

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**LAZERLE İNDÜKLENMİŞ RETİNOPATİ ÜZERİNE BAZIK  
FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN KORUYUCU ETKİSİ  
İmmünohistokimyasal, İmmünofloresans ve Ultrastrüktürel  
Bir Çalışma**

**Araş.Gör. Dr.Ünal KARTAL  
UZMANLIK TEZİ**

**SİVAS  
2009**

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**LAZERLE İNDÜKLENMİŞ RETİNOPATİ ÜZERİNE BAZIK  
FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN KORUYUCU ETKİSİ  
İmmünohistokimyasal, İmmünofloresans ve Ultrastrüktürel Bir  
Çalışma**

**Araş.Gör. Dr.Ünal KARTAL  
UZMANLIK TEZİ**

**Prof.Dr.Emel KOPTAGEL  
Danışman Öğretim Üyesi**

**SİVAS  
2009**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde teorik ve bilimsel alanda yetişmemde ve tezimin hazırlanmasında; bilgi birikim ve deneyimleri ile bana ışık tutan, bu konuda hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan başta danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Emel KOPTAGEL olmak üzere; Prof. Dr. H. Eray BULUT, Doç.Dr. Celal KALOĞLU ve Doç. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN hocalarıma derin minnet ve saygılarımı sunuyorum.

Tez çalışmam sürecinde katkılarından dolayı Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Haydar ERDOĞAN, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Prof. Dr. Fahrettin GÖZE, Prof. Dr. Reyhan EGİLMEZ, Biokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç Dr. Yavuz SİLİĞ, Deney Hayvanları Bölümü'nden Vet. Dr. Yücel YALMAN; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Öğretim Üyeleri Doç Dr. Hüseyin AKTUĞ, Doç.Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Öğretim Üyeleri Prof Dr. Candan ÖZOĞUL ve Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK; Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeoloji Mühendisliği Öğretim Üyesi Prof.Dr. Osman KOPTAGEL; Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof Dr. Sabire KARAÇALI ve Yrd. Doç.Dr. Remziye DEVECİ hocalarıma ve ismini sayamadığım emeği geçen tüm çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emek ve fedakarlıklarını her zaman yanında hissettiğim saygıdeğer annem Fatma ve canım eşim Milhan ve de dünya tatlısı çocuklarım Özge ile Yiğit'e çok teşekkür ederim.

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun 12/03/2002 tarih ve 2002/1 sayılı ve Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü'nün 28/03/2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen "Tez Yazım Kılavuzu'na" göre hazırlanmıştır.



## ÖZET

### **LAZERLE İNDÜKLENMİŞ RETİNOPATİ ÜZERİNE BAZİK FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN KORUYUCU ETKİSİ İmmünohistokimyasal, İmmünofloresans ve Ultrastrüktürel Bir Çalışma**

Araştırmalarda, endüstride, askeri alanlarda lazer kullanımı mesleki göz kazalarını da beraberinde getirmiştir. Yaşa bağlı maküler dejenerasyonlar gibi retinal kusurlarda rutin olarak kullanılan oftalmik lazer terapisi sonucu retinal lezyonlar gelişmektedir. Bu oküler hasarlar, fotoreseptörlerde önemli kayıplara ve lazerden direkt etkilenmeyen hasar alanlarına komşu dokularda da istenmeyen hasarlara ve sıklıkla görme zayıflığına yol açar. Bu durum, lazer atışından direkt etkilenmeyen, lezyona komşu normal dokunun lazerle etkilenmesinin kaçınılmaz sonucudur. Lezyon çevresindeki normal dokuları korumak/kurtarmak ve güvenli perifoveal fotokoagülasyona izin vermek, tedaviden sağlanan yararı arttırabilir.

Bu çalışmada, çok yaygın kullanılan lazer uygulamaları sonucu ortaya çıkan yan etkilerin araştırılması ve ortaya çıkabilecek olası retina hasarında bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) kullanımının nöroprotektif etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Bu amaçla, 30 adet *Chinchilla* cinsi erişkin, renkli, erkek tavşanlara diyot lazer uygulanmasını takiben oluşturulan gruplarda uygulamaya bağlı retinal harabiyet, diyot lazerle birlikte bFGF kullanımından sonra bu dokuda ortaya çıkan iyileşme ve yenilenme düzeyleri histokimyasal ve ultrastrüktürel yöntemlere ek olarak nestin, Ki- 67, vimentin, GFAP ekspresyonlarına yönelik immünohistokimyasal ve immünofloresan yöntemlerle saptandı.

Elde edilen bulgular sonucunda, tavşan gözlerine fokal diyot lazer uygulaması hem bölgesel hem de komşu alanlarda morfolojik değişikliklere yol açmıştır. Hasar alanlarında nöral retinanın dış nükleer

tabakasının tamamen ortadan kalktığı, retinal pigment epiteli tabakasının kesintiye uğradığı ve retinal pigment epiteli hücrelerinin intraretinal göçü, hasar alanı ile hasara komşu alanların birbirlerinden ayrılmamış olduğu izlendi. Ayrıca retinanın koroid tabakasına doğru invagine, vitröze doğru evagine olduğu, hasar alanında retinanın kalınlaştığı ve yer yer ödematöz alanların oluştuğu saptandı. GFAP, vimentin, Ki-67 ve nestin ekspresyonlarının da hasar alanlarında arttığı gözlemlendi. Fokal diyot lazerle fotokoagülasyondan hemen sonra bFGF'nin uygulandığı grupta ise retina tabakalarının normale yakın düzenlenim de olduğu, ödematöz alanların ortadan kalktığı, pigment epiteli tabakasının sürekliliğini koruduğu ve koroidal kan damarlarında dilatasyonlar olduğu izlendi. GFAP, vimentin, Ki-67 ve nestin proteinleri ekspresyonlarının da diyot lazer grubuna göre daha kuvvetli olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, lazerle fotokoagülasyondan sonra bFGF uygulamasının retinada koruyucu, tamir, yara iyileştirici etkilerinin olduğu ileri sürülebilir.

**Anahtar Sözcükler:** Retina, bFGF, tavşan, vimentin, nestin, GFAP, Ki-67.

## SUMMARY

### PROTECTIVE EFFECT OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR ON LASER INDUCED RETINOPATHY

#### An Immunohistochemical, Immunofluorescence and Ultrastructural Study

The use of laser in research, industrial and military areas often causes occupational eye accidents. The routinely used ophthalmic laser photocoagulation in retinal defects such as age dependent macular degenerations may cause retinal lesions. Those ocular damages may be accompanied by serious photoreceptor loss and important damages in neighboring areas thus often result with serious sight defects. This is an unavoidable effect of the laser application on the healthy neighboring area to preserve / protect the normal tissues, and to let a reliable perifoveal photocoagulation increases the usefulness of the therapy procedure.

Therefore the aim of the present study was to investigate the side effects of commonly used laser therapy along with the testing the neuroprotective effect of bFGF on a potential retinal impairment.

To do this, 30 *Chinchilla* pigmented adult male rabbits were divided into the control and the experimental groups, and experimental groups were undergone both laser application and bFGF therapy. The retinal tissue impairment and its renovation rate were tested by histochemistry, electronmicroscopy along with the immunohistochemistry and immunofluorescence for nestin, Ki67, vimentin, GFAP expression.

Findings of the present study revealed that the focal laser application on rabbit eyes caused morphological changes both in the application region and in the neighboring areas. In damage areas, the outer nuclear layer of the neural retina was almost disappeared, retinal pigment layer was interrupted, the retinal pigment epithelium has migrated intraretinally, and damage region along with the neighboring areas seemed not separated. On the other hand, retina was invaginated into the

choroid region and evaginated through the vitrous region whereas retina was thickened in damage region, and some edema was evident in those areas. Glial fibrillar acidic protein (GFAP), vimentin, Ki-67 and nestin expressions in damage areas was seemed to be increased. Basic fibroblast growth factor (bFGF) application just after the photocoagulation by laser revealed better results in application areas such as normal arrangement of retinal layers with no edema, a continuous pigment epithelium and dilatations in choroid vasculature. Expressions of GFAP, vimentin, Ki-67 and nestin were stronger than seen in laser application groups.

In conclusion, it could be suggested that the bFGF application after the laser photocoagulation might have protective, repairing and wound healing effects on retina.

**Keywords:** Retina, bFGF, rabbit, nestin, vimentin, GFAP, Ki-67.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

<b>TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>ÖZET</b>	v
<b>SUMMARY</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xi
<b>TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2. 1. Gözün Gelişimi	3
2. 2. Göz Anatomisi	14
2. 3. Gözün Histolojik Yapısı	20
2. 4. Retinanın Tabakaları	25
2. 4.1. Retinanın Pigmentli Epitel Tabakası	28
2. 4. 2. Nöral Retina Tabakası	29
2. 4. 3. Retina Hücreleri	32
2. 5. Ara Filamentler	36
2. 5. 1. Ara Filament Proteinleri	36
2. 6. Ki-67	38
2. 7. Bazik fibroblast growth faktör (bFGF)	38
2. 8. Diyot Lazer	39
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	40
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları	40
3.1.1. Kontrol ve Deney Grupları	40
3. 2. Anestezinin ve Analjeziklerin Uygulanması	43
3. 3. Lazer Uygulanması	43
3. 4. Kullanılan Cihazlar	43
3. 5. Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
3. 6. Doku Preparasyonu	45
3. 7. Işık Mikroskopi	45
3. 7. 1. Histokimyasal Uygulama	45

3. 7. 2. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Uygulamalar	46
3. 8. Elektronmikroskopi	47
<b>4. BULGULAR</b>	<b>48</b>
4.1. Histokimyasal Bulgular	48
4.1.1. Uygulama Yapılmamış Kontrol Grubu	48
4.1.2. Tampon Çözeltisi Uygulanmış Kontrol Grubu	48
4.1. 3. Diyet Lazer İle Fotokoagülasyon Uygulanmış Grup	53
4.1. 4. Diyet Lazer İle Fotokoagülasyon+Bazik FGF Uygulanmış Grup	56
4. 2. İmmünohistokimyasal-İmmünofloresans Bulgular	67
4. 2.1. GFAP İmmünoreaktivitesi	67
4. 2. 2. Vimentin İmmünoreaktivitesi	70
4. 2. 3. Nestin İmmünoreaktivitesi	75
4. 2. 4. Ki-67 İmmünoreaktivitesi	78
4. 3. Elektronmikroskopik Bulgular	83
4. 3. 1. Uygulama Yapılmamış Kontrol Grubu	83
4. 3. 2. Diyet Lazer İle Fotokoagülasyon Uygulanmış Grup	97
4. 3. 3. Diyet Lazer İle Fotokoagülasyon +Bazik FGF Uygulanmış Grup	106
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>111</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>117</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>119</b>
<b>8. EKLER- YEREL ETİK KURUL KARARI</b>	<b>132</b>

## SİMGE ve KISALTMALAR

<b>bFGF</b>	Basic fibroblast growth factor
<b>BMP-4, BMP-7</b>	Bone morphogenetic protein-4, Bone morphogenetic protein-7
<b>CHX10</b>	Homeobox-containing transcription factor
<b>FGFs</b>	Fibroblast growth factors
<b>DN</b>	Dış nükleer tabaka
<b>DP</b>	Dış pleksiform tabaka
<b>EDTA</b>	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>GH</b>	Ganglion hücre tabakası
<b>GFAP</b>	Gliial fibriller asidik protein
<b>İN</b>	İç nükleer tabaka
<b>İP</b>	İç pleksiform tabaka
<b>IRBP</b>	İnterstisiyel retinoid bağlayan protein
<b>KD</b>	Kan damarı
<b>KO</b>	Koroid tabakası
<b>LMAF</b>	bZIP-basic leucine zipper- ailesinin Maf proteinleri
<b>MITF</b>	Microphthalmia-associated transcription factor
<b>PAX2, PAX6</b>	Paired Box Gene2, Paired Box Gene6
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PBST</b>	% 0.1'lik triton-X100 'li phosphate buffered saline
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth faktör
<b>PDGF-R</b>	Platelet-derived growth factor receptor
<b>PROX-1</b>	Prospero ile ilişkili homeobox gen
<b>OsO<sub>4</sub></b>	Osmiyum tetroksit
<b>SF</b>	Sinir fibrilleri tabakası
<b>SHH</b>	Sonichedgehog
<b>SIX3</b>	Homeobox protein SIX3, Sine oculis homeobox homolog 3
<b>SKL</b>	Sklera
<b>SOX2</b>	SRY-related HMG-box (SOX) family of transcription factors
<b>TEM</b>	Transmisyon Elektron Mikroskobu
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor-β
<b>VEGF</b>	Vasküler endotelial growth faktör
<b>YE</b>	Yüzey ektodermi

## TABLOLAR ve ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1</b>	Gözün Gelişimi	8
<b>Şekil 2</b>	Göz Gelişiminin Moleküler Düzenlenimi	10
<b>Şekil 3</b>	6 haftalık embriyoda göz kadehi ve optik sap	12
<b>Şekil 4</b>	Gözün anatomik yapısı	17
<b>Şekil 5</b>	Retinanın tabakaları ve retinanın hücreleri	26
<b>Şekil 6</b>	Deneyin uygulanması.	41
<b>Şekil 7</b>	Uygulama yapılmamış grupta retina ve koroidin genel görünümü	49
<b>Şekil 8</b>	Uygulama yapılmamış grupta nöral retina tabakalarının daha büyük büyütmede görünümü	49
<b>Şekil 9</b>	Tampon çözeltisi uygulanmış kontrol grubunda retina tabakaları	51
<b>Şekil 10</b>	Tampon çözeltisi uygulanmış kontrol grubunda retina tabakalarının daha büyük büyütmede görünümü	51
<b>Şekil 11</b>	Diyot lazerle fotokoagülasyon uygulanmış grupta hasar alanında skleraya doğru evaginasyon, koroid tabakasına doğru invaginasyon	54
<b>Şekil 12</b>	Diyot lazerle fotokoagülasyon uygulanmış grupta hasar alanının görünümü	54
<b>Şekil 13</b>	Diyot lazerle fotokoagülasyon uygulanması ardından bFGF uygulanmış grupta hasar alanının görünümü.	57
<b>Şekil 14</b>	Diyot lazerle fotokoagülasyon+bFGF uygulanmış grupta yanık hasar alanı	59
<b>Şekil 15</b>	Diyot lazerle fotokoagülasyondan sonra bFGF verilen grupta hasar alanının görünümü.	61
<b>Şekil 16</b>	Diyot lazerle fotokoagülasyondan sonra bFGF uygulanmış grupta hasar alanında tamirin önemli ölçüde tamamlandığı izlenmekte	61
<b>Şekil 17</b>	Diyot lazerle fotokoagülasyonun sonra bFGF uygulanmış grupta hasar alanının görünümü	63
<b>Şekil 18</b>	Diyot lazerle fotokoagülasyondan sonra bFGF uygulanmış grupta hasar alanına uzak bölgelerde sklera, retina ve koroid tabakalarının görünümü	65
<b>Şekil 19</b>	Retina örneklerinde glial fibriller asidik protein immünoreaktivitesi.	68
<b>Şekil 20</b>	Vimentin immünoreaktivitesi. Negatif kontrol.	71
<b>Şekil 21</b>	Uygulama yapılmamış kontrol grubuna ait tavşan retinalarında vimentin-pozitif hücreler.	71
<b>Şekil 22</b>	Tavşan retinalarına diyot lazer uygulandıktan on gün sonra anti-vimentin immünoreaktivitesi	73
<b>Şekil 23</b>	Diyot lazer+bFGF uygulanmış grupta vimentin immünolokalizasyonu	73
<b>Şekil 24</b>	Tavşan retinalarından parafin tekniği ile alınan kesitlerde nestin immünoreaktivitesi.	76
<b>Şekil 25</b>	Lazer uygulanmamış kontrol grubunda anti-Ki-67 immünoreaktivitesi.	79
<b>Şekil 26</b>	Lazer uygulaması sonrası bFGF uygulanan deneklerin retinasında anti-Ki-67 immünoreaktivitesi.	81
<b>Şekil 27</b>	Uygulama yapılmamış kontrol grubuna ait tavşan retinalarının tabaka ve hücrelerinin yarı-ince kesitlerde görünümü.	85



<b>Şekil 28</b>	Kontrol grubunda nöral retinanın dış nükleer tabaka hücrelerinin ince yapısı	85
<b>Şekil 29</b>	Kontrol grubunda nöral retinanın iç nükleer tabaka hücrelerinin ince yapısı	87
<b>Şekil 30</b>	Kontrol grubunda nöral retinanın genel görünümü	89
<b>Şekil 31</b>	Kontrol grubunda dış sınırlayıcı membranın ince yapısı	89
<b>Şekil 32</b>	Kontrol grubunda dış sınırlayıcı membranın ince yapısı daha büyük büyütmede izlenmekte	91
<b>Şekil 33</b>	Kontrol grubu retinalarında dış nükleer tabaka hücreleri arasında Müller hücrelerine ait fibriller yapıda uzantılar	93
<b>Şekil 34</b>	Kontrol grubunda iç pleksiform tabakada sinaptik alanlar	95
<b>Şekil 35</b>	Pigmentli retina hücrelerinde ovoid biçimli melanin granülleri, heterokromatik çekirdek, epitelin oturduğu bazal lamina, fotoreseptörlerin dış segmentleri	95
<b>Şekil 36</b>	Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının görünümü	98
<b>Şekil 37</b>	Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının büyütmede elektronmikroskopik görünümü	daha 98
<b>Şekil 38</b>	Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının büyütmede elektronmikroskopik görünümü.	daha 100
<b>Şekil 39</b>	Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının iç nükleer tabaka hücrelerinin ince yapısı	102
<b>Şekil 40</b>	Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının büyütmede elektronmikroskopik görünümü	daha 104
<b>Şekil 41</b>	Lazer uygulamasından sonra bFGF uygulanan deneklerinin retinasında hasar alanı	107
<b>Şekil 42</b>	Lazer uygulamasından önce bFGF uygulanan deneklerinin retinasında hasar alanına pigmentli retina epiteli tabakasından gelen pigment hücrelerinin ince yapısı	109
<b>Şekil 43</b>	Lazer uygulamasından sonra bFGF uygulanan deneklerin hasar alanında pigmentli retina epiteli tabakası	109



## 1. GİRİŞ

Bilimsel araştırmalarda, endüstride, askeri alanlarda, klinikte lazer kullanımı çok yaygındır. Klinikte lazer, retinal hastalıklarının tedavisinde, diabetin yol açtığı mikroanevrizma, kanama ve eksudaların tedavisinde, yaşlılarda görülen makula dejenerasyonlarında, bazı retina tümörlerinin tedavisinde oftalmik lazer etkin olarak kullanılmaktadır (1). Lazerin bu yaygın kullanımı mesleki göz kazalarını da beraberinde getirmiştir. Perifoveal retinaya lazer fotokoagülasyon uygulaması, sıklıkla görme kaybına yol açar (2-5). Bu durum, lazer atışından direkt etkilenmeyen, lezyona komşu normal dokunun lazerle etkilenmesinin kaçınılmaz sonucudur. Lezyon çevresindeki normal dokuları korumak/kurtarmak ve güvenli perifoveal fotokoagülasyona izin vermek, tedaviden sağlanan yararı arttırır.

Retinal fotokoagülasyon lezyonları, kısmi iyileşme ile takip edilen primer ve sekonder dejenerasyonlara yol açar. Son yıllarda lazer tedavisi sırasında kazara oluşabilecek retinal yanıklara karşı yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır (6-12).

Merkezi sinir sisteminin her bölgesinde bulunan glial hücrelerin temel işlevleri nöronal sağlığı devam ettirmektir. Nöral rejenerasyona katılırlar ve nöral stem hücreler olarak hareket ederler. Retinal glial hücreler olan Müller hücreleri, akut retinal harabiyeti veya kronik nöronal stresi takiben stem hücreler olarak davranır ve reaktif gliosis geçirirler. Müller hücre gliosisi; çoğalma, intermediet filamentlerden nestin, vimentin, GFAP üretimindeki artıştan dolayı hücre şeklinde ortaya çıkan değişiklikler, iyon transport özelliklerinde değişiklikler, vasküler endotelial growth faktör (VEGF) gibi sinyal moleküllerinin salgılanması ile karakterizedir (12). Retinal harabiyetin tamirinde büyüme faktörleri ve sitokinler de işlev görürler. Bazik fibroblast growth faktör (bFGF), merkezi sinir sisteminde hücresele olaylarla ilişkili proliferatif, rejeneratif, canlılığı

sürdürmede işlev gören bir büyüme faktörüdür. Ekzojenöz bFGF uygulanması; retinal dekolman gibi retinal harabiyetlerde nöron dışı retinal hücrelerde çoğalmayı indükler. Retinal glial hücrelerde intermediet filament proteinlerinin ekspresyonunu artırır. Fotoreseptör hücre dejenerasyonu ve kaybını önler veya geciktirir. Hücre aksonlarının yenilenmesine öncülük eder. Retinaları çıkarılmış embriyolarda tüm retinanın yenilenmesini uyarır (8-12).

Bu çalışmada, diyot lazer uygulanması ile oluşturulan deneysel retinal hasar sonucu retinadaki nöronlarda, glial hücrelerde ve matrikste ortaya çıkabilecek hasar, intermediet filamentlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler, Müller hücrelerinin rejenerasyondaki rolü, lazerle fotokoagülasyondan hemen sonra bazik fibroblast büyüme faktör (bFGF) kullanımının retina üzerine nöroprotektif etkisi olup olmadığının immünohistokimyasal-immünofloresans tekniklerin uygulanması ile ışık mikroskopik düzeyde ve ince yapı değişimlerinin belirlenmesi için de elektron mikroskopik düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2. 1. GÖZÜN GELİŞİMİ

Gözler; ön beyin nöroektodermi, başın yüzey ektodermi, bu iki tabaka arasındaki mezoderm ve nöral krista hücreleri olmak dört kaynaktan gelişir:

Ön beyin nöroektodermi; retina, irisin arka tabakası ve optik sinire farklanır. Başın yüzey ektodermi; lens ve kornea epitelini oluşturur. Nöroektoderm ve yüzey ektodermi arasındaki mezodermden, göz küresinin vasküler ve fibröz tabakaları gelişir. Mezenşimal hücreler, mezodermden farklanırlar, fakat krista nöralisten çıkarak mezenşim içine göç eden hücreler koroid, sklera ve korneal endotele farklılaşırlar (13, 14).

Göz, 22 günlük embriyoda ön beynin kenarlarında bir çift sığ çukur şeklinde ortaya çıkar. Nöral tüpün kapanması ile ön beynin dışa doğru cepleri olan optik vezikülleri oluşturur. Bu veziküller, daha sonra yüzey ektodermi ile temas ederler ve lens oluşumu için ektodermden değişiklikleri indüklerler (Şekil 1, 2). Kısa bir süre sonra optik vezikül invagine olmaya başlar ve çift duvarlı göz kadehini şekillendirir. Göz kadehinin iç ve dış duvarları önceleri intra-retinal boşluk olarak adlandırılan bir lümen ile ayrılır hemen sonra bu lümen kaybolur ve iki tabaka birbirinden uzaklaşır. İnvaginasyon sadece kadehin merkezi kısmını sınırlamaz aynı zamanda koroid fissürü oluşturan iç yüzeyin bir parçasını da kapsar. Bu fissürün oluşumu, hyaloid arterin gözün iç çemberine ulaşmasını sağlar. Yedinci hafta sırasında koroid fissürün dudakları kaynaşır ve göz kadehinin ağzı, gelecekte pupili oluşturacak yuvarlak bir açıklığa dönüşür. Bu olaylar sırasında başlangıçta optik vezikülle temasta olan yüzey ektoderminin hücreleri uzamaya başlar ve lens plağını oluşturur. Lens plaklarının oluşumu, yüzey ektoderminin altındaki mezenşim ile temastan sonra optik veziküllerin indüksiyonu ile gerçekleşir (15). Bu plak, invagine olur ve lens vezikülünü oluşturur. Beşinci hafta sırasında, lens vezikülü, yüzey ektodermi ile temasını kaybeder ve göz kadehinin ağzında bulunur (14,16).

**Retina, iris ve silyar cismin gelişimi:** Küçük pigment granülleri ile karakterize optik kadehin dış tabakası **retinanın pigment epiteli** tabakası olarak bilinir. Optik kadehin iç (nöral) tabakasının gelişimi daha karmaşıktır. Arka 4/5'ini oluşturan **pars optica retina**, intraretinal boşluğu sınırlar ve ışığa duyarlı elementler olan rod ve konlara farklı hücreleri içerir. Bu fotoreseptif tabakaya komşu tabaka manto tabakasıdır, beyinde olduğu gibi nöronlar ile destekleyici hücreleri içerir. Manto tabakası, dış nükleer tabaka, iç nükleer tabaka ve ganglion hücre tabakalarını içerir. Fibröz tabakanın yüzeyinde daha derin tabakaların sinir hücrelerine ait aksonlar bulunur. Bu zondaki sinir fibrilleri optik sapa doğru birleşerek optik siniri oluşturur. Işık impulsları rod ve konlara ulaşmadan önce retinanın çoğu tabakasını geçerler. İç tabakanın öndeki 1/5 lik bölümü olan **pars ceca retina** tek hücre kalınlığında kalır. Daha sonra bu tabaka, irisin iç tabakasını oluşturan **pars iridica retina** ve silyar cismin oluşumuna katılan **pars ciliaris retina** olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 1, 2, 3).

Retinal nörogenez, yeni başlayan fovea çevresinde sentro-periferal bir sırayla oluşur. Foveal konlar, hamileliğin 12. haftasında gelişen ilk retinal hücrelerdir (17), doğum sonrası 3-4 yıla kadar olgun morfoloji ve yoğunluğa ulaşırlar (18). Başta, fovea sentralis olacak bölge, gelişen nöronların yoğun hücresel yığılmasından dolayı şişkin izlenir (19). Bu şişkin yapılanmada, retina gangliyon hücreleri, oksijen kaynağına en yakın durumda bulunan koriokapillerislerden en uzak mesafede yerleşir (20, 21). Hyaloid arter, bir kist veya kordon oluşturmak üzere kalabilir. Normal olarak bu damarın distal bölümü dejenere olur, geride kalan proksimal bölümü retinanın sentral arterini oluşturur (Şekil 1, 2, 3).

**Lensin gelişimi:** Lens vezikülünün oluşumundan kısa zaman sonra arka duvar hücreleri öne doğru uzamaya başlar ve giderek vezikülün lümenini dolduran uzun fibrilleri oluşturur. Yedinci haftanın sonunda bu primer lens fibrilleri lens vezikülünün ön duvarına ulaşır. Lensin büyümesi bu evrede bitmemiştir, yeni (sekonder) lens fibrilleri sürekli olarak merkezi kora eklenir (Şekil 2).

**Koroid, sklera ve kornea'nın gelişimi:** Beşinci haftanın sonunda göz primordiumu tamamen gevşek mezenşimle kuşatılır. Gelişim ilerlediğinde mezenşim, beynin piamateri ile karşılaştırılabilen i tabakaya ve duramatere benzer dış tabakaya farklanır. İç tabaka daha sonra bol damarlı pigmentli koroid tabakasını dış tabaka ise sklerayı oluşturur. Sklera, optik sinir çevresinde duramaterle devam eder. Gözün n yüzünün üstünü örten mezenşimal tabakaların farklanması farklıdır. n kamara, mezenşimdeki vakuolizasyonlar ve yarıklarla lensin ve irisin önündeki iç tabaka olan iridopupiller membranı ve sklera ile devam eden dış tabaka olan korneanın substantia propriasını oluşturur. n kamara, yassı mezenşimal hücreler ile döşelidir.

Kornea ise;

- yüzey ektoderminden köken alan bir epitel tabakası
- sklera ile devam eden substantia propria (stroma)
- n kamarayı sınırlayan bir epitel tabakasından oluşur.

Lensin önündeki iridopupiller membran tamamen ortadan kalkar, n ve arka göz kameraları arasındaki bağlantı sağlanır.

**Vitröz cismin gelişimi:** Mezenşim, göz primordiumunu sadece dıştan çevirmez aynı zamanda koroid fissür ile göz kadehini i taraftan da sarar. Burada intrauterin yaşam boyunca lensi besleyen hyaloid damarları ve retinanın i yüzeyindeki damarlı tabakayı oluşturur. Ayrıca lens ve retina arasındaki ince fibril ağını da oluşturur. Bu ağın i boşlukları daha sonra şeffaf jelatinöz madde ile doldurularak vitröz cisim oluşturulur. Bu bölgedeki hyaloid damarlar tıkanır ve fetal yaşam sırasında ortadan kalkarak geride hyaloid kanal kalır.

**Optik sinirin gelişimi:** Optik kadeh, beyinle ventral yüzeyindeki bir çukur olan koroid fissür içinden optik sap ile bağlanır. Hyaloid damarlar bu olukta bulunur. Beyne dönen sinir fibrilleri sapın i duvarındaki hücreler arasında uzanır. Yedinci hafta sırasında koroid fissür kapanır ve optik sapın içinde dar bir tünel şekillenir. Sinir fibrillerinin sayıca giderek artması

sonucu, sapın iç duvarı büyür ve sapın iç ve dış duvarları kaynaşır. İç tabakanın hücreleri optik sinir fibrillerini destekleyen nöroglia şebekesini sağlarlar. Optik sap böylelikle optik sinire dönüşür. Merkezinde ileride retinanın merkezi arteri olarak adlandırılacak olan hyaloid arterin bir bölümü bulunur. Dışta, koroid ve skleranın bir devamı olarak sinirin pia, araknoid ve dura tabakaları sırasıyla optik siniri sarar (Şekil 3).

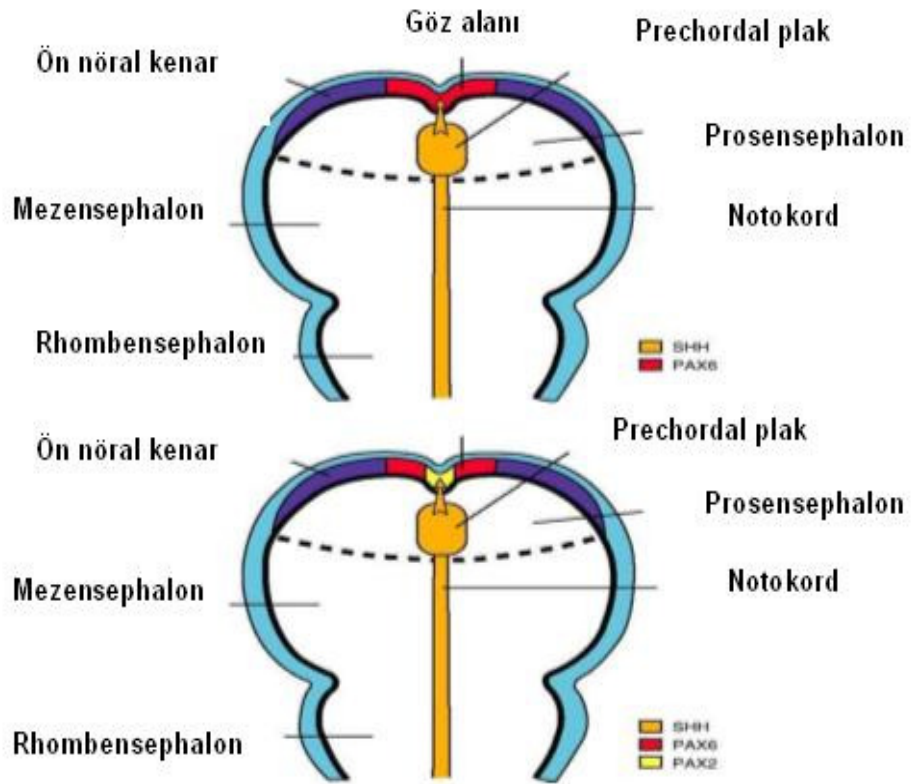
**Göz kapakları ve göz yaşı bezlerinin gelişimi:** Altıncı haftada, nöral krista hücre mezenşiminden ve kornea üzerindeki derinin iki kıvrımlı bölümünden göz kapakları gelişir ve 10. haftada birbirine temas eder. Göz küresinin iç yan açılarında yüzey ektodermin oluşturduğu bir dizi kıvrımdan göz yaşı bezleri gelişir (14).

**Göz gelişiminin moleküler düzenlenimi:** Göz gelişiminde anahtar düzenleyici gen, PAX6'dır (Paired Box Gene6). Transkripsiyon faktörü olan PAX6 nörolasyon başlamadan önce nöral plağın ön nöral kenarlarındaki bir bantta eksprese edilir. Bu evrede, daha sonra iki optik primordiuma ayrılacak olan bir tane göz alanı vardır (Şekil 1). Bu alanın ayrılması için gereken sinyal, prekordal plakta eksprese edilen sonichedgehog (SHH)'dur. SHH ekspresyonu göz alanının merkezindeki PAX2'yi artırırken, PAX6'yı azaltır. Daha sonra PAX2, optik saplarda; PAX6 ise göz kadehi ve lensi oluşturan üstteki ektoderimde eksprese edildiğinden bu yapı sürdürülür (Şekil 1, 2). Gelişim ilerlerken, PAX6'nın optik kadeh oluşumu için elzem olmadığı görülür. Bunun yerine, bu süreç, optik vezikül, çevre mezenşim ve lens-oluşturan bölgedeki yüzey ektodermi arasındaki interaktif sinyallerle düzenlenir. Yüzey ektoderminden gelen fibroblast büyüme faktörleri, nöral retinanın farklanmasını başlatırken, çevre mezenşimden salınan transforming growth faktör  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), pigmentli retinanın oluşumunu yönlendirir. Bu genlerden akışla transkripsiyon faktörleri olan MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) ve CHX10 (homeobox-containing transcription factor) eksprese edilir. MITF, pigmentli retinanın ve CHX10 ise nöral retinanın farklanmasını yönetirler. Lens ektodermi, göz

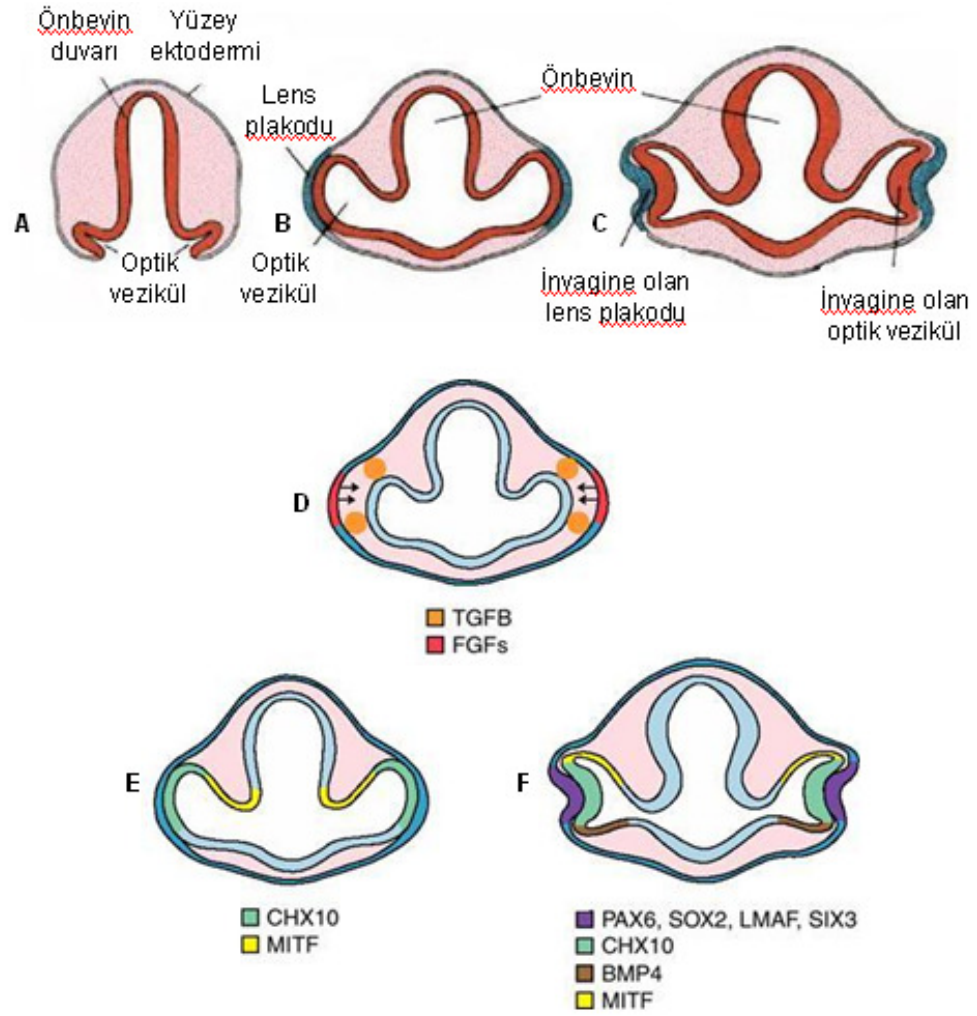


kadehinin tam oluşumu için gereklidir, lens plakodu yoksa göz kadehi invaginasyonu oluşmaz. Lensin farklanması PAX6'dan bağımsızdır, PAX6 geni, optik vezikülün indüktif aktivitesinden sorumlu değildir. Bunun yerine PAX6, yüzey ektoderminde lens gelişimini düzenlemek için bağımsız olarak hareket eder. Süreç, transkripsiyon faktör SOX2'i upregüle eden nöral plakta PAX6 ekspresyonu ile başlar ve gelecekteki lens ektodermine PAX6 ekspresyonu ile de devam eder. Sırası ile optik vezikül, SOX2 ile diğer bir transkripsiyon faktörü LMAF'in (bZIP-basic leucine zipper- ailesinin Maf proteinleri) ekspresyonunu artıran ve sürdüren BMP-4'ü salgılar. SOX2 ve PAX6'nın ekspresyonunu sürdürmek için lens ektodermine BMP-7 ekspresyonu artarken, homeobox genler olan SIX3 (Homeobox protein SIX3, Sine oculis homeobox homolog 3) ve PROX1'un (Prospero ile ilgili homeobox gene) ekspresyonu, PAX6 tarafından upregüle edilir. Sonuçta, PAX6, SOX2 ve LMAF'in kombine ekspresyonu, lens kristalin proteinlerinin oluşumundan sorumlu genlerin ekspresyonunu başlatırken, PROX1 ekspresyonu hücre çoğalmasını kontrol eden genleri düzenler (Şekil 1, 2) (16).

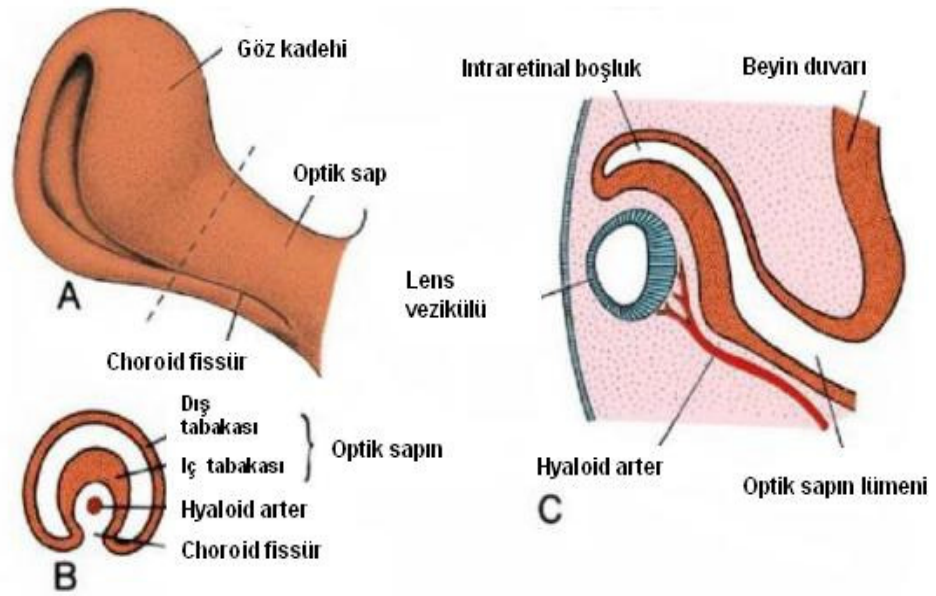
**Şekil 1.** Gözün gelişimi. **A** ve **B**. Gebeliğin 3.haftasında göz gelişimin ilk evreleri. Transkripsiyon faktör PAX6, göz gelişimi için yönetici gendir ve önce ön nöral kenarın merkezindeki bir bantta eksprese edilir (**A**). Prekordal plaktan salınan sonichedgehog (SHH), PAX6'nın orta hatta ekspresyonunu inhibe ederken aynı bölgede PAX2'nin ekspresyonunu upregüle eder (**B**). PAX2 daha sonra optik sap farklanmasını düzenlerken, PAX6 ise gözlerin farklanmasını düzenlemeye devam eder (16).



**Şekil 2.** Göz gelişiminin moleküler düzenlenimi. **A.** 22 günlük embriyoda optik çukurlar. **B.** 4 haftalık embriyoda ön beyin seviyesinde yüzey ektodermi ile temasta olan optik veziküller. **C.** 5 mm'lik embriyoda optik veziküller ve lens plakodunun invaginasyonu. **D.** PAX6, nöral plak evresinde tek göz alanında eksprese edilir. Optik vezikülün üzerinde bulunan lensin gelişeceği bölgedeki yüzey ektoderminden (YE) salınan fibroblast growth faktörleri (FGF) nöral retina tabakalarının farklanmasını başlatırken çevre mezenşimden salınan transforming growth faktör  $\beta$  (TGF $\beta$ ) ailesi ise pigmentli retina tabakasının farklanmasını başlatır. Dış sinyaller göz kadehinin dış ve iç tabakalarının oluşumunu sağlar ve CHX10 ve MITF gibi downstream genleri artırır. Bu genler, bu yapıların kesintisiz olarak farklanmalarını düzenler (**E, F**). Göz alanlarının tayinindeki rolleri yanısıra PAX6, lens gelişimini de düzenler. PAX6, oluşacak lensteki SOX2 ekspresyonunu artırırken, dış vezikül tabakasından salınan BMP4 ise transkripsiyon faktörü LMAF'yi artırır. Bu gen aktive olduğunda, PAX6, SIX3 ve PROX1 genlerini içeren homedomainin ekspresyonunu uyarır. PAX6, SOX2, LMAF ve PROX1'in kombine ekspresyonu kristalin oluşumunu sağlar. SIX3, kristalin genini inhibe ederek bu sürecin düzenlenmesine yardımcı olur (16).



**Şekil 3. A.** 6 haftalık embriyonun göz kadehi ve optik sapının ventrolateral görünümü. Optik sapın alt yüzündeki koroid fissür giderek uca doğru incelenerek ortadan kalkar. **B.** A'da gösterilen optik saptan geçen enine kesitte koroid fissürdeki hyaloid arter izlenmekte. **C.** Lens vezikülü, göz kadehi ve optik saptan geçen koroid fissür hattından kesit (16).



## 2. 2. GÖZ ANATOMİSİ

Orbita boşluğu tabanı dışa bakan koni şeklindedir. Her iki orbitanın medial duvarları birbirine paraleldir. Medial ve lateral duvar arasında 45 derecelik bir açı bulunmaktadır. Orbita duvarları 7 adet kemikten yapılmıştır. Bunlar etmoid, frontal, lakrimal, maksiller, palatin, sfenoid ve zigomatik kemiklerdir. Orbita yukarda frontal sinüs, altta maksiller sinüs, ortada ise etmoid ve sfenoid sinüslerle komşudur. Orbita duvarında önemli yapıların geçtiği açıklıklar vardır:

- 1. Optik foramen:** Optik sinir, oftalmik arter, sempatik sinir lifleri geçer.
- 2. Üst orbital fissur:** Trigeminal sinirin oftalmik dalı, okulomotor, troklear, abduzens sinirleri ve sempatik sinir lifleri geçer. Orbitanın venöz drenajı da superior oftalmik ven aracılığı ile bu fissürden geçip sinus kavernoza dökülür.
- 3. Alt orbital fissur:** Trigeminal sinirin maksiller dalı, infraorbital sinir, inferior oftalmik ven, infraorbital arter, yanaklar, alt kapak, üst dudak ve dişlerin duyu sinirleri geçer.

Göz küresi (*bulbus oculi*), orbita boşluğu içinde bağ dokusundan zengin bir yağ yastığı içine yerleşmiş, görme fonksiyonu ile görevli, ön-arka uzunluğu 22-27 mm olan küresel bir organdır. Ortalama 6.5 mm<sup>3</sup> hacminde ve 7.5 g ağırlığındadır. Her göz küresi için dört rektus kası ve iki oblik kas ile tüm yönlere bakış sürdürülür. Göz kapakları (*palpebra oculi*), kırpma refleksi ile koruyucu olarak görev yaparken, üst kapak temporal kısmın arkasında yerleşmiş gözyaşı bezi (*glandula lacrimalis*) de gözyaşı salgısı ile hem koruyucu, hem de saydamlığın sürdürülmesi ile ilgilidir. 12 kafa çiftinden altısı (II, III, IV, V, VI ve VII. kafa çiftleri) gözün duyu ve motor işlevlerinin devamını sağlar (22).

İnsanlarda göz, orbita içine gizlenmiş olup optik sinir aracılığı ile beyinle bağlantılıdır. Göz küresi, gözün iç takası olan retinanın



fotoreseptör işlevini kolaylaştırır ve retinayı korur. Göz küresi; tunica fibrosa, tunica vasculosa ve tunica nervosa olmak üzere 3 tabakadan oluşur (23, 24).

### 1. Tunica fibrosa (sklera ve kornea)

Göz küresinin en dışında yer alan koruyucu bir tabakadır. Kürenin arka 5/6 sını oluşturan sklera, 1/6 ön bölümünü oluşturan kornea ve bunları birleştiren halka olan limbustan meydana gelir. Sklera, optik sinirin gözden ayrıldığı yerde, sinir lifleri paketlerinin geçebildiği lamina cribrosa adı verilen ağ şeklinde bir yapılanma gösterir.

Eliptik, saat camı şeklinde saydam bir tabaka olan kornea, önden arkaya doğru gözün ilk kırıcı dokusudur. Gözde kırıcılığın en fazla olduğu dokudur. Epitel tabakasının mükemmel düzeni, damarsız olması, stromadaki kollajen liflerin ve oluşturduğu lameller sistemin düzeni ve endotelinin sıvı dinamiği üzerindeki belirgin etkisiyle intrastromal su düzeyinin sabit tutuluşu, korneanın saydamlığını sağlar. Trigeminal sinirin oftalmik dalı duyu innervasyonunu sağlar. Epitel, gözyaşı ve limbus damarlarından, endotel yüzü ise ön kamara sıvısından beslenir (22).

**2. Tunica vasculosa (uvea):** Yoğun pigmentli ve damarlı bu tabaka önden arkaya *iris*, *corpus ciliare* ve *koroid* olarak ayrılır. İris, stromasındaki pigment granül miktarı ile gözün rengini belirleyen, ortada oluşturduğu pupil açıklığı ile de göze giren ışık yoğunluğunu ayarlayan yapıdır. Pupil kenarına yakın sirküler sfinkter kas ile myozis oluşturur. Periferde radyal yerleşimli dilatatör kas, sempatik innervasyon yardımı ile pupillada midriyazis oluşturur.

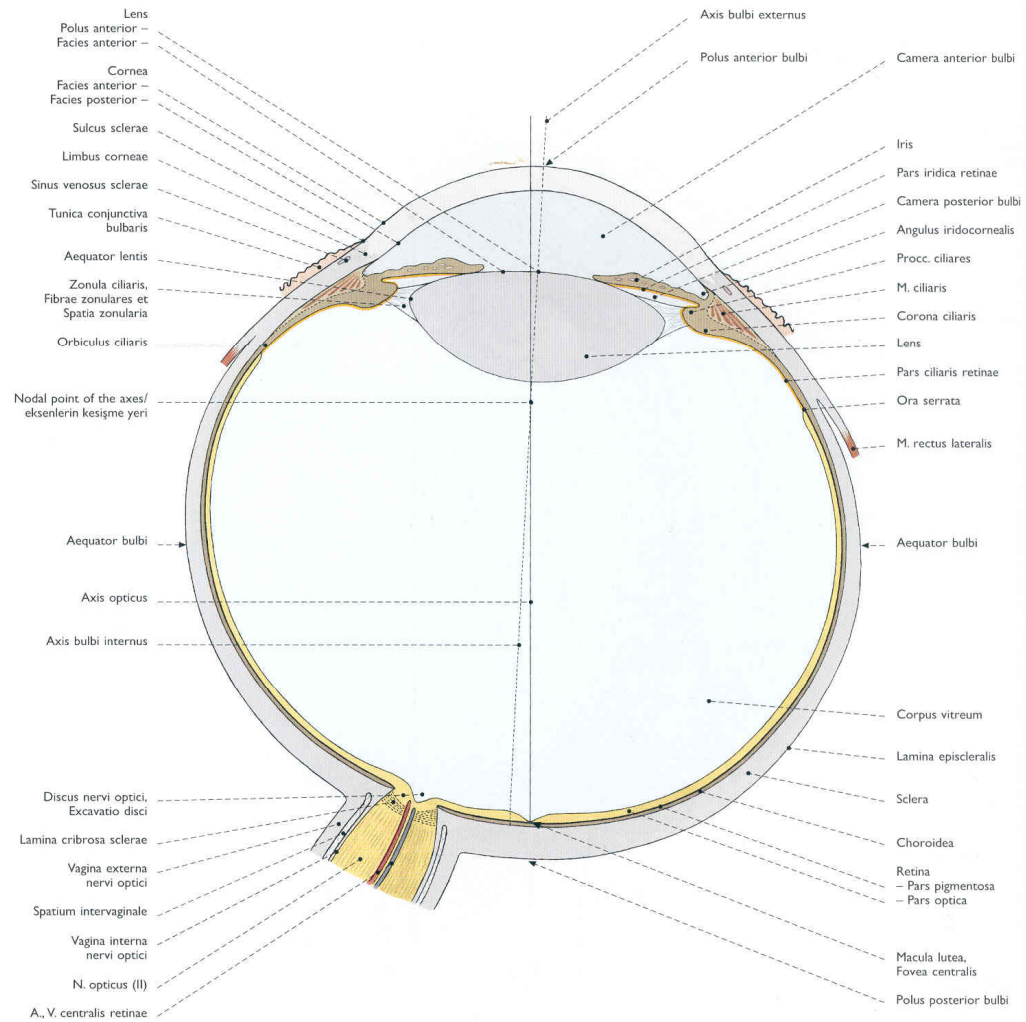
Uveanın iris ile koroid arasında kalan kısmı olan korpus siliare, bir yandan uzantılarında ön kamara sıvısının yapımını sürdürürken, öte yandan bu çıkıntıların devamı olan *Zinn lifleri* ile kristalin lensi yerinde tutar. Silyer kasın yardımıyla akomodasyonu yani yakına bakışta lensin kırıcılığını artırma olayını yönetir. Silyer cismin pigmentsiz epitelinden aktif sekresyon ve ultrafiltrasyon ile plazmadan derive edilen ön kamara sıvısı, arka kamaradaki pupil açıklığından ön kamaraya geçerek limbustaki ön

kamara açısından episkleral venlere drene olur. n kamara sıvısı bir yandan gözün tonusunu sağlarırken, diğer yandan komėu yapıların beslenmesini sağlar (22-24).

Koroid, pigmentli, vasküler bir pleksustur. Dığta sklera ile sınırlıdır. Dığtan içe doğru büyük damarlar, orta damarlar ve koriokapillaris tabakalarından oluğur. Dolağımını kısa ve uzun arka silyer arterlerden sağlar. Retina pigment epiteli ve retinanın dığ segmentlerinin beslenmesi ile retina pigment epitelinin ısı dzenleniminden sorumludur.

**3. Tunica nervosa (retina):** Dığta tek katlı retina pigment epiteli, ite nöral retina olmak üzere iki tabakalıdır (23-24).

**Şekil 4.** Gözün anatomik yapısı (25).



Göz küresinin içinde ön kamara, arka kamara ve vitröz boşluğu olmak üzere birbiriyle bağlantılı üç kamara bulunur. Hümor aköz, arka kamaradan ön kamaraya dolandır. Vitröz humoru içeren vitröz boşluğun önünde lens yer alır. Kemik orbita, göz kapakları, konjuktiva ve lakrimal sistem göz küresini korur. *Arteria carotis interna*'nın bir dalı olan oftalmik arter, gözü ve orbita içindeki yapıları besler. Süperior ve inferior orbital venler gözün asıl drenajını sağlar. Venler, intrakraniyal kavernöz sinusa boşalır (22, 24).

### 2. 3. GÖZÜN HİSTOLOJİK YAPISI

**Tunica fibrosa:** Kornea ve skleranın oluşturduğu göz küresinin dış tabakasıdır. Kornea beş histolojik tabakadan oluşur:

**1. Kornea Epiteli:** Çok katlı yassı non-keratinizedir. 5-7 sıralı hücre içerir. Dış yüzey hücrelerinin mikrovillusları vardır. Hücreler birbirlerine desmozomlarla bağlanır. Sitoplazma desmozomlarla birleşen sitokeratinleri içerir. Kornea epiteli çok hassastır, çok sayıda serbest sinir sonlanması bulundurur. Belirgin yara iyileşme kapasitesine sahiptir. Limbusta, kornea-skleral bileşkede korneal epitel ile devam ederek konjonktiva adını alır.

**2. Bowman Tabakası:** 6-9  $\mu\text{m}$  kalınlığındadır. Yapısını tip I kollajen lifler oluşturur. Elastik liflerden yoksundur. Bu tabaka şeffaftır ve kendini yenileme yeteneği yoktur. Bowman tabakası, kornea stromasının en ön kısmıdır ve farklı organize olmuştur. Bu nedenle, membran yerine tabaka olarak adlandırılır. Bowman tabakası, travma ve bakteriyel invazyona karşı koruyucu tabakadır.

**3. Stroma (Substantia Propria):** Kornea kalınlığının %90'ını oluşturan şeffaf tabakadır. Tip I ve V kollajen lifler düzenli ince tabakalar şeklinde yerleşir. Liflerin değişik açılarda ve birbirleri ile kesişen düzlemlerde bir kafes oluşturması travma ve deformasyona karşı direnci sağlar. Lifler ve tabakalar, kondroitin ve keratan sülfat içeren, proteoglikandan zengin bir ekstraselüler matriks ile ayrılır. Kornea epitelini geçen sinirler kornea stromasında bulunur.

**4. Descement Membranı:** 5-10  $\mu\text{m}$  kalınlığı ile vücuttaki en kalın membranlardan birisidir. Kornea endoteli tarafından oluşturulur. Hezagonal düzenlenmiş lif yapısı Tip VII kollajen içerir.

**5. Kornea Endoteli:** Descement membranın arka yüzünü örter ve gözün ön kamarası ile yüzleşir. Tek tabaka yassı epitel hücreleri içerir. Hümör aközün kornea stromasına geçmesini engelleyecek geçirgen olmayan interselüler boşluklar içerir. Kornea endotelinin yapısal ve işlevsel

bütünlüğü, korneanın şeffaflığının korunmasında gereklidir.

**Tunica vasculosa (Uvea):** Gözün pigmentli, damarlı orta tabakasıdır. Koroid, silyer cisim ve iris olmak üzere üç bölgeye ayrılır.

**Koroid**, üç tabakadan oluşur. Bruch membran, koroidin kollajen ve elastik liflerden zengin bir ağ ve bazal laminayı içeren en iç bölümüdür. Bazal lamina, retinanın pigmentli epiteli ve alttaki pencere kapillerin endoteli tarafından oluşturulur. Koriyokapillar, retina ve foveanın dış tabakalarına oksijen ve besin temin eden pencere kapillerden oluşur. Koroid stroması, kollajen ve elastik lifler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, otonomik sinir sistemi nöronları ve melanositlerce çevrilmiş büyük arter ve venleri içerir.

**Silyer cisim**, ora serratanın önündedir ve koroid ile retinanın öne çıkıntılı olmasını sağlar. Uveal bölüm ve nöroepitelyal bölüm olmak üzere iki yapıdan oluşur.

Silyer cismin uveal bölümü, suprasilyar olarak bilinen koroidin dış tabakasının devamıdır. Silyer kas, halka şeklinde bir düz kastır. Kasıldığında silyer bölgecik olarak bilinen lensin sirküler süspansör ligamentinin boyunu kısaltır. Pencere kapillerler silyer kasın kanlanmasını sağlar. Silyer cismin nöroepitelyal bölümü silyer epitelin iki tabakasını oluşturur. Silyer uzantılar, silyer cismin 1/3 ön bölümündeki 70 kadar ışınsal uzantıdır. Silyer uzantılar, silyer cismi örten iki tabakalı bir epitel ile örtülüdür.

- Retinanın pigmentli epiteli ile devam eden dış pigmentli epitel tabakası. Bruch membranı ile devam eden bir bazal lamina tarafından desteklenir.
- Sensoriyal (duyusal) retina ile devam eden iç pigmentsiz epitel tabakası.

Pigmentli ve pigmentsiz hücrelerin apikal yüzleri birbirine bakar. İki epitel de arka kenarlarında düzdür ve ön kenarda silyer uzantıları oluşturmak için katlanmıştır. Pencere kapillerler tarafından beslenen silyer uzantıların epitel hücreleri, hümör aköz salgılar (22-24).

**İRİS:** Silyer cismin devamıdır ve lensin önünde yer alır. İris, gözün ön ve arka kamaraları arasında hümör aközün akması için bir kapı oluşturur ve göze giren ışığın miktarını kontrol eder. İrisin iki elamanı vardır:

- Ön uveal ya da stromal yüz
- Arka nöroepitelyal yüzey.

Ön (dış) uveal yüz, mezenşim orjinlidir ve düzensiz bir yüzeyi vardır. Fibroblastlar ve ekstraselüler matriks içine gömülmüş pigmentli melanositler tarafından oluşturulur. Pigmentli melanositlerin sayısı irisin rengini belirler. Albinolarda iris, kan damarları nedeni ile pembe renkte görünür. İrisin kan damarları radyal dağılır ve pupil çapındaki değişikliklere paralel olarak kan damarlarının boyunda da değişiklikler olur. Arka (iç) nöroepitelyal yüzey iki tabaka pigmentli epitel içerir. Dış tabaka, silier epitelin pigmentli tabakasının devamı şeklindedir; dilatatör pupilla kasını oluşturan miyoepitelyal hücreler içerir. Pupilin etrafında iris stromasından sfinkter pupilla düz kası yer alır (22).

**Ön Kamara:** Ön kenarda kornea endoteli ve irisin ön yüzü, arkada lensin pupillar bölümü ve silyer cismin tabanı arasındaki boşluktur. Limbusta endotelle döşeli düzensiz boşluklar olan trabeküler bir ağ yapısı bulunur. Bu kanalcıklar birleşerek Schlemm kanalına açılırlar. Schlemm kanalı, ön kamara sıvısını (aköz humor) skleradaki venöz sisteme iletir.

**Arka Kamara:** Önde irisin arka yüzü, arkada lens ve zonuler lifler (lensin asıcı ligamanları) ile sınırlanmıştır. Hümör aköz, silyer uzantılar tarafından bu bölgede sentezlenir ve salınır.

**Vitröz Boşluk:** Lensten retinaya uzanır ve şeffaf jel madde ile doldurulmuştur (vitröz hümör). Vitröz hümörün %99'u sudur. Hiyaluronik asit ve kollajen lifler de vardır ve bunlar hiyalositlerden üretilir.

**LENS:** Şeffaf, bikonveks, elastik ve damarlı bir yapıdır. Zonuler lifler, silier epitelden uzanır ve kapsülün ekvatoryel kısmına yapışır ve lensi yerinde tutar. Lens, üç yapıdan oluşur:



**Lens Kapsülü:** Kalın ve lense saran şeffaf, bazal membrana benzer bir yapıdır. Kapsülün ön kısmının önünde, arkadan ekvator bölgeye doğru uzanan tek tabaka küboid epitel hücreleri yer alır. Kapsülün arka yüzünün altında epitel hücre tabakası yoktur. Lensin kortikal bölgesinde **kortikal lens lifleri** adı verilen, uzamış ve konsantrik yerleşimli, ekvator bölgesindeki ön epitelden çıkan hücreler bulunur. Kortikal lens lifleri, çekirdek ve organel içerir. Çekirdek ve organeller, kortikal lens lifleri lensin merkezine doğru uzandığında kaybolurlar (nükleer lens lifi bölgesi).

Lens hücreleri, tek sitoskeletal protein görünümünde farklılıklar içerir:

- **Filensin**, kristalinin yapışmasını sağlayan intermediyet (ara) filamenttir;
- **Kristalinler** olarak isimlendirilen lense özgün proteinler ( $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ ).

Filensin ve kristalinler, lens lif hücrelerinin şeffaflığını ve yapılarını korumayı sağlar.

Lens hücre lifleri orta dikiş bölgesinde birbiri içine girer. Bu bölgelerde oluklu bağlantılar ve bazı noktasal desmozomlar karşıdaki sitoplazmik çıkıntılarla bağlanır. İç kortikal bölgede ve lensin merkezinde çekirdeksiz yaşlı lens lifleri bulunur. Bu bölgedeki glukozun yaklaşık %80'i lens tarafından metabolize edilir. Lens, silyer gövdeyi lensin ekvatoruna bağlayan demetlerden oluşmuş asıcı ligamanlarla (zonuler liflerce) desteklenir. Silyer gövde ve zonuler lifler akomodasyonda rol oynar (22-24).

### **Tunica nervosa (Retina)**

Göz küresinin en içteki üçüncü tabakası olan retina şeffaf bir membrandır. Retina, pigment epiteli ve nöral (sensoryel) retina tabakalarından oluşur. Optik sinirden ora serrataya kadar uzanır. Optik sinir giriş yerinde 0.55 mm kalınlığındadır, ora serratada 0.1 mm kalınlıkta sonlanır. İçte vitröz cisim, dışta koroid ile komşudur. Pigment epiteli, koroide sıkıca yapışmıştır. Pigment epiteli ile sensoryel retina arasında anatomik bağ yoktur, birbirlerine sadece yaslanırlar. Retina dekolmanında bu iki tabaka birbirinden ayrılır. Retina, oftalmoskopik olarak: arka kutup (makula), ekvator (periferik retina) ve ora serrata olarak

3 bölgeye ayrılır (22-24).

Optik disk merkezinden 4 mm temporalde ve 0.8 mm inferiorda bulunan, 5–6 mm çapında, üst ve alt retinal temporal arter ve venlerle çevrelenmiş alana arka kutup veya makula adı verilir. Retinal kesitlerde foveal bölge, hem ganglion hücre tabakasının hem de iç nükleer tabakanın bulunmadığı bir çöküntü alanı olarak ayrılır (21, 26, 27). Makula, merkezden periferde doğru foveola, fovea, parafovea ve perifovea bölgelerine ayrılır.

**Foveola:** Foveanın merkezindeki 0.35 mm'lik alanıdır. Foveanın en ince yeridir.

**Fovea:** 1.5 mm çapında, papillanın 4 mm temporalinde ve 0.5 mm aşağısındadır. Bipolar hücreler ve gangliyon hücrelerinin yanlara itilmiş olmasından dolayı, retina foveada incelmıştır ve iç yüzü iç büküktür. Foveanın 0.4–0.5 mm'lik merkez alanı kapillerler içermeyen damarsız bölgedir ve beslenmesi koroiddedir.

**Parafovea:** Foveanın 0.5 mm dış alanıdır. Burada bipolar ve gangliyon hücreleriyle sinir lifleri katı vardır. Koni ve basil hücrelerinin sayısı yarı yarıyadır.

**Perifovea:** Makulanın en dıştaki 1.5 mm alanıdır. Bu bölgede retinanın diğer katlarında olduğu gibi, gangliyon hücreleri tek katlıdır.

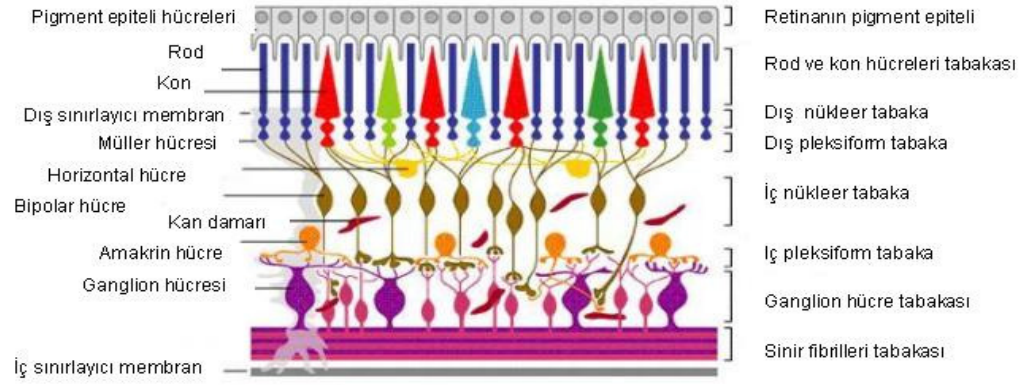
Arka kutup ile ora serrata arasında kalan bölge ekvator (periferik retina) dur. Burada karanlık adaptasyonunu sağlayan basiller çoğunluktadır. Periferde doğru ora serrata ile devam eder. Ora serrata retinanın en periferindeki bölgedir. Korpus siliyarenin pars planasında sonlanır. Sensoriyel retina, korpus siliyare epitelinin iç katıyla, pigment epiteli de dış katıyla devam eder. Ora serratada fotoreseptörler bulunmaz.

## 2. 4. RETİNANIN TABAKALARI

Histolojik olarak retina; dışta tek katlı kübik hücrelerden oluşan nonsensoryal (duyusal olmayan) retina pigmentli epitel ve içte dokuz tabakadan oluşan nörosensoryal (sensoryal, duyusal, nöral) bölüm olmak üzere on farklı tabakadan oluşur. Yaşam boyunca retinohipotalamik yol olarak bilinen bir yapı aracılığıyla ön beyinle ilişkide kalır (21, 23, 28). Pigmentli epitelin tek katlı kalmasına karşılık sensoryal retinada mitozlar sonucu, fotoreseptör, bipolar ve gangliyon hücreleri ile bağlantı hücreleri olan amakrin, yatay ve destek hücreleri olan Müller hücreleri gelişir. Sensoryal retinada, birinci nöron fotoreseptörlerin (koni ve basil hücreleri) bölgesi nöroepitel, ikinci nöron bipolarlar ile üçüncü nöron gangliyon hücreleri bölgesi nöroserebral olarak adlandırılır. Koroidden vitreusa kadar retinayı oluşturan tabakalar:

- Pigmentli epitel katı
- Fotoreseptörler katı (koni ve basil hücrelerinin dış segmentleri tarafından oluşturulmuştur)
- Dış sınırlayıcı membran
- Dış nükleer kat (koni, basil hücrelerin çekirdeklerinin bulunduğu bölgedir)
- Dış pleksiform kat (fotoreseptörler ile bipolar hücreleri sinapslarının bulunduğu bölge)
- İç nükleer kat (bipolar, amakrin, yatay ve Müller hücrelerin çekirdeklerinin bulunduğu bölge)
- İç pleksiform kat (bipolar ve gangliyon hücreleri arasındaki sinapsların bulunduğu yer)
- Gangliyon hücreleri katı
- Sinir lifleri katı (gangliyon hücreleri aksonları)
- İç sınırlayıcı membran

**Şekil 5.** Retinanın tabakaları ve retinanın hücreleri (29).



### 2. 4. 1. RETİNANIN PİGMENTLİ EPİTEL TABAKASI

Tek sıralı, 4-6 milyon kübik hücrelerden oluşur ve foveada, periferdekilere göre daha yüksek, dar ve pigmentlidir. Optik disk (papilla) kenarından ora serrataya uzanır. Ora serratada silier cismin pars planasının pigmentli epitel tabakası olarak devam eder ve arkasındaki koroidin Bruch zarına, bazal membranı ile sıkıca yapışır.

Apikal yüzdeki mikrovilli, fotoreseptörlerin (koni, basil) dış segmentlerini çevreler. Burada sensoriyal retina ile pigmentli epitel amorf ekstrasellüler materyal olan interfotoreseptör matriks ile birbirine tutunmuştur, anatomik bir bağlantı yoktur. Kübik nonsensoryal pigmentli epitelin apikal yüzü sıkı bağlantılarla birleşir ve eksternal retinal bariyeri (kan-retina bariyeri) oluşturur. Melanin granülleri apikal sitoplazmada ve apikal hücre uzantılarında görülür. Pigmentli epitel hücresi içindeki melanin, organizmada ilk ortaya çıkan pigmenttir (1.ay). Melanin granülleri fotoreseptörlere ulaşan fazla ışığı absorbe eder. Retina pigmentli epitelinin beş ana görevi vardır:

- Besinlerin koroid kan damarlarından sensoriyel retinanın dış tabakalarına taşınması.
- Sensoriyal retinadan metabolik ürünleri uzaklaştırmak.
- Koni ve çubuk hücrelerin dış segmentlerinden dökülen fotoreseptör disklerin aktif fagositozu ve siklusa yeniden katılması.
- Retina pigmentli epitelin sıkıca yapıştığı Bruch membranının bazal lamina içeriğinin sentezi.
- Rodopsin fotopigmentinin oluşumu için gereklidir. İnterfotoreseptör matriksin ana proteini olan interstisyel retinoid bağlayan protein (IRBP) tarafından fotoreseptöre geri çevrilen soluklaşmış (beyazlaşmış) fotopigmenti, tüm trans retinolü retinole dönüştürerek rejenere eder (21, 23).

## 2. 4. 2. NÖRAL RETİNA

Duysal retina, dokuz tabakadan oluşan ince, şeffaf ve hücreli bir yapıdır. Nöronal, glial ve vasküler olmak üzere üç tip doku içerir. Burada ışık sinyalleri sinir uyarılarına dönüştürülür ve horizontal, bipolar, amakrin ve gangliyon hücreleri arasındaki devrelerle entegre edilip, sinir lifleri tabakası ve optik sinir yoluyla beyne iletilir. İç pleksiform tabakadan içeride kalan retina, santral retinal arter dallarından, dışarıda kalan retina bölümleri ise koroidin koriokapillarisinden beslenir (21, 23). Dıştan içe doğru duysal retina tabakaları:

- **Fotoreseptör Tabaka:** Dış sınırlayıcı membranın dışında yer alan fotoreseptör tabakası birinci nöron olan 130 milyon basil (rod) ve 7 milyon koni hücrelerinin iç ve dış segmentlerinden oluşur. Fotoreseptörler son derece özelleşmiş hücreler olup, ışığı görme pigmenti içeren bir molekül içine absorbe ederler. Işık enerjisi bu molekülleri değiştirerek sinir uyarısını üretir. Foveolada sadece koniler vardır. Basil hücreleri foveoladan 0.5 mm uzaklıkta ortaya çıkarlar. 5-6 mm uzaklık, en yoğun oldukları bölgedir. Konilerin sayısında merkezden periferde doğru hızlı bir düşüş gözlenir. Basillerin dış segmentleri konilerinkinden daha uzundur.
- **Dış Sınırlayıcı Membran:** Gerçek anlamda bir membran olmayıp, komşu fotoreseptörlerin hücre zarları ile Müller hücrelerini birleştiren bir seri bağlantı komplekslerinin (zonula adherens) oluşturduğu bir membran görünümüdür. Fotoreseptör tabakasını dış nükleer tabakadan ayırır.
- **Dış Nükleer Tabaka:** Çekirdek ve sitoplazmalarıyla beraber fotoreseptör hücre gövdelerinin oluşturduğu bir bölgedir. Fotoreseptör hücre aksonları dış pleksiform tabakadaki horizontal ve bipolar hücreler ile sinaps yapar.
- **Dış Pleksiform Tabaka:** Birinci nöron fotoreseptörler (rod ve koniler) ile bipolar hücrelerin arasındaki sinapsların yer aldığı bölgedir. Retinada normal kalınlığı 2 µm olmasına rağmen, fovea çukurluğunun kenarlarında 50 µm'yi bulur. Kendi içinde dış, orta ve iç bölgelere ayrılır. Dış bölge fotoreseptörlerin aksonal uzantılarını (Henle lifleri tabakası) ve Müller hücrelerinin sitoplazmalarını; orta bölge fotoreseptörle aksonlarının

uçlarını; iç bölge bipolar, horizontal ve Müller hücrelerinin uzantılarını içerir. Foveada konilerin önünü serbest bırakmak için kenarlara çekilerek Henle katını oluşturur.

- **İç Nükleer Tabaka:** Kabaca dört tabaka hücre gövdesinden oluşur. İçten dışa doğru: Amakrin, Müller, bipolar ve horizontal hücrelerin nükleuslarıdır. Bipolar hücreler sinir iletisini fotoreseptörlerden alıp gangliyon hücrelerine taşırlar. Bu hücreler iki çeşittir. Basiller ile bağlantılı bipolar hücreleri, 1-4 basil ile sinaps yaparlar. Konilerin bipolar hücreleri kısadır. Dendritleri bir koni ile aksonları da bir gangliyon hücresi ile sinaps yapar. Horizontal ve amakrin hücrelerin yatay uzantıları vardır ve devre tamamlama işlevi gördükleri sanılmaktadır. Glial Müller hücreleri, retinanın iskeletini oluşturur. Dış sınırlayıcı membrandan iç sınırlayıcı membrana kadar uzanan büyük hücrelerdir. Esas olarak destek ve besleyici rol oynarlar ancak henüz bilinmeyen bir yol ile sinir iletilerinin taşınması ve modifikasyonunda da rol oynayabilirler.

- **İç Pleksiform Tabaka:** Foveolada bulunmayan iç pleksiform tabaka, ikinci nöron bipolarlar ile üçüncü nöron gangliyonlar ve amakrin hücreleri arasındaki sinapsların bulunduğu bölgedir. Bipolar, amakrin, gangliyon ve Müller hücrelerinin uzantılarını içerir. Nadiren gangliyon veya amakrin hücre gövdesi iç pleksiform tabakaya deplase olmuş olabilir.

- **Ganglion Hücre Tabakası:** Üçüncü nöron olan gangliyon hücrelerinin gövdelerini içerir. Sentral retina veya foveadaki gangliyon hücre gövdeleri yedinin üzerinde tabaka oluşturabilirken, periferal retina içinde tek hücre tabakasına kadar azalabilir (30-34). Foveolada bu tabaka bulunmaz. Koni ve basil hücrelerinde üretilen sinyaller, bipolar hücreler ile gangliyon hücrelerine iletilir. Bu hücrelerin aksonları da sinir lifleri tabakasını, optik siniri ve optik traktusu oluşturur ve sonunda lateral genikulat cisimde sinaps yaparlar (22). İnsan ve primat retinalarında cüce, güneş şemsiyesi, çalı, kısa yaygın, çelenk ve dev olmak üzere altı tip retinal glial hücre saptanmıştır (35). Merkezdekiler küçüktür ve dendritleri konilerle sinaps yapan bir bipolar hücreyle sinaps yaparlar. Periferdekiler daha büyüktürler ve birkaç bipolar hücreyle sinaps yaparlar (Şekil 4).



- **Sinir Lifleri Tabakası:** *Korpus genikulatum laterale*de sonlanan 1.2 milyon dolayındaki gangliyon hücresi aksonları, sinir lifleri katını oluşturur. Burada ayrıca retina arter ve venleri, astrositler, mikrogliyal hücreler ile oligodendrositler de vardır. Gangliyon hücrelerinin aksonlarından makuladan çıkanlar, mekik şeklinde bir alan oluşturarak (makülopapiller demet) optik sinire doğru düz bir seyir izlerler, temporal retinadan gelenler bu makülopapiller demet etrafından arkuat bir yol izleyerek papillaya ulaşırlar ve nazal retinadan gelenler de yelpaze gibi toplanarak papillaya ulaşırlar (Şekil 4).

Embriyogenez sırasında optik sinirin miyelinizasyonu *lamina kribrozada* durduğundan gangliyon hücrelerinin aksonları retinada miyelinsiz iken papilladan itibaren miyelinlidir. Optik disk kenarında veya retinanın herhangi bir yerinde yama tarzında miyelinli lifler görülebilir. Büyük  $\alpha$  tipi gangliyon hücrelerinin aksonları olan Y lifleri geniş çaplıdır. İletim hızları yüksektir.  $\alpha$ -hücreleri retinada az bulunan (%10) hücrelerdir. Y lifleri ve bunların  $\alpha$ -gangliyonları glokomada erken dönemde etkilenirler. Orta çaplı X lifleri, orta büyüklükteki beta ( $\beta$ ) hücrelerine aittir, iletim hızları daha düşüktür. B-hücreleri ve X lifleri retinada % 40 oranında bulunurlar. W lifleri oldukça fazladır (% 50), daha incedirler, en küçük gangliyon hücreleri olan gama ( $\gamma$ ) hücrelerine aittir.

- **İç Sınırlayıcı Membran:** Retinanın en iç katıdır ve retinayı vitrözden ayıran orta kalınlıkta PAS (+) filamentöz bir membrandır. Vitröz ile temasta olan iç yüzünün düzgün olmasına karşılık, dış yüzü Müller hücrelerinin uçlarından dolayı irregülerdir. Çoğu kısmı Müller hücrelerinden kaynaklanır (21, 23).

### 2. 4. 3. NÖRAL RETİNA HÜCRELERİ

Nöral retinada;

- Fotoreseptör nöronlar, koni ve çubuk (rod, basil) hücreleri
- İletici nöronlar; bipolar ve ganglion hücreleri
- İlişkili nöronlar; horizontal ve amakrin hücreler
- Destekleyici nörogliyal hücreler, Müller hücreleri olmak üzere dört hücre grubu bulunur (Şekil 4).

#### **Fotoreseptör nöronlar, koni ve çubuk (rod, basil) hücreleri:**

Çubuk ve koniler, nöral retinada özel bölgede bulunur. Koniler; uzaysal çözümüleme, renkli görme ve ince detay çözümülemesi için gerekli iken, rodler hareket, kontrast ve parlaklığa duyarlılıktan sorumludur (21, 23, 36). Koniler merkez foveada baskındır, renkli ve ayrıntılı görmeyi sağlar. Çubuklar periferde yoğunlaşmıştır, periferik ve gece görme fonksiyonunu sağlar. Koni ve çubuklar, özel yapısal ve işlevsel kutuplaşmaya sahip uzun hücrelerdir. Dış ve iç segment olmak üzere iki ana segment içerirler.

Fotoreseptör dış segmentleri, ışığı nöral sinyallere çevirmek için gerekli protein ve pigmentlerle yüklü membranöz disk yığınlarını içerir (37). Diskler, iç ve dış segmentlerin birleştiği bölge silyumdan uzaklaşırken hücre zarlarının tomurcuklanarak oluşturduğu kıvrımlardır. Disk elemanları iç segmentte sentezlenir ve silyum içeren dar sitoplazmik köprülerden geçerek dış segmente doğru göç eder. Diskin üretimi ve yeniden oluşumu devamlıdır. Silyumun yakınına yeni diskler eklenir. Eski diskler retinanın pigmentli epiteline doğru hareket eder ve dış segmentin kenarına ulaştıklarında pigmentli epitelin hücreleri tarafından fagosite edilir. Diskin yenilenme süresi yaklaşık on gündür.

İç segment, ATP sentezini karşılayacak bol miktarda mitokondriyonlar, Golgi aygıtı, düz ve granüllü endoplazmik retikulum içerir. Siller dokuz periferik mikrotübül çifti içerir, ancak mikrotübülün ortadaki merkez çifti eksiktir. Fotoreseptörlerin son kısmı, bipolar hücreler ve horizontal hücrelerin sitoplazmik uzantıları ile sinaptik kontakt yapan aksonlara eşdeğerdir. Koni ve çubuk hücreler arasında üç belirgin

farklılık vardır:

- Çubukların dış segmenti silindirikdir, konilerin ise koniktir.
- Koniler, bipolar hücre dendritleri ve horizontal hücrelerin nöritleri ile temasta olan bir küçük düğüm ya da koni yumrusu ile sonlanır. Çubuklar daha kalın bir çubuk sapı ile sonlanırlar. Çubuk sapı aynı zamanda bipolar ve horizontal hücreler ile de sinaps yapar. Koni ve çubukların sinaptik sonlanmaları-sferül yanda pediküller (yumru veya ayakçık)- sinaptik vezikül ile çevrili sinaptik şerit içerir.
- Çubuk hücreler, rodopsin fotopigmentini içermelerine karşın, koniler iodopsin adı verilen benzer pigmenti içerir. **Rodopsin** gece görüşü sırasında iş görür. **İodopsin** ayrıntılı görme ve renk (mavi-yeşil-kırmızı) farklılığında çalışır. Rodopsin ve iodopsinin her ikisi de prostetik grup 11-cis-retinale bağlı transmembran proteinleridir. Prostetik grupta bulunmayan proteine opsin adı verilir.

Koniler, üç farklı fotopigment ışığı absorbe eder, mavi ışık (420 nm), yeşil ışık (535 nm) ve kırmızı ışığa (565 nm) duyarlıdır. 11-cis-retinalin 11-trans-retinale izomerizasyonu koni ve çubuklarda aynıdır.

**İletici nöronlar; bipolar ve ganglion hücreleri:** Bipolar hücreler öncelikle fotoreseptörlerden ganglion hücrelerine aktarılan sinyallerden sorumludur (36). Sadece tek bir aksonu gangliyon ve amakrin hücreler ile sinaps yaparken birçok bipolar hücre dendriti fotoreseptörlere uzanır (34). Periferel retinadaki bir bipolar hücre 50-100 den fazla rod (çubuk, basil) hücresinden uyarı alırken sentral retinanın foveal bölgesinde, konların bipolar ve gangliyon hücrelerine oranı 1:1:1 kadar yüksek olabilir (21). Bipolar hücreler iki ana sınıfa ayrılır:

- Çubuk bipolar hücreler, çubuk yumrularına (sferüllerine) bağlıdır.
- Koni bipolar hücreleri, koni ayakçıklarına (pediküllerine) bağlıdır.

Koni bipolar

hücreleri iki ana sınıfa ayrılır: cüce koni bipolar hücreleri ve diffüz koni bipolar hücreleri.

Diffüz koni bipolar hücrelerin dendritleri, dış pleksiform tabakada dallanır ve pek çok koni pedikülü ile temas eder. Karşı kutupta ise yaygın

bipolar hücre aksonu iç pleksiform tabakaya doğru uzanır ve gangliyon hücrelerinin dendritleri ile temas eder (Şekil 4).

Cüce koni bipolar hücreleri, tek bir koni ayakçığı ile sinaps yapar. Tek bir gangliyon hücresi ile temas eden bir tek aksonu vardır. Cüce bipolar hücreleri, optik sinir lifinin tek bir konisi ile temastadır. Bunun aksine diffüz bipolar hücreler, daha geniş uyarı getiren ve götüren yollara sahiptir. Bipolar hücrelerin çekirdekleri retinanın iç nükleer tabakasının bir bölümünü oluşturur.

Gangliyon hücreleri dendritlerini iç pleksiform tabakaya doğru uzatır; aksonlar optik sinirin bir parçasını oluşturur. Ganglion hücre dendritleri, bipolar ve amakrin hücrelerden uyarılar alır (37). Gangliyon hücreleri iki tiptir;

- pek çok bipolar hücre ile temasta olan diffüz gangliyon hücreleri,
- tek bir cüce bipolar hücre ile dendritleri aracılığıyla temasta olan, cüce gangliyon hücreleri. Cüce gangliyon hücreleri uyarıları sadece konilerden alır.

**İlişkili nöronlar; horizontal ve amakrin hücreler:** Horizontal ve amakrin hücrelerin akson ve dendritleri yoktur, sadece her iki yönde temas edecek olan nöritik çıkıntıları vardır. Horizontal ve amakrin hücrelerin çekirdekleri iç nükleer tabakada bulunur (Şekil 4).

Horizontal hücreler, koni ayakçıkları üzerinde sonlanan nöritlere uzantı verirler. Tek bir dallanan nörit, hem çubuk yumruları (sferülleri) hem de koni ayakçıkları ile sinaps yapar. Bu nöritik sinapslar retinanın dış pleksiform tabakasında oluşur. Bu nörit ve aksonal dağılım, horizontal hücrelerin koni ve çubuk hücreleri ile retinaya yakın bir alanda entegre olduğunun işaretidir .

Amakrin hücreler, iç nükleer tabakanın iç kenarında bulunur. Bipolar hücrelerin aksonal terminalleri ve gangliyon hücrelerinin dendritik dalları ile bağlantı yapan tek nöritik çıkıntıları vardır.

**Destekleyici nöroglial hücreler, Müller hücreleri:** İnsan retinasında mikroglia ve makroglia (astrositler ve Müller hücreleri) olmak

üzere iki tip glia vardır: Müller hücreleri, retinanın temel glial hücresidir, astrositler sinir fibriler tabakasının fonksiyonel bileşenidir. Mikroglialar ise merkezi sinir sistemindeki enfeksiyon ya da hasarlanmaya karşı direnci sağlayan immun sistem kökenli hücrelerdir (36).

**Retinal mikroglialar**, nöronlarla ilişkili parenkimal mikroglia, kan damarlarıyla ilişkili paravasküler makrofajlar ve perivasküler boşluk içinde bulunan perivasküler makrofajlar olmak üzere üç şekilde bulunur (38, 39). Kemik iliği kökenli mikroglia, hem dentriform hücreler hem de lökosit ortak antijeni (CD45) eksprese eden makrofajlardan oluşur (38-40). Normal gelişim sürecinde ölen retinal hücrelerden DNA'yı temizler (41) ve *ex vivo* kültürlerde aktif hale getirilebilir (42) ve olgun retinadaki nörodejeneratif hastalıklar dahil (43) enfeksiyonlar veya enflamatuar nörolojik süreçlerde işlev görürler (44).

**Astrositler**, optik disk ve yanındaki kök hücrelerden köken alır (45) fakat aynı zamanda fetal retinada kendiliğinden çoğalırlar (46). Olgun retinada, astrositler çoğunlukla sinir fibrilleri tabakasında bulunurlar (47). Astrositler, özellikle gangliyon hücre aksonları olmak üzere retinadaki nöronal bileşenlerle de sıkı bir anatomik ilişkiye sahiptirler (48). Astrositler ve Müller hücreleri olgun retinada birçok bakımdan birbirlerinin işlevlerini yapabilirler (48). Astrositler ve Müller hücreleri, iç retinal yüzeyde kan damarlarını saran glia limitansın oluşumunda rol oynarlar (49). Retinal kan damarları ile astrositlerin yakın ilişkisi rodentler, kedi, primat ve insanlar dahil sadece vaskülarize retinalarda dikkati çekmektedir (26, 50, 51). Gelişen sıçan retinasında platelet-derived growth faktör (PDGF) ganglion hücrelerince eksprese edilir (52). Retinal astrositler ise uygun PDGF reseptörünü (PDGF-R) eksprese ederler. Bu büyüme faktörü, nöral retinada astrosit çoğalması veya göçünü uyarmaktan sorumlu olabilir (52). Astrositler retinal damar gelişimi sürecinde olgunlaşan nöronların neden olduğu düşünülen hipoksiye yanıt olarak VEGF salgılar (53).

**Müller hücreleri**, retinal mimariyi destekleyen iskeleti oluşturur. Radyal uzantıları hem iç hem de dış sınırlayıcı membranı oluşturmak için

retinayı bir yandan diğer yana kat eder. Müller hücreleri, en büyük retinal hücrelerdir. Müller hücrelerinin çekirdekleri iç nükleer tabakaya yerleşmiştir. Sitoplazmik çıkıntıları, dış ve iç sınırlayıcı membrana doğru uzanır. İç sınırlayıcı membran, Müller hücrelerinin bazal laminasını oluşturur ve retinayı vitröz cisimden ayırmaya yardımcı olur. Müller hücrelerinin sitoplazmik çıkıntıları; fotoreseptörler, bipolar ve gangliyon hücreleri arasındaki boşlukları doldurur. Fotoreseptör temas bölgelerinin dış segmentinde, Müller hücrelerinin uzantıları, zonula adherens, mikrovilli, nöral fotoreseptörler ve glial Müller hücreleri arasındaki ilişkiyi stabilize eder. Bu temas bölgeleri dış sınırlayıcı membranın belirgin sınırını oluşturur. Glial Müller hücrelerine ek olarak, tüm tabakalarda mikrogial hücreler de bulunur. Müller hücreleri, retinal kapiller endotelial hücrelerin geçirgenliğinde, etkili kan akımında ve nöral işlevleri desteklemekte işlev gören en önemli retinal hücredir (36). Müller hücreleri, retinal nöronları oluşturan aynı progenitör kök hücreden köken alırlar (12). Müller hücreleri, bir enerji kaynağı olarak fotoreseptörlerce kullanılan laktoz için glukoz metabolizmasında rol oynarlar, hücre dışı boşluklardaki glutamat gibi nörotransmitter son ürünlerini bulup sağlayarak retinal homeostazı devam ettirirler (54). Çoğu büyüme faktörü, sitokinler ve nörotransmitterler, Müller hücrelerince üretilir (54) ayrıca iyon kanalları ve akuaporinler yoluyla doku boşluklarından hücre dışı sıvıyı temizlerler (55) (Şekil 4).

## **2. 5. Ara Filamentler**

Ara filamentler, 10 nm çapında olan esnek ve güçlü polimerlerdir. Ara filamentler hücre hareketlerine doğrudan katılmazlar. Bunun yerine epitel hücreleri, kas hücreleri, sinir aksonları gibi mekanik olarak baskıyla karşılaşan hücrelere yapısal destek sağlarlar (23, 24, 56-59).

### **2. 5. 1. Ara Filament Proteinleri**

Arafilaman proteinleri, çeşitli hücre tiplerinde görülen yüksek stabil sitoskelet bileşenlerini oluşturan 10 nm çapında filamentleri oluşturan proteinlerin heterojenöz bir grubudur (60). Bugüne kadar elliden fazla ara

filament tipi tanımlanmıştır. Amino asit dizileri arasındaki ve protein yapılarındaki benzerliklere göre altı grupta sınıflandırılırlar (24, 58).

**Tip I ve Tip II Ara Filamentler (Asidik ve Bazik Keratinler):** Bu proteinler, tip I (asidik) ve tip II (bazik) intermediyet proteinleri oluştururlar. Tip I ve tip II ara filamentler, desmozom ve hemidesmozomların sitoplazma plaklarına tutunurlar. Çok sayıdaki izoformları iki gruba ayrılır.

- Epitelyal keratinler (20 kadar)- epitel hücrelerinde bulunur.
- Trichositik keratinler (13 kadar)-saç keratinleri - saç, tırnaklar, boynuzlar ve sürüngen derisini oluşturur.

**Tip III Ara Filamentler:**

- **Vimentin:** Fibroblastlar, düz kas hücreleri, kondroblastlar ve beyaz kan hücreleri gibi mezenşimal kökenli hücrelerde bulunan bir proteindir (56, 57, 61). Vimentinin çekirdeğe, endoplazmik retikuluma ve mitokondriye lateral ya da terminal olarak tutundukları ve sitoplazmada organellerin pozisyon alması ve sabitlenmesinde görev aldıkları bilinmektedir (62). Vimentin, Müller hücre belirteci olarak kullanılan bir intermediyet filament proteindir. Müller hücre farklanmasını kuvvetli olarak destekler.
- **Desmin:** Özgün olarak kas hücrelerinde eksprese edilir ve buradaki farklı kasılabilir elemanları Z diskine bağlar (58).
- **Gial Fibriller Asidik Protein (GFAP):** Astrosit ve bazı Schwann hücrelerinde eksprese edilen glial fibriller asidik proteindir (GFAP). Glial fibriller asidik protein, Müller hücre belirteci olarak da kullanılan bir intermediyet filament proteindir. GFAP, lens epitelinde, karaciğerde Kupffer hücrelerinde, tükrük bezleri tümörlerinin bazı hücrelerinde ve eritrositlerde de bulunur.
- **Periferin:** Periferik sinir sistemindeki nöronlarda nörofilament proteinler ile beraber sentezlenir (58, 61).

**Tip IV Ara Filamentler:**

- **$\alpha$ -Internexin:** Nöral gelişimin erken dönemlerinde, nörofilament proteinlerinin ekspresyonundan önce eksprese edilir (58, 61).

- **Nörofilamanlar:** Üç nörofilament proteinini (NF-L, NF-M ve NF-H) içerir. Bu proteinler birçok tipteki olgun sinir hücrelerinde ana ara filamentleri oluşturur (56, 58).

#### **Tip V Ara Filamentler:**

- **Laminler:** Çoğu ökaryotik hücrede bulunan nükleer laminlerdir. Nükleer laminler, hücre iskeletinin bir parçası olmalarından çok, nükleus zarının altını döşeyerek ortogonal bir tabaka oluştururlar. Nükleer laminler çekirdek kılıfına mekanik destek olup kromatine bağlanır (56, 58).

#### **Tip VI Ara Filamentler:**

- **Nestin:** Nöral gelişimin çok erken dönemleri sırasında, merkezi sinir sisteminde nöral progenitör hücrelerce eksprese edilen bir intermediyet filament proteinidir (58).

## **2. 6. Ki-67**

İnsan Ki-67 proteininin ekspresyonu tamamen hücre çoğalması ile ilgilidir (63). İnterfaz sırasında Ki-67 antijeni sadece çekirdek içinde saptanır, mitozda ise proteinin çoğu kromozomların yüzeyine yerleşir. Ki-67, hücre çoğalmasını göstermek için mitotik hücrelerde aktif olan  $G_1$ , S,  $G_2$  ve M evrelerinde eksprese edilen bir nükleer protein iken dinlenme evresindeki ( $G_0$ ) hücrelerde bulunmadığından hücre çoğalmasını göstermek için mükemmel bir belirteçtir (63).

## **2. 7. Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF)**

Fibroblast büyüme faktörleri (FGFs) omurgalılarda en az 22 polipeptit büyüme faktörünü içeren bir ailedir. Bilinen 22 tane FGF'nin moleküler kütlesi 17-34 kDa arasında değişir ve % 13-71 oranında amino asitleri benzerdir. FGF ailesinin en bilinen özelliği heparine ve heparine benzer glikozaminoglikanlara kuvvetli affinitesinin olmasıdır. FGF'ler embriyonik gelişimin önemli düzenleyicileridir aynı zamanda yara iyileşmesinde, fibroblast uyarıcı aktivitelerde, tümör büyümesinde, ekstremit ve sinir sistemi gelişiminde, anjiyogenetik ve mitojenik



aktivitelerde de rol oynarlar (64-66). FGF'ler ve reseptörleri gelişimde merkezi bir rol oynarlar .

Bir polipeptit mitojen olan bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) mezoderm ve ektodermden gelişen hücre tiplerinde büyüme ve farklılaşmayı uyarır (67). Değişik kaynaklardan saflaştırılan bFGF'nin fibroblastlar, endotel hücreleri, astrositler, oligodendrositler, nöroblastlar, keratinositler, koyun lens epitel hücreleri, osteoblastlar, düz kas hücreleri ve melanositler gibi mezodermal ve nöroektodermal kökenli hücrelerde çoğalmayı uyardığı gösterilmiştir (68, 69). Bu gözlemler, aynı zamanda bFGF'nin kontrolsüz hücre çoğalması ve anjiyogenezle sonuçlanan patolojik sonuçlara yol açtığını da göstermiştir. Bazik FGF'nin son zamanlarda Alzheimer, Parkinson, beyin iskemisi gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi üzerine etkisi yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (70-78). Bazik FGF, nöronlar, hipokampus, striatum, spinal kord, serebellum ve parasempatik gangliyonlar üzerinde tropik etkiye sahiptir. Mitoz sonrası farklılaşmış nöronların yaşamını artırır (76). Nöronları serbest radikallere, nitrik okside, hipoglisemiye, eksitatör aminoasitlere ve oksijensizliğe karşı korur (10). Merkezi sinir sistemi yaralanmaları sonrasında rejenerasyonda bFGF önemli bir rol oynar (79). Beynin geçici ve devamlı iskemisinden korunmasında bFGF önemli fonksiyon görür (10).

## **2. 8. Diyot Lazer**

Diyot lazerler oftalmolojide yoğun olarak kullanılmaktadır. Avantajları, çok yönlülükleri, taşınabilirlikleri ve ekonomik oluşlarıdır. Emisyon dalga boyları (810 nm) bazı klinik durumlarda avantaj oluşturabilir. Diyot lazer enerjisi kızılötesi dalga boyunda geliştirildiğinden lens opasiteleri, vitröz hemoraji, retinal vasküler hastalıklarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Retinal fotokoagülasyonda diyot lazerin faydaları klinik çalışmalarla gösterilmiştir (80-83).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3. 1. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada, vücut ağırlıkları 1500-2700 gram arasında değişen, erişkin *Chinchilla* cinsi renkli (pigmentli) erkek tavşanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, deney süresince standart pellet yem, yeşil sebzeler ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 01/03/2007 tarih ve B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/176 sayılı onay belgesi alınmıştır (Onay belgesi 8. bölümde verilmiştir).

#### 3. 1. 1. Kontrol ve Deney Grupları

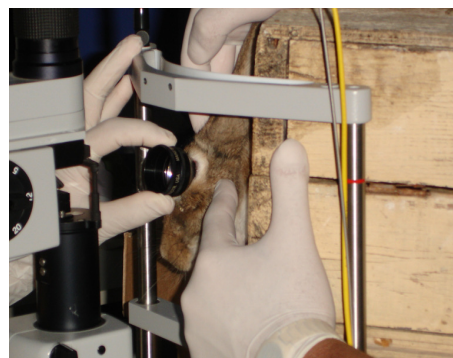
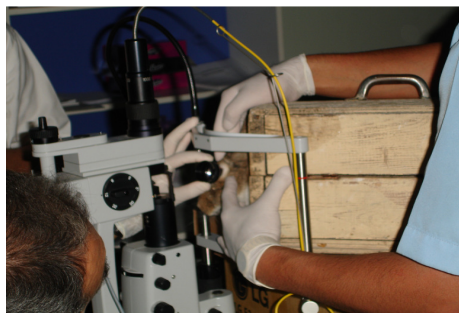
**Grup-1 (n=10):** Tavşanların sağ gözleri hiçbir işlem yapılmadan kontrol grubu olarak ayrılıp, sol gözlerine ise diyot lazer uygulanmıştır. 10 gün sonra sağ ve sol gözler ışık ve elektronmikroskopik düzeyde incelenmek üzere alınmıştır (Şekil 5).

**Grup-2 (n=10):** Tavşanların sağ gözleri hiçbir işlem yapılmadan kontrol grubu olarak ayrılmış, sol gözlerine ise diyot lazer uygulanmasının hemen ardından bFGF enjeksiyonu yapılmıştır. Uygulamadan 10 gün sonra sağ ve sol gözler ışık ve elektronmikroskopik düzeyde incelenmek üzere alınmıştır (Şekil 5).

**Grup-3 (n=10):** Tavşanların sağ gözlerine intraokuler olarak bFGF'nin hazırlanmasında kullanılan tampon sıvısı enjekte edilmiş, sol gözlerine ise diyot lazer uygulanmasının hemen ardından bFGF enjeksiyonu yapılmıştır. Uygulamadan 10 gün sonra sağ ve sol gözler ışık ve elektronmikroskopik düzeyde incelenmek üzere alınmıştır (Şekil 5).

Bazik FGF'nin uygulandığı grup-2 ve 3'te, 10 µl tamponla (Isiotech Intraocular Irrigating Solution, Ioltech® S.A, France) hazırlanmış 10 µg bFGF, limbusun 3-4 mm gerisinden transskleral olarak 27 G insülin enjektörü ile 0.05 ml vitröze enjekte edildi (Şekil 5).

**Şekil 6.** Deneyin uygulanması.



### 3. 2. Anestezi ve Analjezik Uygulanması

Deneye başlamadan önce tavşanlara 50 mg/kg ketamine hidroklorid, 15 mg / kg xylazine hidroklorid sol ön ayak adalesine intramusküler yolla uygulanarak anestezi yapıldı. İşlem boyunca tavşanlar solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu. Tavşanların ağrı duymaması için rimadyl 3 gün süreyle 4 mg / kg dozunda subkutan olarak uygulandı. Uygulamadan 10 gün sonra benzer şekilde tavşanlara anestezi uygulanmış, gözler alındıktan sonra deney hayvanları yüksek doz sodyum penta-barbital ile sakrifiye edilmiştir (Şekil 5).

### 3. 3. Lazer Uygulanması

Anestezi altındaki tavşanlara Cumhuriyet Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda diyetli lazer cihazı (Oculight Symphony Diyet Lazer-İris Medikal) ile gözlerine korneadan lazer güç girişi 50-1500 mW'ta olacak şekilde, 50-1000 µm çapta, 0.02 saniyeden başlayarak 1.0 saniyeye kadar aralıklarla atış yapılarak retinal harabiyetin oluşup oluşmadığı retinal göz muayenesi ile saptanıp görüntülendi (Topcon Slit Lamp Biomikroskop SL07).

### 3. 4. Kullanılan Cihazlar

- Ben Mari (Leica, Germany)
- Biomikroskop (Topcon Slit Lamp SL07, USA)
- Diyetli lazer cihazı (Oculight Symphony Diyet Lazer-İris Medikal)
- Doku Takip Cihazı (Leica, Germany)
- Elektron Mikroskop (Zeiss EFTEM Libra 120 Transmisyon Elektronmikroskop, Germany)
- Embedding Oven (MKN Taab, UK)
- Floresan mikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japan)
- Hassas Tartı (Denver Instrument Company, USA)
- Knife-maker (LKB Bromma 7800, Sweden)
- Multiplate (LKB Bromma 2208, Sweden)
- Manyetik karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)

- Masaüstü Makro Santrifüj (Mistral 1000 MSE, UK)
- Mikro Dalga Fırın (Arçelik MD 554 Intellwave, Türkiye)
- Mikropipetler (10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl, Gilson, USA)
- Mikrotom (Leica, Germany)
- Ph Metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Rapid Sectioning Cryostat for Routine Diagnostics (Leica, Germany)
- Rotator (Taab, UK)
- Stereomikroskop (Nikon, Japan)
- Ultratom (Reichert, Austria)
- Ultratom (LKB,, Sweden)
- Vorteks (Clifton Cyclone,UK)

### **3. 5. Kimyasal Maddeler**

- AEC kromojen (Lab Vision, UK)
- Basic fibroblast growth factor (Sigma,USA)
- Cryomatrix Shandon (Thermo Scientific, USA)
- Crystal Mount Aqueous Mounting (Sigma, USA)
- Eozin (Biooptica, Milano, Italy)
- Gel Mount Aqueous Mounting (Sigma, USA)
- Hematoksilen (Biooptica, Milano, Italy)
- Large Volüm Ultra Clean Diluent (Lab Vision, UK)
- Large Volüm Ultra V Blok (Lab Vision, UK)
- Monoklonal Anti-Vimentin Cy3 Conjugate (Sigma, USA)
- Mouse Anti-Human Nestin Monoclonal Antibody (Lifespan Biosciences, USA)
- Mouse anti-Ki-67 monoklonal antibody (Chemicon, USA)
- Osmium Tetroxide Crystal (EMS, USA)
- Paraformaldehit (Sigma, USA)
- Peroxidase Reagent (% 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi) (DBS Pleasanton, USA)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)

- Sodyum borohidrid ( $\text{NaBH}_4$ ) (Merck, Germany)
- Triton X-100 (Sigma, USA)

### 3. 6. Doku Preparasyonu

Genel anestezi altındaki tavşanlara, 38 °C'de pH:7.4 olan 0.1 M sodyum fosfat çözeltisinde hazırlanan % 2.5 gluteradehit + % 1.5 formaldehitte 25-30 dakika genel vücut perfüzyonu (kardiyak perfüzyon) uygulandı (84). Perfüzyon ile kısmi olarak tespit edilen gözler çıkarılıp korneaları uzaklaştırıldıktan sonra aynı fiksatifte 24 saat bekletildi. Işık mikroskopik incelemeler için ayrılan doku parçaları % 10'luk tamponlanmış nötral formalinde 24 saat daha tespit edilip, artan dereceli etanol ile dehidre edildikten sonra ksilolle şeffaflandırılıp parafin içinde bloklandı.

Frozen kesitler için ayrılan beş tavşan genel vücut perfüzyonu yapılmadan genel anestezi altında gözler alındıktan sonra yüksek doz sodyum penta-barbital ile sakrifiye edildi. Alınan gözler buz aküsünün üzerine alınıp korneaları uzaklaştırıldı. % 5'lik tamponlu sukroz çözeltisi ile hazırlanmış % 4'lük paraformaldehide alındı, sükroz oranı kademeli olarak % 20'ye artırılıp + 4 °C de bir gece bekletildi. Dokular sabah % 20'lik sükroz çözeltisi frozen doku matriksi (cryomatrix) ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra oda ısısında 60 dakika bekletildi. Kriyomatriks içinde otuz dakika oda ısısında inkübasyon ardından -20 °C deki frozen cihazına alınarak bloklandı. (-) 20 °C deki kriyostat içinde poly-L-lysin kaplı lama 10-15 µm kalınlıkta seri kesitler alındı. Lamaları içeren kasetler alüminyum folyolara sarılarak -80 °C'ye kaldırıldı.

Elektronmikroskopi için +4 °C'de 5-6 gün % 3'lük glutraldehitte bekletilen dokular daha sonra 2 saat süre ile %1'lik  $\text{OsO}_4$ 'le tespit edilerek rutin işlemlerden sonra Agar 100 rezinle bloklandı.

### 3. 7. Işık Mikroskopi

#### 3. 7. 1. Histokimyasal Uygulama

Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örneklerden Leica

mikrotom ile alınan 5-7 µm kalınlığındaki seri kesitlere hematoksilen-eozin boyama uygulaması yapıldı ve lezyon alanları arandı. Bu alanlar saptandıktan sonra alınan kesitlere genel morfolojiyi göstermek amacıyla hematoksilen-eozin boyama uygulaması yapıldı. Görüntüler Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskobu aracılığıyla kaydedildi.

### 3. 7. 2. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Uygulamalar

#### Primer Antikorlar:

- Goat anti-mouse **GFAP** (Abcam, USA),
- Mouse anti-**Ki-67** monoklonal antibody (Chemicon, USA),
- Mouse Anti-Human **Nestin** Monoclonal Antibody (Lifespan Biosciences, USA),
- Monoklonal Anti-**Vimentin** Cy3 Conjugate (Sigma, USA)

#### Sekonder Antikorlar:

- Goat Anti-Mouse IgG (H&L) Peroxidase Conjugated Antibody (Chemicon, USA)
- Goat polyclonal to Mouse IgG-H&L (Cy3)(Abcam, USA)

#### İmmünofloresan Uygulamalar

Parafine gömülü örneklerden alınan 5 µm'lik seri kesitler rutin takiple suya indirildi. Otofloresansı engellemek için 15 dakika Coleman'ın Schiff reaktifi uygulandı. % 2.5'lük NaBH<sub>4</sub> içinde 30 dakika bekletildi. Üç kez onar dakika distile suda yıkandı. 10 dakika peroksidaz (% 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metanol ¼) bloğu sonrası mikrodalga fırınla antijen retrieveal (EDTA- pH: 8, 600 watt 5 dakika, 360 watt 15 dakika) yapıldı. 15 dakika serum UV bloğunu takiben yıkama yapmaksızın UV blok dökülüp primer antikor (GFAP seyreltilmeden-doğrudan ve Nestin 1/100 oranında seyreltilerek) ile 90 dakika ve sekonder antikorla (Goat anti-mouse Cy3 conjugated IgG 1 / 100) 60 dakika inkübe edildi. Üç kez beşer dakika PBS'te yıkama sonrası oda ısısında kurutulup, gel mount aqueous mounting medyum ile kapatıldı. Tüm ara basamaklarda PBS'te yıkama ve inkübasyonlar oda



ısısında ve nemli kutuda yapıldı.

Vimentin primer konjuge (monoklonal anti-vimentin Cy3 conjugate 1 / 50) olduğu için 90 dakika oda ısısında nemli kutuda inkübe edilip PBS'te 3 kez beşer dakika yıkama sonrası oda ısısında kurutulup gel mount aqueous mounting medyum ile kapatıldı.

### **İmmünohistokimyasal Peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) yöntemi:**

Frozen kesitler oda ısısında kurutuldu ve % 0.1'lik triton-X100'lü fosfat tamponlu tuzda (PBST) hazırlanan % 1'lik sodyum dodesil sülfat ile 5 dakika antijen retrieval yapıldı. Kesitler, bDW'de üçer kez 10 dakika yıkandı. Peroksidaz (%3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metanol ¼) bloğu 10 dakika yapıldı. 15 dakika UV blok uygulandı. UV blok damlası döküldükten sonra yıkama yapmadan primer antikora (Ki-67, 1/10) 2 saat inkübe edildi. Sonra sekonder antikor (anti-mouse IgG, H&L peroxidase conjugated IgG 1/100) 60 dakika inkübe edildi. PBS'te yıkandı ve oda ısısında kurutulup gel mount aqueous mounting medyumla kapatıldı. Tüm ara basamaklarda 3 kez beşer dakika PBST'te yıkama ve tüm inkübasyonlar oda ısısında nemli kutuda yapıldı.

İmmunfloresan görüntüler Olympus BX51 (Tokyo, Japan) Floresan mikroskop ile uygun alanlardan kademeli olarak fotoğraflandı.

### **3. 8. Elektronmikroskopi**

Lezyon alanlarını tesbit için Agar 100 rezinle bloklanan örneklerden LKB-V ve Reichert ultratomları ile alınan yarı ince kesitlere Toluidin blue O boyaması uygulandı. Lezyon alanlarından 100 ve 200 meshlik bakır gridlere alınan ince kesitler 20 dakika % 70'lik metanolde doyurulmuş uranil asetat çözeltisi ve 1 dakika % 1'lik kurşun sitrat ile kontrast boyaması uygulanarak 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan EFTEM Libra 120 transmisyon elektron mikroskopunda incelenerek uygun alanlardan kademeli olarak görüntülendi.

## **4. BULGULAR**

### **4. 1. HİSTOKİMYASAL BULGULAR**

Deney ve kontrol gruplarına ait otuz tavşana ait bulgular ayrı ayrı değerlendirildi.

#### **4. 1. 1. Uygulama Yapılmamış Kontrol Grubu**

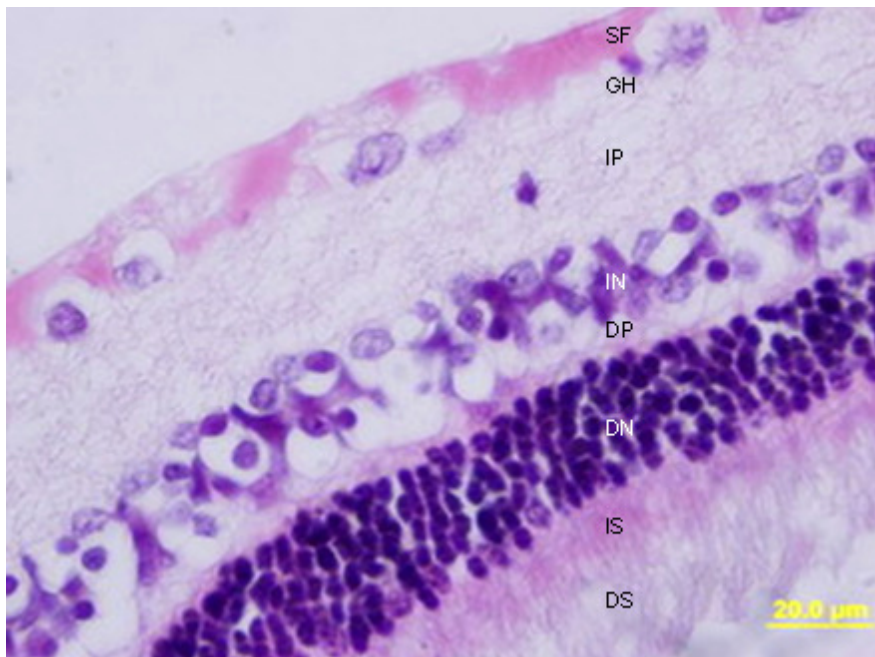
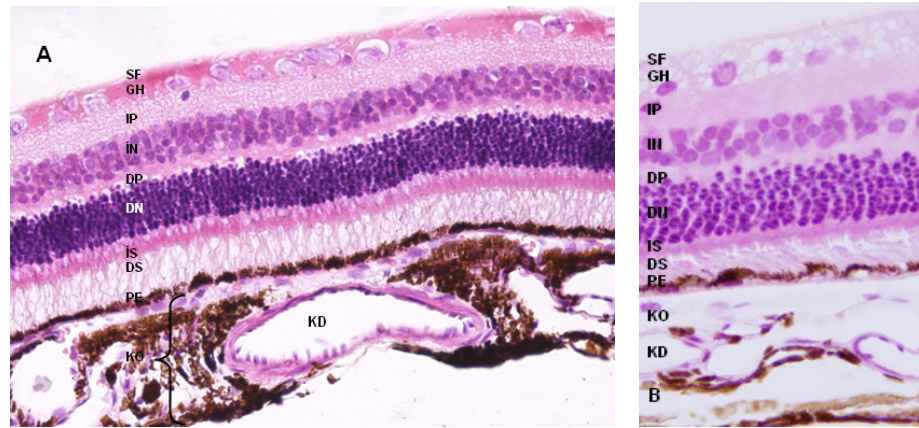
İç nöral retina (nörosensoryel retina) ve pigment epiteli olarak bilinen epitel hücrelerinden oluşan dış tabaka olmak üzere iki temel tabakadan oluşan retinanın tüm tabakaları düzenli olarak izlenmiştir (Şekil 7A ve 7B). Nöral retinanın vitrözden başlayarak sinir fibrilleri tabakası, ganglion hücre tabakası, iç pleksiform tabaka, iç nükleer tabaka, dış pleksiform tabaka, dış nükleer tabaka ve fotoreseptör tabaka olmak üzere tabakaları belirgin olarak izlenmektedir (Şekil 7 A, 7 B ve 8). Pigmentli retina epiteli altında ise bol damarlı, pigmentli, gevşek bağ dokusu yapısındaki koroid tabakası normal morfoloji ile izlenmiştir (Şekil 7 A ve 7 B).

#### **4. 1. 2. Tampon Çözeltisi Uygulanmış Olan Kontrol Grubu**

Göze herhangi bir madde enjeksiyonun retina üzerinde etki yapılıp yapılmadığını araştırmak üzere tavşanların sağ gözüne bazik fibroblast büyüme faktörünün hazırlanmasında kullanılan tampon çözeltisi enjekte edildi. Bu grupta uygulama yapılmayan kontrol grubu ile benzer bulgular elde edildi (Şekil 9 ve 10).

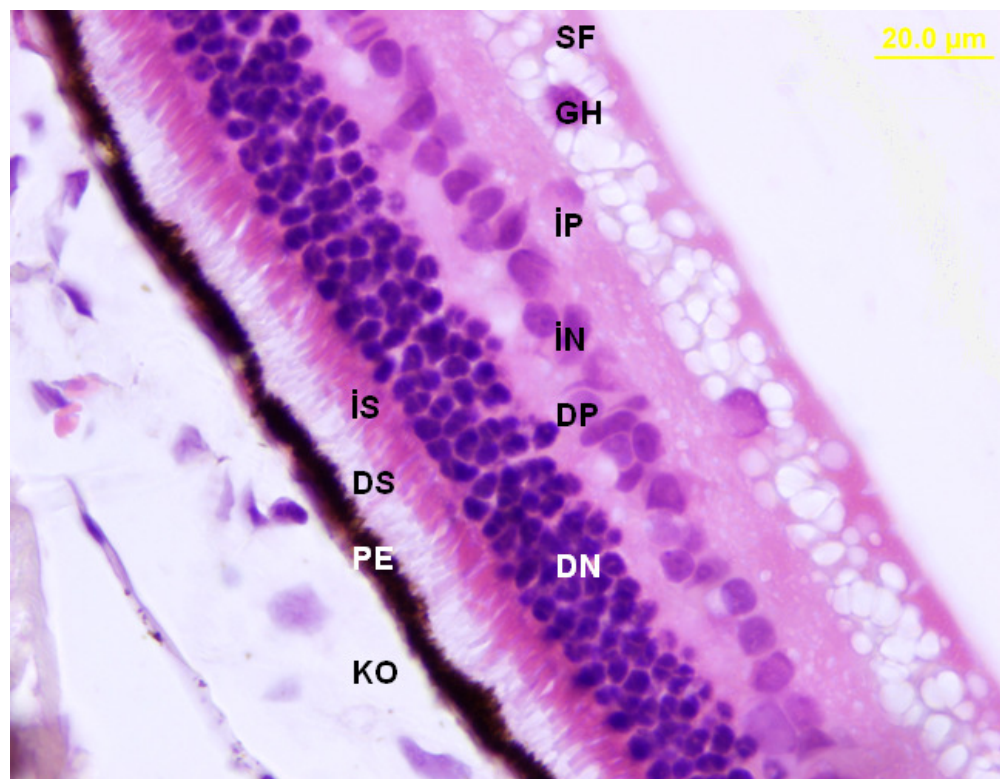
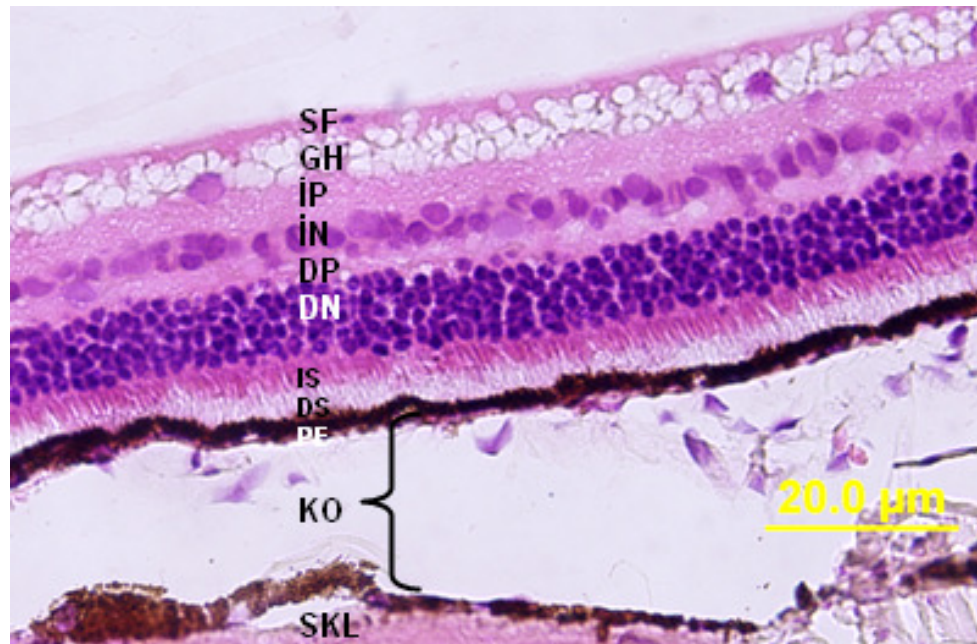
**Şekil 7.** Uygulama yapılmamış grupta retina ve koroidin genel görünümü. Koroid (KO), koroidal kan damarları (KD), pigmentli retina tabakası (PE) fotoreseptörlerin dış (DS) ve iç (İS) segmentleri, dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları (A ve B). Hematoksilen-Eozin, A:X 40, B:X 100

**Şekil 8.** Uygulama yapılmamış grupta nöral retina tabakalarının daha büyük büyütmede görünümü. Fotoreseptörlerin dış (DS) ve iç (İS) segmentleri, dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları. Hematoksilen-Eozin, X 100.



**Şekil 9.** Tampon çözeltisi uygulanmış kontrol grubunda retina tabakaları. Fotoreseptörlerin dış (DS) ve iç (İS) segmentleri, dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları. Hematoksilen-Eozin, X 40.

**Şekil 10.** Tampon çözeltisi uygulanmış kontrol grubunda retina tabakalarının daha büyük büyütmede görünümü. Fotoreseptörlerin dış (DS) ve iç (İS) segmentleri, dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları. Hematoksilen-Eozin, X 100.



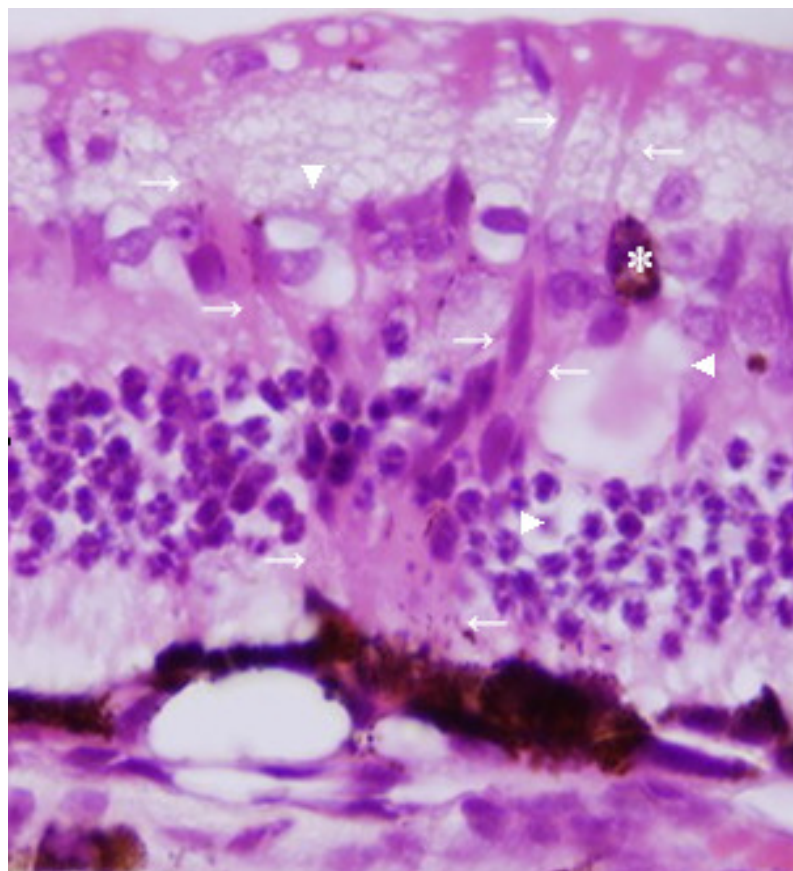
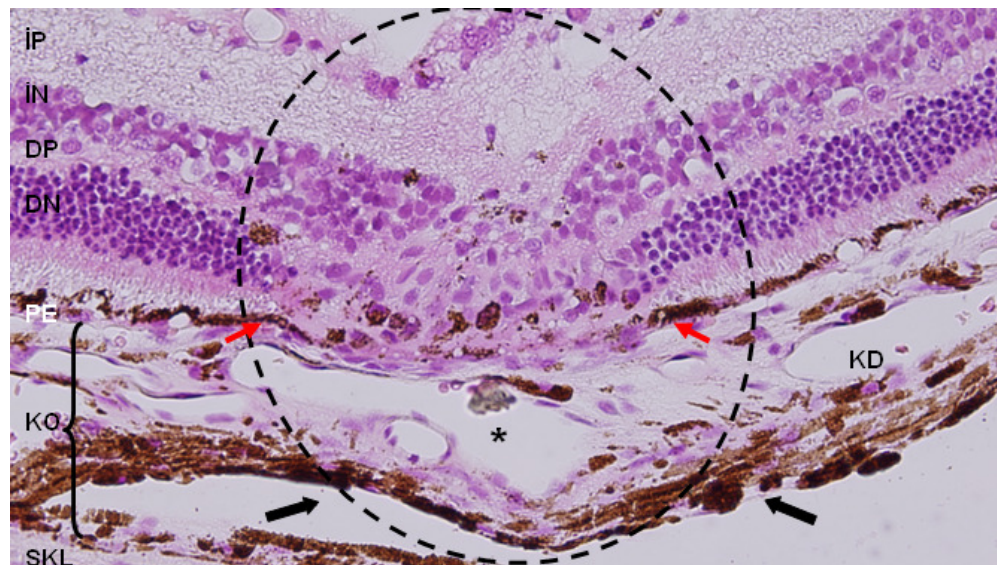
#### 4. 1. 3. Diyot Lazer İle Fotokoagülasyon Uygulanmış Grup

Bir prob yardımı ile tavşan retinalarına diyot lazer fotokoagülasyonu uygulanmasından on gün sonra alınan retina dokularında klinik olarak retina yanıkları izlenmiştir. Histopatolojik bulgularda ise iç retinal hücresel elementlerde daha belirgin olmak üzere retinanın tüm kalınlığında retinal hücre kayıpları izlenmiştir (Şekil 11). Retinal yanıkların yanı sıra ciddi koroidal hasarlar ve bazı gözlerde ise iç sklera hasarları izlenmiştir (Şekil 11). Yanık retinal alanın genellikle yüzeye skleraya doğru evagine olurken koroide doğru da invagine olduğu izlenmiştir (Şekil 11). Bu grupta en çok etkilenen tabakanın dış nükleer tabaka olduğu, tabaka hücrelerinin tamamen ortadan kalktığı, ancak hasara komşu alanlarda tabaka hücrelerinin normal yapısını koruduğu izlendi (Şekil 11 ve 12). Dış nükleer tabakada yıkım ve beraberinde yanık lezyonunun merkezi kısmında çekirdek kayıpları gözlenmiştir. İkinci derecede etkilenen diğer tabakalar ise iç nükleer tabaka ile fotoreseptörlerin iç ve dış segmentlerini bulduran tabakalardır (Şekil 11 ve 12). Bu grupta iç nükleer tabakanın koroide doğru invagine olduğu gözlenmiştir. Dış pleksiform ve iç nükleer tabaka hücrelerinin yanma ile kaybedilen hasar alanını doldurduğu izlenmiştir. İç nükleer tabakaya ait bu hücreler ökromatik belirgin çekirdekleri ile dikkati çekmiştir (Şekil 11 ve 12). Hasar alanında retina epitel tabakasının devamlılığı da ortadan kalkmıştır (Şekil 11). Bu alanındaki pigmentli retina epitel hücrelerinin normal alanlarından ayrılarak üst tabakalara doğru yer değiştirdiği ve iç nükleer tabakaya kadar ulaştığı görülmüştür (Şekil 11 ve 12). Bu grupta aynı zamanda koroidal damarların dilate olduğu da (Şekil 11) gözlenmiştir. İç nükleer tabakaya ulaşmış pigment hücreleri yanı sıra, yüzeyel sinir fibrilleri tabakası ile hasar alanı arasında uzanan iğ biçimli heterokromatik çekirdekli ve uzun sitoplazmik uzantıları eozinofilik olan dikey yerleşimli hücrelere rastlanmıştır (Şekil 12). Tüm tabakalar arasında farklı büyüklüklerde ödematöz alanlar izlenmiştir (Şekil 12).

**Şekil 11.** Diyot lazerle fotokoagülasyon uygulanmış grupta hasar alanında (kesik çizgiler) skleraya doğru evaginasyon (siyah oklar), koroid tabakasına doğru invaginasyon (kırmızı oklar) ve koroidal kan damarlarında dilatasyon (\*) dikkati çekmekte. Sklera (SKL), koroid (KO), pigment epiteli (PE), dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP) tabakaları. Hematoksilen-Eozin, X40.

**Şekil 12.** Diyot lazerle fotokoagülasyon uygulanmış grupta hasar alanının görünümü. İç nükleer tabakaya ulaşmış pigment hücresi (\*), yüzeyel sinir fibrilleri tabakası ile hasar alanı arasında uzanan iğ biçimli çekirdekli ve uzun uzantılı dikey yerleşimli hücreler (oklar), ödematöz alanlar (ok başları). Hematoksilen-Eozin, X 100.

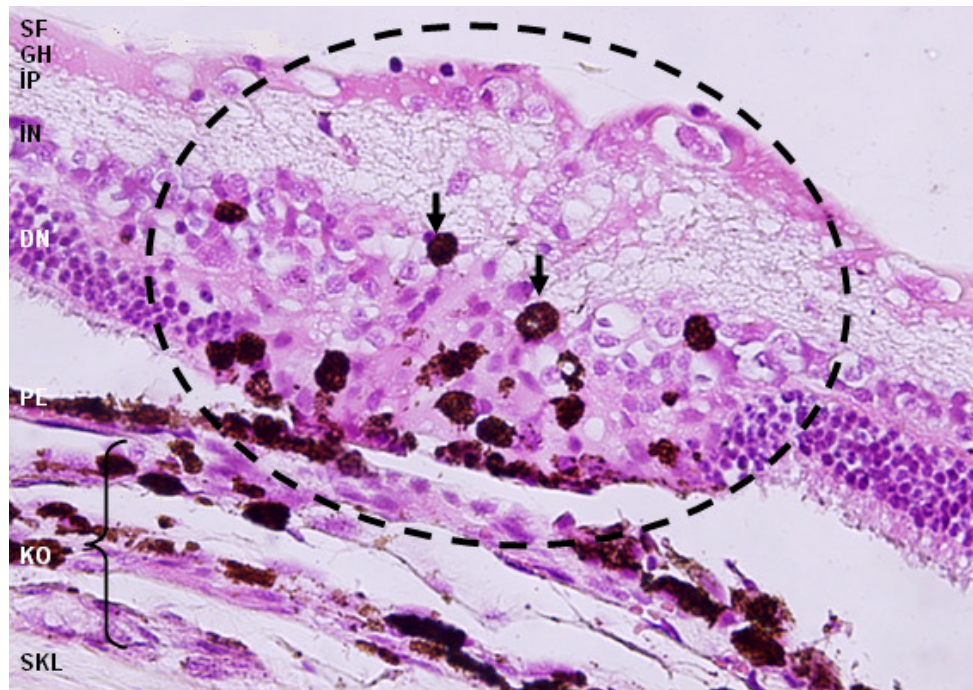




#### 4. 1. 4. Diyot Lazer İle Fotokoagülasyon Ardından bFGF Uygulanmış Grup

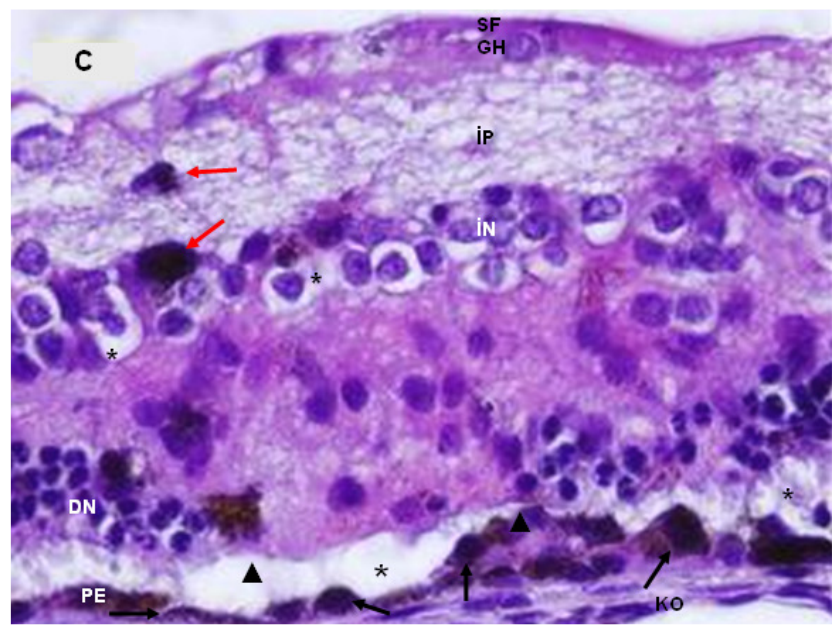
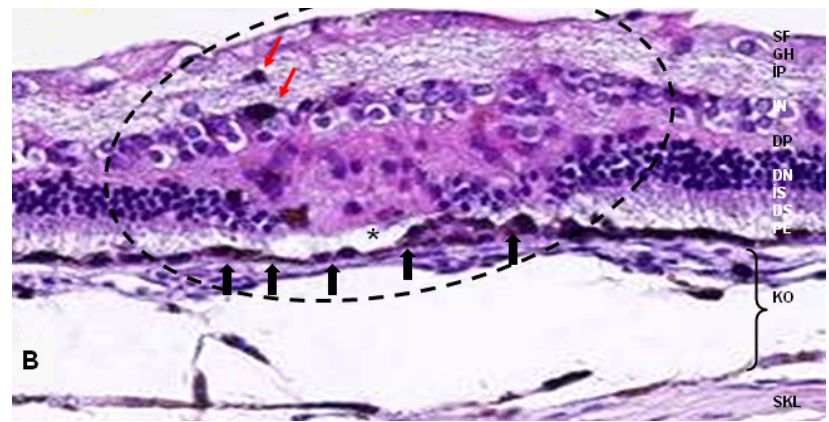
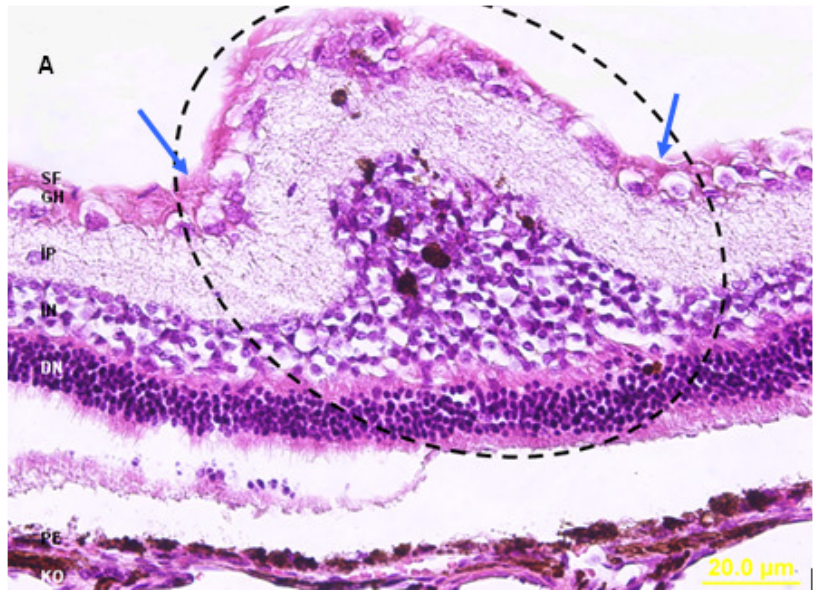
Bir prob yardımı ile tavşan retinalarına diyot lazer fotokoagülasyonu uygulanmasından hemen sonra bGF uygulamasının nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı bu deney grubunda uygulamadan 10 gün sonra alınan retina örnekleri ışık ve elektron mikroskopik düzeylerde araştırıldı. Elde edilen histolojik bulgularda dış nükleer tabakanın tamamen ortadan kalktığı, iç nükleer tabakada bulunan hücrelerin çoğalarak aşağıya koroid tabakasına doğru invagine olduğu ve retina pigment epiteli tabakası ile temas ederek yara alanını doldurduğu izlendi (Şekil 13). Yara alanının tabanını retina pigment epiteli hücreleri döşerken, epitelden ayrılan yuvarlak ve iri pigmentli hücrelerin yüzeye doğru ilerleyerek iç nükleer tabaka hücreleri arasına yerleştikleri izlendi (Şekil 13). Yara alanında retina pigment epiteli tabakası kesintisiz olarak izlenirken bu bölgedeki pigment epitelinin hemen üstünde geniş ödematöz alanlar da görülmüştür (Şekil 13 ve 14 A-C). Yanık hasar alanı küçük olduğunda, iç nükleer tabakanın düzenini kaybetmediği ancak dış pleksiform tabakanın vitröze doğru evagine olurken, koroid tabakasına doğru da invagine olarak yara alanını tamamen doldurduğu izlenmiştir. Yara alanında kalınlığı artan dış pleksiform tabaka içinde dış granüler tabakaya ait az sayıda hücreler de görülmüştür. Yara alanına komşu alanlarda ise diğer tabakaların normal morfolojilerini koruduğu saptandı (Şekil 14 A-C). Bazı retina örneklerinde ise hasar alanında tabakaların ne evaginasyon ne de invaginasyon gösterdiği tabakaların çok düzenli olarak sıralandığı, retinanın normal kalınlığında olduğu, rejenerasyonun önemli ölçüde başarılı olduğu izlendi (Şekil 15, 16, 17). Bu örneklerde en reaktif tabakanın pigmentli retina epiteli tabakası olduğu, bu tabakanın kesintisiz olarak devam ettiği de izlendi (Şekil 15, 16 A, 16 B, 17). Bu grupta nadiren iç nükleer tabakada hücre çoğalmasının önemli ölçüde arttığı ve dış nükleer tabaka ile birlikte altta retinal epitel tabakasına kadar invagine olduğu da saptandı (Şekil 17). Hasar alanına uzak noktalarda ise retinal tabakalarda histolojik yapılarında değişiklik izlenmemiştir (Şekil 18 A ve 18 B).

**Şekil 13.** Diyot lazerle fotokoagülasyon uygulanması ardından bFGF uygulanmış grupta hasar alanının görünümü (kesik çizgiler). İç nükleer tabakaya kadar çıkan pigmentli hücreler (oklar). Sklera (SKL), koroid (KO), pigment epiteli (PE), dış nükleer (DN), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları. Hematoksilen-Eozin, X 40.



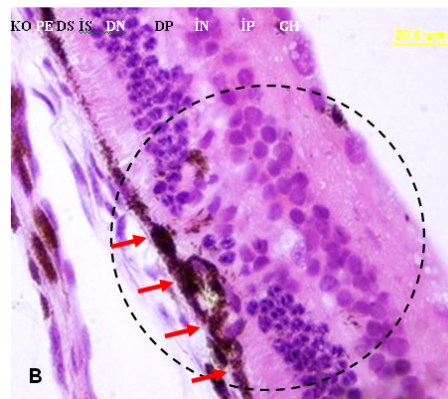
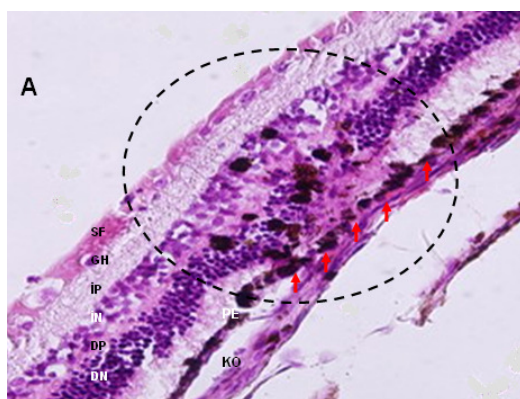
**Şekil 14.** Diyot lazerle fotokoagülasyon + bFGF uygulanmış grupta yanık hasar alanı küçük olduğunda iç nükleer tabakanın (İN) düzenini kaybetmediği ancak dış pleksiform tabakanın vitröze doğru evagine olurken (mavi oklar) koroide doğru da invagine (ok başları) olarak yara alanını tamamen doldurduğu izlenmektedir. Kesintisiz pigmentli retina epiteli tabakası (siyah oklar), ödematöz alanlar (\*), iç pleksiform tabakada pigment granüllü hücreler (kırmızı ok). Hematoksilen-Eozin, A: X40, B: X20, C: X100.





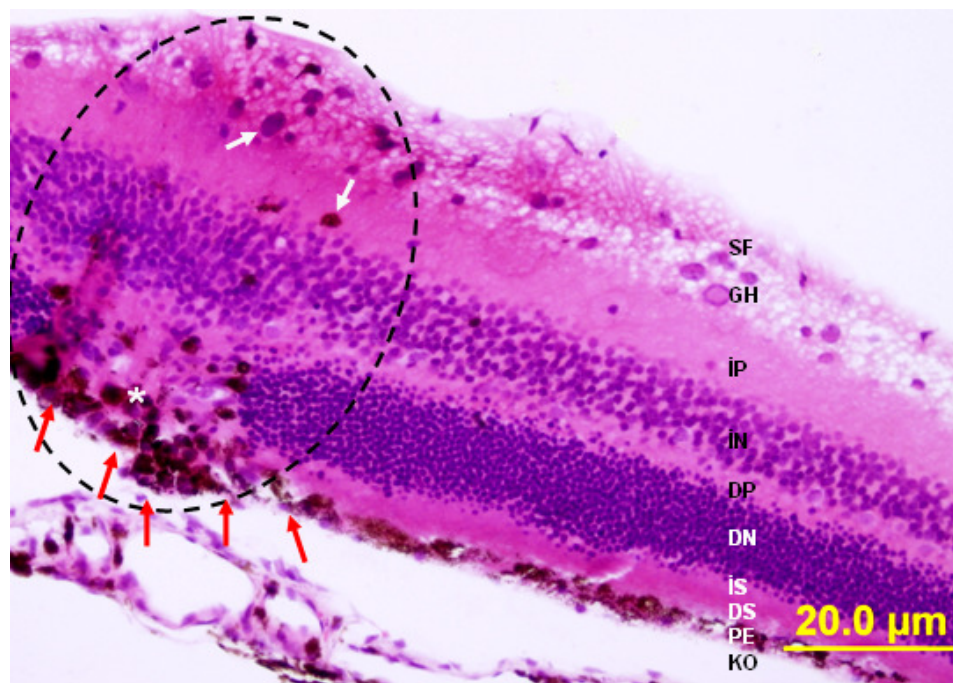
**Şekil 15.** Diyot lazerle fotokoagülasyondan sonra bFGF verilen grupta hasar alanının görünümü(kesik çizgiler). Hasar alanında tamirin önemli ölçüde başarılı olduğu izlenmekte. Koroid (KO), koroidal kan damarı (KD), pigment epiteli (PE), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP) tabakaları Hematoksilen-Eozin, X 100.

**Şekil 16.** Diyot lazerle fotokoagülasyondan sonra bFGF uygulanmış grupta hasar alanında (kesik çizgi) tamirin önemli ölçüde tamamlandığı izlenmekte. Kesintisiz pigment epiteli (kırmızı oklar). Koroid (KO), pigment epiteli (PE), fotoreseptörlerin dış segmenti (DS), iç segmenti (İS), dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları. Hematoksilen-Eozin, A: X40, X 100.

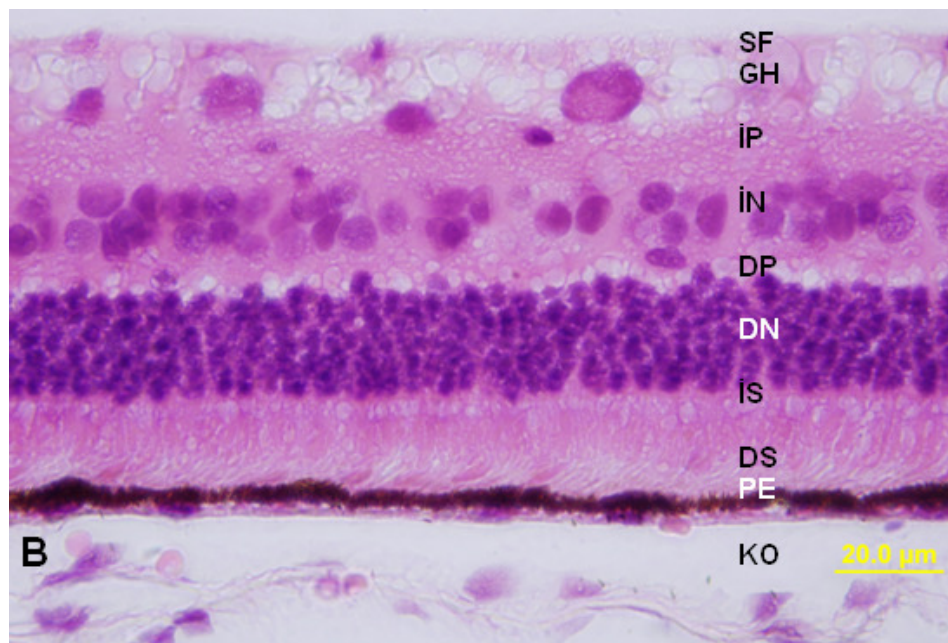
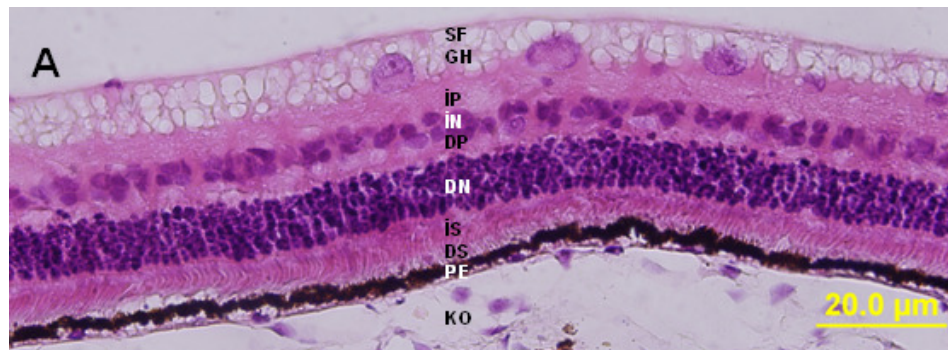




**Şekil 17.** Diyot lazerle fotokoagülasyondan sonra bFGF uygulanmış grupta hasar alanının görünümü (kesik çizgiler). İç nükleer tabakanın (İN) kalınlaştığı, pigmentli retina epitel tabakasına ait çoğalan hücrelerin üst tabakalara doğru ilerlediği (beyaz oklar), kesintisiz pigment epiteli (kırmızı oklar), dış pleksiform tabaka invaginasyonu (\*) izlenmekte. Koroid (KO), pigment epiteli (PE), fotoreseptör dış segment (DS), iç segment (İS), dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları. Hematoksilen-Eozin, X20.



**Şekil 18.** Diyot lazerle fotokoagülasyondan sonra bFGF uygulanmış grupta hasar alanına uzak bölgelerde koroid ve retina tabakalarının görünümü. Kesintisiz pigment epiteli (kırmızı oklar). Koroid (KO), pigment epiteli (PE), fotoreseptörlerin dış segmenti (DS), iç segmenti (İS), dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları. Hematoksilen-Eozin, A: X40, X 100. Hematoksilen-Eozin, A: X 40, B: X100.

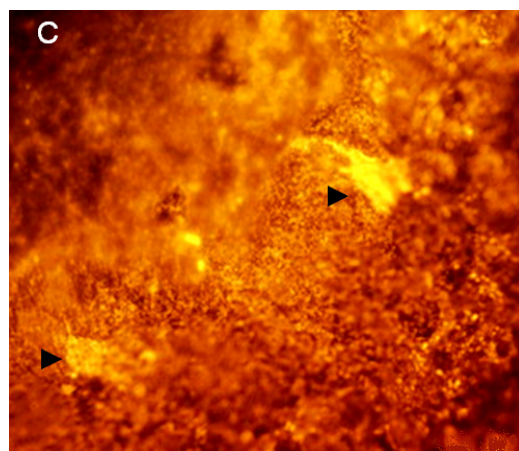
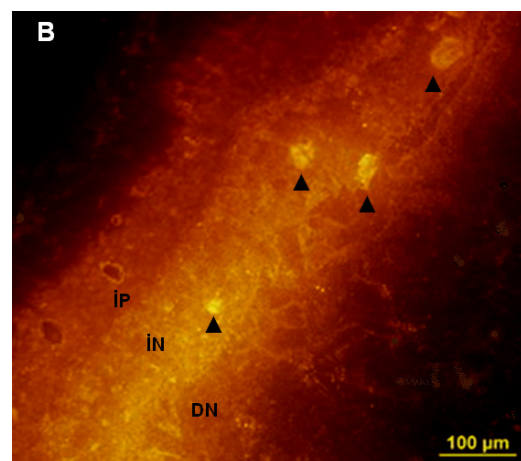
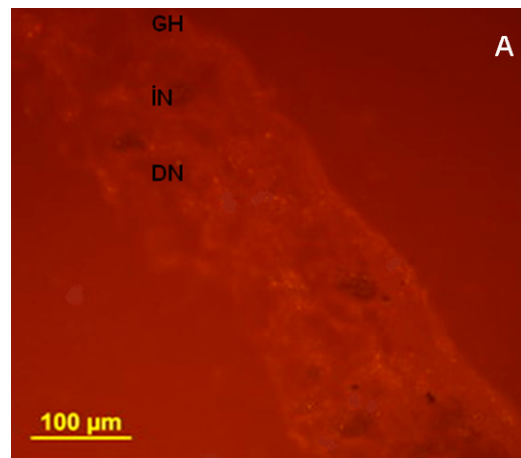


## **4. 2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL-İMMÜNOFLORESAN BULGULAR**

### **4. 2. 1. Glial Fibrillar Asidik Protein (GFAP) İmmünoreaktivitesi**

Glial fibriller asidik protein-pozitif hücre sayısı kontrol grubu tavşan retinalarında oldukça az sayıda izlendi (Şekil 19 A). Diyot lazer ardından bFGF uygulanan tavşan retinalarında hasar bölgesinin merkezi alanlarında diğer bölgelere ve kontrol grubuna göre glial fibriller asidik protein-pozitif hücre sayısı daha fazla idi. Retinanın iç nükleer tabaka ile dış pleksiform tabakalarında daha kuvvetli GFAP immünoreaktivitesi saptandı (Şekil 19 B ve C).

**Şekil 19.** Retina örneklerinde glial fibriller asidik protein immünoreaktivitesi. A: kontrol, B ve C: Lazer sonrası bFGF uygulanmış deney grubunda retinanın iç nükleer tabaka (İN) ile dış pleksiform tabakalarında (DP) daha kuvvetli immünoreaktivite gösteren GFAP-pozitif hücreler (ok başları). Bar: A ve B: 100 µm, C: X100



#### 4. 2. 2. Vimentin İmmünoaktivitesi

Anti- vimentin antikorunu test etmek için uygulanan negatif kontrol kesitlerinde vimentin-pozitif hücreler izlenmedi (Şekil 20). Uygulama yapılmamış kontrol gruplarında vimentin proteini-pozitif hücreler dış nükleer tabaka hücrelerinde orta şiddette bir immünoaktivite izlenirken, maksimum vimentin ekspresyonu iç nükleer tabaka hücrelerinde, ganglion tabakası hücrelerinde, sinir fibrilleri tabakasında ve Müller hücresi gövde ve uzantılarında izlenmiştir (Şekil 21 A, B, C). Diğer tabakalardaki vimentin immünoaktivitesi çok zayıf olarak izlendi (Şekil 21 A, B, C).

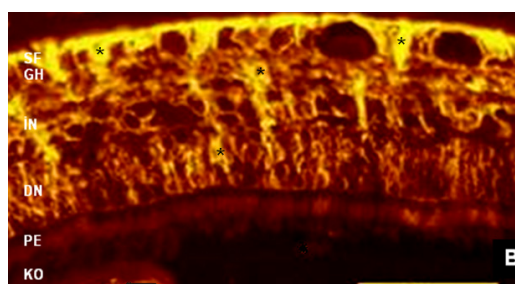
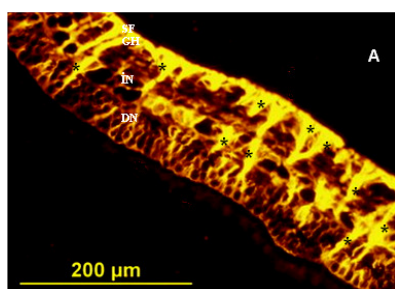
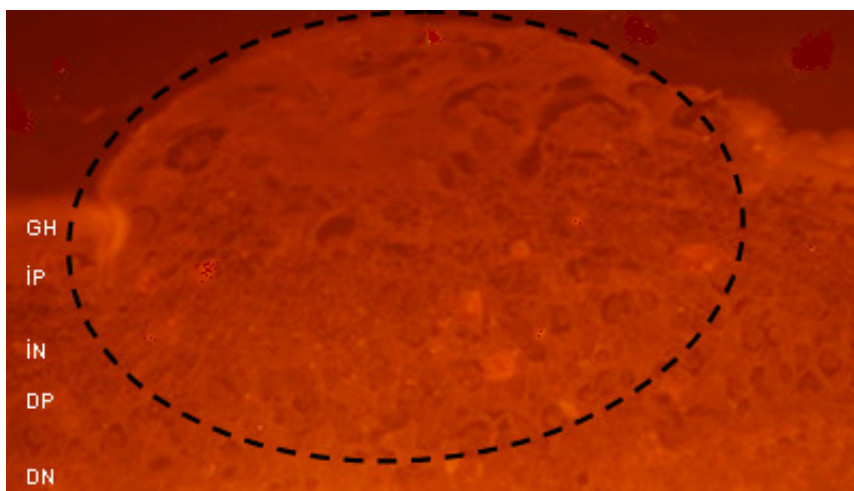
Diyot lazer ile fotokoagülasyon uygulanmasından on gün sonra alınan retina örneklerinde hasar alanına uzak alanlardan alınan kesitte retina pigment epiteli tabakası dışında sinir fibrilleri tabakasında en yoğun olmak üzere tüm retinal tabakalarda ve koroid tabakasında vimentin ekspresyonu izlendi (Şekil 22 A). Hasar alanında ise vimentin ekspresyonu özellikle alanın merkezi bölgesinde, yanığa bitişik alanlarda ve sinir fibrilleri tabakasında yoğunlaşmıştı (Şekil 22 B).

Lazerle fotokoagülasyondan hemen sonra bFGF enjekte edilen tavşanlardan on gün sonra alınan retina örneklerinde retina pigment epiteli tabakası hariç vimentin ekspresyonunun tüm retinal tabakalarda daha düzenli olarak dağılım gösterdiği, ancak hasar alanının skleraya doğru evagine olduğu üst bölgelerinde anti-vimentin immünoaktivitesinin daha zayıf, bu alana komşu sinir fibrilleri tabakasında ise çok kuvvetli olduğu izlendi (Şekil 23 A). Lazerle hasarlanmış alan daha küçük olduğunda tüm tabakalarda çok kuvvetli vimentin immünoaktivitesinin saptandığı (Şekil 23 B).



**Şekil 20.** Vimentin immünoreaktivitesi. Negatif kontrol. Gangliyon hücre (GH), iç pleksiform (İP), iç nükleer (İN), dış pleksiform (DP), dış nükleer (DN) tabakalar. Bar 100 µm.

**Şekil 21.** Uygulama yapılmamış kontrol grubuna ait tavşan retinalarında vimentin-pozitif hücreler. Dış nükleer tabakada (DN) orta şiddette, iç nükleer (İN), sinir fibrilleri tabakasında (SF) ve Müller hücre gövde ve uzantılarında (\*) kuvvetli immünoreaktivite. A, B: Bar 200.0 µm, C: 100.0 µm.



**Şekil 22.** Tavşan retinalarına diyot lazer uygulandıktan on gün sonra anti-vimentin immünoreaktivitesi.

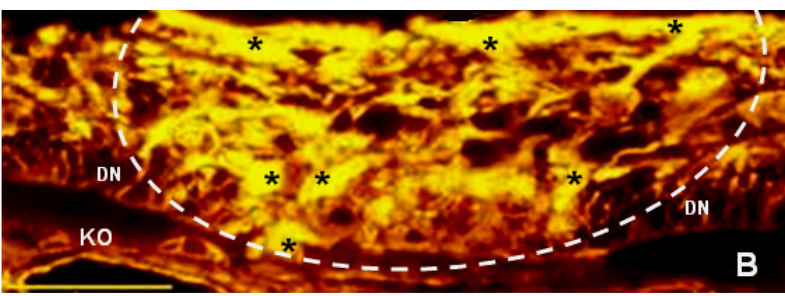
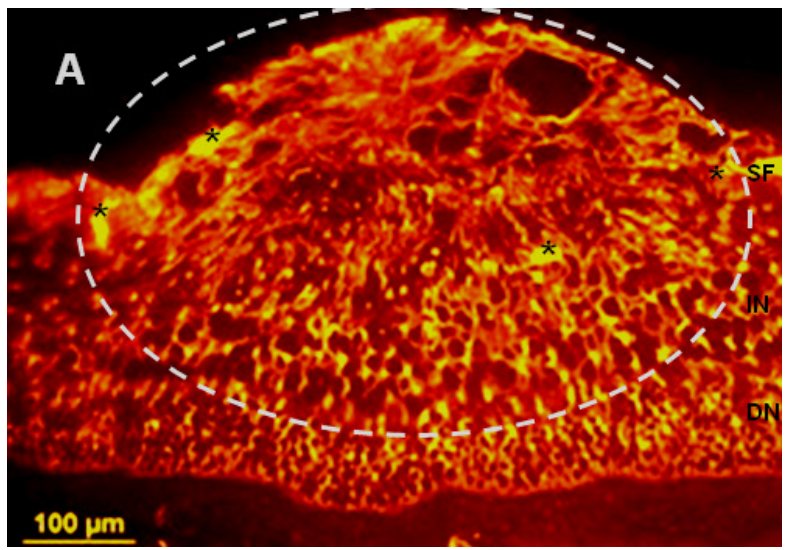
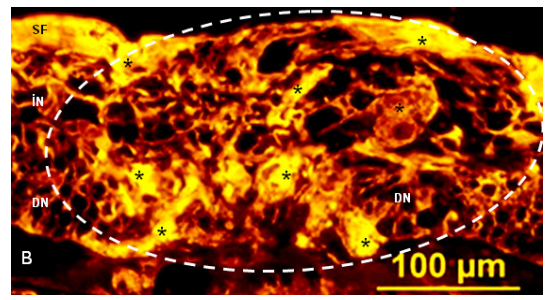
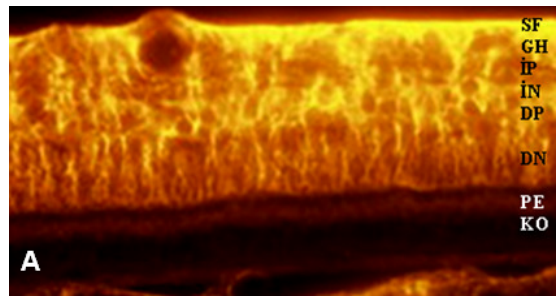
**A.** Hasar alanına uzak bölgelerde pigment epiteli tabakası (PE) hariç sinir fibrilleri tabakasında (SF) daha yoğun olmak üzere tüm retinal tabakalarda vimentin ekspresyonu izlenmekte. Bar: 20.0 µm.

**B.** Hasar alanı (kesik çizgiler) merkezinde, sinir fibrilleri tabakasında (SF) ve hasara bitişik alanlarda izlenen kuvvetli vimentin immünoreaktivitesi (\*). Bar: 100.0 µm.

**Şekil 23.** Diyot lazer+bFGF uygulanmış grupta vimentin immünolokalizasyonu.

**A.** Geniş lazer yanık alanı oluşturulduğunda vimentin-pozitif hücreler pigmentli retina epiteli tabakası (PE) hariç diğer tabakalarda düzenli dağılım gösterirken hasar alanına bitişik sinir fibrilleri tabakasında (SF) kuvvetli immünolokalizasyon izlenmekte. Bar: 100.0 µm.

**B.** Hasar alanı (kesik çizgiler) küçük olduğunda anti-vimentin aktivitesi pigment epiteli tabakası (PE) hariç tüm retinal tabakalarda çok kuvvetli (\*) olarak izlenmekte. Bar: 100.0 µm.



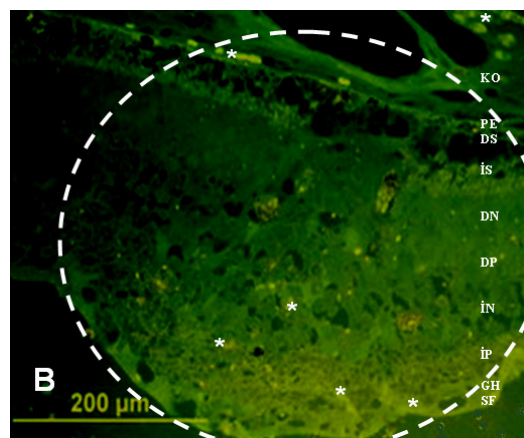
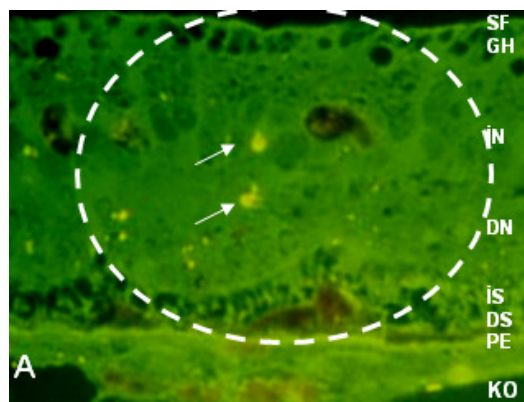
#### **4. 2. 3. Nestin İmmünoreaktivitesi**

Nestin-pozitif hücre sayısı uygulama yapılmamış kontrol grubuna ait kesitlerde nöral retinanın iç nükleer tabakasında daha yoğun olarak izlendi (Şekil 24 A). Bu hücrelerin sayısı hasar bölgelerinde diğer bölgelere göre daha fazla idi. Nestin-pozitif hücreler, koroid tabakasında bulunan damarlar çevresinde, dış nükleer tabakanın ortadan kalktığı tamir bölgelerinde, pigment epiteli tabakasında daha yoğun olarak izlendi (Şekil 24 B).

**Şekil 24.** Tavşan retinalarından parafin tekniği ile alınan kesitlerde nestin immünoreaktivitesi. Sinir fibrilleri (SF), gangliyon hücre (GH), iç pleksiform (İP), iç nükleer (İN), dış pleksiform (DP), dış nükleer (DN), fotoreseptör iç (İS) ve dış segmentleri (DS), pigment epitel ve koroid tabakaları (KO).

**A.** Uygulama yapılmamış kontrol grubu tavşanların retinalarından alınan kesitlerde nestin immünoreaktivitesi. Bar 100.0 µm.

**B.** Lazer uygulamasından sonra bFGF uygulanan deneklerden alınan kesitlerde nestin-pozitif hücreler koroidal damarlar çevresinde, pigment epitel tabakasında (PE) ve rejenerasyon alanlarında (\*) izlenmekte. Bar 200.0 µm.

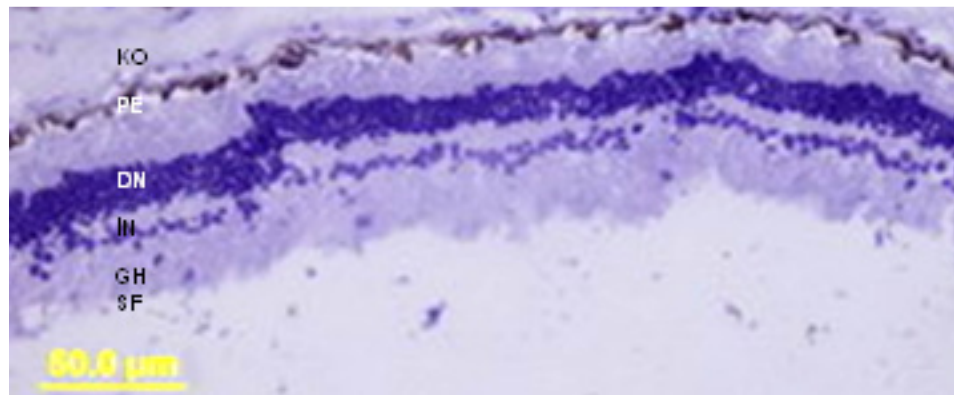


#### 4. 2. 4. Ki-67 İmmünoaktivitesi

Ki-67 proteininin ekspresyonu tamamen hücre çoğalması ile ilgili olduğundan uygulama yapılmamış kontrol grubuna ait retinalardan alınan frozen kesitlerde Ki-67 pozitif immünoaktivitesi koroid tabakasında, pigment epitel tabakasında, dış ve iç nükleer tabaka hücrelerinde çok zayıf olarak izlendi (Şekil 25). Diyot lazer uygulanmasından hemen sonra bFGF uygulanan tavşanların retinalarında koroid tabakasındaki damarlar çevresinde (Şekil 26 A), retinanın özellikle retina pigment epitel tabakasında, dış nükleer tabakasında, iç pleksiform tabakaya kadar ulaşan retina pigment epitel hücrelerinde (Şekil 26 A, B, C) daha kuvvetli olarak izlendi. Hasar alanında Ki-67 pozitif hücre sayısının oldukça az olduğu izlendi (Şekil 26 A, B, C).



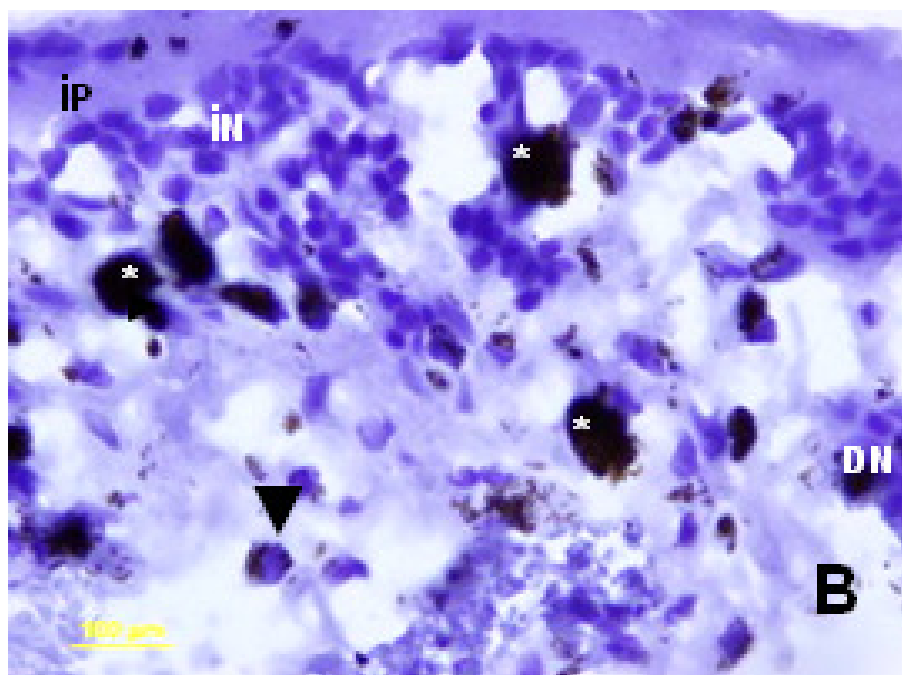
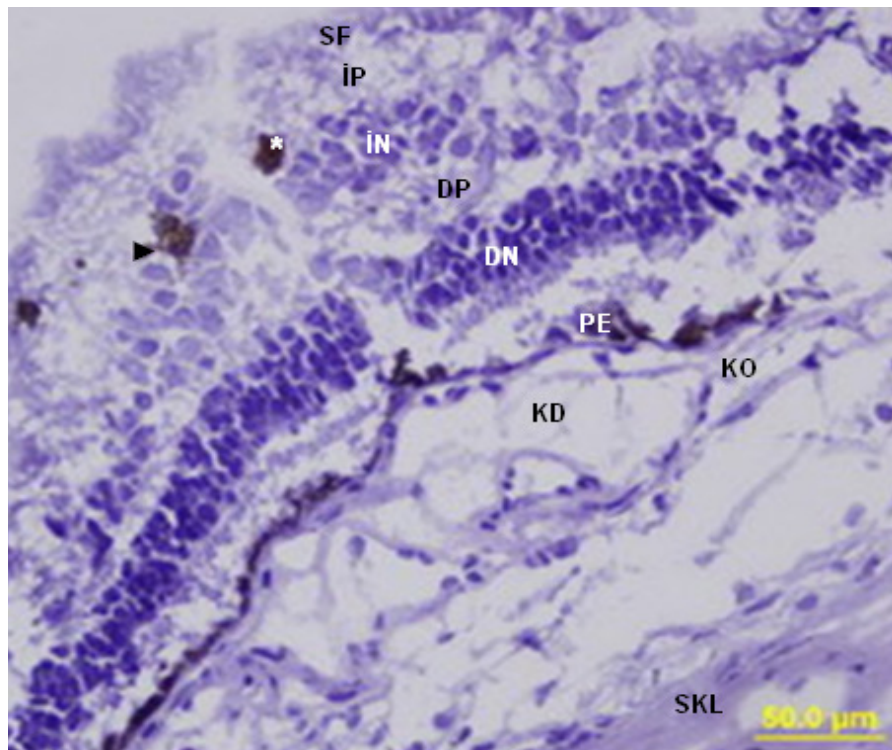
**Şekil 25.** Lazer uygulanmamış kontrol grubunda anti-Ki-67 immünoreaktivitesi. Koroid (KO), pigment epiteli (PE), dış nükleer (DN), iç nükleer (İN), gangliyon hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları izlenmekte. Bar: 50.0 µm.



**Şekil 26.** Lazer uygulaması sonrası bFGF uygulanan deneklerin retinasında anti-Ki-67 immünoreaktivitesi.

**A.** Hasar alanında iç nükleer tabakada anti-Ki-67 immünoreaktivitesi (ok başı). İç pleksiform tabakaya (İP) göç etmiş retina pigment epiteli hücreleri (\*). Sklera (SKL), koroid (KO), kooidal kan damarı (KD), pigment epiteli (PE), dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları. Bar: 50.0 µm.

**B.** Hasar alanında dış nükleer tabakaya (DN), iç nükleer tabakaya (İN) ve iç pleksiform tabakaya (İP) göç etmiş retina pigment epiteli hücreleri (\*) ve anti-Ki-67 immünoreaktivitesi (ok başı). Bar: 100.0 µm.



### 4. 3. ELEKTRONMİKROSKOPİK BULGULAR

#### 4. 3. 1. Uygulama Yapılmamış Kontrol Grubu

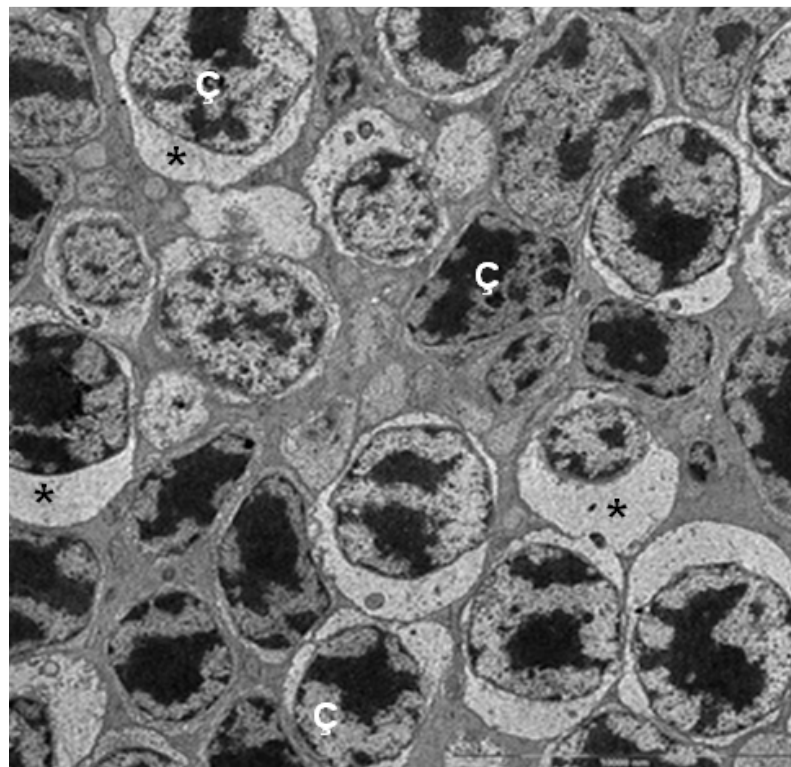
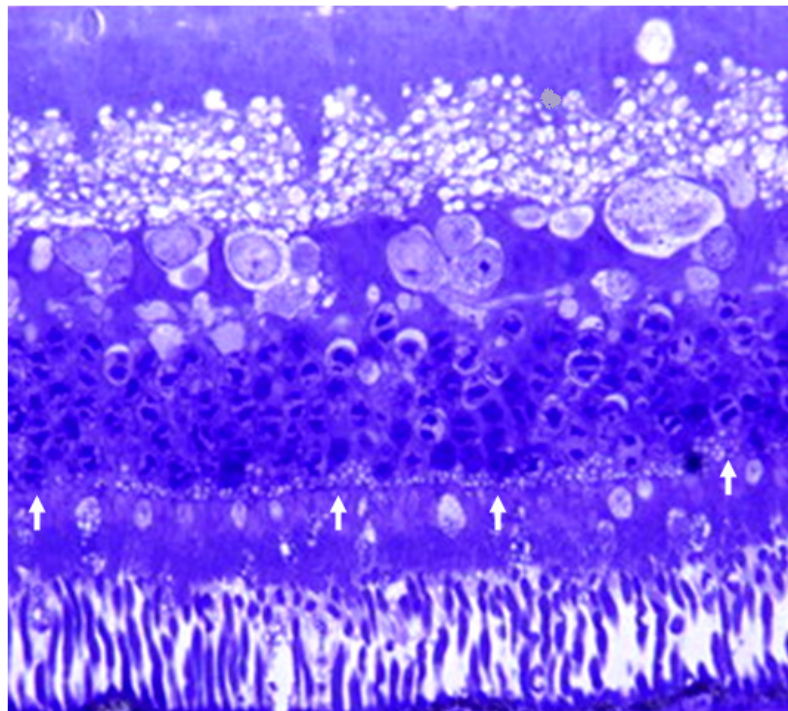
Bu gruptan alınan yarı-ince kesitlerde retinanın tüm tabakaları düzenli histolojik tabakaları ile izlenmiştir. Koroide komşu alçak kübik biçimli pigment retina hücre çekirdeklerinin ökromatik ve belirgin çekirdekçikli oldukları izlenirken sitoplazmalarında melanin granüllerinin apikal yerleşimli ve koyu bazofilik boyandıkları izlenmiştir (Şekil 27). Pigment epiteli üzerinde sırasıyla fotoreseptör tabakanın dış ve iç segmentleri, dış nükleer, dış pleksiform, iç nükleer, iç pleksiform, ganglion hücre tabakaları izlenmiştir (Şekil 27).

Elektronmikroskopik düzeyde incelemede dış nükleer tabaka hücreleri çekirdeklerinin oldukça iri olduğu ve sitoplazmanın önemli bir bölümünü doldurdukları, bazı hücre çekirdeklerinin ise sitoplazmayı hemen hemen kapladıkları görüldü (Şekil 28). Çekirdekte heterokromatik alanların parçalı geniş kümeler olarak bulunduğu görüldü (Şekil 28). İç nükleer tabaka hücrelerinin iri ökromatik çekirdekli oldukları ve dış nükleer tabaka hücrelerine göre daha geniş sitoplazmalık alanlara sahip oldukları izlenmiştir. Heterokromatin genellikle çekirdek zarının altında ince bantlar şeklinde yer almıştır (Şekil 29A, 29B, 29C). İç nükleer tabaka hücrelerinde yer yer sitoplazmik küçük vakuoller de izlenmiştir (Şekil 29A, 29B, 29C, 30A). İç pleksiform tabakada bipolar, amakrin, gangliyon ve Müller hücrelerine ait uzantılar normal yapıları ile izlenmiştir (Şekil 30A ve 30B). İç pleksiform tabaka ile iç nükleer tabaka hücrelerinin de yakın ilişkide olduğu, normal histolojik yapıları ile izlenen iç nükleer tabaka hücreleri arasında yer yer dens heterokromatik piknotik çekirdekli ve organelden fakir, geniş şeffaf sitoplazmalı dejenerasyona uğramış hücreler de izlenmiştir (Şekil 30A). Nöral retinanın iç pleksiform tabakasındaki uzantılar arasında sinaptik alanlar dens görünümüleriyle izlenmiştir (Şekil 30A ve 30B). Kesintili olarak izlenen dış sınırlayıcı membran, fotoreseptör tabakası ile dış nükleer tabaka arasında sınır oluşturmaktadır (Şekil 31A ve 31B). Fotoreseptörlerin hücre zarları ile

Müller hücrelerini birleştiren bağlantı kompleksleri tarafından oluşturulan dış sınırlayıcı membran, dış nükleer hücre tabakası hücreleri arasında da kesintili bir hat olarak normal yapısı ile izlenmiştir (Şekil 32A ve 32B). Fotoresptörlerle Müller hücreleri arasında kurulan zonula adherens tipi bağlantı kompleksleri dens görünümleri ile elektronmikrograflarda belirgin olarak izlenebilmiştir (Şekil 32A ve 32B). Rod hücre sferüllerinin ince yapıları normal görünümünü korumuştur (Şekil 32B). Retinal makroglialardan olan Müller hücrelerinin fibröz yapılar içeren uzun uzantıları ise dış nükleer tabaka hücreleri arasında onları çepeçevre kuşatır görünümde izlenmiştir (Şekil 33). İç pleksiform tabaka hücrelerinin arasında kurulan sinaptik bağlantılar (Şekil 34 A ve 34 B) dens yapılar olarak izlenmiştir. Bu grupta oval ya da ovoid biçimli melanin pigment granüllerine sahip retina pigment epiteli hücreleri ve fotoresptörlerin dış segmentleri de ince yapı seviyesinde normal histolojik yapıda izlenmiştir (Şekil 36).

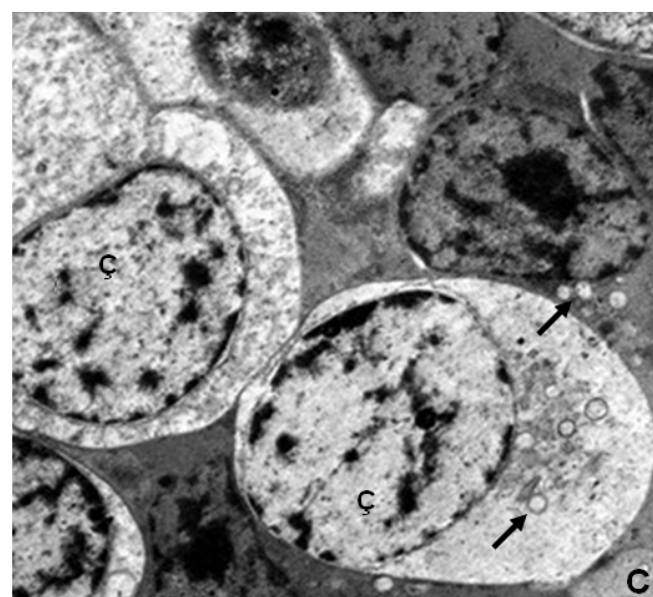
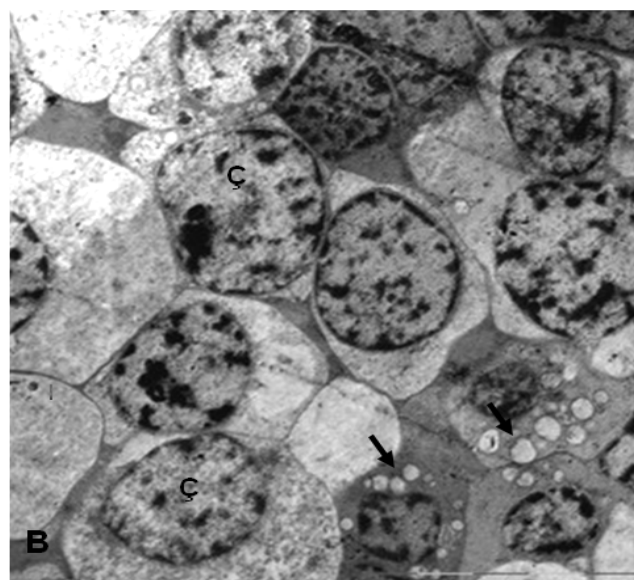
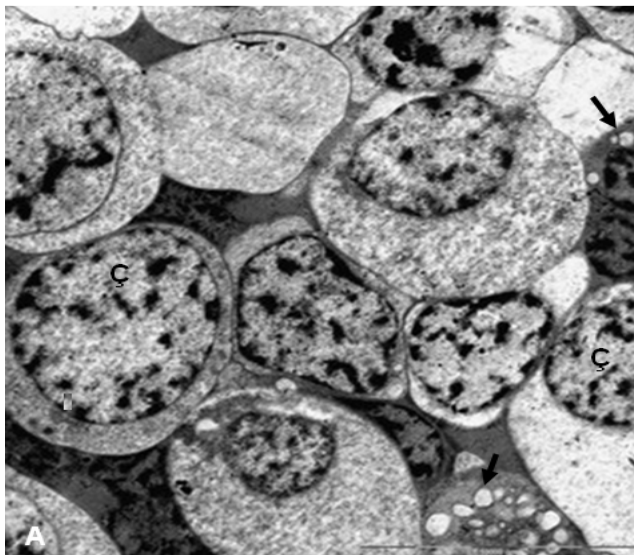
**Şekil 27.** Uygulama yapılmamış kontrol grubuna ait tavşan retinalarının tabaka ve hücrelerinin yarı-ince kesitlerde görünümü. Pigmentli retina tabakası (PE) fotoreseptörlerin dış (DS) ve iç (İS) segmentleri, dış nükleer (DN), dış pleksiform (DP), iç nükleer (İN), iç pleksiform (İP), ganglion hücre (GH) ve sinir fibrilleri (SF) tabakaları izlenmekte. Toluidin blue-O. X100.

**Şekil 28.** Kontrol grubunda nöral retinanın dış nükleer tabaka hücrelerinin ince yapısı. Heterokromatik çekirdekler (Ç), sitoplazma (\*). Bar: 10 000 nm.





**Şekil 29.** Kontrol grubunda nöral retinanın iç nükleer tabaka hücrelerinin ince yapısı. Ökromatik çekirdekler (Ç), sitoplazmik vakuoller (oklar). A ve C: Bar 10 000 nm, B: Bar 5 000 nm.

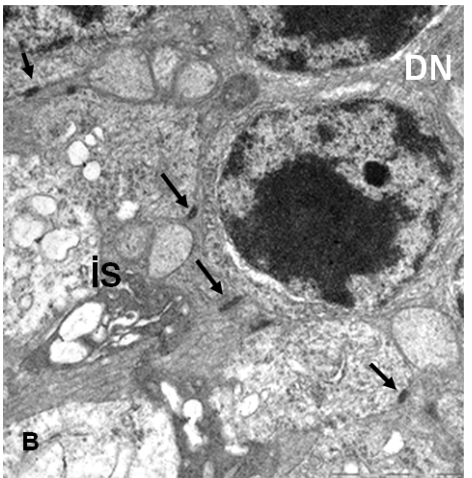
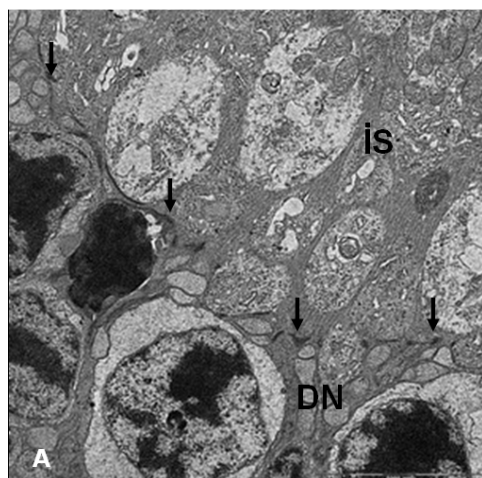
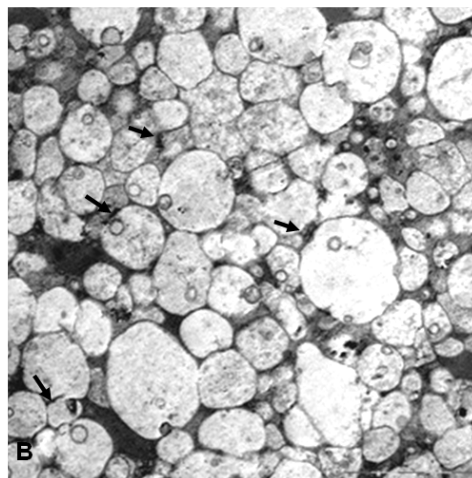
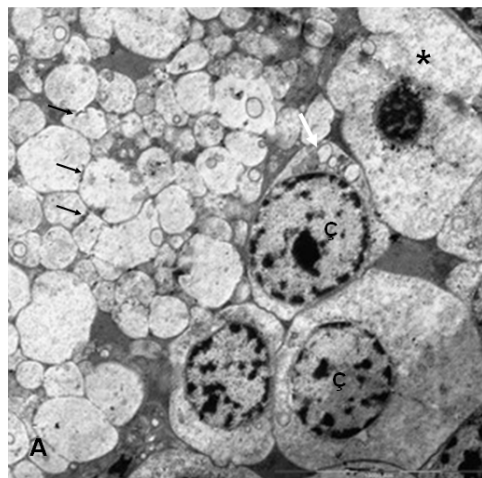


**Şekil 30.** Kontrol grubunda nöral retinanın genel görünümü.

- A.** İç nükleer ve iç pleksiform tabaka. İç nükleer tabakada normal morfolojide hücreler yanı sıra dens piknotik çekirdekli geniş sitoplazmalı dejeneratif hücre (\*). Bar 10 000 nm.
- B.** İç pleksiform tabakada bipolar, amakrin, gangliyon ve Müller hücrelerinin uzantıları arasındaki sinaptik alanlar (ok). Bar 5 000 nm.

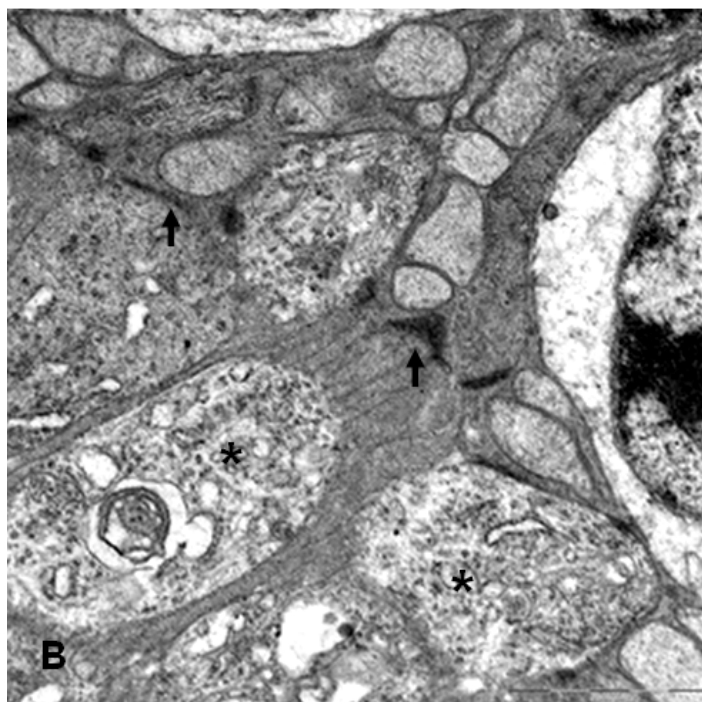
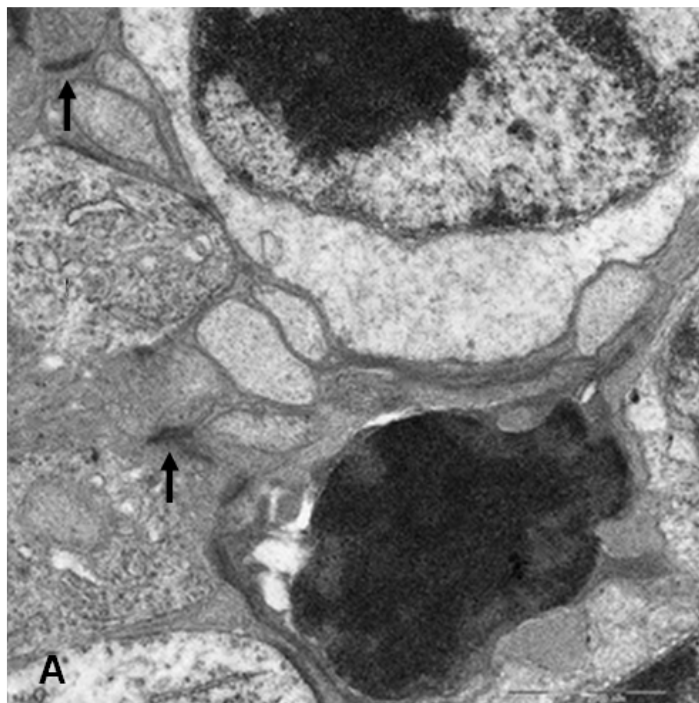
**Şekil 31.** Kontrol grubunda dış sınırlayıcı membranın ince yapısı.

- A.** Dış sınırlayıcı membran (ok), dış nükleer tabaka hücreleri (DN), fotoreseptör tabakanın iç segmentleri (İS). Bar 5 000 nm.
- B.** Dış sınırlayıcı membran (ok), dış nükleer tabaka hücreleri (DN) ile fotoreseptörlerin iç segmentleri (İS) tabakası. Bar 2 000 nm.

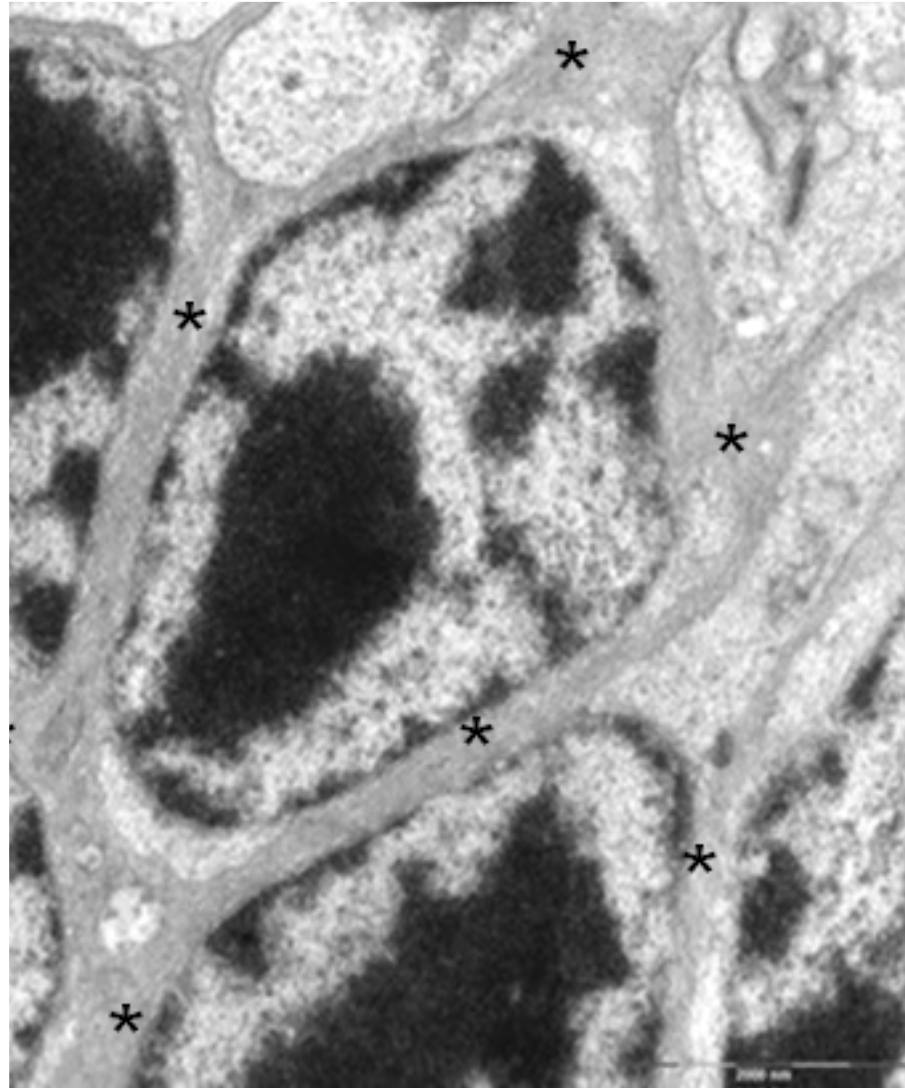


**Şekil 32.** Kontrol grubunda dış sınırlayıcı membranın (ok) ince yapısı daha büyük büyütmede izlenmekte.

- A.** Fotreseptörlerle Müller hücrelerinin uzantıları arasındaki zonula adherens tipi (ok) bağlantı kompleksleri (A). Bar 2 000 nm.
- B.** Normal morfolojik görünüşleri ile Rod hücre sferülleri (\*). Bar 2 000 nm.



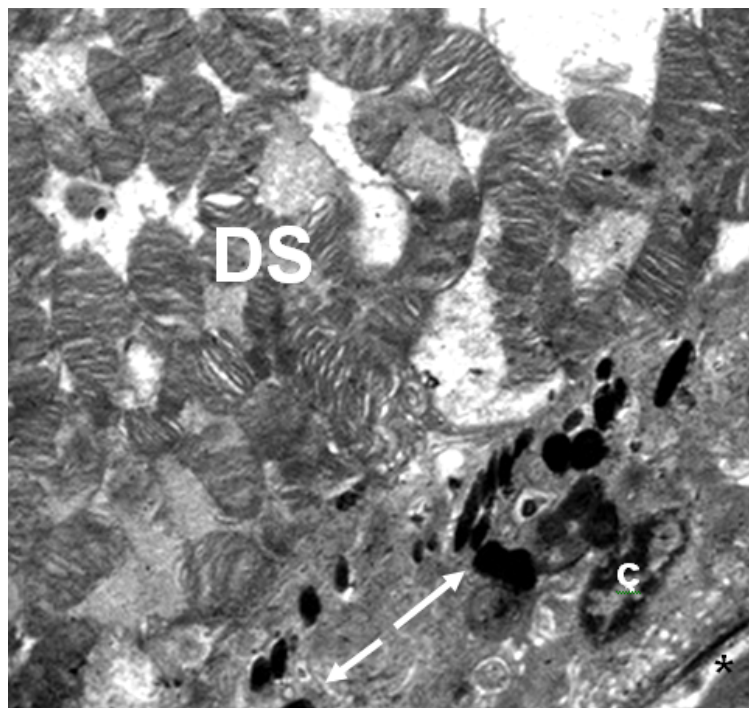
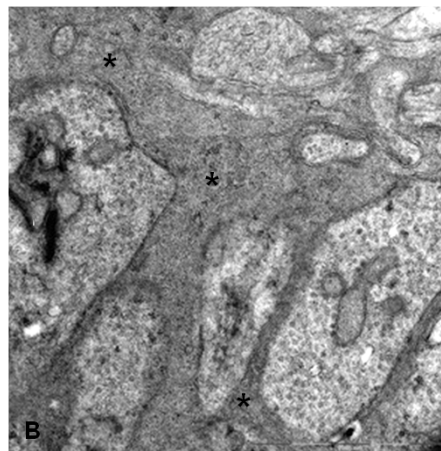
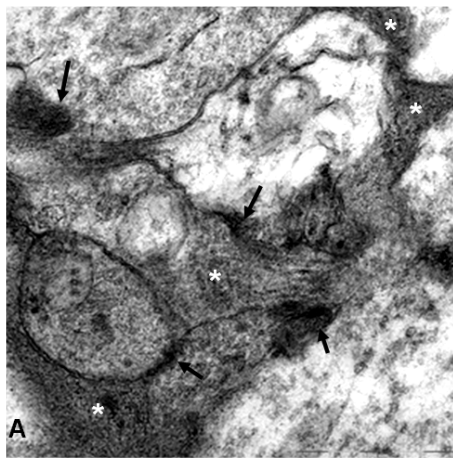
**Şekil 33.** Kontrol grubu retinalarında dış nükleer tabaka hücreleri arasında Müller hücrelerine ait fibriller yapıda uzantılar (\*). Bar 2000 nm.





**Şekil 34.** Kontrol grubunda iç pleksiform tabakada sinaptik alanlar (oklar) (A), Müller hücresi uzantıları (\*) ( B). Bar A: 2 000 nm, B: 1 000 nm.

**Şekil 35.** Pigmentli retina hücrelerinde ovoid biçimli melanin granülleri (ok başları), heterokromatik çekirdek (Ç), epitelin oturduğu bazal lamina (\*), fotoreseptörlerin dış segmentleri (DS). Bar A: 5 000 nm.

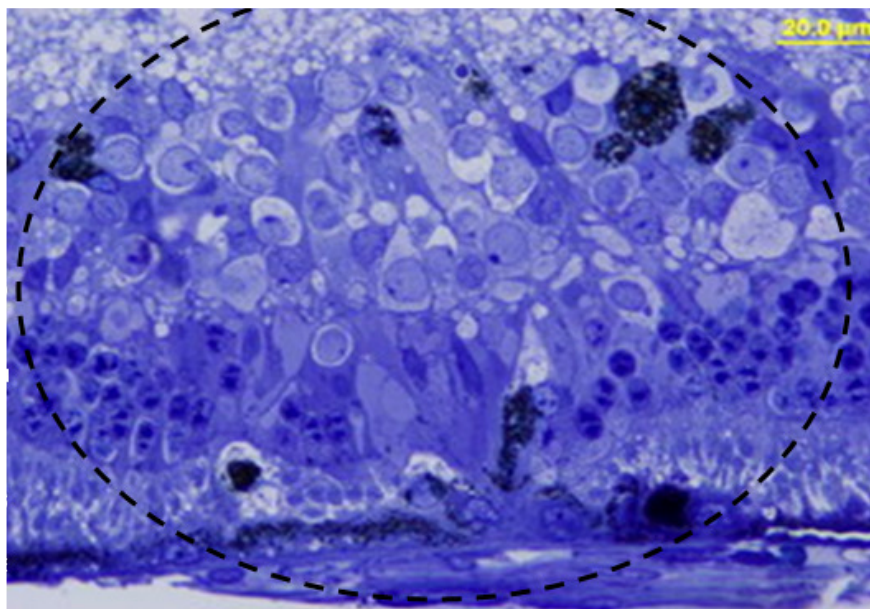
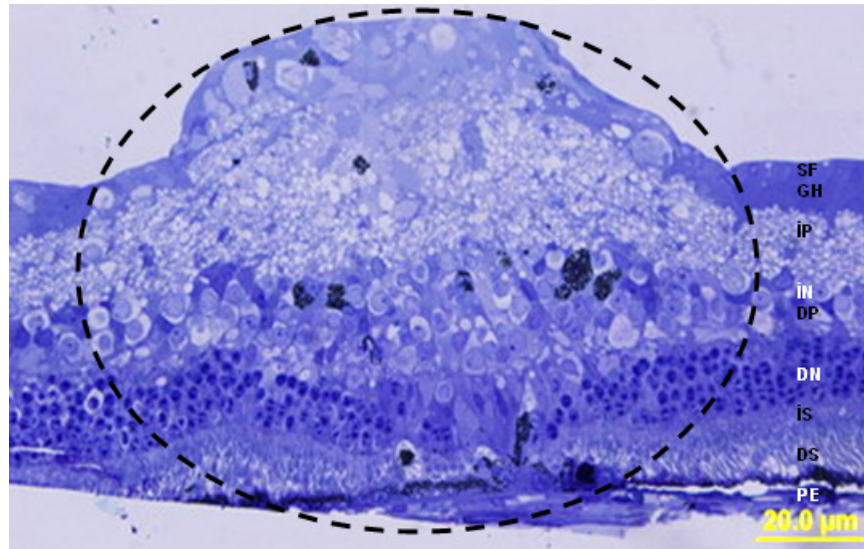


#### 4. 3. 2. Diyot Lazer Uygulanan Grup Bulguları

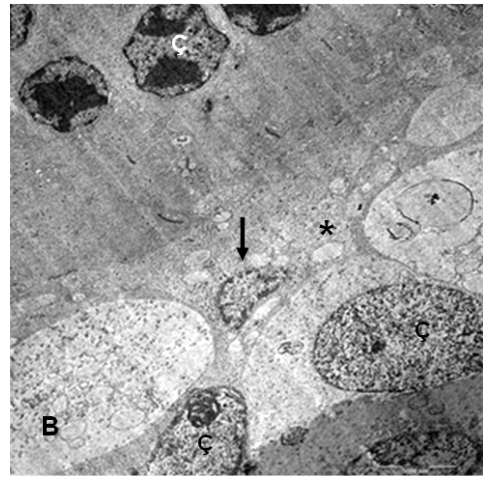
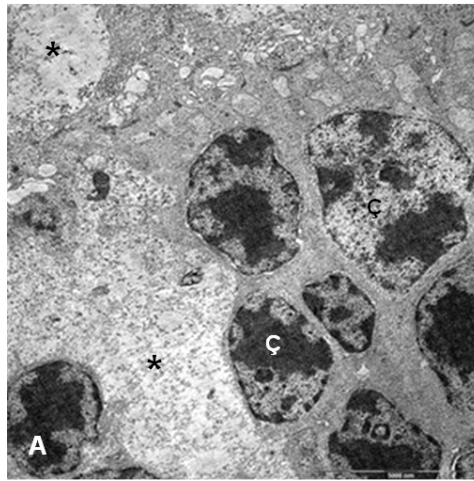
Bu grupta diyot lazerle fotokoagülasyondan sonra nöral retina ve koroide bölgesel histopatolojik değişiklikler izlenmiştir. En belirgin bulgu yanık bölgesine komşu normal retina tabakalarının aşağıya koroide doğru çökmeye başlaması ve aynı zamanda yanık alanının komşu alanlara göre yüzeye doğru kalınlaşarak çıkıntı yapmasıdır (Şekil 36 ve Şekil 37). Diyot lazerle indüklenen retinal lezyonlarda onuncu günde en çok etkilenen tabakanın dış nükleer tabaka olduğu saptanmıştır (Şekil 36 ve Şekil 37). Dış nükleer tabakada yıkım ile yanık lezyonunun merkezi kısmında çekirdek kayıpları gözlenmiştir. Dış nükleer tabaka önemli ölçüde incelendiği ve iç nükleer tabakanın koroide doğru invagine olduğu gözlenmiştir. Lezyona komşu alanlarda bol mitotik figürler izlenmiştir. Lezyonun orta hattında retinal pigment epitel tabakasının da devamlılığını yitirerek kesintiye uğradığı gözlenmiştir (Şekil 36 ve Şekil 37). İç nükleer tabakada çoğalan hücrelerin oldukça büyüdüğü, ökromatik çekirdekleri, genellikle periferik yerleşimli çekirdekçikleri olduğu görülmüştür (Şekil 37). Transmisyon elektronmikroskopu ile yapılan incelemelerde ise hasar alanında az sayıda bulunan dış nükleer tabaka hücrelerinin dens heterokromatik çekirdekli, yer yer piknotik çekirdekli oldukları, çekirdek kontürlerinin düzensizleştiği ve sitoplazmik organellerde kayıplar olduğu görülmüştür (Şekil 38A). Hasar alanına iç nükleer tabakadan göç eden hücreler ise iri ökromatik çekirdekleri belirgin çekirdekçikleri ile dikkati çekmiştir (Şekil 38 B ve Şekil 39 A, B C). Hasar alanında iç nükleer tabaka hücreleri arasında geniş ödematöz alanların yer aldığı görülmüştür (Şekil 38 A, 38 B, Şekil 39 C). İç pleksiform tabakada ganglion hücreler, bipolar hücreler ve amakrin hücreler arasındaki sinapslar normal yapılarını korumuştur (Şekil 40). Sinaptik alanlarda merkezleri dens yapıda sinaptik veziküller ve mitokondrilerin yer aldığı görüntü alanları izlenmiştir (Şekil 40).

**Şekil 36.** Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının görünümü. Lezyonun merkezi kısmında dış nükleer tabakada (DN) yıkım ve çekirdek kayıpları, retina pigmentli epitel tabakasının (PE) kesintiye uğradığı izlenmekte. Lezyon alanı çoğalan hücrelerin invazyonu ile daha kalın olarak izlenmekte. Toluidin blue-O. Bar 20.0 µm.

**Şekil 37.** Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının (kesik çizgiler) daha büyük büyütmede görünümü. Toluidin blue-O. Bar 20.0 µm.

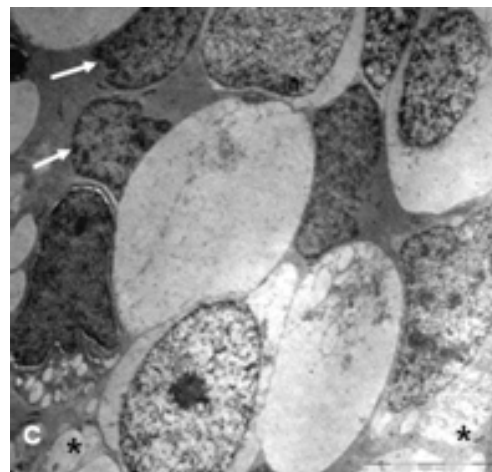
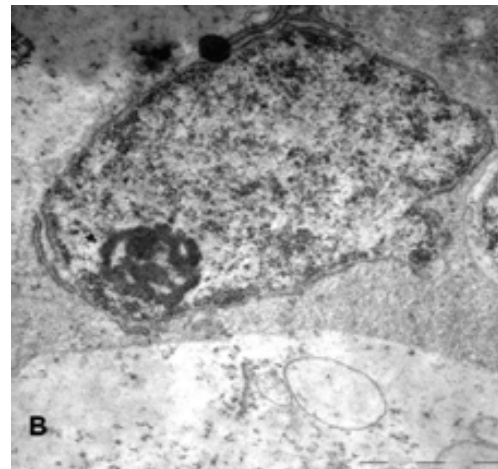
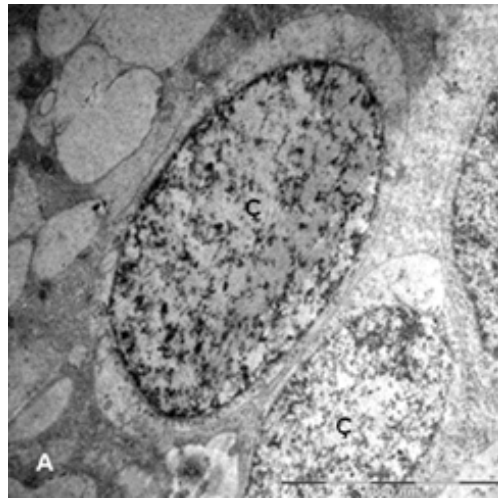


**Şekil 38.** Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının daha büyük büyütmede elektronmikroskopik görünümü. Dış nükleer tabaka hücrelerinin ökromatik çekirdekleri (Ç) yanında piknotik çekirdek (ok), ödematöz alanlar (\*) izlenmekte (A ve B). Bar 5 000 nm.

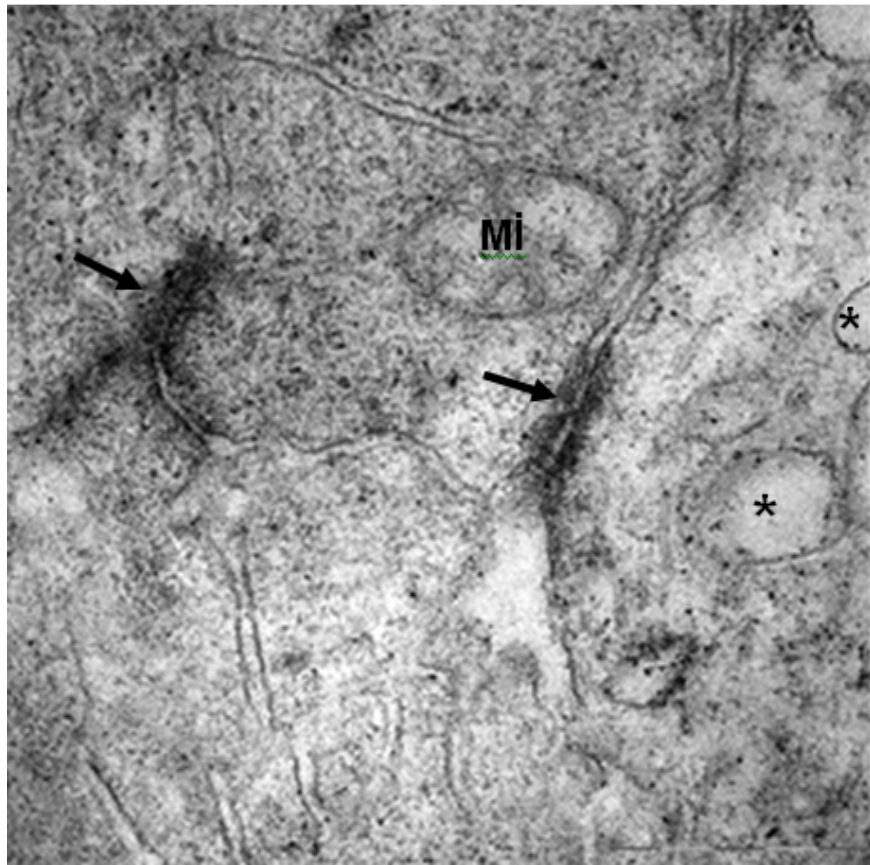


**Şekil 39.** Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının iç nükleer tabakası hücrelerine ait ökromatik çekirdekler (A ve B). İç nükleer tabaka hücreleri arasında dens heterokromatik çekirdekli dış nükleer tabakaya ait hücrelerine ait piknotik çekirdekler (oklar) ve ödematöz alanlar (\*) izlenmiştir (C). Bar: 5 000 nm.





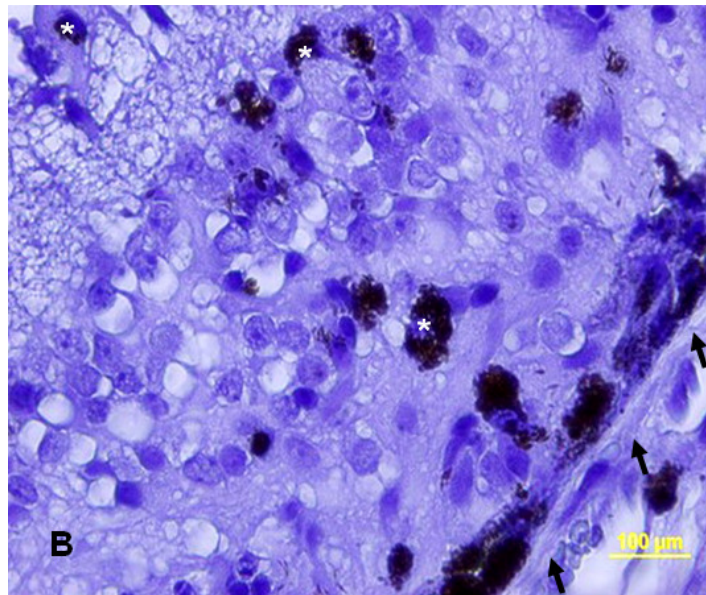
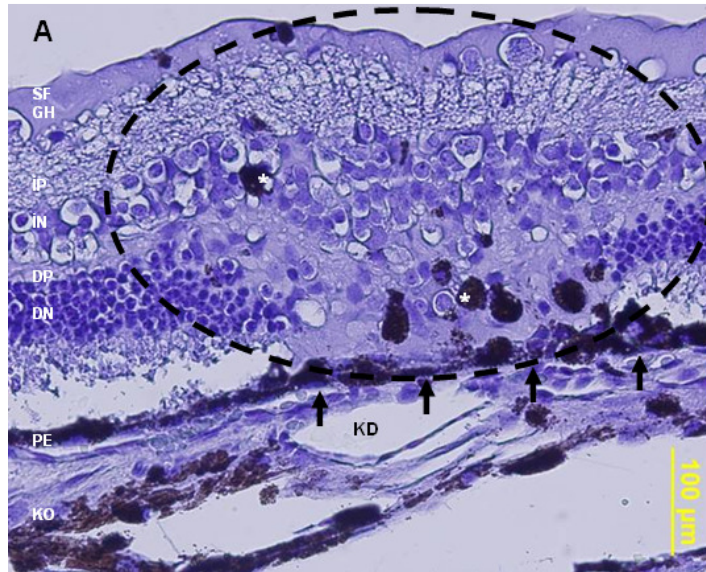
**Şekil 40.** Diyot lazer uygulanmasından on gün sonra hasar alanının daha büyük büyütmede elektronmikroskopik görünümü. İç pleksiform tabakada ganglion hücreler, bipolar hücreler ve amakrin hücreler arasındaki sinaptik alanlar (oklar), sinaptik alanlarda mitokondri kesitleri (MI) ve sinaptik veziküller (\*) izlenmekte. Bar 5 000 nm.



### 4. 3. 3. Diyot Lazer Uygulanması Sonrası bFGF Uygulanan Grup Bulguları

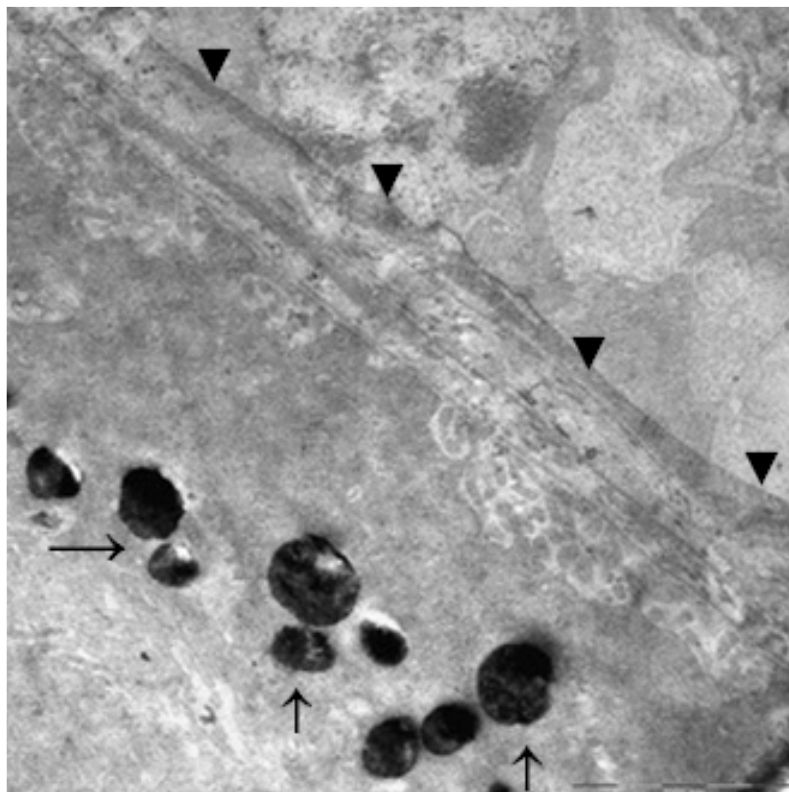
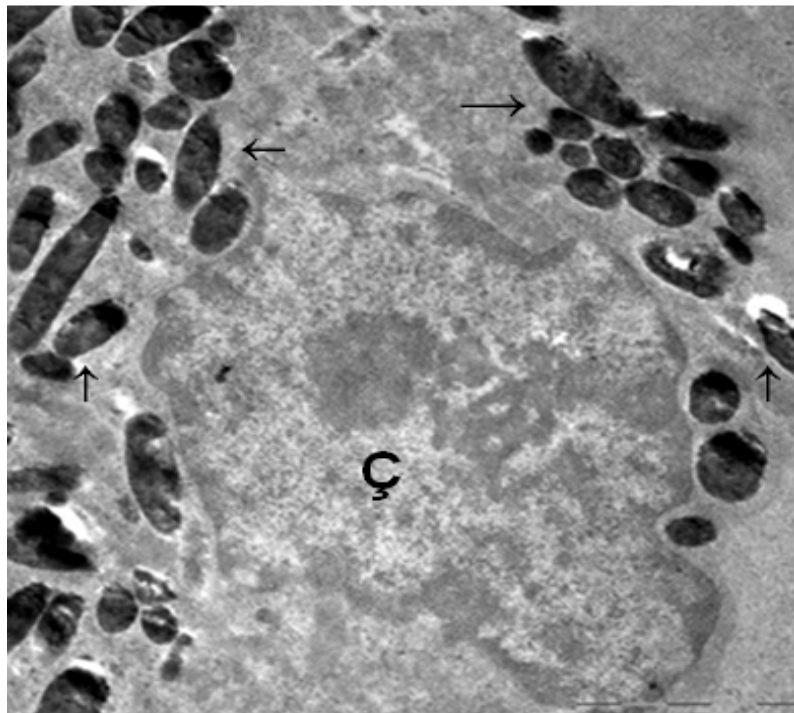
Retinal dejenerasyondan korumak için diyot lazerle fotokoagülasyon sonrası bFGF uygulanan deneklerden elde edilen retinaların yarı-ince kesitlerinin ışık mikroskopik düzeyde incelenmesinde dikkati çeken en önemli bulgu Brush membranının ve retinal pigment epiteli tabakasının bütünlüğünü koruması idi (Şekil 41 A ve B). Bu grupta tamir süreci sırasında genişlemiş koroidal kapiller damarlar izlenmiştir (Şekil 41 A ve B). Retinanın pigmentli epitel tabakasına ait pigmentli hücrelerin hasar alanının lazerle fotokoagülasyon sonucu kaybolan dış nükleer tabakasında çok sayıda olduğu, hasar alanının yüzeyine doğru sayıca azalarak ilerlediği ve az sayıda hücrenin ise ganglion hücre tabakasına ulaşabildiği saptanmıştır (Şekil 41 A ve B). Yüzeye doğru ilerleyen bu retinal pigment hücrelerinin ince yapısına bakıldığında iri ökromatik düzensiz kontürlü çekirdekli, belirgin olarak izlenebilen 1-2 çekirdekçikli, ovoid ya da yuvarlak biçimli pigment granüllerine sahip oldukları görülmüştür (Şekil 42). Hasar alanındaki iç nükleer tabaka hücrelerinin hasar alanının merkezine göre sayıca giderek azalarak invagine olduğu görülmüştür. Diyot lazer uygulanan grupla karşılaştırıldığında hasar alanındaki iç nükleer hücre tabakasının hücre kat sayısının azaldığı, özellikle hasar alanına komşu bölgelerin dış pleksiform tabaka tarafından doldurulduğu saptanmıştır (Şekil 41 A ve B). Genel olarak hasar alanına bakıldığında ise hasar alanının sklera ve vitröze doğru evaginasyonunun azaldığı, retina tabakalarının daha düzenli organize olduğu görülmüştür (Şekil 41 A ve B). Retinal pigment epiteli tabakasının ince yapı incelemelerinde kesintisiz yapısını koruduğu, tabakayı oluşturan kübik hücrelerin az sayıda genellikle apikal yerleşimli yuvarlak biçimli melanin granülleri içerdiği izlenmiştir (Şekil 42 ve Şekil 43).

**Şekil 41.** Lazer uygulamasından sonra bFGF uygulanan deneklerinin retinasında hasar alanı (kesikli çizgili). Pigmentli retina epitel tabakasına ait pigmentli hücrelerin (\*) yüzeye doğru sayıca azalarak ilerledikleri, kesintisiz pigmentli retina epiteli tabakası ile altında Bruch membran (oklar) izlenmekte (A ve B). Toluidin blue-O, Bar 100 µm.



**Şekil 42.** Lazer uygulamasından önce bFGF uygulanan deneklerinin retinasında hasar alanına koroid tabakasından gelen pigment hücrelerinin ince yapısı. Pigment inklüzyonları (oklar), çekirdek (Ç). Bar 2 000 nm.

**Şekil 43.** Lazer uygulamasından sonra bFGF uygulanan deneklerin hasar alanında pigmentli retina epiteli tabakası. Melanin granülleri (oklar), kesintisiz Brush membran (ok başı). Bar 2 000 nm.





## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma, klinikte oftalmatolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan diyot lazerin retina üzerine etkilerini histolojik olarak araştırmak ve diyot lazer sonucu oluşabilecek hasarın hemen her doku ve organda fizyolojik olaylara aracılık ettiği bilinen büyüme faktörleri kullanarak lazer etkisinin geri döndürülüp döndürülemediğini araştırmayı amaçlamıştır. Bu büyüme faktörlerinden çalışmamız için bazik fibroblast büyüme faktörü seçilmiştir.

Lazer kullanımı sadece tıp alanı ile de sınırlı değildir. Endüstride, askeri alanlarda da yaygın olarak kullanılır. Bazı retina tümörlerinin tedavisinde, diabetin yol açtığı mikroanevrizma, kanama ve eksudaların tedavisinde, yaşlılarda görülen makula dejenerasyonlarında, koroidal ve retinal neovaskülarizasyonda lazerin önemi tartışılmazdır (5, 6, 81-83). Diyot lazerin yaygın kullanımı beraberinde komşu dokularda yanıklar gibi istenmeyen sonuçlar da doğurmaktadır (85). Değişik dalga boylarında etkili olan farklı lazer tipleri bulunmakla birlikte kullanım kolaylığı, ucuzluğu, komşu dokularda daha az hasara yol açması gibi avantajlara sahip olduğundan (5, 81-83, 85-89) bu çalışmada diyot lazer kullanımı tercih edilmiştir.

Çalışmamızda, retina dokusuna diyot lazer etkisi, hasarlar üzerine ekzojenik yolla verilen bazik fibroblast büyüme faktörünün etkisi olup olmadığı tavşan modellerinde çalışılmıştır. Tavşan retinaları fovea içermemeleri dışında, insan retina anatomisi ile neredeyse aynı özellikleri taşır. Klinik uygulamalarda insanlar için geliştirilen diyot lazer cihazı küçük deney hayvanlarına adapte edilemediğinden, boyut olarak daha büyük olan tavşanlarda kullanılabilmiştir. Diyot lazer uygulaması sonunda yanık oluşup oluşmadığı albino tavşanlarda çok zor tespit edilebildiğinden, gözlerinde pigmentler içeren *Chinchilla* türü renkli tavşanlar kullanılmıştır. Cinsiyet farklılığı araştırılmadığından çalışmamız sadece erkek tavşanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Retinal harabiyetlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kortikosteroidler yanısıra nöroprotektif bileşikler olarak da adlandırılan

maddeler sinir doku yapılarında oluşan hasarların tedavisinde yaygın kullanıma sahiptir (6, 9, 10, 79, 90, 91). Temel işlevleri nöronları desteklemek olan glial hücreler, merkezi sinir sisteminin her bölgesinde bulunur. Travma, nörodejenerasyon, inflamatuvar hastalık veya eksitotoksisite sonucu merkezi sinir sistemi homeostazı bozulduğunda glial hücreler aktifleşir ve reaktif gliosis geçirirler (92-96). Bu süreç, nöronların korunma ve tamirinde önemli olduğu düşünülen gen ekspresyonunda değişiklikler ve hücre çoğalması ile karakterizedir (92, 94, 96-98). Glial-nöronal etkileşimlerin yararlarının yanı sıra, glial hücre aktivasyonunun bazı durumlarda zararlı olduğu ve hastalıkların ilerlemesine yol açtığı da düşünülmektedir (97).

Tüm omurgalıların retinası multipotent retinal projenitör hücrelerden farklıdır. Erişkin memeli retinasında, retinal stem hücreler, pigmentsiz silyar kenarda tanımlanmıştır. *In vitro* çalışmalarda, bu stem hücrelerin çoğalma yeteneği olan ve birçok hücre tipine farklanabilen multipotent retinal projenitörler olduğu gösterilmiştir. Endojenöz projenitörler nörogenezin canlı kaynakları olabilir. Erişkin memeli retinası hasarlandığında nörojenik değişiklikler gösterir. Erişkin merkezi sinir sisteminde glial hücrelerin nöral rejenerasyona katıldıklarına ilişkin çok sayıda çalışma vardır (97-99). Erişkin memeli beyninin subventriküler zon astrositleri hem normal hem de rejenere olan beyinde nöral stem hücreler olarak davranırlar (97). Johansson ve arkadaşları ileri derecede farklanmış glial hücreler olan ependimal hücrelerin multipotent glial hücreler olduğunu göstermiştir (99, 100). Omurgalı retinası merkezi sinir sisteminin diğer bölgelerinde bulunmayan bir özel tip glial hücre olan Müller hücrelerini içerir. Retinada yer alan Müller hücrelerinin de retinal hasarı takiben stem hücreler olarak davranabileceği öne sürülmüştür (94, 101). Balık ve kuşlarda Müller hücreleri, retinal hasara yanıt olarak dedifferensiyasyon olur, çoğalır ve yeni nöronlar oluştururlar. Kemiricilere ait Müller hücrelerinin de toksik hasarı takiben çoğalabildiği ve bipolar hücreler ile rod fotoreseptörlerini oluşturduğu gösterilmiştir (102). Bu bilgiler, Müller hücrelerinin erişkin memeli retinasının rejenerasyonu için potansiyel bir kaynak olduğunu göstermiştir. Merkezi sinir sisteminin diğer glial hücreleri

gibi Müller hücreleri de akut retinal hasar veya kronik nöronal stresi takiben reaktif gliosis geçirirler (99, 101, 103). Müller hücre gliosisi; çoğalma (103), nestin, vimentin, GFAP gibi intermedier filamentlerin üretimindeki değişiklikten dolayı hücre şeklinde ortaya çıkan değişiklikler, iyon transport özelliklerinde değişiklikler (104) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi sinyal moleküllerinin salgılanması (102, 105) ile karakterizedir. VEGF, nöroprotektif potansiyele sahip önemli bir trofik faktör olarak bilinir (102, 105). Ancak retina hasarlandığında erişkin memeli retinaları nörojenik değişiklikler göstererek rejeneratif süreçlere katılabilmektedir. Bu süreçte, Müller hücreleri nöral stem hücreler olarak temel rol oynarlar. Örneğin kendilerini yenilerler, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak retinal nöronları oluşturma potansiyelleri vardır (106).

Gliosis, retinal nöronların korunması ve tamiri için gereklidir. Ancak diyabetik retinopati gibi bazı patolojiler reaktif gliosis ile ağırlaşabilir (102, 104, 105). Glial hücre aktivasyonu ve gliosis sırasında bu hücrelerdeki değişiklikleri indükleyen çevresel faktörler iyi bilinmesine karşın, bu sürecin nasıl düzenlendiği hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Akut retinal hasarı takiben glial fibriler asidik proteinin (GFAP) hızlı düzenlenimi ile Müller hücre şeklindeki değişiklikler ve Müller glial hücre çoğalması reaktif gliosisin ilk bulgularıdır (103, 107). Merkezi sinir sistemindeki çeşitli nöropatolojik durumlarda reaktif gliosisin rolü çalışılmıştır (108, 109).

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), merkezi sinir sisteminde hücreyel olaylarla ilişkili proliferatif, rejeneratif ve canlılığı sürdürmede işlevi olan çok yönlü bir büyüme faktörüdür (78, 110). Hasar yerinde endojenöz bFGF düzeyinin artışının saptanması, hücre içi ve hücre dışı kaynaklardan salınmasının ve/veya aktivasyonunun bu süreçte düzenleyici rol oynayabildiğini göstermektedir (11, 70, 71, 75, 90, 111). Çalışmalarda ekzojenöz bFGF uygulamasının sadece hasar bağımlı sonuçları taklit etmede değil, aynı zamanda hasar sonrası nöron canlılığının sürdürülmesine de yardım eder, nöron olmayan retinal hücrelerde çoğalmayı indükler (112-114) ve retinal glial hücrelerde intermedier filament proteinlerinin ekspresyonunu artırır (114). Işık hasarlı retinalar (111, 115-117) ve retinal distrofik sıçanlarda da (115)

fotoreseptör hücre dejenerasyonu ve kaybını önler veya geciktirir. Optik sinir kesisi sonrası gangliyon hücre aksonlarının yenilenmesine öncülük eder (118) ve retinaları çıkarılmış civciv embriyolarında tüm retinanın yenilenmesini uyarır (119). Bazik FGF'nin merkezi sinir sisteminin bazı bölgelerine uygulanmasının aksonal hasarı takiben nöronal ölüm derecesini azalttığı gösterilmiştir. Bazik FGF, retinal dejenerasyonun bazı formlarında nöral retinada ve retinal pigment epitelinde bulunduğundan merkezi sinir sistemindeki gibi retinal rejenerasyonda rol alır (8).

Bazik FGF, hem yüksek affiniteli hücre yüzey tirozin kinaz reseptörlerine hem de düşük affiniteli ekstrasellüler matriks reseptörlerine bağlanır. Ekstrasellüler matrikste heparan sülfat içeren moleküllere bFGF bağlanmasının, yüksek affiniteli reseptörlerle fonksiyonel etkileşim için gerekli olduğu düşünülmektedir (120). Çoğu büyüme faktöründe olduğu gibi, reseptör-ligand kompleksi daha sonra zaman zaman hücre içerisine alınır (121). Yüksek konsantrasyonda bFGF içeren retinada immün yerleşim ve in situ hibridizasyon çalışmaları, bFGF'nin çeşitli hücreler ve hücre dışı alanlarda varlığını doğrulamıştır (31, 72, 77, 111, 122).

Anti-bFGF kesitlere uygulandığında, bağlanma iç ve dış pleksiform tabakalar yanı sıra retinal bazal membran üzerinde saptanmıştır (122). Varsayılan yüksek affiniteli bFGF reseptörleri; fotoreseptörler (122-126), Müller hücreleri (125), retinal pigment epitel hücreleri (126-128) ve ganglion hücrelerini (121, 129) içeren bir çok retinal hücre tipinde tanımlanmıştır. Ekzojenöz bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) uygulanması retinal dekolman gibi hasarlarda nöronal olmayan retinal hücre çoğalmaları için uyarı niteliği taşır (130).

Nestin, ilk kez Hockfield ve McKay tarafından 1985 yılında bir monoklonal antikor ile tanımlanmış bir intermedier filament proteindir (131). Nestin, gelişen merkezi sinir sisteminde nöral tüpteki stem hücrelerinde belirgin olarak eksprese edilir. Terminal nöral farklılaşma tamamlanınca nestin azalır ve nörofilamentlerle yer değiştirir. Nestin aynı zamanda glioma ve glioblastomalarda da saptanmıştır. Nestine karşı geliştirilen antikorlar, sinir sisteminde çoğalan nöral progenitör hücreler için bir belirteç olarak çok kullanılmaktadır. İnsan nestin proteini, 856 amino

asitten oluşur ve moleküler ağırlığı 240 kDa kadardır (58). Bu çalışmada, lazer uygulamasından sonra bFGF uygulanan deneklerde nestin-pozitif hücreler koroidal damarlar çevresinde, pigment epiteli tabakasında ve rejenerasyon alanlarında yoğun olarak izlenmiştir.

Gial fibriler asidik protein (GFAP), tip III intermediet filament protein ailesinin bir üyesidir. Merkezi sinir sisteminin diğer bazı astrositlerinde, periferik ganglionların satellit hücrelerinde ve periferik sinirlerdeki miyelinsiz Schwann hücrelerinde kuvvetli ve spesifik olarak eksprese edilir. Nöral stem hücreler sıklıkla kuvvetli olarak GFAP'ı da eksprese ederler. Bu nedenle, GFAP'a karşı antikolar astrositler için çok kullanışlı belirteçlerdir. Astrosit kökenli beyin tümörlerinde GFAP kuvvetli olarak eksprese edilir. Çalışmamızda glial fibriller asidik protein-pozitif hücre sayısı kontrol grubu tavşan retinalarında oldukça az sayıda izlenirken, diyot lazer ardından bFGF uygulanan tavşan retinalarında hasar bölgesinin merkezi alanlarında diğer bölgelere ve kontrol grubuna göre glial fibriller asidik protein-pozitif hücre sayısı daha fazla idi. Çalışmamızda retinanın amakrin, Müller, bipolar ve horizontal hücrelerin gövdelerinin bulunduğu iç nükleer tabakası yanı sıra fotoreseptörler ile bipolar hücrelerin arasındaki sinapsların yer aldığı dış pleksiform tabakalarında daha kuvvetli GFAP immünoreaktivitesi saptandı.

Tavşan gözlerine fokal lazer uygulaması hem rodlarda hem de konaracılıklı retinal işlevlerde lokal ve geniş-dağılımlı değişiklikleri uyarır. Elektrofizyolojik anormalliklere rod-bipolar hücrelerde ve bu hücrelerden lazerlenmiş alanın daha da uzağına ulaşarak PKC alfa izoenziminin giderek azalması eşlik eder (132). PKC alfa zayıflayan protein sentezi ile direkt olarak ve olasılıkla GFAP artışına bağlı olarak protein tüketimi ile de indirekt olarak azaltılır (132). Fokal lazer fotokoagülasyonu, iç retinal sinyal geçişini PKC-alfa- aracılıklı inhibitör regulasyonu ile engeller (132). Tavşan retinalarına fokal diyot lazer uygulaması yaptığımız bu çalışmada hem bölgesel hem de komşu alanlarda morfolojik değişikliklere yol açmıştır. Dış nükleer tabakanın hasar alanlarında tamamen ortadan kalktığı, retinal pigment epiteli hücrelerinin intraretinal göçü, hasar alanı ile hasara komşu alanların temasta kalmaları, hasar alanında GFAP'ın artışı

gibi bulgularımız Wallentén ve arkadaşlarının (132) bulguları ile uyum göstermiştir.

Çalışmamızda Ki-67 ekspresyonları fokal lazer fotokoagülasyonu ardından bFGF uygulanan grupta zayıf olarak izlendi. Kohno (2006) yaptığı çalışmada Ki-67 ekspresyonunun lazer uygulamasından sonraki saatler ve günde arttığını ancak daha sonra immünoaktivitenin giderek azaldığını saptamıştır (133). Bizim çalışmamızda retina örnekleri 10. günde alındığından bFGF'li grupta zayıf Ki-67 immüno lokalizasyonu izlendi.

Fokal lazer fotokoagülasyonu ardından tamir süreci sırasında görülen genişlemiş koroidal kapiller damarlar, bu alanda kan akımının arttığını göstermektedir. Tavşan retinaları avasküler olduğundan retinanın kanlanması koroidal kan damarlarından sağlanmaktadır.

Kullanılan diyot lazer etkisi ile retina pigment epitelinin önemli ölçüde etkilenmiş olması, lazer uygulamasından hemen sonra bFGF uygulanmadığında hasarın daha belirgin olması, retina pigment epiteli ve Bruch membranının özellikle hasar alanının merkezinde kesintiye uğraması ya da tamamen ortadan kalkması bu tabakadaki kromoforlar tarafından radyasyonun absorbe edilmesi olabilir. Melanin ise bilindiği gibi retinada bulunan temel kromofordur.

Sonuç olarak, diyot lazer uygulaması klinikte yoğun olarak kullanılmasına rağmen lazerin uygulandığı alan ve bu alana komşu bölgelerde önemli hasara yol açtığı, ancak uygulamayı takiben büyüme faktörlerinden bFGF kullanımı ile retina tabakaları ve hücrelerinin morfolojilerinde belirli oranlarda normale geri dönüş olduğu ileri sürülebilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

### Sonuçlar:

- ✓ Tavşan gözlerine fokal diyot lazer uygulaması ile:
  - Hem bölgesel hem de komşu alanlarda morfolojik değişikliklere yol açmıştır.
  - Yanık bölgesine komşu normal retina tabakalarının aşağıya koroide doğru çökmeye başlamadığı,
  - Yanık alanının komşu alanlara göre yüzeye doğru kalınlaşarak çıkıntı yaptığı,
  - Retinal lezyonlarda onuncu günde en çok etkilenen tabakanın dış nükleer tabaka olduğu,
  - Dış nükleer tabakada yıkım ile yanık lezyonunun merkezi kısmında çekirdek kayıpları olduğu,
  - Dış nükleer tabaka önemli ölçüde incelendiği, yer yer alanlarında tamamen ortadan kalktığı,
  - İç nükleer tabakanın koroide doğru invagine olduğu, iç nükleer tabakada çoğalan hücrelerin oldukça büyüdüğü, ökromatik çekirdekleri, genellikle periferal yerleşimli çekirdekçikleri olduğu,
  - İç nükleer tabaka hücreleri arasında geniş ödematöz alanların yer aldığı,
  - Lezyona komşu alanlarda bol mitotik figürler olduğu,
  - Lezyonun orta hattında retinal pigment epitel tabakasının da devamlılığını yitirerek kesintiye uğradığı,
  - GFAP, vimentin, Ki-67 ve nestin ekspresyonlarının hasar alanlarında arttığı izlenmiştir.
- ✓ Tavşan gözlerine fokal diyot lazer uygulamasından hemen sonra transskleral olarak ekzojenöz bFGF uygulanması ile:
  - Brush membranının ve retinal pigment epiteli tabakasının

bütünlüğünü koruduğu,

- Koroidal kapiller damarların genişlediği,
- Pigmentli retinal hücrelerin intraretinal göçleri,
- Hasar alanındaki iç nükleer tabaka hücrelerinin hasar alanının merkezine göre sayıca giderek azalarak invagine olduğu,
- İç nükleer hücre tabakasının hücre kat sayısının azaldığı, özellikle hasar alanına komşu bölgelerin dış pleksiform tabaka tarafından doldurulduğu,
- Hasar alanının sklera ve vitröze doğru evaginasyonunun azaldığı,
- GFAP, vimentin, Ki-67 ve nestin ekspresyonlarının tamir alanlarında diyot lazer grubu ile karşılaştırıldığında daha da arttığı,
- Retina tabakalarının daha düzenli organize olduğu ve yara iyileşmesinin önemli ölçüde başarılı olduğu görülmüştür.

#### **Öneriler:**

- Diyot lazer uygulaması-görme kaybı ilişkisi ve bFGF ile görme kayıpları geri döndürülebilir mi? sorusuyla yeni bir çalışma planlanabilir.
- Lazer ile hasar ve bFGF'nin yara iyileşmesi üzerine etkisinin daha iyi izlenebilmesi için 1., 3. 5. günlük deney grupları eklenerek yeni bir çalışma planlanabilir.
- Lazer uygulaması etkisini azaltmak için kullanılan bFGF'nin farklı dozlardaki etkileri araştırılabilir.
- bFGF'nin topikal uygulamadaki etkileri çalışılabilir.
- Pigmentli retina hücrelerini hedefleyen yeni bir çalışma planlanabilir.
- Pigmentli retina hücreleri ve Müller hücre kültürleri hazırlanarak bFGF etkisi incelenebilir.
- Retina doku kültürleri üzerinde bFGF etkisi araştırılabilir.
- Diyot lazer, diyot lazer+bFGF uygulamalarının retina hücreleri ve tabakaları üzerine etkileri morfometrik yöntemler kullanarak kantitatif olarak araştırılabilir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Brancato R, Pratesi R: Applications of diode lasers in ophthalmology. *Lasers Ophthalmol.* 1; 119-29, 1987.
2. Stuck BE and Beklin M (Eds.): *Laser Inflicted Eye Injuries*. SPIE: Bellingham, 188-191, 1996.
3. Stuck BE, Zwick H, Molchany JW, Lund DJ: Accidental human laser retinal injuries from military laser systems. *SPIE*: 2674, 7, 20, 1996.
4. Zwick H, Gagliano D, Zuclich JA, Stuck BE, Belkin M: Laser induced retinal nerve fiber layer (NFL) damage. In: Parel JM, *Ophthalmic Technologies*. SPIE: Bellingham, pp. 330-337, 1995.
5. Mellerio J, Marshall J, Tegroth B, Anderberg B, Wolbrasht M: Battlefield laser weapons: an assessment of systems, hazards, injuries and ophthalmic resoucers required for treatment. *Laser and Light in Ophthalmol.* 4, 41, 67, 1991.
6. Belkin M, Rosner M, Solberg Y, Turetz Y, Rol Pascal O, Joos Karen M, Manns Fabrice, Stuck Bruce E: Neuroprotective therapy for argon-laser induced retinal injury. *Congrès Ophthalmic technologies IX*, San Jose CA, 23-25 January 1999.
7. Belokopytov M, Dubinsky G, Belkin M, Epstein Y, Rosner M: Development and recovery of laser-induced retinal injury in rats. *Ophthalmic Technologies XV*. Edited by Manns F, Soederberg, PG, Ho A, Stuck, BE, Belkin M: *Proceedings of the SPIE*, 5688, 312-319, 2005.
8. Schuschereba TS, Bowman PD, Ferrando RE, Lund DJ, Quong JA and Vargas J A: Accelerated healing of laser-injured rabbit retina by basic fibroblast growth factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 pp. 945–954, 1994.
9. Fischer AJ, Schmidt M, Omar G, Reh TA: BMP4 and CNTF are neuroprotective and suppress damage-induced proliferation of Muller glia in the retina. *Mol Cell Neurosci* 27:531-42, 2004.

10. Fisher M, Meadows ME, Do T, Weise J, Trubetsky V, Charette M, Finklestein SP: Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15, 953-959, 1995.
11. Fischer AJ, McGuire CR, Dierks BD, Reh TA: Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J Neurosci*, 22:9387-98, 2002.
12. Fischer AJ and Reh TA: Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia*, 43:70–76, 2003.
13. Wright LL, Macqueen CL, Elston GN, Young HM, Pow DV, Vaney DI: The DAPI-3 amacrine cells of the rabbit retina. *Vis Neurosci*, 14(3):473-92, May-Jun 1997.
14. Moore KL, Persaud TVN: *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, With The Collaboration of Mark G. Torchia. 8 th ed., pp: 419-430, Saunders- Elsevier; Elsevier Science Health Science div, Saint Louis, Page Count: 522, September 2007.
15. Carlson BM: *Human Embryology and Developmental Biology*, Mosby Year Book Inc., St. Louis, MS, 1994.
16. Sadler TW: *Langman's Medical Embryology*, 10th ed.; Chapter: Eye, 415-426, Lippincott Williams & Wilkins; Hagerstown, Page Count: 371, 2008.
17. Diaz-Araya C and Provis JM: Evidence of photoreceptor migration during early foveal development: a quantitative analysis of human fetal retinae. *Visual Neurosciences*: 8:505-514, 1992.
18. Yuodelis C and Hendrickson A: A qualitative and quantitative analysis of the human fovea during development. *Vision Res.* ,26(6):847-55, 1986.
19. Mann I: *The Development of The Human Eye*. New York: Grune & Stratton, 1964.
20. Provis JM, Provis CM, Diaz and B. Dreher: Ontogeny of the primate fovea: a central issue in retinal development. *Prog. Neurobiol.* 54, 549–580, 1998.

21. Tretiach ML: Bovine Models of Human Retinal Disease: Effect of Perivascular Cells on Retinal Endothelial Cell Permeability. PhD Thesis (Medicine), University of Sydney, Department of Clinical Ophthalmology, Sydney Digital Theses, <http://hdl.handle.net/2123/1153>, 143 pages, 2006.
22. Standring S: Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice. Thirty-ninth Ed. Elsevier Churhil Livingstone, Chapter 41-42-43, 681-723, Lemp MA: Clinical Anatomy of the Eye. Blackwell Scientific Publication, 159-167, Edingburg, United Kingdom, 2005.
23. Kierszenbaum AL: Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş. Çeviri Editörü Ramazan Demir, Sayfa:227- 250, Palme Yayıncılık, Mayıs 2006.
24. Junqueira LC, Carneiro J: Temel Histoloji (Çeviri Editörü: Aytekin Y, Solakoğlu S) Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN: 975-420-467-5, Sayfa: 43-51, 2003.
25. Petra Köpf-Maier: Wolf-Heidegger'in İnsan Anatomisi Atlası Cilt: 2 (Çeviri Editörü: Elhan A.) Güneş Kitabevi, ISBN: 975-8531-14-X, Sayfa: 374, 2001
26. Stone J, Dreher Z: Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. The Journal of Comparative Neurology, 255 (1):35–49, 1986.
27. Leventhal AG, Schalla DJ and Ault SJ: Extrinsic Determinants of Retinal Ganglion Cell Structure In the Cat. The Journal of Neuroscience, 8(8): 2028-2038, June 1988.
28. Sezen F: Göz Hastalıkları. Palme Yayıncılık, 299-302, Ankara, 2001.
29. Wilkinson-Berka JL: Diabetes and retinal vascular disorders: role of the renin-angiotensin system. Expert reviews in molecular medicine. Cambridge University Press 6 (15):1-18, 2004.
30. Curcio CA and Allen KA: Topography of ganglion cells in human retina. J Comp Neurol; 300:5-25,1990.
31. Gao H. and Hollyfield JG: Basic fibroblast growth factor (bFGF) immunolocalization in the rodent outer retina demonstrated with an anti-rodent bFGF antibody. Brain Res. 585, 355-60, 1992.

32. Wassle H, Boycott BB and Röhrenbeck J: Horizontal cells in the monkey retina: cone connections and dendritic network . *Eur J Neurosci.* 1(5):421-435, 1989.
33. Wassle H, Grünert U, Röhrenbeck J, Boycott BB: Retinal ganglion cell density and cortical magnification factor in the primate. *Vision Research*, 30(11):1897-911, 1990.
34. Wassle H and Boycott BB: Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* 71: 447-480, 1991.
35. Polyak SL: *The Retina*. University of Chicago Press, Chicago, 1941.
36. Kolb H, Nelson R, Ahnelt P, Cuenca N: Cellular organization of the vertebrate retina. In: Kolb H, Ripps H, Wu S, eds, *Concepts and Challenges in Retinal Biology: A Tribute to John E Dowling*, Amsterdam: Elsevier Science. 3–26, 2001.
37. Blanks JC: Morphology and topography of the retina. In: Ogden TE, Hinton DR, eds. *Retina*. St. Louis: Mosby-Year Book, 32-53, 2001.
38. Penfold PL, Madigan MC, Provis JM: Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci.* 7: 383-388, 1991.
39. Provis JM, Penfold PL, Edwards AJ, van Driel D: Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia*, Aug;14(4):243-56,1995.
40. Penfold PL, Provis JM, Liew SCK: Human retinal microglia express phenotypic characteristics in common with dendritic antigen-presenting cells. *Journal of Neuroimmunology* Volume 45, Issue 1-2, Pages 183-192, 1993.
41. Egensperger R, Maslim J, Bisti S, Holländer H, Stone J: Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). *Brain Res Dev Brain Res*, Nov 22;97(1):1-8, 1996.
42. Becher B and Antel JB: Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia*, 18:1-10, 1996.

43. Zeng XX, Yee-Kong NG and Eng-Ang L: Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visual Neuroscience*, 17:3:463-471, 2000.
44. Ling EA, Ng YK, Wu CH, Kaur C: Microglia: Its development and role as a neuropathology sensor. *Prog Brain Res.* 2001;132:61-79, 2001.
45. Watanabe T and Raff MC: Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature*, 332: 834-837, 28 April, 1988.
46. Sandercoe TM, Madigan MC, Billson FA, Penfold PL, Provis JM: Astrocyte proliferation during development of the human retinal vasculature. *Experimental eye research*, 69(5):511-23, 1999.
47. Ogden TE: Nerve fiber layer astrocytes of the primate retina: morphology, distribution, and density. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 17:499-510, 1978.
48. Hollander H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling TL, Stone J: Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells. *J Comp Neurol*; 313: 587-603. 1991.
49. Dreher B, Robinson SR: Development of the retinofugal pathway in birds and mammals: Evidence for a common 'timetable'. *Brain Behav Evol*, 31:369-390, 1988.
50. Schnitzer J: Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci Letters* 78:29–34, 1987.
51. Schnitzer J: Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia*, 1(1):74-89, 1988.
52. Mudhar HS, Pollock RA, Wang C, Stiles CD, Richardson WD: PDGF and its receptors in the developing rodent retina and optic nerve. *Development* 118: 539-552, 1993.
53. Provis JM, Leech J, Diaz CM, Penfold PL, Stone J, Keshet E: Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression, *Exp. Eye Res.* 65, pp. 555–568, 1997.

54. Puro DG and Stuenkel LE: Thrombin-induced inhibition of potassium currents in human retinal glial (Muller) cells. *Journal of Physiology*, 485.2, pp. 337-348, 1995.
55. Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P: Review of pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res*, 36:241-249, 2004.
56. Güneş HV: Moleküler Hücre Biyolojisi. Kaan Kitabevi. I. Baskı. ISBN: 975-6787-05-8, Sayfa: 86-121, 2003.
57. Pollard TD, Earnshaw WC: *Cell Biology*. Elsevier Science (USA) ISBN: 0-7216-3997-6, Sayfa: 557-617, 2002.
58. Cooper GM, Hausman RE: *Hücre (Moleküler Yaklaşım)*. Çeviri Editörü: Sakızlı M, Atabey N, İzmir Tıp Kitabevi, üçüncü baskı. ISBN: 9944-5148-0-2, sayfa: 435-482, 2006.
59. Hausman RE: Ocular extracellular matrices in development. *Progress in Retinal and Eye Research*. 26, 162-188, 2006.
60. Lewis GP and Fisher SK: Up-regulation of glial fibrillary protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol*, 230:263-90, 2003.
61. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing 4<sup>th</sup> Eds. ISBN: 0815332181, 907-982, 2002.
62. Katsumoto T, Mitsushima A, Kurimura T: The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol Cell*. 68(2): 139-146, 1990.
63. Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. Mar;182(3): 311-22, 2000.
64. Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z: Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 9:203-226, 1990.
65. D'Amore PA: Heparin-endothelial cell interactions. *Haemostasis*, Suppl 1:159-165, 1990.

66. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A: Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 7 165–197, 2000.
67. Ago H, Kitagawa Y, Fujeshima A, Matsuura Y, Katsube Y: Crystal structure of basic fibroblast growth factor at 1.6Å resolution. *J Biochem*; 110: 360-3, 1991.
68. Kitchens DL, Snyder EY, Gottlieb DI: FGF and EGF are mitogens for immortalized neural progenitors. *J Neurobiol*, 25: 797-807, 1994.
69. Zhang GH, Ichimura T, Wallin A, Kan M, Stevens JL: Regulation of rat proximal tubule epithelial cell growth by fibroblast growth factors, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta, and analysis of fibroblast growth factors in rat kidney. *J Cell Physiol*, 148: 295-305, 1991.
70. Eckenstein FP, Shipley GD, Nishi R: Acidic and basic fibroblast growth factors in the nervous system: distribution and differential alteration of levels after injury of central versus peripheral nerve. *Journal of Neuroscience*. 11, 412-19, 1991.
71. Finklestein SP, Apostilides PJ, Caday CG, Prosser J, Prosser J, Philips MF, Klagsbrun M: Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds. *Brain Res*. 460, 252-9, 1988.
72. Logan A: A time course for the focal elevation of synthesis of basic fibroblast growth factor and one of its high-affinity receptors (Ig) following a localized cortical brain injury. *J. Neurosci*. 12, 3828-37, 1992.
73. Ma J, Qiu J, Hirt L, Dalkara T, Moskowitz MA: Synergistic protective effect of caspase inhibitors and bFGF against brain injury induced by transient focal ischemia, *Br. J. Pharmacol.*, 133, 345-350, 2001.
74. Logan A: Acidic and basic fibroblast growth factor genes show individual time-related responses following central nervous system lesion. *J. Endocrinol*. 124, 47, 1990.

75. Frautschy SA, Walicke PA and Baird A: Localization of basic FGF and its mRNA after CNS injury. *Brain Res.* 553, 291-9, 1991.
77. Baird A, Walicke, PA.:Fibroblast growth factors. *Br. Med. Bull.*, 45, 438-452, 1989.
76. Baird A, Walicke, PA: Fibroblast growth factors. *Br. Med. Bull.*, 45, 438-452, 1989.
77. Baird A, Esch F, Gospodarowicz D and Guillemin R: Retina- and eye-derived endothelial growth factors: partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry* 24, 7855-60, 1985.
78. Baird A, Bohlen P: Fibroblast growth factors. In: *Peptide Growth Factors and their Receptors* (Eds.Sporn MB and Roberts AB), 369-418, Springer, Berlin, 1990.
79. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB: Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine Rev.*, 18, 26-45 ,1997.
80. Smiddy WE, Fine SL, Quigley AJ, Hohman RM, Addicks EM: Comparison of krypton and argon laser photocoagulation in primate retina. *Arch Ophthalmol.* 102:1086-1092, 1984.
81. McHugh JDA, Marshall J, Ffytche TJ, Hamilton AM, Raven A: Macular photocoagulation of human retina with a diode laser: a comparative histopathological study. *Lasers Light Ophthalmol.* 3:11-28, 1990.
82. Balles MW, Puliafito CA, D'Amico DJ, Jacobsen JJ, Birngruber R: Semiconductor diode laser photocoagulation in retinal vascular disease. *Ophthalmology.* 97:1553-1561, 1990.
83. Noyori K, Noyori S, Ohki R: Clinical trial of diode laser photocoagulator: preliminary report. *Lasers Light Ophthalmol.* 3:81-87, 1990.
84. Striedinger K, Petrasch-Parwez E, Zoidl G, Napirei M, Meier C, Eysel UT: Loss of connexin 36 increases retinal cell vulnerability to secondary cell loss. *Eur J Neurosci* 22, 605–616, 2005.
85. Barkana Y, Berkin M: Laser eye injuieres. *Surv Ophthalmol*, 44 (6), 459-478, May–June 2000.



86. Öz Ö, Gider M: Retina Hastalıkları ve Diode Lazer. 8:292-300, Ret-vit 2000.
87. Brancato R, Pratesi R, Leoni G, et al: Histopathology of diode and argon laser lesions in rabbit retina. Invest Ophthalmol & Vis. Sci. 30(7); 1504-10, 1989.
88. Marshall J, Bird A: A comparative histopathologic study of argon and krypton laser irradiations of the human retina. Br J Ophthalmol. 63:657-668, 1979.
89. Sliney DH: Intreaction mechanisms of laser radiation with ocular tissues. Lasers and Light In Ophtalmology, 2:222, 1988.
90. Blanco RE, Lopez-Roca A, Soto J, Blagburn JM: Basic fibroblast growth factor applied to the optic nerve after injury increases long-term cell survival in the frog retina. J. Comp. Neurol, 7;423(4):646-58, 2000.
91. Garcia M, Vecino E: Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. Histol Histopathol, 18, 1205-18, 2003.
92. Ide CF, Scriptor JL, Coltman BW, Dotson RS, Snyder DC, Jelaso A: Cellular and molecular correlates to plasticity during recovery from injury in the developing mammalian brain. Prog. Brain Res. 108, 365-377, 1996.
93. Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT: Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for Inflammation and gliosis. Experimental Neurology, 152, 74-87, 1998.
94. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA: Reactive microgliosis. Prog. Neurobiol. 57, 563-581, 1999.
95. Streit WJ: Microglial response to brain injury a brief synopsis. Toxicol. Pathol. 28, 28-30, 2000.
96. Unger JW: Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. Microsc. Res. Tech. 43, 24-28, 1998.

97. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH: Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20, 570–577, 1997. [erratum appears in *Trends Neurosci.* 21, 80, 1998.
98. Wilson JX: Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 1149–1163, 1997.
99. Humphrey MF, Constable IJ, Chu Y, Wiffen S: A quantitative study of the lateral spread of Muller cell responses to retinal lesions in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 334, 545–558, 1993.
100. Johansson BC, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frise J: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, Vol. 96, 25–34, January 8, 1999.
101. MacLaren RE: Development and role of retinal glia in regeneration of ganglion cells following retinal injury. *Br. J. Ophthalmol.* 80, 458–464, 1996.
102. Sueishi K, Hata Y, Murata T, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H: Endothelial and glial cell interaction in diabetic retinopathy via the function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Pol. J. Pharmacol.* 48, 307–316, 1996.
103. Sahel JA, Albert DM, Lessell S: Proliferation of retinal glia and excitatory amino acids. *Ophtalmologie* 4, 13–16, 1990.
104. Reichenbach A, Faude F, Enzmann V, Bringmann A, Pannicke T, Francke M, Biedermann B, Kuhrt H, Stolzenburg JU, Skatchkov SN, Heinemann U, Wiedemann P, Reichelt W: The Muller (glial) cell in normal and diseased retina: a case for single-cell electrophysiology. *Ophthalmic Research.* 29, 326–340, 1997.
105. Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Eliot D, Puklin JE, and Abrams GW: Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 36–47, 1997.
106. Das AV, Mallya KB, Zhao X, Ahmad F, Bhattacharya S, Thoreson WB, Hegde GV, Ahmad I: Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev*

- Biol,1;299 (1):283-302, Epub 2006 Jul 29, Nov 2006.
107. Taomoto, M et al: Retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea in Syrian golden hamsters. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 236, 688–695, 1998.
  108. Hjelmeland LE, Harvey AK: In Progress in Retinal Research, Vol. 7 (Eds. Osborn N, Chader G). 259–281, Pergamon, New York, 1988.
  109. Dithmar S, Holz FG, Volcker HE: Massive reactive gliosis of the retina. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd*, 211, 338–341, 1997.
  110. Hicks D, Bugra K, Faucheux B, Jenny, JC, Laurent M, Malecaze F, Mascarelli F, Raulais D, Cohen Y, Courtois Y: Fibroblast growth factors in the retina. In Progress in Retinal Research, Vol. 11 (Eds. Osborn N and Chader G), 333-374, Pergamon Press: New York, USA, 1990.
  111. Gao H, Hollyfield JG: Basic fibroblast growth factor in retinal development: differential levels of bFGF expression and content in normal and retinal degeneration (rd) mutant mice. *Dev Biol*, 169(1):168-84, 1995.
  112. de Juan E, Staffansson E and Ohira A: Basic fibroblast growth stimulates H- thymidine uptake in retinal venular and capillary endothelial cells in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 1238-44, 1990.
  113. Eclancher F, Perraud F, Faltin J, Labourdette G, Sensenbrenner M: Reactive astrogliosis after basic fibroblast growth factor (bFGF) injection in injured neonatal rat brain. *Glia* 3, 502-9, 1990.
  114. Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK: Basic fibroblast growth factor: a potential regulator of proliferation and intermediate filament expression in the retina. *J. Neurosci.* 12,3968-78, 1992.
  115. Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM: Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature.* 347: 83-86, 1990.

116. Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM: Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J. Neurosci.* 12, 3554-67, 1992.
117. La Vail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH: Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 89,11249-53, 1992.
118. Sievers J, Hausmann B, Unsicker K, Berry M: Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci Lett.* 76, 157-62, 1987.
119. Park CM, Hollenberg MJ: Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev Biol.* 134 (1):201-5, 1989.
120. Yayon A, Klagsburn M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM: Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 64, 841-8, 1991.
121. Ferguson IA, Schweitzer JB, Johnson E M Jr: Basic fibroblast growth factor: receptor mediated internalization, metabolism, and anterograde axonal transport in retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 10,176-89, 1990.
122. Faucheux BA, Dupis C, Delarere P, Raulais D, Soubrane G, Vigney M, Hauw JJ, Courtois Y, Jeanny JC: Acidic fibroblast growth factor localization and basic fibroblast growth factor binding sites in the eye and optic nerve. In: *Growth Factors and Alzheimer's Disease* (Eds. Hefti F, Brachet PH, Will B), 1991.
123. Raymond PA: Immunolocalization of basic fibroblast growth factor and its receptor in adult goldfish retina. *Experimental Neurology.* 115, 73-8, 1992.
124. Mascarelli F, Raulais D, Courtois Y: FGF phosphorylation and receptors in rod outer segments. *EMBO J* , 8, 2265-73, 1989.

125. Mascarelli F, Tassin J, Courtois Y: Effect of FGFs on adult bovine Muller cells: proliferation, binding and internalization. *Growth Factors* 4, 81-95, 1991.
126. Fayein NA, Courtois Y, Jeanny JC: Ontogeny of basic fibroblast growth factor binding sites in mouse ocular tissues. *Exp. Cell Res.* 188, 75-88, 1990.
127. Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT: Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Current Eye Research.* 8, 1029-37, 1989.
128. Rakoczy PE, Humphrey MF, Cavaney DM, Chu Y, Constable IJ: Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in the retina of Royal College of Surgeons Rats. *Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 1845-52, 1993.
129. Torriglia A, Jeanny JC, Blanquet PR: Immunohistochemical analysis of fibroblast growth factor receptor in bovine retina. *Neurosci. Lett.* 172, 125-8, 1994.
130. Lewis GP, Fisher K, Anderson DH: Fate of biotinylated basic fibroblast growth factor in the retina following intravitreal injection. *Experimental Eye Research.* 62(3): 309-324, 1996.
131. Hockfield S and McKay RDG: Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 5, No. 12, pp. 3310-3328, 1985.
132. Wallentén KG, Malmjö M, Andréasson S, Wackenfors A, Johansson K, Ghosh F: Retinal function and PKC alpha expression after focal laser photocoagulation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 245:1815–1824, 2007.
133. Kohno H, Sakai T, Kitahara K: Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Epub 2005, Jan;244 (1):90-5, 2006.

## 8. EKLER

### 8. 1. ETİK KURUL KARARI

T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
DENEY HAYVANLARI  
ETİK KURULU

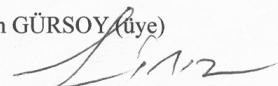
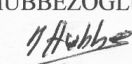
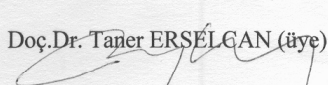
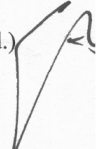
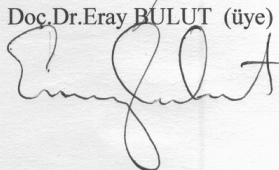
Sayı : :B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/176  
Konu : Hayvan Etik Kurul Hk.

01/03/2007

**Sayın Prof.Dr.Emel KOPTAGEL**

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA;**

01/03/2007 tarih ve 96 sayılı "Lazerle indüklenmiş retinopati üzerine bazik fibroblast büyüme faktörünün koruyucu etkisi" isimli Tıpta Uzmanlık Tezi Projesi Etik Kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Erol SEZER(üye) -ZİNLİ-	Doç.Dr. Sinan GÜRSOY(üye) 
Prof.Dr. Dilek ÖZTÜRK (üye) -ZİNLİ-	Yrd.Doç.Dr. İhsan HUBBEZOĞLU (üye) 
Prof.Dr. Şahende ELAGÖZ (üye) -ZİNLİ-	Yrd.Doç.Dr. Salih ÇETİNKAYA (üye ) -EMEKLİ-
Doç.Dr. Taner ERSELGAN (üye) 	Uzm.Vet.Dr.Yücel YALMAN(Başkan Yrd.) 
Doç.Dr.Eray BULUT (üye) 	Doç.Dr. M.Kemal YILDIRIM (Başkan) 