaç kullanımı	n	Apoptozis oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
İlaç kullanıyor	14	0,011-0,549	0,208±0,154	0,013
Kontrol	16	0,005-0,382	0,083±0,102	

Hastalar glokom tiplerine göre sınıflandırıldı. Olgulardan 6'sında (%42,9) psödoeksfolyasyon glokomu, 4'ünde (%28,6) primer açık açılı glokom, 3'ünde (%21,4) dar açılı glokom, 1'inde (%7,1) konjenital glokom mevcuttu. Konjenital glokomu olan hasta, istatistiksel çalışma için sayısının az olması nedeniyle karşılaştırmaya dahil edilmedi. Psödoeksfolyasyon glokomu, primer açık açılı glokom ve dar açılı glokom Kruskal-Wallis testi ile apoptozis oranları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,517$ ) (**Tablo 4.4.**).

**Tablo 4.4.** Glokom tiplerinin apoptozis oranına etkisi

Glokom tipi	n	Apoptozis oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
PE	6	0,011-0,294	0,146±0,114	0,517
PAAG	4	0,105-0,549	0,249±0,205	
DAG	3	0,072-0,462	0,269±0,195	

Topikal antiglokom ilaç kullanan 14 hastada, ilaç kullanım süresi 1 hafta ile 5 yıl arasında değişmekteydi. Spearman'ın korelasyon katsayısı kullanılarak ilaç kullanım süresi ile apoptozis oranları arasındaki ilişki araştırıldığında, korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. ( $p=0,803$ ,  $r=-0,073$ ).

Olgulardan 7'si (%50,0) bir ilaç, 4'ü (%28,6) iki ilaç, 2'si (%14,3) üç ilaç, 1'i (%7,1) dört ilaç kullanmaktaydı. Kullanılan topikal antiglokom ilaç sayısına göre olgular bir veya birden fazla ilaç kullanımına göre sınıflandırıldı. Bir ilaç kullanan grup ile birden fazla ilaç kullanan grup arasında apoptozis oranları açısından istatistiksel önemli bir fark tespit edilmedi ( $p=0,805$ ) (**Tablo 4.5.**).

**Tablo 4.5.** Kullanılan topikal antiglokom ilaç sayısının apoptozis oranına etkisi

Kullanılan ilaç sayısı	n	Apoptozis oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
Bir	7	0,072-0,549	0,245±0,185	0,805
İki veya daha fazla	7	0,011-0,294	0,172±0,118	

Topikal antiglokom ilaç kullanım süresi 1 aydan kısa ve uzun olan iki grup oluşturulduğunda da, grupların apoptozis oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü ( $p=0,839$ ) (**Tablo 4.6.**).



**Tablo 4.6.** Topikal antiglokoma ilaçların kullanım süresinin apoptozis oranına etkisi

İlaç kullanma süresi	n	Apoptozis oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
Bir aydan kısa	4	0,036-0,294	0,169±0,120	0,839
Bir aydan uzun	10	0,011-0,549	0,224±0,169	

Çalışmaya dahil edilen hastalar 6 farklı ilaç kullanmaktaydılar. Bütün ilaçlarda prezervan madde olarak benzalkonyum kloridi çeşitli konsantrasyonlarda (%0,0075-%0,02) ihtiva etmekteydiler. En yüksek benzalkonyum klorid konsantrasyonu olan %0,02'i Xalatan®'in içerdiği görüldü. Kullanılan ilaçlar arasında Xalatan®'in olduğu grup, kullanılan ilaçlar arasında Xalatan®'in olmadığı grup ile karşılaştırıldığında apoptozis oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,108) (**Tablo 4.7.**)

**Tablo 4.7.** Kullanılan ilaçlar arasında Xalatan®'in varlığının apoptozis oranına etkisi

İlaç tedavisinde Xalatan®	n	Apoptozis oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
Var	9	0,011-0,294	0,170±0,100	0,108
Yok	5	0,036-0,549	0,278±0,218	

Sadece Timoptic® veya Betoptic® kullanan hastalar beta-blokör kullananlar başlığında bir grupta toplanarak, sadece Xalatan® kullanan hastalarla apoptozis oranları açısından karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (p=0,114) (**Tablo 4.8.**)

**Tablo 4.8.** Beta-blokör ve Xalatan®'in apoptozis oranları açısından karşılaştırılması

Kullanılan ilaç	n	Apoptozis oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
Beta-blokör	4	0,132-0,549	0,339±0,198	0,114
Xalatan®	3	0,072-0,187	0,120±0,059	

Topikal antiglokom ilaç kullanan glokomlu olgularda apoptozis oranlarının, goblet oranları ile ilişkisi Spearman'ın korelasyon katsayısı ile araştırıldığı zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ( $r=0,138$ ;  $p=1,00$ ).

Topikal antiglokom ilaç kullanan glokomlu olgular, ilaç kullanmayan glokomu olmayan kontrol grubu ile goblet hücre oranları açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel fark bulunmadı ( $p=0,370$ ) (**Tablo 4.9.**)

**Tablo 4.9.** Topikal antiglokom ilaç kullanımının goblet hücre oranına etkisi

Topikal antiglokom ilaç kullanımı	n	Goblet hücre oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
İlaç kullanıyor	14	0,005-0,046	0,015±0,011	0,370
İlaç kullanmıyor	16	0,003-0,067	0,019±0,015	

Kullanılan topikal antiglokoma ilaç sayısına göre olgular sınıflandırılınca, bir ilaç kullanan grup ile birden fazla ilaç kullanan grup arasında goblet hücre oranları açısından istatistiksel önemli bir fark tespit edilmedi ( $p=0,318$ ) (**Tablo 4.10.**).

**Tablo 4.10.** Kullanılan topikal antiglokoma ilaç sayısının goblet hücre oranına etkisi

Kullanılan ilaç sayısı	n	Goblet hücre oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
Bir	7	0,004-0,046	0,014±0,011	0,318
İki veya daha fazla	7	0,007-0,030	0,016±0,013	

Glokom tipi ile goblet hücre oranları arasında istatistiksel olarak önemli ilişki saptanmadı ( $p=0,825$ ).

Hematoksilen-eosin ile boyanan kesitler incelendiğinde 3'ü ilaç kullanan 1'i ilaç kullanmayan olmak üzere toplam 4 olguda konjonktiva epitel tabakasını invazyon yapmayan kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu görüldü. Apoptozis ve goblet hücre oranları ile istatistiksel olarak ilişkisinin olmadığı saptandı ( $p=0,072$ ,  $p=0,976$ ). Kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile ilaç kullanımı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ( $p=0,315$ ). Ayrıca kullanılan ilaç sayısı ve süresi ile kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonunun istatistiksel önemli ilişkisi yoktu ( $p=1,00$ ,  $p=0,170$ ).

İlaç kullanan 6 olguda ve ilaç kullanmayan 3 olguda hematoksilen-eosin ile boyanan kesitlerde skuamoid değişim saptandı. Skuamoid değişimin ilaç kullanımı ile istatistiksel anlamlı ilişkisi saptanmadı ( $p=0,236$ ). Kullanılan ilaç sayısı ve süresi ile skuamoid değişim arasında istatistiksel önemli ilişki yoktu ( $p=0,592$ ,  $p=0,108$ ).

Skuamoid değişimin apoptozis oranlarına istatistiksel anlamlı etkisi görülmedi ( $p=0,929$ ). Skuamoid değişim ile goblet hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ( $p=0,05$ ) (**Tablo 4.11**).

**Tablo 4.11.** Skuamoid değişimin varlığının goblet hücre oranına etkisi

Skuamoid değişim	n	Goblet hücre oranı		
		Min-Max	Ort±SD	p
Var	9	0,003-0,016	0,009±0,004	0,05
Yok	5	0,004-0,067	0,020±0,016	

## TARTIŞMA

Topikal antiglokom ilaçların glokom tedavisinde önemli bir yeri vardır. Glokomun kronik ve ilerleyici bir hastalık olması nedeniyle bu ilaçlar hastalık süresince uzun dönemler için kullanılmaktadır. Hastaların tedavisinde bazen tek topikal ilaç yeterli olmaktadır, bazen hedef göz içi basınca ulaşmak için birden fazla ilaç kullanımı gerekmektedir.

İdeal bir ilaç tedavisinde aranan özellikler etkinlik, klinik kullanım kolaylığı ve düşük maliyetle birlikte yan etkilerin olmamasıdır.

Oftalmolojide, yaygın ve kronik kullanımda olan topikal antiglokom ilaçları ideale ulaştırmak için çeşitli araştırmalar yürütülmektedir. İlaçların etkinliğini arttırmak için yeni formülasyonlar araştırılmakta, ilaç dozajları ve maliyeti düşürmek için kombine ilaçlar oluşturulmaktadır (38, 39). Topikal antiglokom ilaçlarının yan etkilerinin saptanması, yan etki oluşum mekanizmalarının belirlenmesi ve en aza indirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır.

Göz ön yüzeyi topikal antiglokom ilaçların göz içine ulaşması için geçilmesi gereken bir bariyer gibi düşünülebilir (15). Bu çalışmada klinikte kullanımda olan ilaçların konjonktivada hücresel düzeydeki toksisitesi araştırıldı. Bilinmektedir ki eğer hücre hasara uğramışsa ve bu hasarın onarılması mümkün olmayacaksa hücre ölüme sürüklenmektedir. Şiddetli ani gelişen hasarda ölüm nekroz şeklinde olur. Apoptozisde uyarana sekonder olarak genetik kontrol altında programlanmış hücre ölümü görülür (61). Bu çalışmada topikal antiglokom ilaç tedavisinin konjonktivada programlanmış hücre ölümüne yol açıp açmadığı araştırıldı. Konjonktiva epitel hücrelerindeki apoptozis saptanarak apoptozis oranları hesaplandı. İlaç kullanan 14 hasta, kontrol grubundaki 16 hasta ile apoptozis oranları açısından karşılaştırıldığında, ilaç kullanan grupta istatistiksel olarak anlamlı apoptozis oranı artışı saptandı.

Literatüre bakıldığı zaman in vitro çalışmalar ile topikal antiglokom ilaçların konjonktiva epitel hücrelerindeki apoptozise etkilerinin araştırıldığı görülmektedir. Konjonktiva hücre kültürlerinin kullanıldığı bu çalışmalarda kullanılan hücreler konjonktiva epitelinin bazı karakteristik özelliklerini ihtiva etmekle birlikte (dezmozomlar, mikrovillus, EGF ekspresyonu, FAS reseptörleri gibi), göz yüzeyindeki ilaç difüzyonu, hücrelerin çok katlı olma özelliklerini taşımazlar. Bu çalışmaları sonuçları yol gösterici olmakta fakat insan oküler yüzeyi ile direkt olarak bağlantı kurulamamaktadır. Biz çalışmamızda katarakt veya glokom nedeniyle cerrahi tedavi planlanmış hastaların bulber konjonktivasından cerrahi sırasında inzisyonel biyopsiler alarak, bu spesimenlerde araştırmayı yürüttük. Böylece hastalar kullanmakta oldukları antiglokom ilaçlarına devam ederken konjonktivadaki hücresel hasar incelenebildi.

Bu çalışmanın yapısı spesifik bir ajanın konjonktiva toksisitesini göstermeye yönelik değildi. Amaç klinik kullanımda olan ve pratikte kullanılan topikal antiglokom ilaçların etki yerleri olmamakla birlikte direkt olarak karşı karşıya kaldıkları konjonktivada oluşturdukları subklinik hücresel hasarın apoptozis ile tespitiydi.

İlaç kullanan hastalarda kullanmayanlara göre artmış apoptozis saptanmakla birlikte ilaçlar arasında apoptozis oranları açısından fark bulunamadı. Bu ilaçlar değişik biyokimyasal özellikler gösteren etken maddeler ihtiva eden ajanlardı. Hepsi bir prezervan madde olan benzalkonyum kloridi içermekteydi. İlaçların apoptozis oranını arttırdığının saptanması fakat ilaçlar arasında fark bulunmamasının sebebi, asıl hasara yol açan ajanın bütün ilaçların ihtiva ettiği benzalkonyum klorid olması ile açıklanabilir. Debbasch ve arkadaşları (49) konjonktiva hücre kültürlerinde yaptıkları bir çalışmada prezervan içeren ve prezervansız beta-blokörleri (timolol ve karteolol) apoptozis açısından karşılaştırmışlardır. Sadece prezervan içeren beta-blokör ajanların, prezervan içermeyen beta-blokörlere göre apoptozisin arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada ilaçların glutatyon azalmasından çok serbest oksijen radikallerinin yapımının artması ve mitokondriyal hasar ile hücreyi apoptozise sürüklediği öne sürülmüştür.

Debbasch ve arkadaşlarının (48) yaptığı başka bir in vitro çalışmada, oftalmik solüsyonlarda kullanılan prezervan maddelerin konjonktiva hücrelerine toksisitesi araştırılmıştır. Çalışmada 10 farklı prezervan ajan kullanılmış ve içlerinde en toksik olanların benzalkonyum klorid, benzododekinyum bromid, cetrimid olduğunu gösterilmiştir. Bu 3 ajan da kuarterner amonyum olup, % 0,001'in üzerindeki konsantrasyonlarında tipik kromatin kondansasyonu gözlenmiştir. Konsantrasyon %0,005'in üzerine çıktığı zaman hücrelerde nekroz da görülmüştür. Benzalkonyum kloridin düşük konsantrasyonlarda apoptozise yol açtığı, yüksek konsantrasyonlarda nekroza yol açan toksik bir ajan olduğu görülmektedir.

De Saint Jean ve arkadaşları (60) konjonktiva epitel hücre kültürlerinden aldıkları örneklerde benzalkonyum kloridin toksisitesini in vitro olarak çalışmışlardır. Apoptozisin karakteristiklerinden olan kromatin kondansasyonu, DNA fragmantasyonu, hücre volümünün azalması, apoptotik marker Apo 2.7, DNA'daki apoptotik değişiklikler araştırılmıştır. Benzalkonyum kloridin %0,0001 gibi düşük konsantrasyonlarda bile apoptozis ile hücre ölümüne yol açtığını gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan topikal antiglokom ilaçlarında benzalkonyum klorid konsantrasyonları %0,0075 ile %0,02 arasında değişmekteydi. Xalatan®'in en yüksek konsantrasyon olan %0,02'lik benzalkonyum klorid kapsadığı görüldü. Kullanılan ilaçlar arasında Xalatan® olan ve olmayanlar karşılaştırıldığında apoptozis oranları açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı. Bu her iki grupta da birden fazla ilaç ve farklı dozajların kullanımını ile açıklanabilir. Benzalkonyum kloridin toksisitesinde konsantrasyon önemli bir parametre olmakla birlikte, kullanılan miktar ve dozajın da hücre hasarını etkilemesi muhtemeldir.

Çalışmadaki olgular 1 hafta ile 5 yıl arasında değişen sürelerde topikal antiglokom ilaç kullanmaktaydı. İlaç kullanım süresi ile apoptozis arasındaki korelasyona bakıldığında istatistiksel anlamlı bir sonuç bulunmadı.

Broadway ve arkadaşlarının (17) yaptığı topikal antiglokom ilaç kullanımının konjonktiva hücre profiline etkisini araştırdıkları çalışmada, ilaçların subklinik inflamasyona sebep olduğu ve bunun 3 yıldan fazla ilaç

kullanımında arttığı gösterilmiştir. İlaçların uzun süreli kullanımda toksisitesinin artması beklenen bir durumdur. Bizim çalışmamızda toksisiteyi göstermek amacıyla apoptozis çalışılmıştır. Ancak apoptotik süreç oldukça hızlıdır ve yaklaşık 3-4 saat içinde hücre ortamdan kaybolur ve epitel hücreleri hızlı yaşam döngüleri olan hücrelerdir. Uzun dönem ilaç kullanımında apoptozise giden hücre sayısı çok olması halinde bile apoptozis oranına etki kısıtlı olmuş olabilir.

Glokomlu gözlerde glokomun sebep ve sonuçlarına yönelik yapılan araştırmalarda retina ganglion hücrelerinde ve trabekulum dokusunda apoptozisin arttığı gösterilmiştir (62, 63). Bilindiği kadarıyla konjonktivada sadece glokoma bağlı apoptozis artışı olduğunu gösteren bir çalışma yoktur ve konjonktivanın glokom patofizyolojisinde kayda değer bir yeri olmadığı kabul görmektedir. Biz çalışmamızda glokom tiplerini de konjonktiva apoptozis oranları açısından karşılaştırdık. Primer açık açılı, psödoeksfolyasyon ve kronik primer dar açılı glokomu olan hastalar arasında apoptozis oranları açısından fark bulunamadı.

Çalışmada PAS ile boyanan kesitlerde goblet hücreleri sayılarak, goblet hücre oranları hesaplandı. Böylece topikal antiglokom ilaçların apoptozis oranlarına etkisine paralel goblet hücre oranlarında değişiklik yapıp yapmadığı araştırıldı. Literatürde de topikal antiglokom ilaçların kullanımının goblet hücre sayısında yaptığı değişikliklerin araştırıldığı çalışmalara rastlanılmaktadır. Baun ve arkadaşları (64) topikal antiglokom ilaç tedavisi almış 17 olgu ile yaş uyumlu 18 kontrol olgunun konjonktiva biyopsi materyallerini goblet oranları açısından karşılaştırmışlar ve iki grup arasında goblet oranları açısından fark bulamamışlardır. Çalışmamızın sonucu Baun ve arkadaşlarını destekler niteliktedir.

Bazı çalışmalarda goblet oranı azalmış olarak bulunmuştur (16, 65).

Sherwood ve arkadaşlarının (66) konjonktiva biyopsi materyellerinde yaptıkları çalışmada goblet oranları ilaç kullanan olgularda kontrole göre anlamlı düşüş göstermektedir. Bu çalışmada uzun süre ilaç kullanan hasta grubunun ilaç kullanma süresi ortalama 7,7 yılken, bizim çalışmamızda ilaç kullanım süresi ortalaması 1,9 yıldır. Çalışmamızın Sherwood'un çalışmasıyla



uyumlu sonuçlarının olmamasının sebebi ilaç kullanım süresinin daha kısa olması ile açıklanabilir. Ayrıca Sherwood ve arkadaşlarının çalışmalarında biyopsiler bazı hastalarda üst nazal bulber konjonktivadan alınırken, bazı hastalarda üst temporal bulber konjonktivadan alınmıştır. Çalışmamızda konjonktivada hücre dağılımı farklılıklarının sonuçlarımızı en az etkilemesi için biyopsiler aynı bölgeden alındı.

Abbel-Khalek ve arkadaşları (46) yaşla birlikte goblet hücre oranlarının azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada ise yaşın etkisini en aza indirmek için ilaç kullanan ve kullanmayan hasta grupları yaş uyumlu olarak oluşturuldu. Ancak goblet oranlarının 0,003 ile 0,067 gibi dar bir aralıkta değişim göstermesi ve hasta sayısının azlığı istatistiksel analizde limitasyona sebep olmuş olabilir.

Çalışmada tek hücre apoptozisini saptamak için TUNEL metodu kullanıldı. Parafine gömülmüş doku kesitlerinde tek hücre apoptozisini göstermede TUNEL güvenilen bir yöntemdir (61). Fakat TUNEL'in %100 özgül olmayıp, nekroz sırasındaki DNA degradasyonunu gösterebildiği ve yanlış pozitif sonuçlar verebildiği bilinmektedir (67). TUNEL'in özgüllüğünü arttırmak için ilave yöntemler kullanılabilir. Bunun için immün boyamalar ile aktif kaspaz ve kaspazın yıkım ürünlerine yönelik çalışmalar yapılabilir. Aktif kaspaz 3 tarafından parçalanmış aktinin immün boyanması (Fractin®) buna örnek teşkil etmektedir (68). Ayrıca nükleik asidi bağlayan florasan özellik gösteren boyalar (acridine orange, YOYO-1) kullanılarak, apoptoziste gözlenen tipik kromatin kondansasyonu laser konfokal mikroskopta izlenebilir (54). Bu ek boyamalarla apoptozis daha güvenilir bir şekilde tespit edilmekle beraber, ek laboratuvar ve teçhizat gerektirmektedir. Bizim çalışmamızda oranlar hesaplanıp karşılaştırıldı. Böylece yanlış pozitiflik var olmakla birlikte, sonuçlara etkisi en aza indirilmeye çalışıldı.

Boyamanın özgüllüğünü arttırmak için kit olarak Apoptag® (In situ apoptosis detection kit/Peroxidase; Oncor, Inc) seçildi. Bu kitte biotin-avidin yerine digoksjenin-antidigoksjenin kullanılmaktadır. Dokuda normalde varolan biotin yanlış pozitif boyamaya yol açabilir ve digoksjenin avidin-biotine göre daha spesifiktir.

Wright (69) topikal antiglokom ilaç kullanan 4 hastada konjonktivada epidermalizasyon, goblet hücre kaybı ve kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonunu rapor etmiştir. Çalışmada 3'ü ilaç kullanan, 1'i kullanmayan 4 örnekte kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanıldı. Fakat ilaç kullanımı ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi saptanmadı.

Broadway ve arkadaşları (17) topikal antiglokom ilaçların konjonktiva hücre profiline etkisini araştırdıkları çalışmada, topikal ilaç kullanımıyla konjonktivadaki makrofaj, lenfosit ve mast hücre sayılarında artış olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında inflamatuvar hücreler ayrı ayrı sayılmıştır. Bu çalışmada hematoksilen-eosin ile boyanmış kesitlerde inflamatuvar hücre sayımı yapılmamış, gros olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlendirilmiştir.

Baudouin ve arkadaşları (70) bir çalışmalarında, antiglokom ilaçların inflamasyona yol açtığını göstermişlerdir.

Skuamoz hücreler kolumnar hücrelere göre daha dayanıklıdır. Olumsuz dış etkene maruz kalınca mukozalarda goblet hücre kaybı ile birlikte skuamoid değişim görülebilir. Genellikle skuamoid değişim, goblet hücrelerinin de kaybı ile birlikte dir. Çalışmada skuamoid değişim gösteren hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir goblet hücre oranı düşüklüğü saptandı. Çalışmamızda 9 hastada skuomoid değişim saptandı. Beraberinde keratinizasyon, epidermalizasyon mevcut değildi. Bu hastaların 6'sı ilaç kullanmaktaydı fakat ilaç kullanımı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi saptanmadı.

Bu çalışmada topikal antiglokom ilaçların konjonktiva epitel hücrelerinde apoptozisi arttırdığı bulundu. Bu bulgu ilaçların konjonktivada subklinik bir hasara yol açtıklarını göstermektedir. Ancak ilaçlar arasında apoptozis oranları açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmaması, toksisiteden etken maddelerden çok ilaçların ihtiva ettiği prezervanın büyük ölçüde sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Prezervan içeren antiglokom ilaçlardan, klinik olarak kullanılacak prezervan içermeyen ilaçlara geçiş ile konjonktivadaki hücresel hasar en aza indirilebilecektir.

## SONUÇLAR

1. İlaç kullanan olgularda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmış apoptozis oranları saptandı.
2. İlaç kullanım süresinin, ilaç sayısının ve glokom tipinin apoptozis oranlarına istatistiksel anlamlı bir etkisi saptanmadı.
3. Apoptozis oranları ile goblet oranları arasında istatistiksel anlamlı ilişki tesbit edilmedi.
4. İlaç tedavisi olarak sadece Xalatan® kullanan olgular ile tek beta-blokör kullanan olgular apoptozis ve goblet oranları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark izlenmedi.
5. Kullanılan ilaç tedavisinde Xalatan®'ın bulunduğu ve bulunmadığı olgular arasında apoptozis ve goblet oranları açısından fark izlenmedi.
6. İlaç kullanım süresinin, ilaç sayısının ve glokom tipinin goblet oranlarına istatistiksel anlamlı bir etkisi saptanmadı.
7. Kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve konjonktiva epitelindeki skuamoid değişim ile ilaç kullanımı, ilaç sayısı ve süresinin istatistiksel anlamlı ilişkisi izlenmedi.
8. Kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve skuamoid değişimin apoptozis oranları ile istatistik anlamlı bir ilişkisi saptanmadı.
9. Kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile goblet oranları arasında istatistiksel anlamlı ilişki izlenmedi.

10. Goblet oranlarının skuamoid değişimin görüldüğü olgularda, görülmeyen olgulara göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu saptandı.

## KAYNAKLAR

- 1- Quigley HA, Addicks EM, Green WR ve ark. Optic nerve damage in human glaucoma, II: The site of injury and susceptibility to damage. Arch Ophthalmol., 99, 635-649, 1981.
- 2- Quigley H, Hohman R, Addicks E ve ark. Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open-angle glaucoma. Am J Ophthalmol., 95, 673-691, 1983.
- 3- Hart WM, Becker B. The onset and evolution of glaucomatous visual field defects. Ophthalmol., 89, 268-279, 1982.
- 4- Heijl A, Lunqvist L. The frequency distribution of earliest glaucomatous visual field defects documented by automated perimetry. Acta Ophthalmol., 62, 658-664, 1984.
- 5- Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA ve ark. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. Invest Ophthalmol Vis Sci., 36, 774-786, 1996.
- 6- Spaeth GL. The effect of change in intraocular pressure on the natural history of glaucoma: Lowering intraocular pressure in glaucoma can result in improvement of the visual fields. Trans Ophthalmol Soc UK., 104, 256-264, 1985.
- 7- Tezel G, Siegmund KD, Trinkus K. Clinical factors associated with progression of glaucomatous optic disc damage in treated patients. Arch Ophthalmol., 116, 897-898, 2001.
- 8- Anderson DR. Glaucoma: The damage caused by pressure. Am J Ophthalmol., 108, 485-495, 1989.

- 9- Kass MA, Hart WM Jr, Gordon M ve ark. Risk factors favoring the development of glaucomatous visual field loss in ocular hypertension. *Surv Ophthalmol.*, 25, 155-162, 1980.
- 10- Vogel R, Crick RP, Newson RB ve ark. Association between intraocular pressure and loss of visual field in chronic simple glaucoma. *Br J Ophthalmol.*, 74, 3-6, 1990.
- 11- Quigley HA, Maumenee AE. Long term follow up of treated open angle glaucoma. *Am J Ophthalmol.*, 87, 519-525, 1979.
- 12- Higginbotham EJ. Initial treatment for open-angle glaucoma medical, laser or surgical? Medication is the treatment of choice for chronic open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.*, 116, 239-240, 1998.
- 13- Glaucoma Laser Trial Research Group. The Glaucoma Laser Trial (GLT): Results of argon laser trabeculoplasty versus topical medications. *Ophthalmol.*, 97, 1403-1413, 1990.
- 14- Glaucoma Laser Trial Research Group. The Glaucoma Laser Trial (GLT) and Glaucoma laser follow up study. 7: Results. *Am J Ophthalmol.*, 120, 718-731, 1995.
- 15- Doane MG, Jensen AD, Dohlman CH. Penetration routes of topically applied eye medications. *Am J Ophthalmol.*, 85, 383-386, 1978.
- 16- Sherwood MB, Grierson I, Millar L ve ark. Long term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmol.*, 96, 327-335, 1989.
- 17- Broadway DC, Grierson I, O'Brien C ve ark. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. I. The conjunctival cell profile. *Arch Ophthalmol.*, 112, 1437-1445, 1994.
- 18- Wyllie AH. Apoptosis; an overview. *Br Med Bull.*, 53, 451-465, 1997.

- 19- Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*, 26, 239-257, 1972.
- 20- Bortner CD, Cidlowski JA. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 42, 259-281, 2002.
- 21- Drance SM. The changing concept of glaucoma in the 20<sup>th</sup> century. "100 years of progress in glaucoma", ed. Buskirk EM, Shields MB. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.
- 22- Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol.*, 80, 389-393, 1996.
- 23- Tylefors B, Negrel AD. The global impact of glaucoma. *Bull World Health Organ.*, 72, 323, 1994.
- 24- Preferred Practice Patterns Committee, Glaucoma panel. Primary open-angle glaucoma. American Academy of Ophthalmology, San Francisco, 1996.
- 25- Stamper RL, Lieberman MF, Drake MV. Becker-Shaffer's diagnosis and therapy of the glaucomas. Mosby, St. Louis, Missouri, 4-8, 1999.
- 26- Yalaz M, Otham I, Nas K ve ark. The frequency of pseudoexfoliation syndrome in the eastern Mediterranean area of Turkey. *Acta Ophthalmol (Copenh).*, 70, 209-213, 1992.
- 27- Schulzer M, Drance SM, Douglas GR. A comparison of treated and untreated glaucoma suspects. *Ophthalmol.*, 98, 301-307, 1991.
- 28- Epstein DL, Krug JH Jr, Hertzmark E. A long term clinical trial of timolol therapy versus no treatment in the management of glaucoma suspects. *Ophthalmol.*, 96, 1460-1467, 1989.

- 29- Bartlett JD, Fiscella RG, Ghormley OD, Jaanus SD, Rowsey JJ, Zimmerman TJ. Ophthalmic Drug Facts. Facts and Comparisons, St. Louis, Missouri, 1-7, 1999.
- 30- Kaufman PL, Barany EH. Residual pilocarpine effects on outflow facility after ciliary muscle disinsertion in the cynomolgus monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci., 15, 558-561, 1976.
- 31- Patten JT, Cavanagh HD, Allansmith MR. Induced ocular pseudophakia. Am J Ophthalmol., 82, 272-276, 1976.
- 32- Coakes RL, Brubaker RF. The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure in the normal eye. Arch Ophthalmol., 96, 2045-2048, 1978.
- 33- Van Buskirk EM. Adverse reactions from timolol administration. Ophthalmol., 87, 447-450, 1980.
- 34- Liu GS, Basu PK, Trope GE. Ultrastructural changes of the rabbit corneal epithelium and endothelium after timoptic treatment. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol., 225, 325-330, 1987.
- 35- Dickstein K. Comparison of the effect of timolol versus betaxolol ophthalmic on cardiopulmonary exercise performance in healthy volunteers. Surv Ophthalmol., 33, 457-458, 1989.
- 36- Berry DP, Van Buskirk EM, Shields MB: Betaxolol and timolol: A comparison of efficacy and side effects. Arch Ophthalmol., 102, 42-45, 1984.
- 37- Nelson WL, Kuritsky JN. Early post marketing surveillance of betaxolol hydrochloride Sept 1985-1986. Am J Ophthalmol., 4, 592, 1987.
- 38- Strohmaier K, Snyder E ve ark. The efficacy and safety of the dorzolamide-timolol combination versus the concomittent administration of its components. Ophthalmol., 109, 1-9, 1999.



- 39- Toris C, Camras C, Yablonski M. Effects of PhXA41, a new prostaglandin  $F_{2\alpha}$  analog, on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmol.*, 100, 1297-1304, 1993.
- 40- Rowe JA, Hattenhauer MG, Herman DC. Adverse side effects associated with latanoprost. *Am J Ophthalmol.*, 124, 683-685, 1997.
- 41- O'Brein CS, Swan KC. Carbaminoylcholine chloride in treatment of glaucoma simplex. *Arch Ophthalmol.*, 27, 253, 1942.
- 42- Keller N, Moore D, Carper D. Increased corneal permeability induced by the dual effects of transient tear film acidification and exposure to benzalkonium chloride. *Eye Exp Res.*, 30, 203-210, 1980.
- 43- Burstein NL. Corneal cytotoxicity of topically applied drugs, vehicles and preservatives. *Surv Ophthalmol.*, 25, 15-30, 1980.
- 44- Gasset AR, Ishii Y, Kaufman HE ve ark. Cytotoxicity of ophthalmic preservatives, *Am J Ophthalmol.*, 78, 98-105, 1974.
- 45- Snell RS, Lemp MA. *Clinical anatomy of the eye. Facts and Comparisons*, Blackwell Scientific Publications, Chicago, Illinois. 97-101, 1989.
- 46- Abdel-Khalek LMR, Williamson J, Lee WR. Morphological changes in the human conjunctival epithelium. I. In the normal elderly population. *Br J Ophthalmol.*, 62, 792-799, 1978.
- 47- Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today.*, 14, 126-130, 1993.
- 48- Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Inv Ophthalmol Vis Sci.*, 42, 642-652, 2001.
- 49- Debbasch C, Pisella PJ, De Saint Jean M. Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved  $\beta$ -

- Blockers on Chang conjunctival cells. *Inv Ophthalmol Vis Sci.*, 42, 2525-2533, 2001.
- 50- Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *C. elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature.*, 356, 494, 1992.
- 51- Bellamy COC. P53 and apoptosis. *Br Med Bull.*, 53, 522-538, 1996.
- 52- Wilson SE. Stimulus-specific and cell type specific cascades: Emerging principles relating to control of apoptosis in the eye. *Exp Eye Res.*, 69, 255-266, 1999.
- 53- Nickells RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: An update of molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol.*, 43, 151-161, 1999.
- 54- Tatton NA, Tezel G, Insolia SA ve ark. In situ detection of apoptosis in normal pressure glaucoma: A preliminary examination. *Surv Ophthalmol.*, 45 (Suppl), 268-272, 2001.
- 55- Yew DT, Sha O, Li WWY ve ark. Proliferation and apoptosis in the epithelium of the developing human cornea and conjunctiva. *Life Sciences.*, 68, 2987-3003, 2001.
- 56- Milligan C, Schwartz L. Programmed cell death during animal development. *Br Med Bull.*, 52, 570-590, 1997.
- 57- Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ ve ark. Keratocyte apoptosis following corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 39, 276-283, 1998.
- 58- Evren-Abbasoğlu O, Hoşal BM, Gürsel E ve ark. Mitomycin-C induces apoptosis in cornea. *Br J Ophthalmol* (basımda).
- 59- Sibayan SAB, Latina MA, Sherwood ME ve ark. Apoptosis an morphologic changes in drug-treated trabecular meshwork cells in vitro. *Exp Eye Res.*, 66, 521-529, 1998.

- 60- De Saint Jean M, Brignole F, Bringuier AF. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Inv Ophthalmol Vsi Sci.*, 40, 619-630, 1999.
- 61- Gavrielli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via spesific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*, 119, 493-501, 1992.
- 62- Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA ve ark. TUNEL-pozitive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.*, 115, 1031-1035.
- 63- Agarwal R, Talati M, Lambert W ve ark. Fas-activated apoptosis and apoptosis mediators in human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res.*, 68, 583-590, 1999.
- 64- Baun O, Heegaard S, Kessing SV ve ark. The morphology of conjunctiva after long-term topical anti-glaucoma treatment; a quantitative analysis. *Acta Ophthalmol.*, 73, 242-245, 1995.
- 65- Derous D, de Keizer RJW, de Wolf-Rowendaal ve ark. Conjunctival keratinization, an abnormal reaction to an ocular beta-blocker. *Acta Ophthalmol.* 67, 333-338, 1989.
- 66- Sherwood MB, Grierson I, Millar L ve ark. Long term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmol.*, 96, 327-335, 1989.
- 67- Tatton NA, Maclean-Freaser A, Tatton WG ve ark. A flouroscent double labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson disease. *Ann Neurol.*, 44, 142-148, 1998.
- 68- Suurmeijer AJH, Wijk J, Velduisen D ve ark. Fractin immunostaining for the detection of apoptotic cells and apoptotic bodies in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Laboratory Invest.*, 79, 619-620, 1999.

- 69- Wright P. Squamous metaplasia or epidermalization of the conjunctiva as an adverse reaction to topical medication. *Trans Ophthalmol Soc UK.*, 99, 244-246, 1999.
- 70- Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K ve ark. Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs. *Ophthalmol.*, 3, 556-563, 1999.