

Deneyisel Akut Retinal İskemi Modelinde Memantin Uygulamasının Nöron Koruyucu Etkisi ve Hiperbarik Oksijen Tedavisi ile Karşılaştırılması - Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal İnceleme*

Neuroprotective Effect of Memantine and Hyperbaric Oxygen Therapy After Acute Ischemia-Reperfusion Injury: Immunohistochemical Analysis

Serkan ERDENÖZ¹, Ulviye YİĞİT², Ersin OBA³, Ünal USLU⁴, Meltem CUMBUL⁵, Halil Hüseyin ÇAĞATAY⁶, Şamil AKTAŞ⁷

ÖZ

Amaç: Deney hayvanlarında oluşturulan akut retinal iskemi modelinde, NMDA reseptör antagonisti olan Memantin infüzyon yoluyla verilmesinden sonra retina gangliyon hücrelerindeki nöroprotektif etkilerinin değerlendirilmesi ve hiperbarik oksijen tedavisi ile karşılaştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 24 adet, Wistar cinsi, albino, 4-6 aylık, yaklaşık 200-300 gr. ağırlığındaki sıçanlar kullanıldı. Kontrol grubu hariç tüm deneklere iskemi-reperfüzyon modeli uygulandı. Gözlerine sadece sham uygulanan, herhangi bir tedavi verilmeyen ve 3. haftada sakrifiye edilen denekler (Kontrol grubu- K; 6 denek). İskemi sonrasındaki ilk saat içinde intavenöz olarak 25 mg/kg Memantin infüzyonu tedavisine alınan 3. haftada sakrifiye edilen denekler (Memantin grubu-M; 6 denek). İskemi takiben ilk 2 saat içinde tedavisine başlanan ve 9 gün süreyle hiperbarik oksijen tedavisi uygulanan ve 3. haftada sakrifiye edilen denekler (Hiperbarik oksijen grubu-HBO; 6 denek). Akut retinal iskemi uygulanan ancak tedavi uygulanmayan ve 3. haftada sakrifiye edilen denekler (Akut retinal iskemi grubu-ARI; 6 denek). Kardiyak perfüzyon işlemi ile sakrifiye edilen deneklerin gözleri enükle edildikten sonra stereolojik inceleme ile retina gangliyon hücre sayımı (RGH) sayımı ve Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) yöntemi ile apoptotik indeks analizi yapıldı.

Bulgular: Memantin ve HBO gruplarıyla, kontrol grubu arasında RGH sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, bu iki grupla ARI grubu arasında anlamlı fark saptandı. Apoptotik indekslerin karşılaştırılmasında da Memantin ve HBO grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Yine apoptotik indeks karşılaştırılmasında HBO ve Memantin gruplarıyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Sonuç: Memantin akut retinal iskemi modelinde intravenöz yoldan verildiğinde, tek dozla dahi, nöron koruyucu etki göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut retinal iskemi modeli, memantin, hiperbarik oksijen tedavisi, retina gangliyon hücre sayımı, apoptotik indeks.

ABSTRACT

Purpose: This study applies treatment methods to rat retina subjected to acute ischemia-reperfusion injury and compares by histopathological examination the efficacy of Memantine and hyperbaric oxygen therapy.

Material and Methods: Twentyfour adult Wistar albino rats were divided into four groups after retinal ischemia was induced by elevating the intraocular pressure to 120 mmHg. The groups were: Group 1: Control group, right eyes were cannulated with a 30 gauge needle and removed without causing any intraocular pressure change. Group 2: Memantine treatment group, animals were given single dose of intravenous 25 mg/kg Memantine by tail vein route after inducing acute retinal ischemia. Group 3: Hyperbaric oxygen (HBO) therapy group, in two hours following acute retinal ischemia HBO treatment was applied for nine days. Group 4: Acute retinal ischemia model but without treatment (ARI).

Results: Twenty-one days after establishing ischemia-reperfusion, the right eyes were enucleated after cardiac glutaraldehyde perfusion method, and then submitted to histological evaluation. In average, the total retinal ganglion cell count (RGCC) was 239.93±8.60 in control group; 125.14±7.18 in ARI group; 215.89±8.36 in Memantine group and 208.69±2.05 in HBO group. Mean apoptotic index in groups were 0.03±0.02; 0.5±0.03; 0.22±0.05 and 0.08±0.03 respectively.

Conclusion: The present study shows that Memantine and HBO therapy was effective in reducing the damage induced by acute ischemia-reperfusion in rat retina. Our study suggests that these treatments had beneficial effects due to neuroprotection, and therefore may be applied in clinical practice.

Key Words: Acute retinal ischemia model, memantine, hyperbaric oxygen therapy, retinal ganglion cell counts, apoptotic index.

* Bu çalışma TOD 44. Ulusal Oftalmoloji Kongresi'nde sunulmuştur.

- 1- M.D., Akyazı State Hospital, Eye Clinic, Sakarya/TURKEY
ERDENÖZ S., serkanerdenoz@gmail.com
- 2- M.D., Bakırköy Training and Research Hospital, Eye Clinic, İstanbul/TURKEY
YİĞİT U., ulviyeyigit@hotmail.com
- 3- M.D. Professor, Kafkas University Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, İstanbul/TURKEY
OBA E., ersinobayahoo.com
- 4- M.D. Asistant Professor, Yeditepe University Medical Faculty, Department of Histology, İstanbul/TURKEY
USLU U., unaluslu@yeditepe.edu.tr
- 5- M.D., Yeditepe University Medical Faculty, Department of Histology, İstanbul/TURKEY
CUMBUL M.,
- 6- M.D. Asistant Professor, Kafkas University Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, İstanbul/TURKEY
ÇAĞATAY H.H., drhcgty@gmail.com
- 7- M.D. Professor, İstanbul University, İstanbul Medical Faculty, Department of Underwater Medicine and Hyperbaric Medicine, İstanbul/TURKEY
AKTAŞ S., saktas@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi - Received: 20.05.2012

Kabul Tarihi - Accepted: 27.07.2012

Ret-Vit 2012;20:185-192

Yazışma Adresi / Correspondence Address: M.D., Serkan ERDENÖZ
Akyazı State Hospital, Eye Clinic, Akyazı-Sakarya/TURKEY

Phone: +90 216 573 85 53

E-Mail: serkanerdenoz@gmail.com

GİRİŞ

Akut retinal iskeminin tipik bir örneği olan, santral retinal arter oklüzyonu (SRAO), nadir görülen bir oftalmik acildir.

Hastaların çoğu 60 yaşın üzerindedir; çocuklarda ve genç popülasyonda ise daha seyrek olarak bildirilmiştir.¹⁻³ SRAO'da tedavinin amacı, retina dolaşımını en kısa zamanda tekrar sağlamak ve iskemik retinal alanlara oksijenin yeniden taşınabilmesini sağlayarak retinal hücrelerin korunmasını sağlamaktır. Klasik tedavi yöntemlerine ek olarak kompleks ve invaziv yeni tedavi metodları da denenmesine rağmen, istenilen başarıya henüz ulaşılamamıştır.^{1,4-6} Günümüz şartlarında SRAO meydana gelen bireyin doktora ulaşması, teşhis konulup hiperbarik oksijen tedavisinin uygulandığı bir merkeze ulaşması ve tedavinin başlanması için geçecek zaman diliminde kritik sürenin aşılması çok yüksek bir olasılıktır.

Bu nedenle ilk başvurduğu merkezde teşhis konulup hemen tedavisinin yapılabileceği pratik bir yöntem ihtiyacı vardır. Çalışma, yeni tedavi yolları arayışından yola çıkarak, SRAO meydana gelen bireylere uygulanabilecek pratik ve etkili bir çözüm hedeflemiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Denekler

Bu çalışmada, 28 adet, Wistar cinsi, albino, 4- 6 aylık, yaklaşık 200-300 gr. ağırlığındaki sıçanlar kullanıldı. Denekler, standart kafeslerde 7'li gruplar halinde, "ad libitum" standart yem ve su verilerek, ısısı (21±2 °C) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması floresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00-18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

Denekler akut retinal iskemi uygulanan (21 adet denek) ve kontrol grubu K denekleri (7 adet denek) olarak önce iki gruba ayrıldı. Akut retinal iskemi işlemi sırasında komplikasyon oluşan, iskemi oluşturulması başarısız olan Memantin, ARI ve HBO gruplarından birer adet olmak üzere toplamda 3 adet denek protokolden çıkartıldı. Kontrol grubundaki bir denek de rastgele olarak seçilip protokole dahil edilmedi.

Altışar denekten oluşan dört grup;

1. Gözlerine sadece sham uygulanan, herhangi bir tedavi verilmeyen ve 3. haftada sakrifiye edilen denekler (Kontrol grubu- K; 6 denek).
2. İskemi sonrasındaki ilk saat içinde intravenöz olarak 25 mg/kg Memantin infüzyonu tedavisine alınan 3. haftada sakrifiye edilen denekler (Memantin grubu- M; 6 denek).

3. İskemi takiben ilk 2 saat içinde tedavisine başlanan ve 9 gün süreyle hiperbarik oksijen tedavisi uygulanan ve sakrifiye edilen denekler (Hiperbarik oksijen grubu -HBO; 6 denek).

4. Akut retinal iskemi uygulanan ancak tedavi uygulanmayan ve 3. haftada sakrifiye edilen denekler (Akut retinal iskemi grubu- ARI; 6 denek).

İskemi- reperfüzyon oluşturulduktan 21 gün sonra kardiyak glüteraldehit perfüzyonu yöntemi ile fikse edilecek sakrifiye edilen deneklerin göz küreleri, enükleasyon işlemi uygulanarak, histolojik incelemeye alındı.^{7,8}

Akut Retinal İskemi Modeli

Sıçanlara, ketamine (100 mg/kg) ve klorpromazine (25 mg/kg) karışımı anestezi madde intraperitoneal enjeksiyonla verildi. Gözlere de %0.5 proparacaine göz damlası damlatılarak topikal anestezi sağlandı. Gözler %1 lik siklopentolat ile dilate edildi. Genel anestezi altında ön kamaraya 30 gauge kanülle girilerek tubing setle ön kameraya saline solüsyonu verildi. Kanülle saline verilen gözün basıncı en az 120 mmHg olmasını sağlayacak şekilde serum şişesi denekten 200 cm yükseklikte 60 dakika bekletildi. Retinal iskemi, direk oftalmoskopi ile retinanın beyazlaşmasının gözlemlenmesi ile doğrulandı. Reperfüzyon ise kanül çekildikten sonra retinal refleksinin kendine özgü rengine dönmelerinin gözlemlenmesi ile doğrulandı.⁹

Memantin Uygulaması

Memantin grubuna, akut retinal iskemi modeli oluşturulduktan sonraki bir saat içinde kuyruktan, intravenöz olarak, 25 mg/kg memantin (Ebixa® saf etken madde; Lundbeck İlaç Tic.Ltd. Şti.) çözelti halinde bir kerede ve tek doz olarak verildi.

Hiperbarik Oksijen Uygulaması

Hiperbarik oksijen tedavisi İÜ, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nda bulunan tek bölmeli, çelik, 0.6 m³ hacmindeki deney basınç odasında gerçekleştirildi. Her bir tedavi seansı 2.5 ATA'lık basınçta (=1.5 bar, 15 metre deniz suyu basıncı), 80 dakika sürdü. Tedavi öncesinde basınç odası 10 dakika %100 oksijen ile havalandırıldı ve 10 dakikada oksijen ile 2.5 ATA basınca ulaşıldı. 2.5 ATA'lık tedavi basıncında geçen 60 dakika sonunda yine 10 dakikada çıkartıldı. Tedaviler ilk 2 gün 8 saatte bir, sonraki 7 gün 12 saatte bir olmak üzere 9 gün sürdü. İlk tedavinin girişim sonrası ilk saatler içinde yapılması planlandı bu nedenle sıçanlar işlem sonrası iki saat içinde tedaviye alındı.

Sakrifikasyon ve Kardiyak Perfüzyon

Perfüzyon tespitinin başlamasından 15 dakika önce, sıçanlara anestezi öncesi 150 U/kg intraperitoneal heparin verilerek 10 dk süreyle antikoagülan etkinin oluşması beklendi.

Daha sonra intraperitoneal uygulanan 2 mg/kg Sodyum pentotal ile anestezi gerçekleştirildi. Anestezi-nin gerçekleştiği doğrulandıktan sonra sıçanların ekstremiteleri ve kuyrukları kesim panelleri üzerine geniş yapışkan bantlarla tespit edildi. V kesi ile sternum kaldırılarak toraks boşluğu açıldı. Kalbin tepesinden 18 gauge kelebek iğne ile girilerek sol ventriküle dikkatli bir biçimde yerleştirildi. Daha sonra sağ atriyum kesildi ve üç yollu kanülden önce 10 dk süreyle %0.9 NaCl verildi. Perfüzyon aparatı bir litrelik iki adet serum şişesi ve bunlara bağlı üç yollu i.v. kanülden oluşmaktaydı. (Caire klempili Venoset; 150 cm., 15 damla/ml). İntravenöz serum şişeleri sıçanların perfüze edileceği tezgâhın yaklaşık 120-125 cm yukarısına asıldı.

Şişelerden birisinde %0.9 Na klorür diğeri ise kakodilat tamponu içinde %2.5'lik glutaraldehit konuldu (0.05 M Na kakodilat; pH =7.3-7.4 glutaraldehide) (EM teknik derecesinde; pH 7.4). Üçlü vananın çıkışına, distal ucunda 18-gauge iğne bulunan, iç çapı 3.0 mm ve boyu 15-30 cm olan propilen bir boru bağlandı. Sağ atriyumdan akan sıvının berraklaştığı görüldüğünde kanülün vanası diğer girişe çevrilerek fosfat tamponu içinde %2.5 glutaraldehid çözeltisi 35 damla/15 sn olacak şekilde verilmek suretiyle 25 dk süreyle perfüzyon tespiti gerçekleştirildi. Her denek için yaklaşık 300 ml tespit sıvısı kullanıldı.

Gangliyon Hücre Sayımı

Enükleasyonun ardından gözler bir gece fiksatifte bekletildikten sonra rutin doku takip işlemine alındı. Parafin aşamasında gözlerin korneası kaldırılarak lensleri çıkarıldı. Göz vitreus boşluğuna parafin verildi ve takip sürecine devam edildi.

Dokular optik sinir kasetin alt yüzüne bakacak şekilde gömüldü. Retinanın ön ve arka bölümlerini kapsayacak şekilde 20 µm kalınlığında HM325 Microm marka rotari mikrotomla tüm bloktan seri kesitler alındı. Kesitler 1/10 oranında örneklendi. Bu örnekleme sırasında ardışık kesitlerin birer tanesi hematoksilen eosin ile boyanarak kapatıldı. Diğer kesitler immunhistokimyasal değerlendirme için ayrıldı.

Stereolojik Değerlendirme

Sayımlar için; CCD Dijital kamera (Optronics Microfire 1600x1200P, Goleta, CA, USA), ATI FireGL görüntü yakalama kartı (Advance Micro Device, Camberly, UK), bilgisayar kontrollü Ludl X-Y-Z motorize preparat tablası (Bioprecision, Howtrone, NY, USA), mikrokator (Heidenhein, Traunreut, Germany), Leica 4000B ışık mikroskobu (Leica, Wetzlar, Germany) ve Sterio Investigator 7.5 programı (Microbrightfield, Williston, VT, USA) yüklenmiş olan masaüstü bilgisayardan oluşan stereolojik çalışma istasyonunu kullanıldı.

Toplam ganglion hücre sayısı optik parçalama yöntemi kullanılarak tahmin edildi. Toplam ganglion hücre sayısını tarafsız hesaplanmasını sağlayabilmek için sistematik rastgele örnekleme yöntemi kullanıldı (10). Örnekleme aralığı 1/10 olarak alındı.

Adım aralığı alanı 200 µmx200 µm, sayım çerçevesi alanı 30 µmx30 µm kullanıldı. Takip sonrası ölçülen ortalama kesit kalınlığı µm, üstten ve alttan alınan güvenlik sınırları 1 µm, disektör yüksekliği 16 µm olarak saptandı. Kesitler Leica Apo Plan (NA=1.40) objektif aracılığı ile tarafsız sayım kuralları uygulanarak sayıldı.

TUNNEL Metodu ile Apoptozis Analizi

Stereolojik analize yapılmayan 20 µm kalınlıktaki kesitlerden stereolojik sayım sonucu her hayvandan en fazla hücre sayılan kesitin ardışığı bir kesit immunohistokimyasal boyama işlemine alındı. Boyama işlemi üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı.

Kesitler deparafinize ve dehidrate edildi. Kesitler Fosfat Tampon Tuzu (PBS) ile yıkandıktan sonra antikor uygulama işlemine hazırlamak ve hücre zarını permeabilize etmek için %0.1 (v/v)'lik Triton X-100 (Acros Organics; Geel, Belgium) deterjan olarak uygulandı. Triton X-100 %0.1 (w/v) sodyum sitrat (Merck; Darmstadt, Germany) içinde hazırlandı. Uygulama buz üzerinde 2 dakika bekletilerek yapıldı. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında PBS ile iki kere yıkandı.

Antijen kurtarma işlemi için Bosch HMT 812C mikrodalga fırın 2.45 GHz frekansta (en fazla 900 W) kullanıldı. Bu işlem için kesitler, içinde 200 ml 0.01M sitrat tamponu olan plastik kavanoza yerleştirildi. Sıcaklığı oda sıcaklığından 86 dereceye çıkana kadar 45 saniye boyunca mikrodalga fırında tutuldu. Bu işlem sonrası kesitler soğutulmuş 80 ml PBS doldurulmuş şaleye daldırıldı bu sırada şaleye oda sıcaklığında distile su eklendi ve bundan sonraki işlemler için kesitler oda ısısına getirilmiş oldu. Kesitler daha sonra hızlıca oda sıcaklığındaki PBS içine alındı.

Tekrar PBS ile yıkanan kesitlerin zemin boyanmasının ve artefaktların azalması için bloklama solüsyonunda ve oda ısısında 30 dakika tutuldu. Bloklama solüsyonu çift distile su içerisinde %2 bovine serum albumin (BSA), %10 normal keçi serumu (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Germany) ve %0.03 Triton X-100 ile hazırlandı.

Bu işlemler sonrası kesitlerdeki kırık DNA'ları belirlemek için kesitlere Tunnel reaksiyon kiti (katolog no: 11 684 809 910) uygulandı. Bu inkübasyon 37 derecede karanlık ve nemli ortamda 60 dakikada yapıldı. Daha sonra her bir kesit PBS ile 3 kere 5'er dakika boyunca durulandı.

Tablo 1: Kontrol grubu (K), Akut Retinal İskemi grubu (ARI), Hiperbarik Oksijen (HBO) ve Memantin grubu retinal gangliyon hücre sayıları. Ortalamaları ve standart sapmaları.

Denek No	Kontrol Grubu Toplam Hücre Sayısı	ARI Grubu Toplam Hücre Sayısı	HBO Grubu Toplam Hücre Sayısı	Memantin Grubu Toplam Hücre Sayısı
1	203625.0	126225.0	207447.2	197100
2	243991.7	128797.2	208472.2	210600
3	265144.4	129350.0	213383.3	239303
4	230450.0	153583.3	212266.7	196200
5	251513.9	108333.3	199500.0	209164
6	244833.3	104533.3	211050.0	243000
Toplam Hücre Sayısı	235802.8	134488.9	210392.4	210800.7
St Dev	21064	17598	5029	20480
Ortalama	239926	125137	208687	215894

Kesitleri ışık mikroskopunda görünür hale getirmek için kesitlere POD (horseradish peroksidaz) çevirici (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany) eklenecek etüvde (37C0) 30 dakika bekletildi. Daha sonra renklendirme için %0.05 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (SkyTek; Utah, USA) karışımını kullanıldı. Kesitlere Mayers Hemotoksilen ile artalan boyaması yapıldı. Kesitlerin Değerlendirilmesi: Hazırlanan preparatlar Leica DM 4000 model ışık mikroskobu, tam motorize mikroskop tablası kullanılarak ve stereoinvestigator 7.5 versiyonu programı yardımıyla değerlendirildi. Kesit 200x200 lük optik alanlara bölündü, her alanda 30x30'luk alan örneklem alanı rastgele seçildi. Böylece kesitin tüm yüzeyinin %2.25'lik bölümü rastgele ve eşit olarak alanı olarak sayıldı. Sayım sırasında 3 farklı işaretleyici kullanıldı. Apoptik, nekrotik ve normal hücreler ayrı işaretleyiciler ile işaretlendi. Apoptotik hücre toplam hücre oranı kullanılarak apoptotik indeks çıkartıldı.

İstatistiksel Değerlendirme

Toplam hücre sayıları ve apoptotik indeks değerleri Graphpad 5.0 istatistik programıyla tek yönlü ANOVA kullanılarak ayrı ayrı karşılaştırıldı.

Kontrol grubu ve Akut Retinal İskemi grubuna göre ilaçların etkinliğinin biyoistatistiksel anlamlılığı Kruskal Wallis parametrik olmayan varyans analizi ile test edildi. Kruskal Wallis testinde anlamlı bulunan değişkenlerin çoklu karşılaştırmaları Dunn testi ile yapıldı. Gruplar arası etkileşimin anlamlılık kontrolleri $p < 0.001$; $p < 0.05$; $p < 0.1$ düzeylerine göre karşılaştırıldı.

BULGULAR

Stereolojik İnceleme

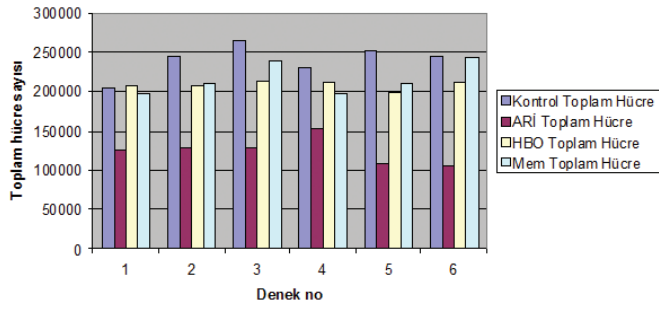
Gangliyon Hücre Sayımı: Kontrol grubunda toplam hücre sayısı 235802.8 ± 21063.7 (Ort: 239926.3); ARI grubunda toplam hücre sayısı 134488.8 ± 17597.7 (Ort: 125137); HBO grubunda toplam hücre sayısı 210392.3 ± 5028.6 (Ort: 208686,5); Memantin grubunda toplam hücre sayısı 210800.7 ± 20480 (Ort: 215894) olarak bulundu (Tablo 1, Grafik 1).

İmmünohistokimyasal İnceleme

Apoptoz Değerlendirmesi: Apoptotik hücre, nekrotik hücre, normal hücre ve toplam hücre sayıları her bir grup ve her bir denek için ayrı ayrı hesaplandı.

Tablo 2: Kontrol (K) grubu, Akut Retinal İskemi grubu (ARI), Hiperbarik Oksijen grubu (HBO) ve Memantin grubunun apoptotik indeks değerleri.

	K Apoptotik İndeks	ARI Apoptotik İndeks	HBO Apoptotik İndeks	Memantin Apoptotik İndeks
Denek sayısı	6	6	6	6
En düşük	0.0000	0.3700	0.0000	0.0000
%25'lik dilim	0.0000	0.4300	0.0000	0.0975
Orta değer	0.0000	0.5350	0.0750	0.2150
%75'lik dilim	0.0925	0.5625	0.1600	0.3800
En yüksek	0.1000	0.5700	0.2500	0.3800
Ortalama	0.03167	0.5033	0.08833	0.2200
Std. Deviasyon	0.04916	0.07840	0.09496	0.1468
Std. Sapma	0.02007	0.03201	0.03877	0.05994

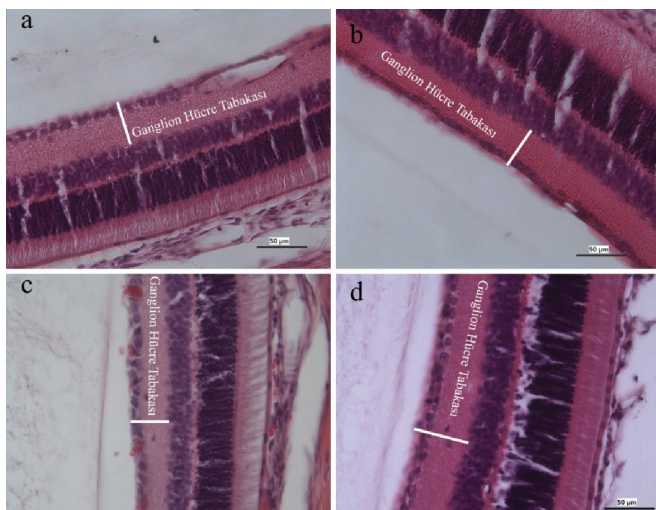


Grafik 1: Kontrol grubu, Akut Retinal İskemi grubu (ARI), Hiperbarik Oksijen grubu (HBO) ve Memantin (MEM) grubu retinal gangliyon hücre değerleri.

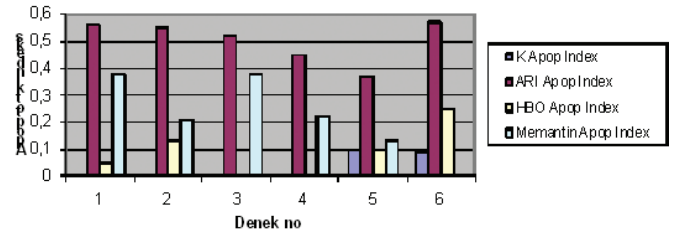
Apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına bölümü ile apoptotik indeks hesaplandı (Apoptotik indeks=Apoptotik hücre sayısı/Toplam hücre sayısı). Apoptotik indeks ortalama değeri kontrol grubunda 0.03; ARI grubunda 0.5; HBO grubunda 0.08 ve Memantin grubunda 0.22 olarak saptanmıştır. Tüm grupların apoptotik indeks ortalama değerleri tablo 2'de gösterilmiştir. Apoptotik indeks ortalama değeri kontrol grubu, ARI grubu HBO grubu ile Memantin grubu değerleri toplu olarak gösterilmiştir (Grafik 2). Her bir gruba ait Hematoksilen Eosin boyası ile gangliyon hücre tabakasının görünümü resim 1'de gösterilmiştir. Her bir gruba ait TUNNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin görünümü resim 2'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Bilindiği gibi retina vücudumuzun en fazla oksijen tüketen dokusudur ve iskemiyeye karşı son derece duyarlıdır. SRAO'nun da dahil olduğu retina ve koroidin çeşitli hastalıklarında sıklıkla retinal iskemiyeye gelişmektedir.^{11,12}

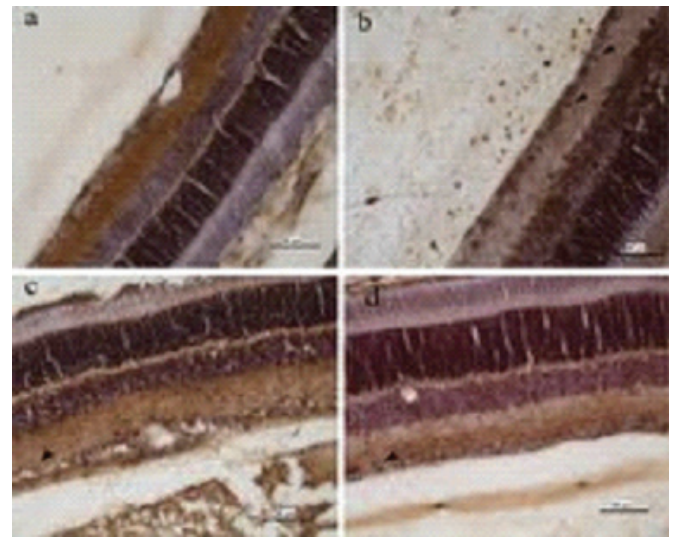


Resim 1: Göz kesitlerinde gangliyon hücrelerinin bulunduğu tabaka gösterilmektedir. Kontrol (a), Akut Retinal İskemi grubu (b), Hiperbarik Oksijen grubu (c), Memantin (d). Hematoksilen Eosin boyaması (X 40 büyütmede, Bar 50 µm).



Grafik 2: Apoptotik indeks ortalama değeri kontrol grubu (K), Akut Retinal İskemi grubu (ARI), Hiperbarik Oksijen grubu (HBO) ile Memantin grubu değerleri.

Birçok organda iskemiyenin etkileri üzerinde yapılan çalışmalar, ciddi iskemiyelerde ilk önce reversibl fonksiyon kaybıyla karakterize "iskemik penumbra" denilen bir dönemin varlığını göstermektedir. İskemiyenin devam etmesi ve terapötik müdahalelerin etkili olmadığı bu dönemin kaçırılması halinde geri dönüşümsüz hasar ve nekroz gelişmektedir.¹³ Hayreh ve ark.,¹⁴ maymunlarda santral retinal arterin tam oklüzyonunun 105 dakikadan uzun sürmesi halinde irreversibl hasara yol açtığını mikroskopik, anjiyografik, elektroretinografik olarak ve VER (Visuel Evoked Response) ile tespit etmişlerdir. Ancak insan retinası için "iskemik penumbra" döneminin ne kadar sürdüğünün kesin olarak belirlenmesi mümkün değildir. Von Graefe'den günümüze kadar SRAO'nun tedavisinde birçok yöntem denemesine rağmen, görme keskinliğini artırabilen başarılı bir tedavi modeli henüz bulunamamıştır.^{4,13,15} Bununla birlikte 24 saatten erken gelen olgularda, enerjik bir tedavi uygulaması önerilmektedir.^{2,6} Retinal iskemiyeye sürecinde ortaya çıkan, glutamatın tetiklediği eksitotoksik nöronal hücre ölümü; aktive olmuş N-methyl-D-aspartat (NMDA) tipi glutamat reseptörlerinin aşırı miktarda Ca²⁺ hücre içine alması ile başlamaktadır.^{16,17}



Resim 2: Göz kesitlerinde apoptotik hücreler gösterilmektedir (→). Kontrol (a), Akut Retinal İskemi grubu (b), Hiperbarik Oksijen grubu (c), Memantin (d). TUNNEL + diaminobenzidine (DAB) boyaması (X 40 büyütmede, Bar 50 µm).

Bundan sonraki aşama, özetle hücre içi yüksek Ca düzeylerinin NO sentaz, aşırı serbest radikal birikimi, lipid peroksidasyon, mitokondrial disfonksiyon, katabolik enzimlerin (nükleaz, proteaz ve lipaz) aktivasyonu ve kaspasların devreye girmesi gibi süreçleri tetiklemeyle sürmektedir. Ayrıca sinir terminalinden veziküller glutamatın Ca bağımlı salınımının iyice artması sonucu apoptoza giden yolun tetiklendiği gösterilmiştir.¹⁸⁻²²

Memantinin glokom oluşturulmuş olan retinada, retina gangliyon hücresi (RGH) sayısını ve dolayısıyla retina kalınlığını koruyucu etkisi, özellikle RGH de NMDA reseptörlerinin bulunması ile açıklanmaktadır.²³ RGH lerindeki NMDA reseptörlerinin bu hücreleri glutamat toksisitesine karşı savunmasız ve kolay etkilenebilir hale getirdiği düşünülmektedir.²³⁻²⁷

Bir NMDA reseptör antagonisti olan memantin, antiviral bir ajan olan amantadinin derivesi olup, günümüzde özellikle Alzheimer tipi demans başta olmak üzere glutamat bağımlı nöronal yıkımla giden süreçlerin engellenmesinde etkinliği gösterilmiş olan bir ilaçtır.²⁸

Rogawski ve Wenk'in Alzheimer hastalarıyla yaptığı çalışmada memantinin güvenli ve iyi tolare edilen bir ilaç olduğu gösterilmiştir.²⁹

Tavşanlarla yapılan çalışmalarda 25 mg/kg bolus memantin enjeksiyonunun letal olduğu, 1 mg/kg ile 10 mg/kg arasındaki dozların belirgin bir yan etkisi olmadığı ancak nöroprotektif etkinliğinin de olmadığı gösterilmiştir.³⁰

Stieg ve ark.,³¹ nöroproteksiyonla ilgili yaptığı çalışmada 20 mg/kg memantin bolus enjeksiyonunun sıçanlarda letal olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. Bizim 2007 yılında sıçanlarla yaptığımız pilot çalışmada da 25 mg/kg memantin bolus dozunun letal olmadığı ortaya çıkmıştır.

Tüm bu çalışmalardan yola çıkarak sıçanların tavşanlara göre memantine karşı daha dayanıklı olduğu sonucuna varılabilir. Deneyimizde sıçanlara, pilot çalışmada da olduğu gibi, 25 mg/kg IV bolus memantin enjeksiyonu uyguladık. Hiç bir denekte letal yan etki görülmedi.

Vorwerk ve ark.,²⁸ 3 ay boyunca her 5 günde bir 1 µl'lik 2.5 mM/l glutamat solüsyonunu intravitreal vermişlerdir. Bir grup deneğe de intravitreal glutamat ile birlikte, 1 mg/kg/gün memantini intraperitoneal yolla vermişlerdir. İntravitreal glutamat düzeyleri endojen düzey olan 5-12 µmol den 26-34 µmol'e çıkmış ve bu kronik yüksek glutamat düzeyinin 3. ayın sonunda RGH nin %42 sini azalttığı görülmüştür. Memantin ile birlikte glutamat verilen grupta memantinin parsiyel koruyucu etkisi olduğunu gözlemişlerdir.

Retinal nöron hasarında memantin nöroprotektif etkinliğine işaret eden çalışmalar mevcuttur: Wolde-Mussie ve ark., sıçanlarda yaptığı çalışmada Memantin nöroprotektif etkinliği gösterilmiş ardından Lipton ve arkadaşlarının çalışmalarıyla da bu sonuç desteklenmiştir.³²⁻³⁴

Lapchak ve ark.,³⁵ yaptığı çalışmada embolik strok modeli uygulanan tavşanlara sistemik olarak verilen memantin nöroprotektif olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın bulgularıyla bu çalışmalar, birbirini destekler niteliktedir. Glokomda da artmış glutamat düzeylerinin ve glutamat aracılı eksitotoksik nöron hasarlanmasının gündeme gelmesiyle, Volbracht ve ark.,³⁴ ile Lipton ve ark.,³⁶⁻³⁷ 2006 yılında yakın zaman aralıklarıyla yaptıkları çalışmalarda glutamat antagonistlerinin ve özellikle NMDA reseptör antagonisti olan memantin glokomdaki nöroprotektif etkisini vurgulamışlardır.

Ülkemizden Etuş ve ark.,³⁸ glokom modeli oluşturulmuş sıçanlarda yaptığı çalışmalarda Memantin, erken dönemde daha etkin olmakla birlikte, erken ve geç dönemde kullanılmasıyla, nöron koruyucu bir etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca bu çalışmalarıyla, literatürde yeterli veri bulunmayan, bu konuyla ilgili ultrastrüktürel verileri ilk kez tartışmaya açmışlardır. Sıçanda oluşturulan deneysel akut retinal iskemi modelinin kullanıldığı çalışmamızda, sistemik olarak verilen memantin nöroprotektif etkinliği "RGH sayımı, apoptotik indeks" parametreleri sorgulanarak gösterilmeye çalışılmıştır.

Sonuçlarımız, kontrol grubuyla Memantin grubu arasında RGH sayısı ve apoptotik indeks yönünden anlamlı fark bulunmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca ARI grubu ve Memantin grubu arasında RGH sayısı bakımından anlamlı derecede fark bulunmuştur. Bunlar tek doz bolus Memantin tedavisinin etkinliği bakımından olumlu sonuçlardır. Kontrol grubunda tespit edilen az miktardaki apoptotik boyanmanın; nöronal hücrelerin fizyolojik döngülerine ait hücre ölümünden veya RPE veya koroidden kaynaklanıp retina yüzeyine dağılmış olabilecek melanin pigmentinin, TUNNEL yönteminde reaksiyon üreten peroksidaz enzimi ile benzer renge sahip olması nedeniyle kesit alımı sırasında, iç retinal katlara yanlışlıkla dağılmış pigmentler olabileceği önceki çalışmalarda da ifade edilmiştir.³⁹

Modern HBO tedavisi çalışmaları 1950'den sonra, HBO ile tümörde radyoterapi duyarlılığı, üzerine yapılan çalışmalarla başlamıştır.⁴⁰ Günümüze dek yapılan çeşitli çalışmalarla HBO tedavisinin endikasyon alanları belirlenmiştir. Akut retinal iskemik hastalıklarda kullanıma girmesi ile bu konuda çalışmalar yapılamaya başlanmış ancak hala yeterli sayıda literatür verisi bulunmamaktadır.⁴¹

HBO tedavisinin gözdeki akut iskemik durumlarda kullanımı, Avrupa Hiperbarik Tıp Komitesi'nin (European Committee of Hyperbaric Medicine - ECHM) 2004'te belirlediği endikasyon listesinde, 3. derece kanıta dayalı öneriler doğrultusunda "Derece C" (Derece C: "İsteğe bağlı kullanım" seçeneği) olarak kabul edilmiş olsa da rutin tedavi protokolünde ilk seçeneklerdendir.

Bu çalışmanın bir özelliği de akut retinal iske mi modeli kullanılarak HBO tedavisinin etkinliğinin immünohistokimyasal ve histopatolojik anlamda değerlendirilmesi bakımından öncü nitelik taşımasıdır.

Literatürde bu bağlamda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda kontrol ve HBO grubu arasında RGH sayısı ve apoptotik indeks yönünden anlamlı fark bulunmaması; buna karşılık ARI ve HBO grubu arasında RGH sayısı ve apoptotik indeks yönünden anlamlı fark bulunması HBO tedavisinin etkinliğini göstermektedir.

Çalışmamızdaki HBO ve Memantin grupları arasında RGH sayısı ve apoptotik indeks yönünden anlamlı fark bulunmaması, Memantin de HBO kadar tedavi etkinliği olduğunu gösterir niteliktedir. RGH sayısı yönünden ARI- HBO, ARI- Memantin grupları arasında anlamlı fark gözlenirken; apoptotik indeks yönünden ARI grubuyla HBO grubu arasında anlamlı fark bulunmasına karşın, ARI grubuyla Memantin grubu arasında anlamlı fark olmaması beklenmeyen bir durum oluşturmaktadır. Bu durum RGH'lerinin aynı zamanda ölmeye başlamadığını, ayrıca tüm hücrelerde sürecin aynı hızda gelişmediğini ileri süren Etüş ve ark., savlarını destekler niteliktedir. Kesin kanıtlar için destekleyici çalışmalara gereksinim vardır. Memantin grubunun ARI grubuna göre RGH sayısı bakımından daha iyi sonuçlar vermiş olması, HBO grubu ile RGH sayısı ve apoptotik indeks yönünden farksız olması, Memantin iyi bir nöron koruyucu bir ilaç olduğunu göstermektedir.

Akut retinal iske mi oluşturulduktan sonra tedavisiz bırakılan grup (ARI), sham uygulaması (K), Memantin intravenöz uygulaması (M) ve Hiperbarik oksijen uygulaması (HBO) yapılan dört grup sıçanın sakrifiye edildikten sonra enükle edilen gözlerinde yapılan histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular değerlendirildi. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda bir NMDA reseptör antagonisti olan Memantin ek-sitotoksitesiteyi önleyerek nöron koruyucu etki gösterdiği sonucuna varıldı.

Retinal iskemide güncel olarak sıklıkla uygulanmakta olan, ancak histopatolojik ve immünohistokimyasal çalışmalarla desteklenmemiş bir tedavi yöntemi olan, HBO tedavisinin etkinliği, RGH sayısı ve apoptotik indeks verileri temel alınarak bilimsel olarak ortaya çıkartıldı.

Memantin ve HBO tedavisinin yine aynı parametreler ışığında karşılaştırılması ile RGH sayısı bakımından eş değer nitelikte tedavi edici özelliği olduğu sonucuna varıldı. Ancak her iki grup arasında apoptotik indeks açısından fark saptanması, apoptozis sürecinde halen daha ortaya çıkartılmamış mekanizmaların olabileceğini düşündürdü.

Akut retinal iske mi meydana geldiği durumlarda, pratik, hızlı, ucuz ve en önemlisi etkili bir müdahale gerekliliğinden yola çıkarak ortaya koyduğumuz bu çalışmanın sonuçları umut vermektedir. Ciddi görsel komplikasyonlarla sonuçlanabilecek akut retinal iske mi durumlarında, prognozu olumlu yönde etkileyebileceğini düşündüğümüz ve bunu deneysel modelle kanıtlamaya çalıştığımız Memantin tedavisinin, klinik kullanımda nasıl bir yer bulacağını zaman içinde yapılacak çok merkezli klinik çalışmalar gösterecektir.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Brown GC, Schachat AP, Murphy RB, et al. Retinal arterial obstructive disease. *Retina* 1989;2:403-19.
2. Kaynak S. Retina arter tıkanıklıkları. *Oftalmoloji. Retina I Özel Sayısı* 1993;2:57-65.
3. Brown GC, Magargal LE, Shields JA, et al. Retinal arterial obstruction in children and young adults. *Ophthalmology* 1981;88:18-25.
4. Henkind P, Chambers JK. Arterial occlusive disease of the retina. *Clinical ophthalmology*. Ed: Duane.T.D., Harper and Row, Publishers, Philadelphia 1986;14:1-14.
5. Brown,G.C. Arterial obstructive disease and the eye. *Ophthalmology Clinics of North America*. Ed: Stamper,R.L., WB Saunders Company 1990;33:373-91.
6. Kanski J.J. *Clinical ophthalmology*. Butterworths and Co.publishers 1989;10:324-8.
7. Beach TG, Tago H, Nagai T. Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation *J Neurosci Methods* 1987;19:183-92.
8. Miller DC. Arch Comment on: Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. *Pathol Lab Med* 1998;122:949.
9. Sasaoka M, Taniguchi T, Shimazawa M, et al. Intravitreal injection of endothelin-1 caused optic nerve damage following to ocular hypoperfusion in rabbits. *Experimental Eye Research* 2006;83:629-37.
10. Gundersen y Jensen. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy* 1987;147:229-63.
11. Aim A. Ocular circulation. *Adler's physiology of the eye*. Ed: Hart, W.M. Mosby Year Book, St.Louis 1992;6:198-227.
12. Welter J. Phototoxic changes in retina. *Clinical light damage to the eye*. Ed: Miller D., Springer-Verlag 1987;7:79-125.
13. Biarr NP, Baker DS, Rhode JP, et al. Vitreoperfusion. A new approach to ocular ischemia., *Arch. Ophthalmol* 1989;107:417-23.
14. Hayreh SS, Kolder HE, And Weingeist TA. Central retinal artery occlusion and retinal tolerance time. *Ophthalmology* 1980; 87:75-8.

15. Brown GC. Retinal arterial obstructive disease. In: Ryan SJ, ed. *Retina*. St Louis: The CW Mosby Co 1989;73:403-19.
16. Sucher NJ, Leis S, Lipton SA. Calcium channel antagonists attenuate NMDA receptor mediated neurotoxicity of retinal ganglion cells in culture. *Brain Res* 1991;551:297.
17. Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, et al. N-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci* 1992;8:567-73.
18. Lipton SA. Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol* 2003;48:38-46.
19. Ritch R. Neuroprotection: Is it already applicable to glaucoma therapy? *Curr Opin Ophthalmol* 2000;11:78-84.
20. Dreyer EB, Pan ZH, Storm S, et al. Greater sensitivity of larger retinal ganglion cells to NMDA-mediated cell death. *Neuroreport* 1994;5:629-31.
21. Haefliger IO, Dettmann ES. Nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma: an overview. In: Haefliger IO, Flammer J, ed. *Nitric Oxide and Endothelin in the Pathogenesis of Glaucoma*. New York: Lippincott- Raven 1998:22-33.
22. Kaushik S, Pandav SS, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. *J Postgrad Med* 2003;49:90-5.
23. Nickells RW. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why and the maybe. *J Glaucoma* 1996;5:345-56.
24. Nickells RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol* 1999;43:151-61.
25. Kim HS, Park CK. Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program. *Brain Research* 2005;1057:17-28.
26. Ji J, Chang P, Pennesi M, et al. Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Research* 2005;45:169-79.
27. Gross R, Ji J, Chang P, et al. A mouse model of elevated intraocular pressure: Retina and optic nerve findings. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003;101:163-72.
28. Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, et al. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells: toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1618-24.
29. Rogawski MA, Wenk GL. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev* 2003;9:275-308.
30. Chen ST, Sultzer DL, Hinkin CH, et al. Executive dysfunction in Alzheimer's disease: association with neuropsychiatric symptoms and functional impairment. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998;10:426-32.
31. Stieg PE, Sathi S, Warach S, et al. Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat. *European Journal of Pharmacology*. 1999;375:115-20.
32. WoldeMussie E, Yoles E, Schwartz M, et al. Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats. *J Glaucoma* 2002;11:474-80.
33. Lipton SA. Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol* 2003;48:38-46.
34. Lipton SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Rev Drug Discov* 2006;5:160-70.
35. Lapchak Paul A. Memantine, an uncompetitive low affinity NMDA open-channel antagonist improves clinical rating scores in a multiple infarct embolic stroke model in rabbits. *Brain Research* 2006;1088:141-7.
36. Matute C, Sanchez-Gomez MV, Martinez-Millan L. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8830-35.
37. Volbracht C, van Beek J, Zhu C et al. Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 2006;23:2611-22.
38. Etuş H. Deneyisel glokomda erken ve geç dönem memantin uygulamasının nöron koruyucu etkisi. *Göz hastalıkları uzmanlık tezi* 2006.
39. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, et al. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vi Sci* 1995;36:774-86.
40. Churchill-Davidson I, Sanger C. et al. High-pressure oxygen and radiotherapy, *The Lancet* 1955;1:1091-95.
41. Nogay HA, Cımpit M, Bürümcek E. Retinal arter oklüzyonlarında hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi: TOD 28. *Ulusal Kong. BİT* 1994;2:608-10.