

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL GLOKOMDA ERKEN VE GEÇ DÖNEM MEMANTİN
UYGULAMASININ NÖRON KORUYUCU ETKİSİ:
HİSTOPATOLOJİK, İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE
ULTRASTRÜKTÜREL İNCELEME**

Dr. Hande ETUŞ

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR

ETİK KURUL ONAYI İLK: 18.05.2005 / HAEK – 104/ B
ETİK KURUL ONAYI SON: 07.11.2006 / HAEK - 10 / 2

2006

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

1	GİRİŞ	1
2	GENEL BİLGİLER	3
2.1	GLOKOMATÖZ HASARIN PATOGENEZİ	3
2.1.1	GLOKOMATÖZ HASARIN PATOGENEZİNE DAİR TEORİLER	3
2.1.2	GLOKOMATÖZ HASARDA GLUTAMATIN ROLÜ VE EKŞİTOTOKSİSİTE	7
2.1.3	EKŞİTOTOKSİSİTE	8
2.1.4	EKŞİTOTOKSİSİTEDE ROL OYNAYAN FAKTÖRLER	11
2.1.5	GLOKOMATÖZ HASARDA EKŞİTOTOKSİSİTE	13
2.1.6	GLOKOMATÖZ HASARDA APOPİTOZ/NEKROZ TEORİSİ	14
2.1.7	GLOKOMATÖZ HASARDA EKŞİTOTOKSİSİTE İLE İLİŞKİLİ APOPİTOZ	15
2.2	GLOKOMDA NÖROPROTEKTİF TEDAVİ	16
2.2.1	GLOKOMDA NÖROPROTEKTİF TEDAVİ YAKLAŞIMININ TEMELLERİ	16
2.2.2	GLOKOMDA NÖROPROTEKTİF TEDAVİ YAKLAŞIMININ MANTIĞI	16
2.2.3	NÖROPROTEKSİYONDA HEDEF NEDEN RETİNA GANGLİON HÜCRELERİDİR?	17
2.2.4	NÖROPROTEKTANLAR NE ZAMAN KULLANILMALIDIR?	19
2.3	MEMANTİN	20
3	GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1	DENEKLER	22
3.2	DENEYSEL GLOKOM MODELİ	24
3.3	MEMANTİN UYGULAMASI	25
3.4	SAKRİFİKASYON VE KARDİAK PERFÜZYON	25
3.5	RETİNAL GANGLİON HÜCRE SAYIMI VE RETİNA KALINLIĞI ÖLÇÜMÜ	27
3.6	TUNEL METODU İLE APOPİTOZ ANALİZİ	27
3.7	ULTRASTRÜKTÜREL DEĞERLENDİRME	28
3.8	İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	29
4	BULGULAR	30
4.1	GÖZ İÇİ BASINÇ DEĞERLERİ	30
4.2	RETİNA GANGLİON HÜCRESİ SAYIMI	37
4.3	RETİNA KALINLIK ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	41
4.4	APOPİTOZ DEĞERLENDİRİLMESİ	49
4.5	ULTRASTRÜKTÜREL DEĞERLENDİRME	59
4.5.1	RETİNAL ULTRASTRÜKTÜREL BULGULAR	59
4.5.2	OPTİK SİNİR AKSONLARINA AİT ULTRASTRÜKTÜREL BULGULAR	66
5	TARTIŞMA	69
6	SONUÇ	81
7	ÖZET	82
8	İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	84
9	KAYNAKLAR	86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate
Ca	Kalsiyum
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNT	Dış nükleer tabaka
EG	Erken glokom grubu
EMG	Erken Dönem Memantin Grubu
ERG	Elektroretinografi
GG	Geç glokom grubu
GİB	Göz içi basıncı
GMG	Geç Dönem Memantin Grubu
İNT	İç nükleer tabaka
İPT	İç pleksiform tabaka
K	Kontrol grubu
Mg	Magnezyum
MK-801	Dizloşipin maleat
Na	Sodyum
NMDA	N-metil D-aspartat
NO	Nitrit Oksit
PMNL	Polimorf nüveli lökosit
RGH	Retina gangliyon hücresi
RPE	Retina pigment epiteli
SSS	Santral sinir sistemi
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated biotin-dUTP nick-end labeling
VECP	Görsel uyarılmış kortikal potansiyel

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Kombine mekanik ve vasküler teori	Sayfa 7
Şekil 2.	Deney planı	Sayfa 24
Şekil 3.	Perfüzyon düzeneği	Sayfa 26
Şekil 4.	K Grubu GİB seyri	Sayfa 32
Şekil 5.	EG Grubu GİB seyri	Sayfa 32
Şekil 6.	GMG Grubu GİB seyri	Sayfa 33
Şekil 7.	GG Grubu GİB seyri	Sayfa 33
Şekil 8.	EMG Grubu GİB seyri	Sayfa 34
Şekil 9.	Tüm gruplara ait sakrifikasyon öncesi son GİB değerleri	Sayfa 34
Şekil 10.	Gruplara ait ortalama RGH sayımı değerleri	Sayfa 40
Şekil 11.	Cresyl Viole ile boyalı retinal kesitte retina ganglion hücresi	Sayfa 40
Şekil 12.	Gruplara ait ortalama retina kalınlığı değerleri	Sayfa 44
Şekil 13A.	GG, x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı retinal kesit	Sayfa 45
Şekil 13B.	GMG, x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı retinal kesit	Sayfa 46
Şekil 13C.	EMG, x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı retinal kesit	Sayfa 47
Şekil 13D.	K, x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı retinal kesit	Sayfa 48
Şekil 14.	Gruplara ait ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri	Sayfa 51
Şekil 15A.	GG, x400 TUNEL metodu ile floresan mikroskopik görüntü	Sayfa 53
Şekil 15B.	GMG, x400 TUNEL metodu ile floresan mikroskopik görüntü	Sayfa 53
Şekil 15C.	EMG, x400 TUNEL metodu ile floresan mikroskopik görüntü	Sayfa 54
Şekil 15D.	K, x400 TUNEL metodu ile floresan mikroskopik görüntü	Sayfa 54
Şekil 15E.	GG, x400 TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü	Sayfa 55
Şekil 15F.	GG, x400 TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü	Sayfa 55
Şekil 15G.	EMG, x400 TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü	Sayfa 56
Şekil 15H.	K, x400 TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü	Sayfa 56
Şekil 15I.	GMG, x1000 TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü	Sayfa 57
Şekil 15J.	GG, x1000 TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü	Sayfa 57
Şekil 15K.	GG, x1000 TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü	Sayfa 58

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.	Deneklere ait GİB ölçümleri	Sayfa 35-36
Tablo 2.	GİB değerleri gruplar arası karşılaştırma	Sayfa 37
Tablo 3.	RGH sayımı değerleri gruplar arası karşılaştırma	Sayfa 41
Tablo 4.	Retina kalınlığı değerleri gruplar arası karşılaştırma	Sayfa 44
Tablo 5.	Apopitotik hücre sayımı değerleri gruplar arası karşılaştırma	Sayfa 52
Tablo 6.	Deney gruplarına ait ortalama değerler	Sayfa 58
Tablo 7.	Retinal ultrastrüktürel bulgular	Sayfa 65
Tablo 8.	Optik sinir aksonlarına ait ultrastrüktürel bulgular	Sayfa 68

1. GİRİŞ

Glokom, optik sinir başında oluşan karakteristik değişiklikler ile birlikte, retina iç katlarında hasar, özellikle RGH lerinin ölümü ve buna bağlı görme alanı kayıpları ile seyreden bir optik nöropati şeklinde tanımlanmaktadır (1). Glokom hastalığının temelinde yatan patolojiyi ortaya koymak, ideal tedavi stratejisini oluşturmak için gereklidir. Normotansif glokom hastalarının yanı sıra bilindiği gibi GİB belli bir noktaya düşürüldüğü halde görme alanı kaybının devam ettiği olgular vardır. Randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; başarılı GİB kontrolüne rağmen bazı hastalarda hasar ilerlemektedir (2-4). Bu sonuçlar çok sayıda araştırmacıyı GİB'ni düşürmeye yönelik klasik glokom tedavisine ek olarak, yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir.

Günümüzde glokoma ait araştırmaların çok önemli bir kısmını glokomdaki nöronal hücre kayıplarının engellenmesine yönelik çalışmalar oluşturmaktadır (5, 6). Bugün glokomdaki nöronal hücre kaybının patofizyolojisine ait temel görüş; retrograd aksoplazmik transport blokajı nedeniyle nörotrofinlerin kaybı, azalan vasküler perfüzyon ve buna bağlı iskemi, serbest radikallerin oluşumu, NO toksisitesi ve glutamat aracılı eksitotoksikite süreçlerinin biri veya birkaçının birlikteliği sonucu oluşan nekroz ve/veya apoptoz aracılı hücre ölümü üzerinde yoğunlaşmaktadır (1, 7). Dreyer ve arkadaşlarının glokomlu insan ve maymun vitreusunda yüksek glutamat düzeyleri olduğunu göstermeleri ile eksitotoksikite süreci, glokomdaki nöroprotektif araştırmaların temel hedefi haline gelmiştir (8). Glokomda glutamat düzeylerinin artışı; ölmüş RGH lerinden glutamat açığa çıkmasına, retinadaki ekstraselüler glutamat inaktivasyon mekanizmalarının bozulmasına, hasarlı nöronların veya glia hücrelerinin glutamatu uzaklaştırılmamasına bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (7-9).

Bu çalışmada, non kompetitif bir NMDA reseptör antagonisti olan memantin sıçanda oluşturulan deneysel glokom modelinde sistemik olarak uygulanmıştır. Glokom sürecinin erken ve geç dönemlerinde uygulanan memantin

retina üzerindeki nöroprotektif etkisi histopatolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel olarak incelenmiştir. Çalışmada;

1. Glokom indüksiyonu oluşturulması süreci ile birlikte verilmeye başlanan memantin, glokomatöz sürecin erken evresindeki eksitotoksik hasarın engellenmesine yönelik etkisi,

2. Glokom indüksiyonu sonrası tedavisiz olarak bir süre artmış GİB sürecine maruz kalmış deneklerde verilmeye başlanan memantin glokomatöz sürecin geç evresindeki eksitotoksik hasara etkisi araştırılmıştır.

Memantin glokomatöz nöronal hasarlanma süreci üzerindeki etkinliği; retinal hücrelerin histopatolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel olarak değerlendirilmesiyle yorumlanmıştır.

Çalışma ayrıca, yapılmış olan elektron mikroskopik incelemeler ve apoptoz sayımı ile glokom modelinde RGH lerinin hasarlanma ve ölüm mekanizmasını aydınlatmaya yönelik bulgular da içermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLOKOMATÖZ HASARIN PATOGENEZİ

2.1.1. GLOKOMATÖZ HASARIN PATOGENEZİNE DAİR TEORİLER

Glokom, optik sinir başında oluşan karakteristik değişiklikler ile birlikte, retina iç katlarında hasar, özellikle RGH lerin ölümü ve buna bağlı görme alanı kayıpları ile seyreden bir optik nöropati şeklinde tanımlanmaktadır (1). Glokom hastalığının temelinde yatan patolojiyi ortaya koymak, ideal tedavi stratejisini oluşturmak için gereklidir. Normotansif glokom hastalarının yanı sıra bilindiği gibi GİB belli bir noktaya düşürüldüğü halde görme alanı kaybının devam ettiği olgular vardır. Randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; başarılı göz içi basınç kontrolüne rağmen bazı hastalar progresyon göstermektedir (2-4). Bu sonuçlar çok sayıda araştırmacıyı GİB nı düşürmeye yönelik klasik glokom tedavisine ek olarak, yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir.

Günümüzde glokoma ait araştırmaların çok önemli bir kısmını glokomdaki nöronal hücre kayıplarının engellenmesine yönelik çalışmalar oluşturmaktadır (5, 6). Bugün glokomdaki nöronal hücre kaybının patofizyolojisine ait temel görüş; retrograd aksoplazmik transport blokajı nedeniyle nörotrofinlerin kaybı, azalan vasküler perfüzyon ve buna bağlı iskemi, serbest radikallerin oluşumu, NO toksisitesi ve glutamat aracılı eksitotoksosite süreçlerinin biri veya birkaçının birlikteliği sonucu oluşan nekroz ve/veya apopitoz aracılı hücre ölümü üzerinde yoğunlaşmaktadır (1,7). Dreyer ve arkadaşlarının glokomlu insan ve maymun vitreusunda yüksek glutamat düzeyleri olduğunu göstermeleri ile eksitotoksosite süreci, glokomdaki nöroprotektif araştırmaların temel hedefi haline gelmiştir (8). Glokomda glutamat düzeylerinin artışının; ölmüş ganglion hücrelerinden glutamat açığa çıkmasına, retinadaki ekstraselüler glutamat inaktivasyon mekanizmalarının bozulmasına, hasarlı nöronların veya glia hücrelerinin glutamatu uzaklaştıramamasına bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (7- 9).

İlk defa 1858 yılında Müller tarafından tanımlanan *mekanik teori*, glokom etyopatogenezinde tartışmaya sunulmuştur. Bu teoriye göre GİB artışı kompresyon etkisiyle direk olarak nöronların ölümünden sorumludur. Yüksek GİB'na bağlı olarak skleral duvarda oluşan gerilim, bağ dokusu desteğinin daha az olduğu lamina kribrozanın üst ve alt kutuplarında distorsiyona ve arkaya doğru çukurlaşmaya neden olur. Lamina kribrozada oluşan distorsiyon lateral genikülat nükleusa doğru olan aksoplazmik akımı bozar ve optik atrofiye yol açar (10).

Schnabel ise aynı yüzyılın sonlarında nöral elemanlarda atrofi geliştiğini ve bunun sonucunda boş alanların oluştuğunu ve optik sinir başının arkaya doğru çekildiğini ifade etmiştir (11). Mekanik teorinin devamı olan mekaniko-vasküler hipoteze göre de; yüksek GİB optik sinirin laminer ve prelaminer bölgelerindeki küçük çaplı damarlarda ve bunlardan çıkan küçük koroidal damarlarda bir kompresyon oluşturmakta, oteoregülasyon mekanizmalarında oluşan bir bozulma nedeni ile kan debisi azalarak ağrıya neden olan ve sinir dokusunda harabiyetle sonuçlanan bir iskemi ortaya çıkmaktadır (12). Akson kaybının lamina kribrosanın en az konnektif doku desteği olan optik sinir başı üst ve alt kadranslarında olması ve en fazla bozulma olan disklerde bile kan damarlarının kalan akson sayısına uygun oranda olması bu teoriyi destekler görünmektedir (13).

19. yüzyıl da, Von Jaeger, optik nöropati gelişimi ve optik atrofi altında vasküler anomalilerin yattığını ileri sürerek mekanik etkiden bağımsız *vasküler teori* fikrini ortaya atmıştır. Glokomatöz hasarın her zaman yüksek GİB da ortaya çıkmaması ve GİB'nın düşürülmesine rağmen optik nöropatinin devam edebilmesi, yüksek GİB dışında başka faktörlerin de glokomun patolojisinde rol oynadığını düşündürmektedir. Etkili olabileceği düşünülen mekanizmalar; optik sinir başının perfüzyon bozukluğu, anormal vasküler rezistans, sistemik hipotansiyon ve diğer faktörlerdir (10). Optik sinir başını besleyen damarlardaki perfüzyon basıncının düşüklüğü doku beslenmesini etkiler ve akson atrofisine neden olur. Optik sinir başının perfüzyon basıncı, pratikte ortalama arteriyel basınç ile göz içi basıncının farkına eşittir;

$$PP = OAB - GİB$$

PP: Perfüzyon Basıncı

OAB: Ortalama Arteriyel Basınç

GİB: Göz İçi Basıncı

Oküler kan akımı ise perfüzyon basıncı ve vasküler rezistans ile yakından ilişkilidir;

$$\text{Kan akımı} = PP/R = (OAB - GİB)/R$$

Yani oküler kan akımı, perfüzyon basıncı ile doğru, vasküler rezistans ile ters orantılıdır (10).

Retinal dokulardaki kan akımı, SSS'nde olduğu gibi sempatik sinir sisteminden bağımsız olarak otoregülasyon adı verilen lokal (NO, prostaglandinler, endotelin ve renin-anjiyotensin sistemi) ve metabolik faktörlerle idare edilir. Sağlıklı bir gözde GİB'nin 30-35 mmHg değerlerine kadar otoregülasyon normal bir şekilde sürer. Glokom olgularının migren ve Reynaud Fenomeni gibi hastalıklarla sıklıkla beraber görülmesi, etyolojide vazospastik bir komponentin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir (10).

Sistemik hipotansiyon da perfüzyon basıncını düşüren önemli bir risk faktörüdür. Normotansif glokom olgularında ambulatuvar olarak kan basıncının monitörize edilmesi sonucunda, noktürnal diastolik kan basıncında ciddi düşüşler saptanmıştır (10).

Mekanik teori başlangıçta büyük destek bulmuştur. Ancak vasküler teori 1920'li yıllarda yeniden popüler olmuş ve GİB artışı nedeni ile veya tamamen ayrı vasküler lezyonların meydana getirdiği iskemiye sekonder glokomatöz optik atrofinin geliştiği fikri kabul görmüştür (11).

1968 yılında aksoplazmik akımın tanımlanması ile glokomatöz optik nöropati gelişiminde rolü nedeniyle mekanik teori bu yıllarda yeniden gündeme gelmiş ancak iskeminin de muhtemel rolü unutulmamıştır (11).

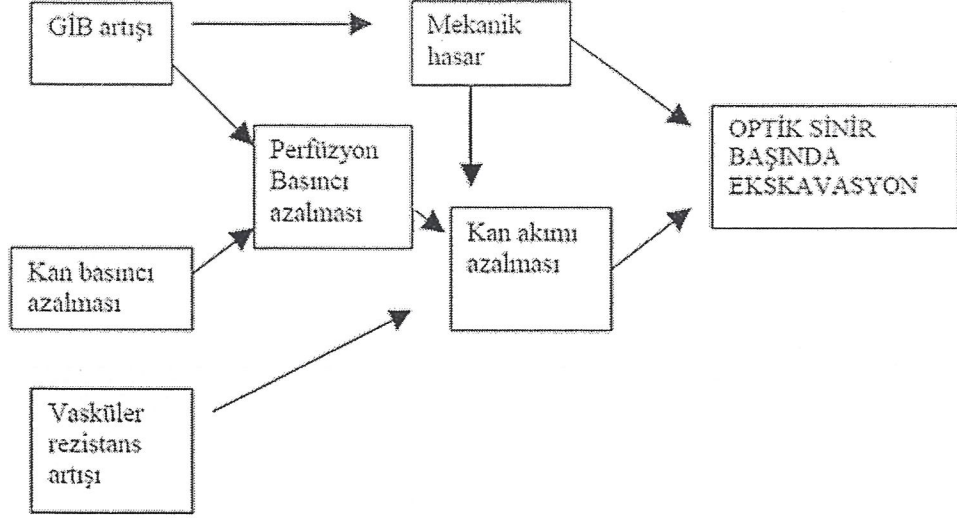
Daha sonraki yıllarda artan GİB'na rağmen glokomatöz optik nöropati görülmeyen oküler hipertansiyonlu hastaların uzun dönem takip sonuçları ile vasküler faktörler ve optik sinir başının histolojik yapısı glokomatöz optik nöropati gelişiminde önem kazanmıştır. Optik sinir başının basınca karşı olan hassasiyeti tanımlanmış ve bu hassasiyetin nöral dokunun yapısal özelliklerine bağlı olduğu belirtilmiştir (14). Lamina kribrozanın strese karşı cevap verebilme yeteneği olan bir doku olduğu ve GİB değişimlerine göre kollajen tipleri ve elastin yapısı ve miktarını

sentez ve/veya parçalanma ile değiştirdiği ancak bu mekanizmanın GİB artışına karşı koruyucu olduğu ve bu cevabın herkeste mevcut olmadığı gösterilmiştir (15).

1993 yılında Güney Afrikada tapılan oftalmoloji grup toplantısında ise E. Michael Van Buskirk glokomatöz optik nöropatili pek çok hastada glokomu sadece GİB ile tanımlamanın anlamlı ve pratik olmadığını, glokom taramasının sadece GİB ile yapılması halinde %50 hastanın atlanabileceğini, glokomatöz optik nöropatili hastaların %20 sinde GİB nin düşürülmesine rağmen optik nöropati progresyonunun devam ettiğini bildirmiştir. Bu nedenle, mikrosirklatuar değişiklikler ve dolayısı ile vasküler teori, glokomatöz optik nöropati gelişiminde gerek primer bir faktör olarak gerekse de diğer faktörler ile beraber bozulmuş otoregülasyon altında GİB na bağlı hasarı artıran bir yardımcı faktör olarak etkilidir (14).

Yaklaşık son 20 yıldır önem kazanan görüş, kombine vasküler ve mekanik görüştür (şekil 1). Bu görüşe göre, yüksek tansiyonlu ve normal tansiyonlu glokomu açıklamak daha kolaydır (16,17).

Glokomda RGH nin ölümünde, *Apoptozis ve/veya Nekrozis teorisi* de tartışılan konular arasındadır. Apoptozis; nekrozdan farklı olarak inflamasyonla beraber olmayan, genetik olarak programlanmış hücre lmdr. Apoptozisin oluşumunu sağlayan nörotoksik eksitotoksinlerden birisi olan glutamat, glokomlu olguların vitreusunda yüksek düzeyde saptanmıştır. Yine yapılan çalışmalarda glokomlu olguların gangliyon hücrelerinde immunoglobulin birikimlerine rastlanmıştır. Bu bulgular RGH lerinin, apoptozis tipi hücre ölümüne uğradığı fikrini desteklemektedir (10).



Şekil 1. Kombine mekanik ve vasküler teori

2.1.2. GLOKOMATÖZ HASARDA GLUTAMATIN ROLÜ VE EKŞİTOTOKSİSİTE

Sinir sisteminin duysal haberleşmesi ve kompleks motor emirleri hızla vücudun bir bölgesinden başka bir bölgesine yayması, düşünce ve belleğin oluşması büyük ölçüde eksitator bir aminoasit olan glutamat ile ilintilidir. Çoğu nöron yüksek konsantrasyonda glutamat içerir (yaklaşık 10 mM). Miktarı sıkı kontrol edilir ve çok kısa zamanda (milisaniye) sinaptik sonlanmalardan geçerek diğer nöronlar ile bağlantı kurar (18). Glutamat çok güçlü bir eksitatördür. Bununla beraber, glutamatın çok fazla miktarda veya normalden fazla süre ortamda bulunması hücrenin ölümüne neden olabilir.

Sinir sistemi çeşitli mekanik hasarlara maruz kaldığında (kafa travması veya spinal kord yaralanması gibi), iskemi durumlarında hasarlı hücrelerden aşırı miktarda glutamat salgılanır. Yüksek düzeylerdeki bu glutamat, yakındaki özgün travmadan sonra hayatta kalabilmiş binlerce hücreyi hasarlar ki onların depolarize olmasına, şişmesine, çözülmesine ve sonuçta ölmesine sebep olur. Bu lizise uğrayan hücreler, otodestruktif olaylara doğru ilerleyen kaskadı başlatacak daha da çok glutamatın salgılanmasına sebep olurlar. Böylece hücre ölümü, özgün kazadan sonra bile progresif olarak devam eder. Benzer bir fenomen inmede de görülür. İskemik

olay nöronlardaki (ki o nöronların iyonik homeostazis sağlanmasına ihtiyacı vardır) enerji yoksunluğuna neden olur ve travmatik yaralanmadaki gibi hücrelerin depolarize olmasına, şişmesine, çözülmesine ve sonuçta ölmesine sebep olan aynı otodestruktif olaylar gerçekleşir (18, 19).

Günümüzde glokomatöz hasarlanma sürecinde, aşırı glutamat aktivasyonunun varlığına dair bir çok kanıt mevcuttur. Bu fenomen, ilk kez 1950 lerin sonlarında Lucas ve Newhouse, subkutanöz injekte edilen glutamatın RGH lerinin ölümüne sebep olduğunu gözlediklerinde yayımlanmıştır (20). John Olney sonrasında bu fenomeni "eksitotoksisite" olarak tanımlamıştır (21, 22). Glokomda vitreus içerisinde yüksek glutamat konsantrasyonları, deneysel glokom modellerinde, RGH ne toksik olacak kadar yüksek düzeylerde bulunmuştur ve glokomlu insanlarda da postmortem çalışmalarda vitreus içerisinde yaklaşık iki katı glutamat yüksekliği tespit edilmiştir (8,9,23,24). Eksitotoksisitenin glokoma katkısı bundan başka, glokom ve retinal hasar oluşturulmuş deneysel glokom modellerinde NMDA reseptör blokeri ajanların nöroprotektif etkisinin gösterildiği çalışmalar ile de desteklenmiştir (25,26).

2.1.3. EKSİTOTOKSİSİTE

Eksitotoksisite; eksitator aminoasit reseptörlerinin aşırı uyarılması ile meydana gelen nöronal hasar süreci olarak tanımlanır. Hasarın bu formu ilk olarak retinada tanımlanmıştır ve sonradan SSS de travmatik ve iskemik hasarlanmanın patogenezinin önemli bir komponenti olarak gösterilmiştir. Bununla beraber, (daha önce aşırı glutamat reseptör stimülasyonu olduğu düşünülen hastalıklar olarak sözedilmiştir) çok sayıda kronik nörolojik hastalıkta eksitotoksisitenin rol aldığına dair artan kanıtlar vardır ve anti-eksitotoksik tedavi bu durumların bazılarında halihazırda kabul görmüştür (27). Eksitotoksisitede; glutamat temel molekül ve nöronların dendritik çıkıntılarda hızlı kayıp temel morfolojik bulgudur.

Daha önce de sözedildiği gibi; 1957 de Lucas ve Newhouse, yenidoğan fare retinasının biyokimyasal farklı ajanlar tarafından etkilenebileceğini öne sürdüler ve subkutanöz glutamat enjeksiyonu sonrasında retinanın iç katlarındaki nöronların sayısının azaldığına dair çarpıcı gözlemleri, mekanizmanın tam olarak

anlaşılmasına karşın, eksitotoksisitenin ilk gösterilişiydi (20,28). 1959 da Curtis ve arkadaşları, sıçan spinal nöronlarında glutamatın depolarize edici etkisini tanımladılar ve bir eksitator aminoasit geliştirilebileceği fikri doğdu (29). Bir dekad sonra, Olney monosodyum glutamat verilen farelerde meydana gelen beyin lezyonlarını tanımladı ve eksitotoksik aminoasit nörotransmitterlerin reseptörlerinin aşırı ve uzun süreli devam eden aktivasyonlarının sebep olduğu nöronal ölümü "eksitotoksisite" olarak adlandırdı (30). Kısa zaman sonra bir büyük kanıt bu bulguyu destekledi; aşırı ekstraselüler glutamat düzeylerinin nöronlar için toksik olabileceği, buna retinanın da dahil olduğu, eksitotoksisitenin belirli nörolojik hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceği gösterildi (31).

Eksitotoksisite; dakikalar içerisinde glutamatın kontrolsüz bir şekilde salınımını takiben; NMDA iyonoforik reseptörlerinin yoğun aktivasyonu, membran depolarizasyonu, sonrasında ise Ca, Na ve su moleküllerinin hücre içerisine aşırı geçişi şeklinde tanımlanmaktadır. Bu hücre içi su artışı intraselüler organellerin şişmesine ve neticede hücrenin nekrotik tipte ölüm ile lizise uğramasına, intrasellüler içeriğin serbestleşmesine, ekstraselüler çevrede çok miktarda glutamat birikmesine sebep olmaktadır (32). Bu noktada artmış hücre içi Ca ile; lipaz, endonükleaz ve proteazların aktif konuma geçmesi hücreyi ölüme götürmektedir. Glutamat gibi uyarıcı aminoasitlerin meydana getirdiği NMDA reseptörleri üzerinden ve hücre içi Ca miktarında artış ile tetiklenen eksitotoksik reaksiyonlar, bu moleküller olmadan, hipoksiye sekonder (membran potansiyelindeki değişikliklerle) NMDA reseptörlerinin pasif olarak açılmasıyla da gelişebilir. Çünkü daha önce de sözedildiği gibi glutamat ile uyarı olmaksızın, depolarizasyonu tetikleyici bir hasar söz konusu olduğunda reseptördeki bağlanma bölgesinden Mg ayrılacak ve reseptör aktifleşecektir. Bu noktada glokom etyolojisinde de yer alan iskemi vb. durumlarda depolarize olan nöronda, NMDA reseptör aktivasyonunun artmasına, "kendi kendini güçlendiren eksitotoksisite" kaskadına ilerleyiş eksitotoksik hasarın daha da belirginleşmesine neden olacaktır (33,34).

NMDA reseptörü aktive olduğunda, bir kanal açar ve bu kanal, Ca ve diğer katyonların hücre içine doğru hareketine izin verir. Sinaptik geçişin normal olduğu durumlarda NMDA reseptörü çok kısa bir süreliğine aktiftir (milisaniyeler). Patolojik koşullarda ise, sinir hücresinden içeri aşırı miktarda Ca akımına sebep

olacak şekilde reseptör uzun bir süre aktif halde kalır. Bu olay dendritik ve sinaptik hasara, sonuçta da nöronal hücre ölümüne kadar ilerleyebilecek biyokimyasal olayları tetikler. Hücre içine aşırı Ca akımı sonucu çok miktardaki Ca, hücrenin enerji depoları olan mitokondrilerin içinde birikebilir ve sonucunda serbest oksijen radikalleri oluşabilir, kaspas aktivasyonu ve apoptoz oluşturucu faktörler serbestlenebilir (35). NMDA reseptör ilişkili kanallar boyunca Ca un nöron içerisine akışı nöronal NO sentetazı aktive edebilir (36), bu NO üretiminde artışa sebep olur ve NO, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ile reaksiyona girdiği zaman toksik peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelir. Peroksinitrit hücrede ağır hasara sebep olur. Aynı zamanda, mitojen ile aktive edilmiş protein kinazların da uyarılması (p38 mitojen ile aktive edilmiş protein kinazı da içerir şekilde), transkripsiyon faktörlerini (örneğin miyosit geliştirici faktör 2C veya MEF2C) aktive eder ki, bunun da çekirdek içerisine girebilmesi ile nöronal hasar ve apoptozis başlar (32).

Hücre içinde Ca düzeylerinin artmasının, hücre ölümünün majör komponenti olduğu düşünülür (32). Bu Ca artışı çeşitli zararlı sonuçlar doğurur. Bunlar; destrüktif lipazların, proteazların ve nükleazların aktivasyonu, serbest radikallerin oluşumu, mitokondrial hasar ve sinir terminalinden veziküller glutamatın Ca bağımlı ekzositozu olarak sayılabilir (28). Böylelikle, Ca aracılı hücre ölümü, belirli bölgelere doğru akım olduğu zaman, daha da fazla etkilidir. NMDA reseptörlerine doğru olan akım özellikle hücre ölümü olayında etkindir. Bu fenomen "kaynak özellikli Ca nörotoksitesi" olarak adlandırılır ki eksitotoksik hasarı daha da derinleştireceği aşıkardır (37). Eksitotoksitenin Ca nörotoksitesinin bir varyantı olduğu da söylenebilir. Normalde nörona yararlı ve hayati önemi olan NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasıyla gelişen eksitotoksite ile aşırı dozda Ca un içeri girmesi ve ölümcül mekanizmaları tetiklemesi sadece nöronlara özgü gerçekleşen bir patoloji olarak öngörülmektedir.

Ca mitokondride birikiminin eksitotoksisteki önemi çok büyüktür. Mitokondri normalde mevcut konsantrasyonunun yaklaşık 50 katına ulaşan miktarlarda Ca tamponlama özelliğine sahiptir ve Ca özellikle 1000 nmol/L'yi aşan konsantrasyonlarda birikme eğilimindedir. Bu kapasitenin aşılması eksitotoksik hücre hasarında temel role sahiptir. Çünkü Ca un dışı atılımında ATP tüketiminden dolayı hücrenin enerji depoları azalmıştır. Bu noktada hücre içindeki en önemli

fonksiyonu, hücrenin yaşamsal fonksiyonlarının devamı için gerekli olan enerjiyi üretmek olan mitokondrilerin disfonksiyonu, ATP üretimini iyice yetersiz kılacak, tüm ATP bağımlı iyonik pompa fonksiyonları yetersiz kalacak (örneğin membran istirahat potansiyelini sağlayan Na/K pompası gibi), iyonik homeostazisin sağlanamaması nedeniyle istirahat potansiyeli sağlanamayacak, böylece depolarizasyon meydana gelecek, bu depolarizasyon daha önce sözü geçen "kendi kendini güçlendiren eksitotoksosite" yi belirginleştirecek ve sonuçta hücrenin ölümü kaçınılmaz olacaktır (38, 39).

2.1.4. EKSİTOTOKSİSİTEDE ROL OYNAYAN FAKTÖRLER

EKSİTATÖR AMİNO ASİT RESEPTÖRLERİ

Eksitator amino asit reseptörleri günümüzde 3 ana gruba ayrılır;

1. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) /kainate reseptörleri
2. Metabotropik reseptörler
3. NMDA reseptörleri

α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA)/kainate reseptörleri; glutamat, AMPA ve kainik asit ile aktive edilebilir. İyonotropik bir reseptördür. Bu reseptör, Na iyonlarının hücre içine ve K iyonlarının hücre dışına akışına izin verir. Oligodendrositlerde ve spinal kordda bulduklarına dair kanıtlar mevcuttur ve bu reseptörlerin aşırı aktivasyonunun ak madde hasarı ile sonuçlanabileceği bilinmektedir (40-42). Bir çalışmada, optik sinir hasarı sonrasında AMPA/kainat reseptörlerinin inhibisyonunun NMDA reseptörlerinin inhibisyonuna göre hasarı daha fazla azalttığı gösterilmiştir de AMPA/kainat reseptörleri myelinize olmayan RGH aksonlarında gösterilememiştir (41).

Metabotropik reseptörler; G-protein bağlı reseptörlerdir. Glutamatın iyonotropik reseptörlere olan etkisi eksitasyon olarak sonuçlanırken, metabotropik reseptörler üzerinden etkisi eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektedir.

N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörleri; Na ve Ca iyonlarının içe akışına ve K iyonlarının dışa akışına izin verir. İyonotropik bir reseptördür. NMDA

reseptörünün işlevini kolaylaştırmak için önce glisin (kofaktör olarak rol oynar) bu reseptöre bağlanmalıdır. Daha sonra glutamat bu bölgeye bağlanır. Ancak normal membran potansiyeli halinde bu kanal Mg ile bloke edilmiş haldedir ve blok; ancak reseptörü içeren nöron kısmen depolarize olduğu zaman ortadan kalkar. Nörotransmitter aracılı ligand kapılı iyon kanalları arasında hem kimyasal hem de voltaja bağlı açılabilen tek kanal NMDA reseptörüdür. NMDA reseptörünün alt ünite reseptörleri tanımlanmıştır. Bunlar; bağlayıcı NR1 alt ünitesi ile birlikte modülatör 4 farklı tipte NR2A-NR2D alt üniteleridir (43-45). NMDA reseptörlerinin alt üniteleri, özellikle RGH, amakrin hücre gövdeleri ve iç pleksiform tabakada olmak üzere; immünohistokimyasal olarak kemirgenlerin iç retina katlarında ve NR1 alt ünitesi, sıçan optik sinirinin intraorbital bölgesinde gösterilmiştir (45,46). Agonist olarak glutamat, kofaktör olarak glisin ve antagonist olarak çinkonun bağlanabileceği farklı bağlanma yerleri içeren NMDA reseptörleri, eksitotoksikite nedeniyle klinik olarak ayrı bir önem taşır. Özellikle kafa travması geçiren ya da inme gelişen hastalarda ketamin, deksrometorfan, fensiklin, Mg ve MK-801 gibi NMDA reseptör antagonistlerinin potansiyel olarak nöron koruyucu oldukları bildirilmiştir (7).

Normal sinaptik fonksiyonda, glutamatın eksitator aktivitesi, sinir terminalleri ve glialardaki geri alım mekanizmaları ile, sinapslardan etkili ayrılmadan dolayı hızlı sona erdirilir (47). SSS de glutamat geri alımında astrositlerin çok önemli rolü olmasına rağmen, Müller hücreleri de bu mekanizmada oldukça aktiftir. Müller hücrelerinin RGH'lerini kültür çalışmalarında eksitotoksik hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (48).

Glutamatın glial hücreler ile geri alımından sonra, glutamat glutamine dönüştürülür, ekstraselüler alana salınır, nöronlar tarafından alınır, tekrar glutamata dönüştürülür. Böylelikle, bu nöronal-gliyal metabolik geçiş formu, eksitator nörotransmitter metabolizmasının önemli bir komponentidir. Bu nöroglial sistemin disfonksiyonunun, artan ekstraselüler glutamat düzeyleri ile eksitotoksik hasara ilerlediği bilinmektedir (49).

2.1.5. GLOKOMATÖZ HASARDA EKŞİTOKSİSİTE

Glokom patogeneğinde eksitotoksisitenin kanıtları çeşitli ipuçları mevcuttur. Bunlar; (i) *vitreal glutamat düzeylerinin deneysel ve klinik glokomda arttığına dair kanıtlar*, (ii) *iskeminin glokomda rol aldığına dair bulgular*, (iii) *nöroproteksiyon tabanlı hayvan çalışmalarının kanıtları*, (iv) *optik sinir hasarı sonrasında RGH nin sekonder dejenerasyonu* şeklinde sayılabilir.

1996 da Dreyer ve arkadaşları; vitreus içerisinde glutamat düzeylerinin hem deneysel hem de klinik glokomda arttığını göstermişlerdir (8). Bu bulgunun desteklediği görüş, aşırı glutamat düzeyleri ve eksitotoksisite glokom patogeneğinin komponentlerindedir (50). Eksitotoksisite, iskemik hasarın önemli bir ögesi olarak dikkate alınır, deneysel iskemik hasarda (hem retinal hem de optik sinir başı iskemisinde) hasarı azaltmanın ipuçları aranmıştır ve glutamat reseptör blokerleri üretilmiştir (51-54). Böylelikle, eğer glokom patogeneğinde iskemi rol oynuyorsa, o halde eksitotoksisite muhtemelen bunun bir komponenttir. Glokom hastalarında hem optik sinir kan akımının yetersiz olduğu, hem de retinal kan akımında anormalliklerin bulunduğu gösterilmiştir. Sonuçta retina ve optik sinir başı iskemik hasar almaktadır. Bunu iskeminin bir komponenti olarak eksitotoksisite izler (55-61).

Nöroproteksiyon tabanlı çalışmalar sadece potansiyel yönetim hakkında bilgi vermez, aynı zamanda patogeneğ hakkında da bilgi vermeye çalışır. Eğer bir anti-eksitotoksik ajanın özel bir modelde hasarı azalttığı gösterilirse, bu durumda eksitotoksisitenin bu modelde patogeneğinin bir komponenti olduğu anlaşılır. NMDA reseptör antagonistlerinin; kemirgenlerde, kronik GİB nin arttırıldığı primat modellerinde , optik sinir iskemisi ve optik sinirin sıkıştırılması (crush injury) ile geliştirilen hasar modelinde RGH si kaybını azalttığı gösterilmiştir (41,51,62,63). Örneğin bir anti-eksitotoksik ajan olan MK-801'in basınç etkili retinal iskemi modelinde RGH nin azalışını önlediği bilinmektedir (51).

2.1.6. GLOKOMATÖZ HASARDA APOPİTOZ/NEKROZ TEORİSİ

Glokomda hücre ölümü mekanizmaları tanımlanmaya çalışılırken apoptoz ve nekroz arasında daima karşılaştırmalar yapılmış, etyopatogeneizde hangisinin ağırlıkta olduğunun ipuçları araştırılmıştır. Bilindiği gibi apoptoz; patolojik koşullarda tetikleyici faktörlerin etkisi ile veya herhangi bir patolojik durum olmaksızın hücre içi programlanmış sinyal sistemi ile harekete geçen, bu nedenle "programlanmış hücre ölümü veya hücrenin intiharı" adı verilen bir hücre ölüm tipidir. Apoptozun bilinen karakteristik özellikleri; kromatin kondansasyonu, hücre sınırlarında yarıma şeklinde deformasyon, hücre zarında şişme ve internükleosomal DNA fragmentasyonu ile karakterizedir. Bu değişimlerin ardından hücre, çok sayıda membran ile kaplı veziküller şeklinde parçalara ayrılır ve herhangi bir intraselüler içerik dışarıya verilmeksizin ve enflamatuvar yanıt olmaksızın "apoptotik cisimcikler" adı verilen bu hücre parçacıkları fagositozla ortadan kaldırılır (64-67). Nekrozda görülen özellikler ise; hücrelerde şişme, organellerde ve plazma membranında bozulma, DNA fragmentasyonu, selüler içeriğin ekstraselüler alana kontrolsüz serbestlenmesi, inflamatuvar hücrelerin damar içinden ekstraselüler alana sızması gibi enflamasyon bulgularıdır (64). Bununla beraber yapılan çalışmalarda hücre ölümüne dair farklı morfolojik ve biyokimyasal komponentlerin bir arada bulunduğu gösterilmektedir (68,69). Sözelimi; inme hasarı sonrasında beyin hücrelerinde görülen nöron ölümünde; kaspas aktivasyonu, DNA fragmentasyonu ve nükleer kromatin kondansasyonu yani apoptoz bulguları saptanmıştır. Ancak bununla beraber, apoptozun tam aksine bu nöronların selüler içerikleri membranla kaplı temiz veziküller içinde paketlenmemiştir ki bu durum apoptozda görülen özelliklerin dışındadır ve gözlenen DNA fragmentasyonu her iki yola da ait olabilme özelliğine sahiptir (70-73). Hücre ölümünde görülen bu birbirine zıt iki özellik, bunun bir hibrid reaksiyon olabileceğini düşünülmektedir (64).

Apoptozdaki genetik ve moleküler yollar hakkındaki bilgilerimizin çoğu hücre kültürü üzerindeki çalışmalardan sonra çoğalmıştır. Özellikle nöronal kültürler üzerindeki hücre ölümünü taklit eden çalışmalarda glokom ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda görülen ölüm mekanizmaları araştırılmaya çalışılmaktadır. Bazı çalışmaların ortaya koyduğu verilere göre; apoptozis ve nekrozis birbiri ile

örtüşmektedir (7, 32, 64). Literatürdeki glokomlu hastaların patolojik retinal dokuları ile yaş uyumlu kontrol retinalarının karşılaştırılması ile yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, RGH ölümünde nekrotik ölümün bulguları yetersiz olup, apopitoz bulguları hem ışık mikroskopik hem de elektron mikroskopik olarak baskın düzeydedir (74,75). Bu çalışmalardaki analizler ışık mikroskopisi, elektron mikroskopisi ve DNA yıkımı için TUNEL prosedürü ile yapılmıştır. Glokom hastalarının retinalarında nadir de olsa DNA kırıkları olan (nekrozda olabildiği gibi) RGH leri belirlenmiştir (74,75). Buna göre RGH'nin salt apopitozun bazı formları ile ölmesi hipotezi zayıflamaktadır. Bu noktada bu karmaşık durumu açıklamak için, güncel bakış açısı ile tercih edilen görüş; glokomda ganglion hücrelerinin apopitoz ile öldüğü ancak farklı glokom hastalarında, değişik patolojik dokularda, farklı karakteristik özellikler tanımlanabileceği yönündedir. Yapılabilen en iyi tanımlamalar; "sekonder nekrozis", "apopitoz ve nekroz arasında olan", "ardışık gelen apopitoz ve nekroz" veya "apopitozis üzerine eklenen nekrozis" şeklindedir. Raffray ve Cohen, bu tanımlamaları tekrar düzenlemiştir (76). Öyle gözükmektedir ki; apopitoz ve nekroz, sınırlı derecede ortak moleküler ve selüler biyolojik mekanizmalara sahip olan ve biyokimyasal ölüm yollarının uç noktalarında birbiri ile devamlılık gösteren süreçlerdir.

2.1.7. GLOKOMATÖZ HASARDA EKSTOTOKSİSİTE İLE İLİŞKİLİ APOPİTOZ

Aktive NMDA reseptörlerinin aşırı miktarda Ca un hücre içine girmesine izin verdiği bilinmektedir (77,78). Hücre içi yüksek Ca düzeyleri ile; nitrik oksit sentaz, aşırı serbest radikal birikimi, lipid peroksidasyon, *mitokondrial disfonksiyon* ve katabolik enzimlerin aktivasyonu (nükleaz, proteaz ve lipaz) ile kaspasların devreye girmesi ve sinir terminalinden veziküler glutamatın Ca bağımlı salınımının iyice artması sonucu apopitoza giden yol tetiklenir (1, 36, 37, 79-81). Choi ye göre; bir apopitoz inhibitörü kullanmak, hücre ölümü ile apopitozis arasındaki ilişkiyi tanımlamak için bir alternatif yol olabilir (82). Kwong ve ark. da aynı tezi savunmuştur (83). Her iki çalışmanın sonucunda apopitoz inhibitörleri kullanarak NMDA ilişkili ekstotoksistide apopitozun varlığı ve özellikle kaspasların retinada

NMDA aracılı eksitotoksistede önemli rol oynadığını gösterilmiştir. Bu noktada glokomda; etkin bir anti-eksitotoksik nöroprotektif ajan ile apoptotik hücre ölümünün önlenmesi olasıdır.

2.2. GLOKOMDA NÖROPROTEKTİF TEDAVİ

2.2.1. GLOKOMDA NÖROPROTEKTİF TEDAVİ YAKLAŞIMININ TEMELLERİ

Nöroproteksiyon, RGH leri canlı ve fonksiyonel tutmak için geliştirilmiş bir tedavi stratejisidir (5). Nöroproteksiyon; glokomun ve diğer hastalıkların geleneksel metodlarla tedavisinden farklıdır, çünkü; GİB ndan, oküler kan akımından ve diğer mekanizmalardan tamamen bağımsızdır. Sadece nöronal yaşam süresini arttırmaya yönelik olarak geliştirilmiş bir tedavi yaklaşımıdır.

Nöroproteksiyonun glokom tedavisindeki yeri ile ilgili tartışmalar halen sürmektedir. Çünkü bu yeni tedavinin yaklaşım ve mantığı geleneksel tedavi yöntemlerinden çok farklıdır. Nöroproteksiyon konusunda sıklıkla 3 soru tartışılır;

1. Çoğu hastada GİB nı düşürülebilir iken neden nöroproteksiyona ihtiyaç vardır?
2. Neden nöroproteksiyon RGH ne yöneliktir?
3. Nöroproteksiyonun doğru strateji olduğunun kanıtları nelerdir?

2.2.2. GLOKOMDA NÖROPROTEKTİF TEDAVİ YAKLAŞIMININ MANTIĞI

Güncel yaklaşımda GİB nı düşürmek için çok sayıda medikal ve cerrahi teknik uygulanmaktadır. Ancak başarılı bir GİB düzeyi sağlandığı halde görme alanı kaybının devam ettiği hastalar vardır (14). Bu durum randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen bilgiler ile de gösterilmiştir ki; mükemmel GİB kontrolüne rağmen bazı hastalar progrese olmaktadır (14). İleri Glokom Girişimsel

Çalışması (Advanced Glaucoma Intervention Study - AGIS) dahilindeki bir retrospektif analizde, 6 yıldan daha uzun süren takiplerinde tüm kontrollerde GİB 18 mmHg dan daha düşük bir grup tanımlanmıştır (2). Bu grubun ortalama GİB 12,3 mmHg olarak ölçülmüştür. Başlangıç görme alanlarındaki ortalama değişiklikler ihmal edilebilir düzeyde bulunmuştur. Ancak takipler sonrasında, yaklaşık 1/7 oranında görme alanında anlamlı kötüleşme olduğu gözlenmiştir. 2 yılda %13,1, 5 yılda %13,9; 7 yılda % 14,4'ü kötüleşme oranları tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmanın sonuçları da, GİB düşürülen hastalarda nöroproteksiyonun rolünü destekler niteliktedir. Birleşik Normotansif Glokom Çalışma Grubunun (Collaborative Normal Tension Glaucoma Study) sonuçlarına göre; GİB %30 ve daha fazla düşürülmesine rağmen, hastaların %20'sinde 3-5 yılda progresyon gözlenmiştir. Sonuç olarak, anlamlı düzeyde GİB düşürülmesine rağmen hastalık progresyon gösterebilmektedir (3, 4).

Nöroproteksiyonun diğer bir gerekçesi de; geleneksel tedavinin yetersizliklerinden ve olası yan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bazı hastalarda düşük GİB elde etmek zordur. Bunun sebebi, bu tip hastaların GİB düşürücü ajanlara iyi yanıt vermemesi, ya da bu ilaçlara ve cerrahi prosedürlere karşı geliştirdikleri yan etkiler veya başedilmesi güç, hastaya ait faktörlerden doğan yanıtızsızlıklardır. Böylece, GİB düşürmeye yönelik geleneksel mekanizmalar veya dışa akımı arttırmaya yönelik tüm uygulamalar etkindir denilebilir ama bunlar her hastada yeterli ve iyi tolere edilir olamayabilmektedir (5).

2.2.3. NÖROPROTEKSİYONDA HEDEF NEDEN RETİNA GANGLİON HÜCRELERİDİR?

Glokomda nöroproteksiyonun hedefi RGH gövdeleri, aksonları ve dendritleridir. Çünkü;

- 1) RGH lerinin ölümü, glokomatöz optik nöropatinin sebebi gibi görünmektedir.
- 2) RGH kaybı geri dönüşümsüzdür, çünkü RGH'leri SSS nöronlarıdır ve öldüğünde bu hücreler retinada görülmez olmaktadır.

3) RGH'leri retinadan çıkış nöronlarıdır ve bu sebeple vizüel sinyallerin gözden beyne ulaştırılmasından sorumludurlar.

Bu üç faktör göstermektedir ki; RGH kaybı, geri dönüşsüz görme kaybına neden olabilmektedir. Retinadaki diğer nöroglial hücre tipleri (örneğin astrositler, glialar) da nöroproteksiyonun hedefidir. Ancak glokomatöz optik nöropatinin final ortak yolu RGH nin kaybıdır ve nöroproteksiyonun hedefi öncelikli olarak bu hücreleri yaşatmaktır (5).

Glokomda RGH ölüm mekanizmaları konusunda önemli spekülasyonlar mevcuttur. Bu teorilere göre;

- RGH nin ölümü, komponentlerinin (aksonlar, glia hücreleri, kan damarları vb.) hasarlanmasından ötürüdür (84,85).
- Optik sinir aksonlarındaki hasar, optik sinirin direk kompresyonunun sonucu veya sitokinler ve/veya büyüme faktörlerinin RGH gövdesine ulaşmasındaki yetersizliğe bağlı olabilir. Bu faktörler beyinden retrograd yolla aksonal transport mekanizması ile taşınır ve bunların kaybı RGH yaşamlarını tehlikeye sokar (86-88).
- Astrosit ve mikrogliaları içerecek şekilde glial hücrelerin hasarlanması ganglion hücreleri üzerinde negatif etkiye yol açabilen kimyasalların salınımıyla sonuçlanabilir (89).
- Optik disk alanında kan damarlarının kompresyona uğraması da, RGH nin iskemik hasara uğramasına sebep oluyor olabilir (7).
- Glutamat metabolizmasının fonksiyon bozukluğunun ve iskemi anında aşırı glutamatın retinada ekstraselüler alanlara akümüülasyonunun RGH ölümünde etkin olabileceğini düşünülmektedir. Hayvan çalışmaları göstermiştir ki; inotropik glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu RGH lerinin kendi destrüksiyonlarına gidişi ile ilişkilidir (90-93).

Yukarıda sayılan bir veya daha fazla etken, yaşamsal sürecin bölünmesi ile ilintili sinyaller vermektedir. Bu sürecin sonucu muhtemelen RGH nin

apoptozdur, takiben RGH nin kalıcı fonksiyon kaybına ilerleyen aksonların wallerian dejenerasyonu gelişir, bu histopatolojik değişimler, glokom hastalarında görme alanı kaybı olarak görülür (5).

2.2.4. NÖROPROTEKTANLAR NE ZAMAN KULLANILMALIDIR?

Beyindeki iskemik hasar (inme veya miyokard enfarktüsü sonrası), beyin nöronlarının ölümünün sonucudur. Beyindeki nöronal hasarı azaltacak nöron koruyucu maddelerin araştırıldığı laboratuvar çalışmalarında, kullanılan nöroprotektan maddeler hasar oluşmadan önce veya hasar anında kullanıldığında olumlu sonuçlara varılmıştır (94-96). Glokomda RGH lerinin ölüm sebebi iskemi olabilir (26, 80, 97). Buna göre; glokom tedavisinde RGH'nin ölümünü engellemek üzere kullanılacak nöroprotektanın hastalığın ilk başlangıcında kullanılmaya başlanması gerekmektedir. Çünkü glokomda RGH ölümüne dayalı retina ve optik sinir hasarının yıllar içerisinde gerçekleştiği bilinmektedir. Mantıken, geridönüşümsüz olarak hasarlanmış bir nörona, hasar gerçekleşikten sonra ilaç verilerek ölümünün engellenmesi mümkün gözükmemektedir. Ancak yine de, hücre ölümü prosesinde geriye dönüşü olmayan noktaya giden yolda bir ya da birkaç basamağın inhibe edilebileceğine inanmak olasıdır. Bu inhibisyonun ne ölçüde mümkün olabileceğinin başlangıç hasarın derecesi ile orantılı olacağı düşünülebilir. İnme sürecinde dakikalar içerisinde meydana gelen nöron kaybı, glokomatöz nöropatide yıllar içerisinde görülmektedir. Her iki durumda da nöroprotektan kullanımının nöron kaybını azalttığı, ölüme giden süreci uzattığı görülmektedir. Nöron koruyucu tedavi ne kadar erken evrelerde başlanırsa ölüm hızını o kadar azaltacağı aşikardır. Optik disk alanında oküler kan akımının azaltıldığı glokom benzeri hasarlarda nöroprotektan verilmesi ile hücre ölümü sürecinin yavaşlatılabildiğini savunan çalışmalar mevcuttur (98, 99).

2.3. MEMANTİN

Memantin (1-amino-3, 5- dimetiladamantan hidroklorid) voltaj bağımlı, reseptöre orta derecede afiniteye sahip, kompetitif olmayan bir NMDA reseptör antagonistidir (100, 101). Patolojik olarak yükselmiş tonik glutamat düzeylerinin nöronal disfonksiyona yol açabilen etkilerini bloke etme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (100). Memantin göz ve beyindeki NMDA reseptörleri için oldukça selektiftir ve diğer iyonotropik glutamat reseptörleri olan AMPA ve kainat reseptörü dahil olmak üzere, diğer SSS reseptörlerinin çoğu için anlamlı bir afiniteye sahip değildir (6, 27, 101). NMDA reseptörünü bloke etme mekanizması; bloğun kullanımına bağlı olması nedeniyle kompetitif değildir. Yani bağlanma odağına yalnızca reseptörün aktive olması halinde erişilebilmektedir. Bu da ilacın; beyinde uzun dönem öğrenme ve hafıza fonksiyonları için gerekli fizyolojik glutaminerjik aktivitesinin önlenmemesi açısından oldukça önemlidir.

Memantin; bir antiviral olarak yaklaşık 20 yıldır kullanılan amantadinin derivesidir ve influenza geçiren bir Parkinson hastasında rastlantısal olarak semptomları iyileştirdiği görülerek nöronlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır (6). Memantin normalde pozitif yük taşıyan (NH^{+3}) bir köprü başı amin ile birlikte üç halka yapısına sahiptir. Amantadinden farklı olarak, kanaldaki bağlanma süresini uzatan iki metil yan gruba sahiptir ve bu onu amantadinden daha iyi bir NMDA reseptör blokleri yapar. İyon kanallarına kısa süreli bağlanır ve aşırı NMDA reseptör aktivasyonunu bloklarken reseptörün normal fonksiyonunun blokajı oldukça sınırlıdır. Bu nedenle uyuşukluk ve halüsinasyonlara yol açmaz. Bu özellikleri nedeniyle, klinik olarak iyi tolare edilebilir bir ilaçtır (102, 103).

Memantin, NMDA reseptör ilişkili kanallardaki Mg sitesinin yanına bağlanır. Mg gibi, kendi voltaj bağımlı depolarizasyonundan ve hızlı kinetiğinden dolayı NMDA reseptöründen kolayca ayrılır. Bununla beraber kronik eksitotoksik hasar sırasındaki uzun depolarizasyon sürecinde reseptörden Mg kadar kolay ayrılmaz (104). Uygun sürede reseptörde kalabilirliği sözgelimi; fizyolojik koşullarda kolay ayrılabilirliği ve etkilemezliği, patolojik koşullarda uygun süreli reseptör etkileşimi memantin için doğru kinetik imzaya sahip olduğunun göstergesidir (97).

Memantin bugün, Parkinson hastalığı ve Alzhemier hastalığına bağı demans tedavisinde kullanılmaktadır, AIDS e bağı demans, nöropatik ağı ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisi ile ilgili çalışmalardan da olumlu sonuçlar alınmaktadır (32,97,104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; glokom indüksiyonu ve enjeksiyonlar Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi (DETAB) nde yapılmıştır. Sakrifikasyon işlemi, Işık mikroskopik, elektron mikroskopik preparatların hazırlanması ve elektron mikroskopik değerlendirmeler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. RGH sayımları, retina kalınlık ölçümü ve apopitotik hücre sayımları Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışma Helsinki Bildirgesinde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

3.1. DENEKLER

Çalışmada toplam 75 adet genç erişkin erkek Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Deneklerin ortalama ağırlığı 220 ± 40 gram olarak hesaplandı. Denekler, standart kafeslerde 6'lı gruplar halinde, ad libidum 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, glokom indüksiyonu uygulanan (65 adet denek) ve kontrol grubu (K) denekleri (10 adet denek) olarak önce iki gruba ayrıldı. Glokom indüksiyon işlemi sırasında komplikasyon oluşan ve indüksiyon girişimi başarısız olan toplam 10 adet denek deney protokolünden çıkartıldı. Glokom indüksiyonu başarıyla yapılan toplam 55 adet denek şu şekilde gruplandı:

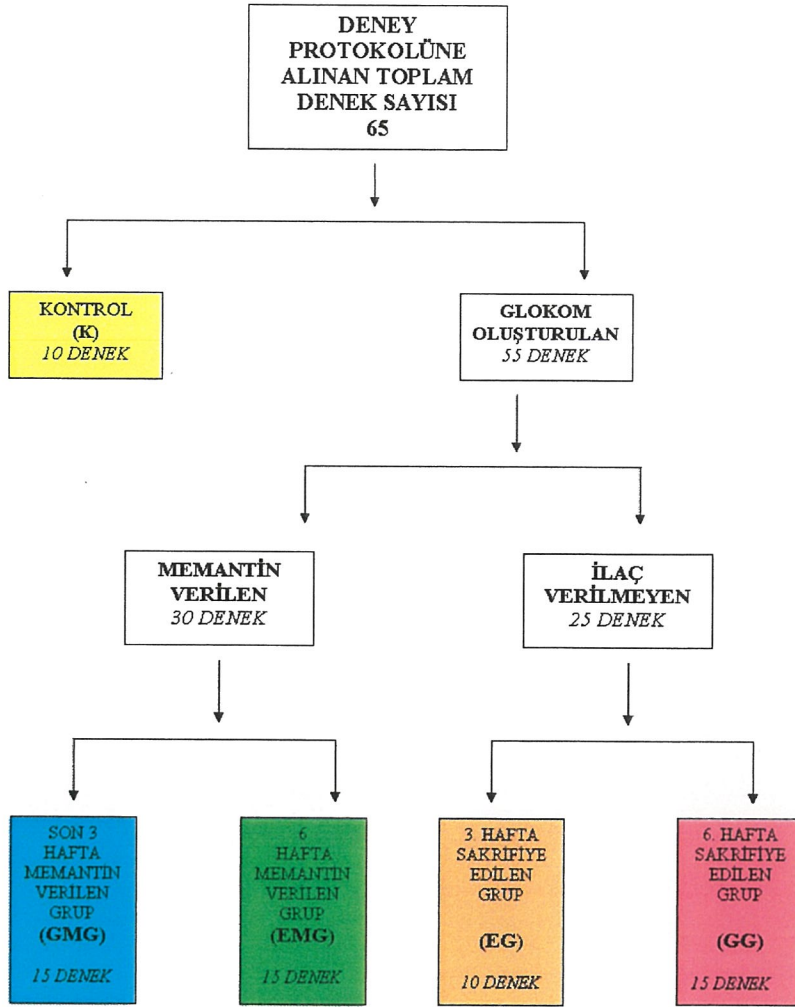
1. Glokom indüksiyonu sonrası 3. haftada sakrifiye edilen denekler (Erken Dönem Glokom Grubu – EG; 10 adet denek)
2. Glokom indüksiyonu sonrası 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Geç Dönem Glokom Grubu – GG; 15 adet denek)

3. Glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı 10 mg/kg/gün intraperitoneal yoldan memantin verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Erken Dönem Memantin Grubu – EMG; 15 adet denek)

4. Glokom indüksiyonu sonrası 3. haftadan itibaren 10 mg/kg/gün intraperitoneal yoldan memantin verilen ve 6. haftada sakrifiye edilen denekler (Geç Dönem Memantin Grubu – GMG; 15 adet denek)

Erken glokom (EG) grubunun oluşturulmasının amacı; geç dönem memantin başlanan GMG grubunda, 3. haftanın sonunda üzerinde memantin olası koruyuculuğunun araştırılacağı 3. hafta sonunda ortalama kalan RGH sayısını ortaya koymaktı. Glokom gruplarına (EG, GG) herhangi bir ilaç uygulanmadı. Kontrol grubuna (K) ise herhangi bir cerrahi uygulama yapılmadı.

Göz içi basınçları glokom indüksiyonunun sürdüğü ilk 3 hafta boyunca işlem öncesi ve sonrasında, sonraki 3 haftada ise haftalık olarak Tono- Pen (Medtronic Solan XL) ile ölçülerek kaydedildi. 6 haftanın sonunda gruplar kardiyak gluteraldehit perfüzyonu yöntemi ile sakrifiye edildikten sonra, fikse edilmiş olan gloablara enükleasyon gerçekleştirildi (105,106).



Şekil 2. Deney planı

3.2. DENEYSSEL GLOKOM MODELİ

Sıçanlara ketamin hidroklorid (15 mg/kg), ksilazin hidroklorid (0,3 mg/kg) ve asepromazin (1,5 mg/kg) intraperitoneal enjekte edilerek genel anestezi uygulandı. Anestezi uygulamasını takiben, 55 adet sıçanın sağ göz ön kamaralarına 30 gauge iğne ile Na hyaluronat (23 mg/ml, Healon-5 ®) enjekte edildi. Cerrahi mikroskop olarak Topcon OMS 75 kullanıldı. Enjeksiyon, korneoskleral limbustan ön kamaraya self- sealing giriş yapılarak, iğne ucunun iris ve lens ile teması engellenerek, iris damarlarında solma izlenene dek (0,03-0,05 ml) uygulandı (107). Bu yöntem ile kontrol grubu hariç tüm deney gruplarında, birer hafta arayla 3 hafta

süresince enjeksiyonlar tekrarlanarak glokom indüksiyonu sağlandı. Her enjeksiyondan hemen önce ve sonra GİB ları ölçüldü. Glokom indüksiyonu sonrası süreçteki GİB ölçümleri 3 mg/kg asepromazin ve 1 damla topikal % 0,4 oksibuprokain hidroklorür ile hafif anestezi uygulamasını takiben, Tono- Pen ile yapıldı. Tono-Pen prob ucunun korneaya teması ile birlikte cihazın içerdiği mikroişlemci ile ardışık, otomatik 5 ölçümün ortalaması alınarak GİB değeri olarak kaydedildi. Enjeksiyonlar ve ölçümler hep aynı saatte (09:00-10:30) yapıldı.

3.3. MEMANTİN UYGULAMASI

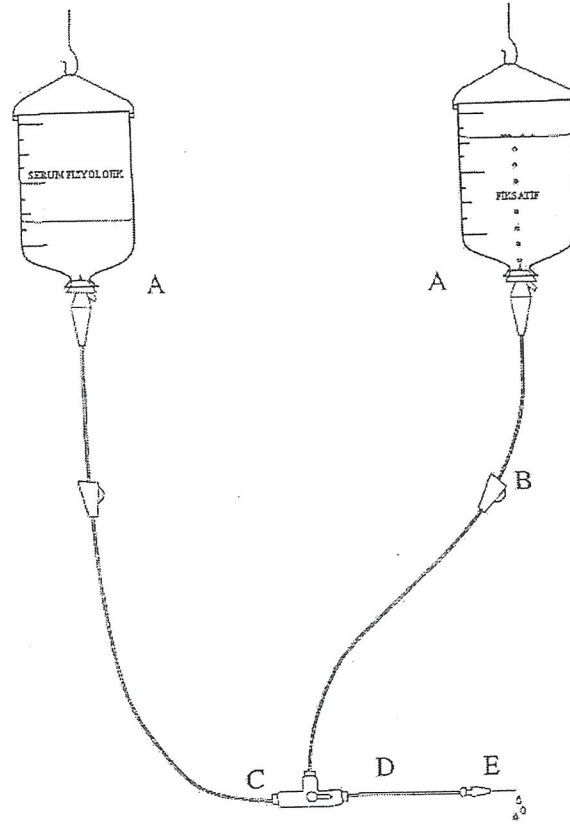
Erken Dönem Memantin Grubuna (15 adet denek), glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte eş zamanlı başlanarak günde tek doz 10 mg/kg/gün memantin distile su ile çözelti halinde (Ebixa® saf etken madde; Lundbeck İlaç Tic.Ltd. Şti.) intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 42 doz memantin uygulandı.

Geç Dönem Memantin Grubuna (15 adet denek), glokom indüksiyonu süreci bitiminde başlanmak üzere (3. haftanın sonunda) günde tek doz 10 mg/kg/gün memantin intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi. 6. haftada sakrifiye edilene dek bu denek grubuna toplam 21 doz memantin uygulandı.

3.4. SAKRİFİKASYON VE KARDİAK PERFÜZYON

Perfüzyon tespitinin başlamasından 15 dakika önce, 350 gramdan daha ağır olan sıçanlara anestezi öncesi 150U/kg intraperitoneal heparin verilerek 10 dk. süreyle antikoagulan etkinin oluşması beklendi. Daha sonra intraperitoneal uygulanan 2 mg/kg Sodyum pentotal ile anestezi gerçekleştirildi. Anestezinin 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 klempli 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 diğesinde 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 (Şekil). Sağ atriyumdan akan sıvının berraklaştığı görüldüğünde kanülün vanası diğeri 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.



Şekil 3. Perfüzyon düzeneği

İki adet birer litreli serum şişesinden (A), birinde serum fizyolojik, diğesinde ise tamponlu glutaraldehit bulunmaktaydı. Bu şişeler üç yollu vanaya (C) takılmış bir serum setine (B) bağlanmıştı. Şişeler tezgahın 120 cm yukarıya asıldı.

Vana çıkışına bağlı tüpün uzunluğu 15–30 cm arasında tutuldu (D). Bu tüpün ucuna da 18G iğne (E) bağlandı.

3.5. RETİNAL GANGLİON HÜCRE SAYIMI VE RETİNA KALINLIĞI ÖLÇÜMÜ

Retinaya ait parafin bloklardan poli-L-lizinle kaplanmış lameller üzerine alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler bir gece boyunca 45° C etüvde bekletildi. Alkol serileri ile dehidratasyon ve toluol ile gerçekleştirilen şeffaflaştırma işlemlerinin ardından kesitler suya indirilerek rutin hematoksilen eozin ve gangliyon hücre sayımı için ayrıca %1 krezil viyole ile boyandı. Morfolojik olarak şekil ve büyüklüklerine göre ayırmsanabilen glia hücreleri ve vasküler endotelial hücreler sayılmadı. Nissl maddesi içeren RGH leri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında Olympus BX 51 model mikroskop ile görüntülendi. SPOT Insight Firewire kamerayla görüntülenen mikrofotografılar, SPOT Advanced Software Windows: Version 4,1 ile analiz edilerek, retinada alan (mm²) başına düşen retinal ganglion hücresi çift kör iki araştırmacı tarafından sayıldı. Gerekli kalibrasyonlar yapıldıktan sonra, aynı dijital analiz sistemi ile tam kat retina kalınlığı ölçüldü.

3.6. TUNEL (DEOXYNUCLEOTİDYL TRANSFERASE-MEDİATED DUTP-BİOTİN NİCK END LABELİNG) METODU İLE APOPİTOZ ANALİZİ

Parafine gömülü retina bloklarından optik sinir başı kenarı baz alınarak 4 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. İmmünohistokimyasal boyama için in situ hücre ölümü belirleme kiti (In-situ cell death detection kit, Roche Applied Science, Almanya) kullanıldı. Retinal kesitler fosfat tamponlu salin solüsyonu ile yıkandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivasyonu metanol içinde %3 lük hidrojen peroksit ile 15 dakika muamele edilerek baskılandı. Proteinaz K çözeltisi (10 mM tris/HCL içinde) (Roche Applied Science, Almanya) ile 30 dk oda sıcaklığında bekletilen kesitler fosfat tamponlu salin yıkamalarının ardından, enzim (deoksiniükleotidil transferaz) ve işaretleyici çözeltisi karışımı içinde 37 C’de 1 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin bitiminde fosfat tamponlu salin ile yıkanan kesitler 540 nm yeşil

filtre altında floersan mikroskop ile ara incelemeye alınarak fotoğraf çekildi. Daha sonra çevirici-POD ile işleme alınan kesitler diaminobenzidin ya da AEC kromojenleri ile işaretlendi ve Mayer hematoksilen ile zıt boyama (counter stain) yapılan kesitler bir lamelle kapatılarak ışık mikroskopta incelendi. Işık mikroskopik analizde retinadaki TUNEL pozitif hücreler (TUNEL yöntemi ile boyalı apoptotik hücreler) sayıldı. Apoptotik hücre sayımları Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında Olympos BX 51 model mikroskop ile gerçekleştirildi. SPOT Insight Firewire kamerayla görüntülenen mikrofotograflar, SPOT Advanced Software Windows: Version 4,1 ile analiz edilerek, apoptotik hücre sayımı yapıldı.

3.7. ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME VE ULTRASTRÜKTÜREL DEĞERLENDİRME

Göz yarı küresinin arka duvarı 1 mm'lik parçalar halinde kesilerek 1 saat süreyle %2,5'lik glutaraldehit fiksatifinde +4 °C de bekletildi ve daha sonra soğuk kakodilat tamponunda (0.05 M; pH 7.4) iki kez 10'ar dakika süreyle yıkandıktan sonra 1 saat süreyle %1 osmium tetroksit ile postfiksasyon gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından %50, %70, %90, %96 ve %100 alkol serileri ile dehidratasyon işlemi uygulandı ve ertesinde propilen oksit-Epon 812 karışımında infiltre edilen dokular Epon-812 gömme ortamında bloklandı. Bloklardan alınan kalın (1 µm) kesitler (Reichert mikrotomu) toluidin mavisi ile boyandı ve retina tabakasının enine kesitinin bulunduğu bloklardan ince kesitler alındı (LKB ultramikrotomu). İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanarak Jeol-1011B elektron mikroskobu ile incelendi ve Megaview sayısal görüntüleme sistemiyle görüntüledi. Retinanın tüm katlarındaki değişimler tutulumun şiddetine göre derecelendirildi (Tablo 7 ve Tablo 8).

3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi “SPSS for Windows version 12” yazılımı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde, değişkenlerin karşılaştırılmasında tüm gruplar için çoklu varyans analizi (ANOVA), grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise Post Hoc değerlendirme (Tukey testi) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

GMG grubundaki iki adet deneğe ait ışık mikroskopik değerlendirmelerin teknik olarak sağlıklı olmaması nedeniyle bu iki deneğe ait tüm parametreler değerlendirmelerin dışında bırakılmıştır. Sonuç olarak GMG grubuna ait bu iki denek çalışma protokolünden çıkartılmış olup, bu gruba ait denek sayısı 13 olarak kabul edilmiştir.

4.1. GÖZ İÇİ BASINÇ DEĞERLERİ

Sakrifikasyon öncesi GİB ölçümleri (ortalama değer \pm standart deviasyon); K grubunda $13,20 \pm 1,31$ mm Hg, EG grubunda $34,30 \pm 1,88$ mm Hg, GG grubunda $30,80 \pm 2,04$ mm Hg, EMG grubunda $29,53 \pm 1,72$ mm Hg ve GMG grubunda ise $29,84 \pm 1,99$ mm Hg şeklinde idi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma analizi (ANOVA yöntemi ile) anlamlı olarak bulundu ($p < 0,05$).

K ve EG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, üçüncü haftanın sonunda sakrifiye edilen EG grubunun ortalama GİB değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin göz içi basınçlarında anlamlı yükselme sağlanmıştır.

K ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen EG grubunun ortalama GİB değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir.

K ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen EMG grubunun ortalama GİB değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir.

K ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda

sakrifiye edilen GMG grubunun ortalama GİB değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir.

EG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p= 0,980$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem glokomlu grup ortalama GİB değerleri ile geç dönem glokomlu grup ortalama GİB değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

EG ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p= 0,148$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem glokomlu grup ortalama GİB değerleri ile erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama GİB değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

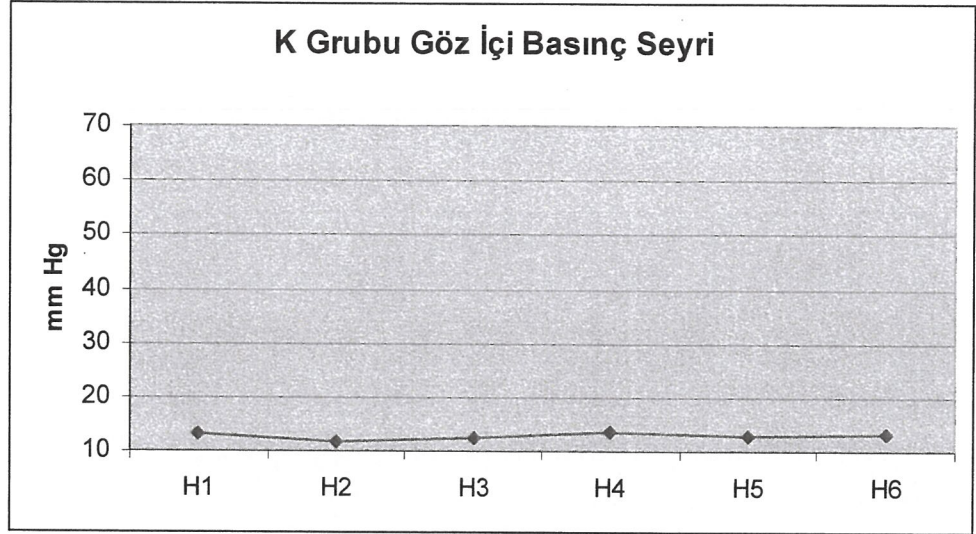
EG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p= 0,360$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem glokomlu grup ortalama GİB değerleri ile geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama GİB değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

GG ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p= 0,286$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama GİB değerlerinde, memantin verilmeyen glokomlu gruba göre anlamlı bir fark saptanmamıştır.

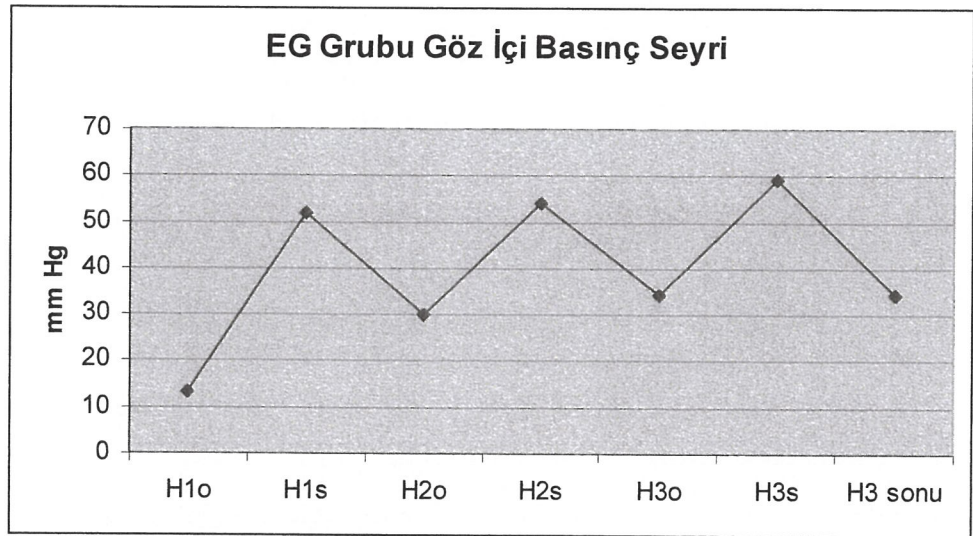
GG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p= 0,604$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama GİB değerlerinde, memantin verilmeyen glokomlu gruba göre anlamlı bir fark saptanmamıştır.

EMG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p= 0,990$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama GİB değerleri ile, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama GİB değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

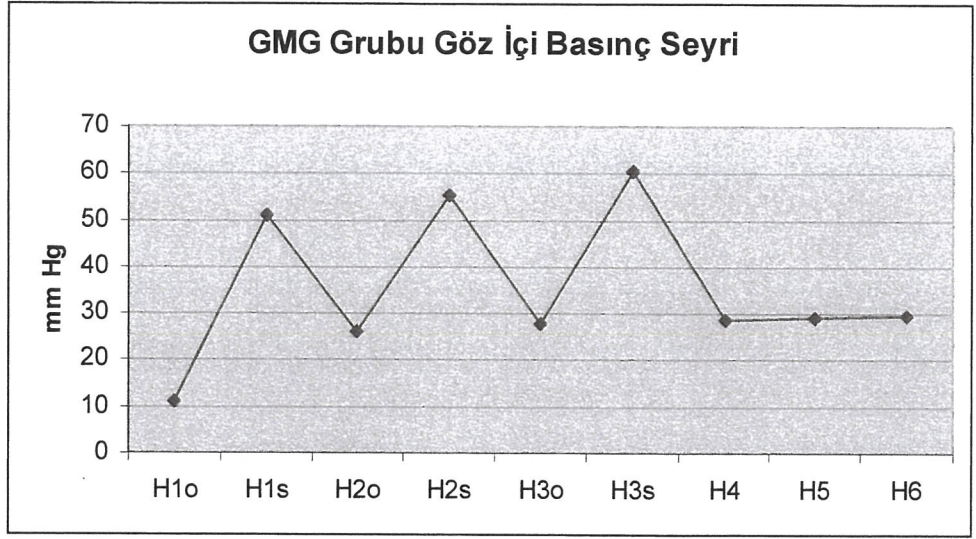
Gruplara ait GİB değerleri Şekil 4 - Şekil 9'da gösterilmiş olup, aynı zamanda Tablo-1'de özetlenmiştir. Tablo-2'de ise gruplar arası istatistiksel karşılaştırmaların anlamlılık değerlendirmelerine ait bulgular özetlenmiştir.



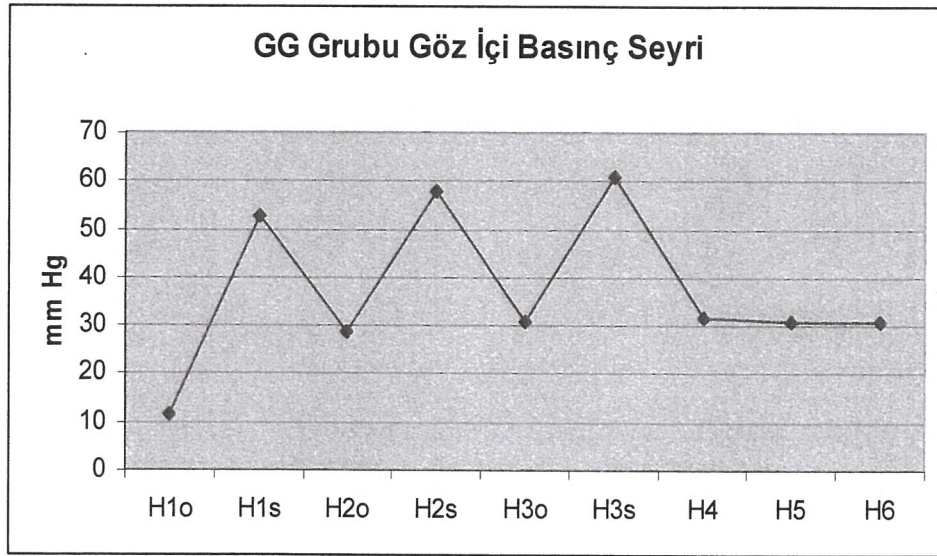
Şekil 4. K Grubu GİB seyri



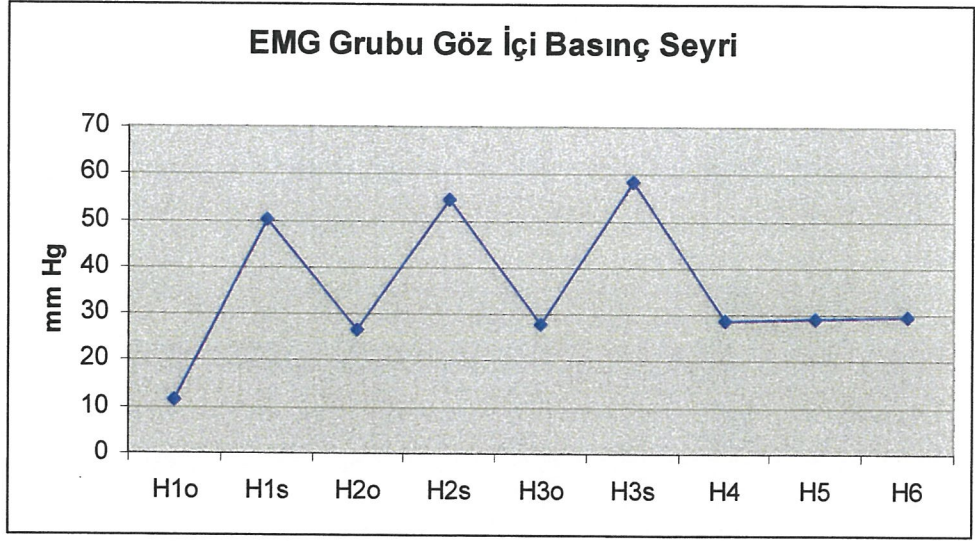
Şekil 5. EG Grubu GİB seyri



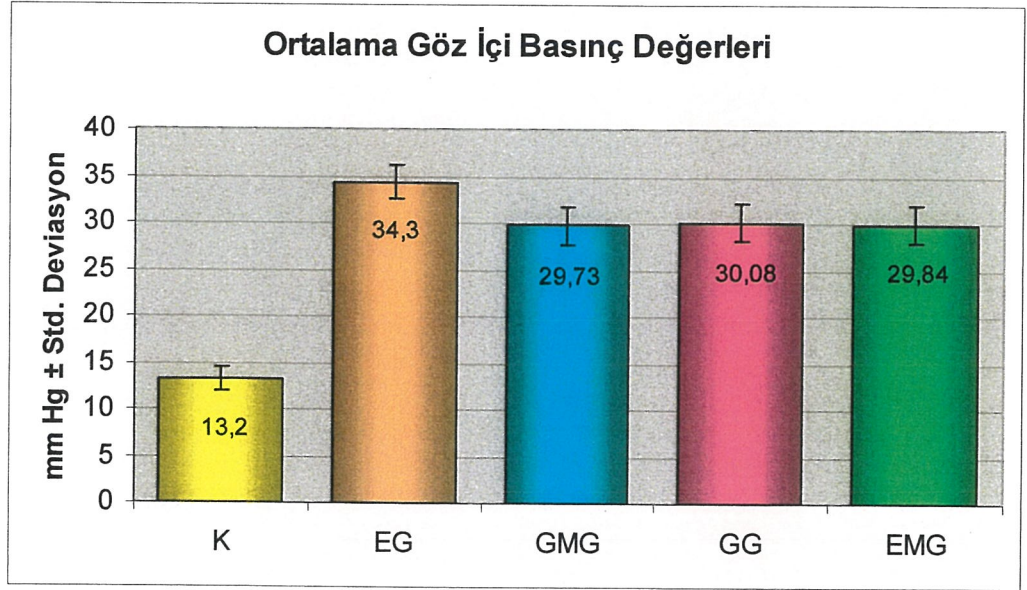
Şekil 6. GMG Grubu GİB seyri



Şekil 7. GG Grubu GİB seyri



Şekil 8. EMG Grubu GİB seyri



Şekil 9. Tüm gruplara ait sakrifikasyon öncesi son GİB değerleri (ortalama mm Hg ± Standart Deviasyon).

Grup	1. Hafta		2. Hafta		3. Hafta		4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta
	Enj. Önce	Enj. Sonra	Enj. Önce	Enj. Sonra	Enj. Önce	Enj. Sonra			
Kontrol	12,00	-	11,00	-	12,00	-	14,00	12,00	12,00
	14,00	-	11,00	-	13,00	-	13,00	14,00	14,00
	11,00	-	9,00	-	10,00	-	12,00	11,00	11,00
	15,00	-	15,00	-	14,00	-	14,00	15,00	15,00
	13,00	-	12,00	-	11,00	-	14,00	12,00	13,00
	13,00	-	13,00	-	11,00	-	12,00	12,00	13,00
	12,00	-	11,00	-	13,00	-	14,00	12,00	12,00
	14,00	-	12,00	-	13,00	-	14,00	15,00	15,00
	15,00	-	14,00	-	14,00	-	16,00	13,00	14,00
	13,00	-	12,00	-	14,00	-	13,00	12,00	13,00
Erken Glokom Grubu	14,00	47,00	28,00	50,00	32,00	55,00	33,00		
	13,00	51,00	30,00	51,00	33,00	57,00	31,00		
	13,00	49,00	34,00	55,00	37,00	60,00	36,00		
	14,00	52,00	31,00	53,00	36,00	59,00	37,00		
	15,00	53,00	32,00	54,00	32,00	58,00	34,00		
	12,00	50,00	30,00	52,00	34,00	60,00	32,00		
	14,00	51,00	26,00	55,00	34,00	59,00	35,00		
	11,00	56,00	31,00	57,00	35,00	61,00	34,00		
	12,00	55,00	32,00	56,00	34,00	62,00	36,00		
13,00	56,00	27,00	57,00	36,00	63,00	35,00			
Geç Glokom Grubu	11,00	53,00	29,00	60,00	32,00	62,00	34,00	31,00	30,00
	11,00	54,00	31,00	61,00	30,00	64,00	31,00	30,00	31,00
	9,00	55,00	27,00	59,00	31,00	61,00	32,00	33,00	30,00
	15,00	53,00	30,00	58,00	33,00	60,00	34,00	33,00	32,00
	12,00	54,00	30,00	55,00	33,00	59,00	32,00	30,00	29,00
	13,00	56,00	31,00	60,00	33,00	61,00	31,00	30,00	30,00
	11,00	55,00	25,00	59,00	28,00	62,00	30,00	31,00	29,00
	12,00	54,00	30,00	57,00	31,00	60,00	32,00	30,00	31,00
	14,00	51,00	28,00	54,00	30,00	60,00	31,00	30,00	30,00
	12,00	50,00	27,00	55,00	29,00	59,00	30,00	29,00	30,00
	10,00	55,00	27,00	62,00	27,00	64,00	28,00	27,00	27,00
	13,00	59,00	31,00	63,00	32,00	63,00	32,00	32,00	33,00
	9,00	45,00	28,00	55,00	31,00	58,00	32,00	33,00	34,00
10,00	48,00	31,00	56,00	33,00	61,00	34,00	35,00	35,00	
11,00	52,00	24,00	58,00	30,00	59,00	33,00	29,00	31,00	

Tablo 1. Deneklere ait göz içi basınç ölçümleri

Grup	1. Hafta		2. Hafta		3. Hafta		4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta
	Enj. Önce	Enj. Sonra	Enj. Önce	Enj. Sonra	Enj. Önce	Enj. Sonra			
Erken Memantin Grubu	10,00	49,00	28,00	54,00	30,00	55,00	30,00	31,00	31,00
	12,00	51,00	29,00	55,00	30,00	56,00	30,00	30,00	32,00
	11,00	55,00	24,00	58,00	26,00	63,00	27,00	29,00	28,00
	14,00	54,00	28,00	57,00	29,00	60,00	28,00	26,00	27,00
	12,00	53,00	29,00	57,00	30,00	61,00	28,00	29,00	30,00
	12,00	48,00	28,00	50,00	30,00	55,00	31,00	30,00	31,00
	13,00	49,00	26,00	51,00	27,00	58,00	28,00	27,00	28,00
	11,00	50,00	24,00	54,00	26,00	59,00	27,00	28,00	29,00
	10,00	47,00	28,00	51,00	29,00	54,00	30,00	31,00	31,00
	12,00	52,00	27,00	57,00	28,00	61,00	30,00	31,00	32,00
	11,00	51,00	26,00	58,00	28,00	63,00	28,00	28,00	29,00
	12,00	50,00	26,00	56,00	27,00	59,00	28,00	29,00	28,00
	13,00	51,00	24,00	54,00	25,00	58,00	26,00	27,00	27,00
	8,00	46,00	25,00	52,00	27,00	60,00	28,00	29,00	29,00
	10,00	48,00	26,00	51,00	29,00	56,00	30,00	31,00	31,00
Geç Memantin Grubu	9,00	44,00	24,00	51,00	26,00	60,00	28,00	27,00	27,00
	10,00	47,00	26,00	50,00	28,00	55,00	29,00	30,00	29,00
	11,00	56,00	24,00	59,00	26,00	63,00	27,00	28,00	29,00
	12,00	52,00	27,00	56,00	28,00	60,00	28,00	28,00	28,00
	14,00	55,00	28,00	57,00	30,00	59,00	28,00	29,00	33,00
	12,00	53,00	29,00	58,00	30,00	62,00	30,00	29,00	29,00
	10,00	48,00	25,00	52,00	28,00	64,00	29,00	31,00	32,00
	10,00	46,00	27,00	52,00	29,00	59,00	29,00	32,00	33,00
	8,00	45,00	25,00	55,00	26,00	61,00	28,00	28,00	29,00
	11,00	50,00	26,00	57,00	27,00	59,00	28,00	28,00	30,00
	11,00	47,00	29,00	50,00	28,00	56,00	28,00	28,00	28,00
	13,00	55,00	27,00	59,00	28,00	62,00	28,00	30,00	29,00
	12,00	56,00	26,00	60,00	29,00	63,00	32,00	31,00	32,00

Tablo 1 (Devam). Deneklere ait göz içi basınç ölçümleri

Grup	Karşılaştırılan Gruplar	p Değeri
K	EG	0,000*
	GG	0,000*
	EMG	0,000*
	GMG	0,000*
EG	K	0,000*
	GG	0,980
	EMG	0,148
	GMG	0,360
GG	K	0,000*
	EG	0,980
	EMG	0,286
	GMG	0,604
EMG	K	0,000*
	EG	0,148
	GG	0,286
	GMG	0,990
GMG	K	0,000*
	EG	0,360
	GG	0,604
	EMG	0,990

Tablo 2. GİB değerleri gruplar arası karşılaştırma. Deney gruplarına ait göz içi basınç ölçümlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Tukey testine göre p değerleri gösterilmiştir. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (*) kabul edilmiştir.

4.2. RETİNA GANGLİON HÜCRESİ SAYIMI

RGH sayımları (mm^2 de ortalama sayı \pm standart deviasyon); K grubunda $1787,70 \pm 8,94$, EG grubunda $1566,90 \pm 26,77$, GG grubunda $1320,40 \pm 18,05$, EMG grubunda $1765,46 \pm 14,35$ ve GMG grubunda ise $1527,53 \pm 68,57$ şeklinde idi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma analizinde gruplar arası farklılık anlamlı bulundu (ANOVA, $p < 0,05$).

K ve EG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, EG grubunun ortalama

RGH sayımı değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma grlmştir.

K ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama RGH sayımı değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonrası altıncı haftanın sonunda deneklerin RGH sayılarında anlamlı azalma grlmştir.

K ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,531$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerleri ile kontrol grubu deneklerin ortalama RGH sayımı değerleri arasında anlamlı bir fark yoktur. Bu, erken dönem başlanan memantin retina ganglion hücre kaybını önlemede anlamlı etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

K ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, GMG grubunun ortalama RGH sayımı değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktür. Bu, geç dönem memantin başlanan grupta ortalama RGH sayısının kontrol grubuna göre anlamlı Şekilde azalmış olduğunu göstermektedir.

EG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama RGH sayımı değerleri, üçüncü haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama RGH sayımı değerlerine göre anlamlı düzeyde az bulunmuştur. Bu, glokom indüksiyonu sonrası altıncı haftanın sonunda deneklerin RGH sayılarında üçüncü haftanın sonuna kıyasla anlamlı derecede azalmanın devam ettiğini düşündürmektedir.

EG ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerleri, erken dönem glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fazlalık göstermektedir. Bu, erken dönem başlanan memantin retina

ganglion hücre kaybını önlemede anlamlı etki gösterebileceğini destekler yönde bir bulgu olarak kabul edilebilir.

EG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p= 0,070$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerleri ile geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama RGH sayımı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

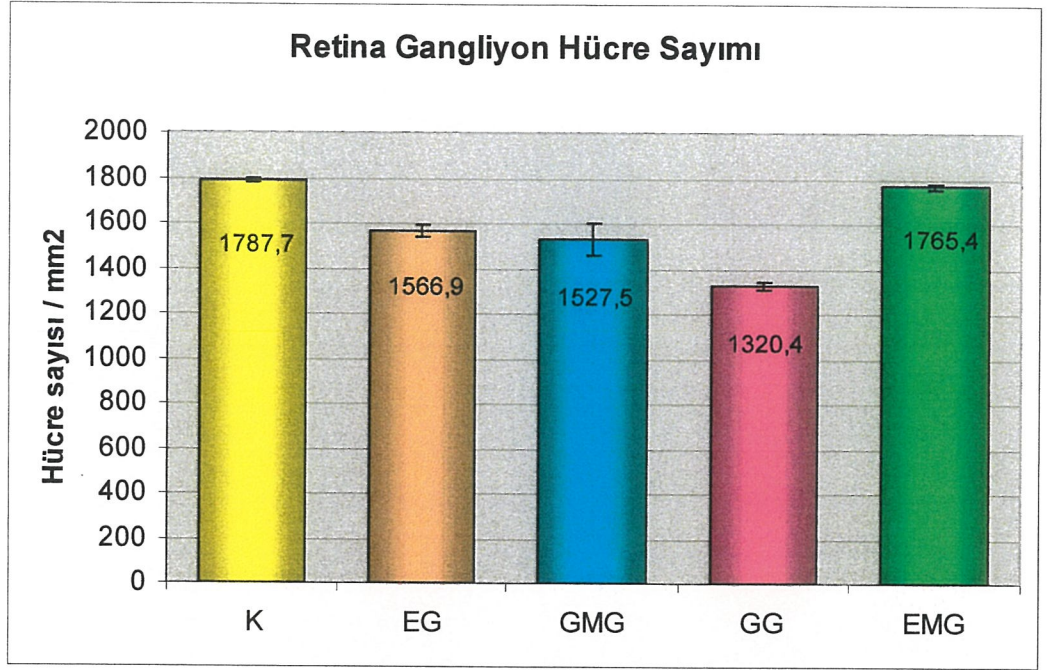
EMG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, memantin verilmeyen glokomlu gruba göre anlamlı düzeyde daha fazla bulunmuştur.

GMG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuca göre, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, memantin verilmeyen glokomlu gruba göre daha fazla bulunmuştur.

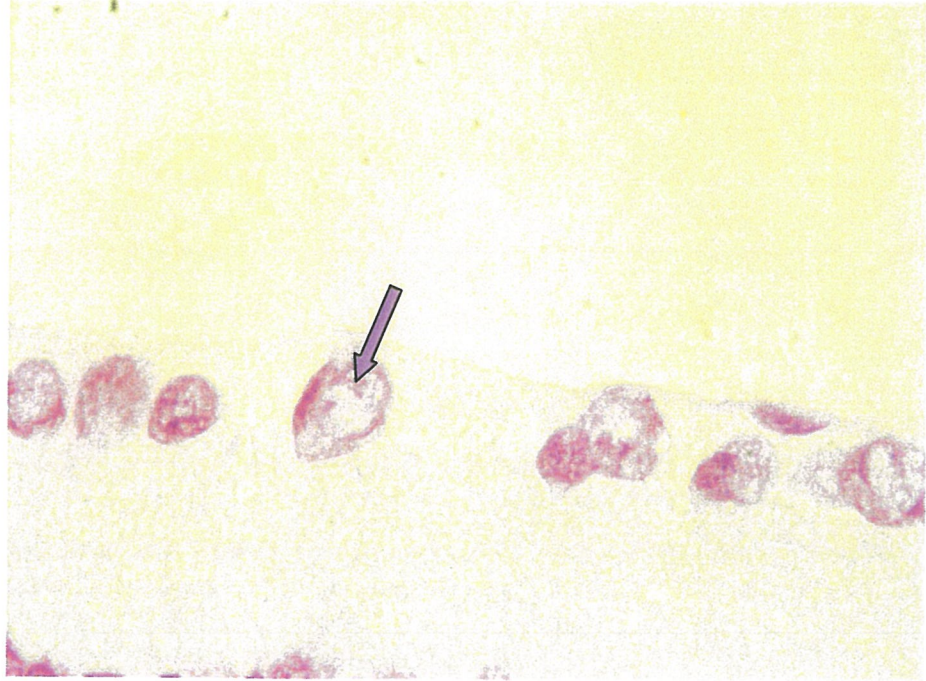
EMG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama RGH sayımı değerleri, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur.

Gruplara ait ortalama RGH sayımı değerleri Şekil-10'da gösterilmiştir. Tablo-3'te ise gruplar arası istatistiksel karşılaştırmaların (ANOVA, Post Hoc Tukey) anlamlılık değerleri özetlenmiştir. Şekil 11'de ise Nissl cisimcikleri ile tanınan RGH ne örnek preparatın resmi görülmektedir.

Yüzde oranları karşılaştırıldığında; EMG da; K grubuna göre RGH kaybı %1,23 iken GG grubuna göre RGH kazancı %33,7 dir. K grubu ile EG grubu karşılaştırıldığında 3. haftanın sonunda RGH kaybı %12,3 tür. K grubu ile GMG karşılaştırıldığında 6. haftanın sonunda kayıp %14,5 tur. EG grubu ile GG grubu karşılaştırıldığında 3. haftadan 6. haftanın sonuna kadar ek %15 lik kayıp devam etmiştir. EG grubu ile GMG grubu karşılaştırıldığında ise 6. haftanın sonundaki ek kayıp %2,4 oranında olmuştur.



Şekil 10. Gruplara ait ortalama RGH sayımı değerleri (Ortalama \pm Standart deviasyon).



Şekil 11. Cresyl Viole ile boyalı retinal kesitte retina gangliyon hücresi Nissl cisimcikleri (ok) izleniyor (x1000).

<i>Grup</i>	<i>Karşılaştırılan Gruplar</i>	<i>p Değeri</i>
K	EG	0,000*
	GG	0,000*
	EMG	0,531
	GMG	0,000*
EG	K	0,000*
	GG	0,000*
	EMG	0,000*
	GMG	0,070
GG	K	0,000*
	EG	0,000*
	EMG	0,000*
	GMG	0,000*
EMG	K	0,531
	EG	0,000*
	GG	0,000*
	GMG	0,000*
GMG	K	0,000*
	EG	0,070
	GG	0,000*
	EMG	0,000*

Tablo 3. RGH sayımı değerleri gruplar arası karşılaştırma. Deney gruplarına ait RGH sayımı değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Tukey testine göre p değerleri. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (*) kabul edilmiştir.

4.3. RETİNA KALINLIK ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Retina kalınlığı ölçüm değerleri (ortalama mikrometre \pm standart deviasyon); K grubunda $91,40 \pm 3,56$, EG grubunda $70,30 \pm 2,26$, GG grubunda $63,46 \pm 3,50$, EMG grubunda $87,86 \pm 3,06$ ve GMG grubunda ise $68,38 \pm 3,17$ şeklinde idi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma analizinde gruplar arası farklılık anlamlı bulundu (ANOVA, $p < 0,05$).

K ve EG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, üçüncü haftanın sonunda

sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama retina kalınlığı değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur.

K ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama retina kalınlığı değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonrası altıncı haftanın sonunda deneklerin ortalama retina kalınlığı değerlerinde anlamlı azalma gözlenmiştir.

K ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,062$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama retina kalınlığı değerleri ile kontrol grubu deneklerin ortalama retina kalınlığı değerleri arasında anlamlı bir fark yoktur. Bu, erken dönem başlanan memantin retinal katman kalınlığının korunmasında anlamlı bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

K ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, GMG grubunun ortalama retina kalınlığı değerleri, K grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktür. Bu, geç dönem memantin başlanan grupta ortalama retina kalınlığının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olduğunu göstermektedir.

EG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama retina kalınlığı değerlerinin, üçüncü haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama değerlerine göre anlamlı düzeyde azalmış olduğu görülmüştür. Glokom indüksiyonu sonrası altıncı haftanın sonunda deneklerin retina kalınlığında üçüncü haftanın sonuna kıyasla anlamlı derecede azalmanın devam ettiği söylenebilir.

EG ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama retina kalınlığı değerleri, erken dönem glokomlu grup ortalama retina kalınlığı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fazlalık göstermektedir. Bu, erken dönem başlanan memantin

retinal katman kalınlığının korunmasında anlamlı etki gösterdiğini destekler bir bulgu olarak kabul edilebilir.

EG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p= 0,609$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem glokomlu grup ortalama retina kalınlığı değerleri ile geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama retina kalınlığı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

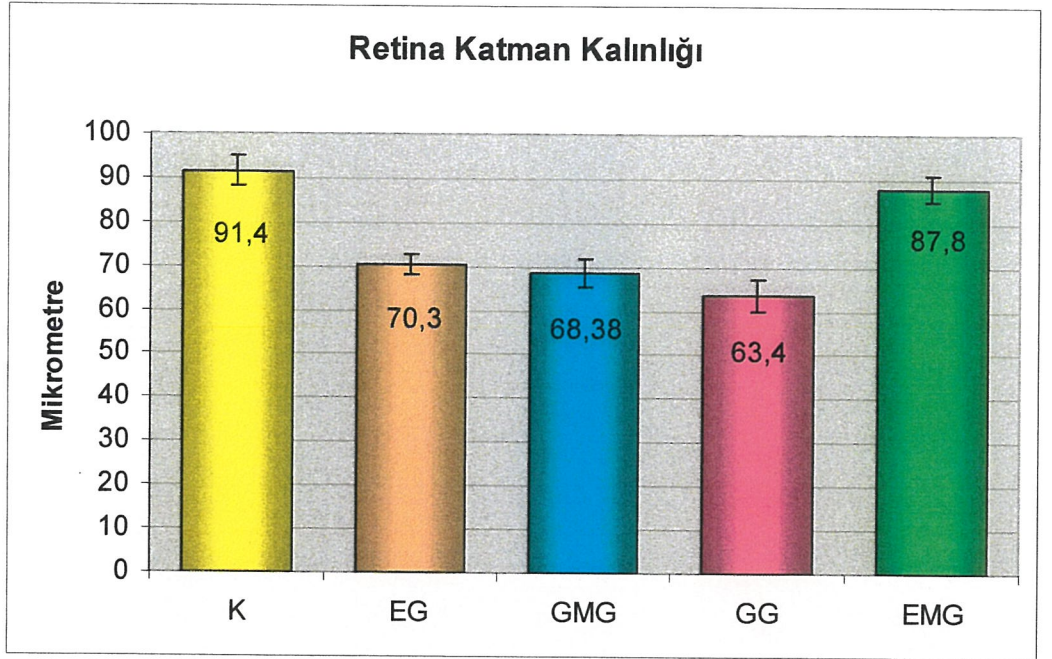
EMG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama retina kalınlığı değerlerinin, memantin verilmeyen glokomlu gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulunmuştur.

GMG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuca göre, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama retina kalınlığı değerleri, memantin verilmeyen glokomlu gruba göre daha yüksek bulunmuştur.

EMG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ölçülen ortalama retina kalınlığı değerleri, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur.

Gruplara ait ortalama retina kalınlığı değerleri Şekil 12’de gösterilmiştir. Tablo-4’te ise gruplar arası istatistiksel karşılaştırmaların (ANOVA, Post Hoc Tukey) anlamlılık değerleri özetlenmiştir. Şekil 13 (A-D)’de ise gruplara ait histolojik kesitler sunulmuştur.

Yüzde oranları karşılaştırıldığında; EMG da; K grubuna göre retina kalınlığı kaybı %3,8 iken GG grubuna göre kazanç %38,4 tür. K grubu ile EG grubu karşılaştırıldığında 3. haftanın sonunda kayıp %23 tür. K grubu ile GMG karşılaştırıldığında 6. haftanın sonunda kayıp %25,1 dir. EG grubu ile GG grubu karşılaştırıldığında 3. haftadan 6. haftanın sonuna kadar ek %9,7 lik kayıp devam etmiştir. EG grubu ile GMG grubu karşılaştırıldığında ise 6. haftanın sonundaki ek kayıp oranı %2,7 dir.

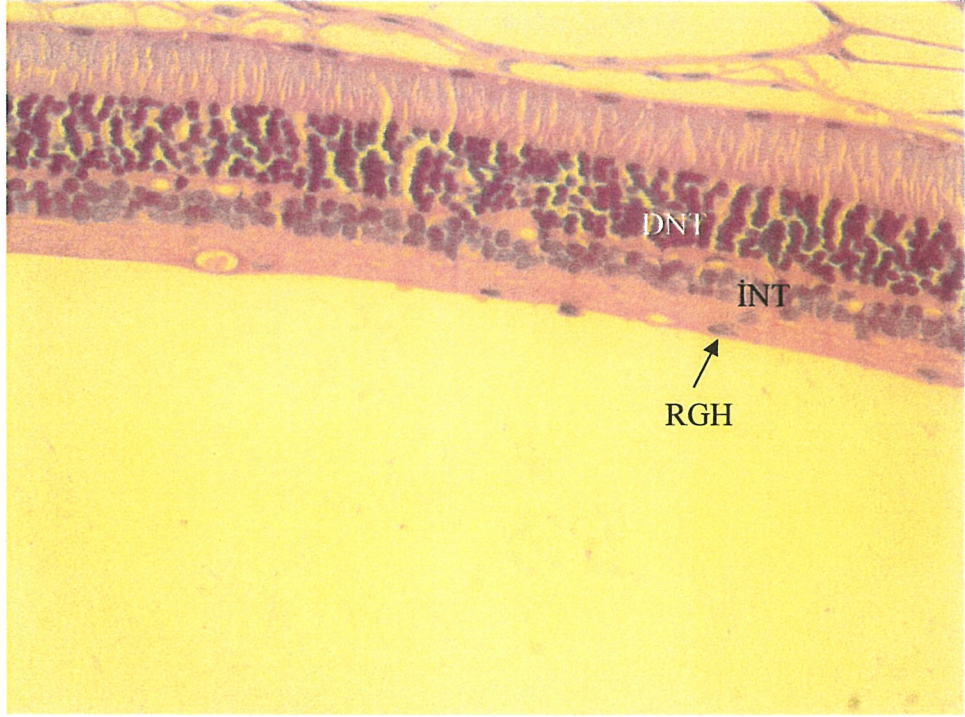


Şekil 12. Gruplara ait ortalama retina kalınlığı değeri (mikrometre \pm standart deviasyon).

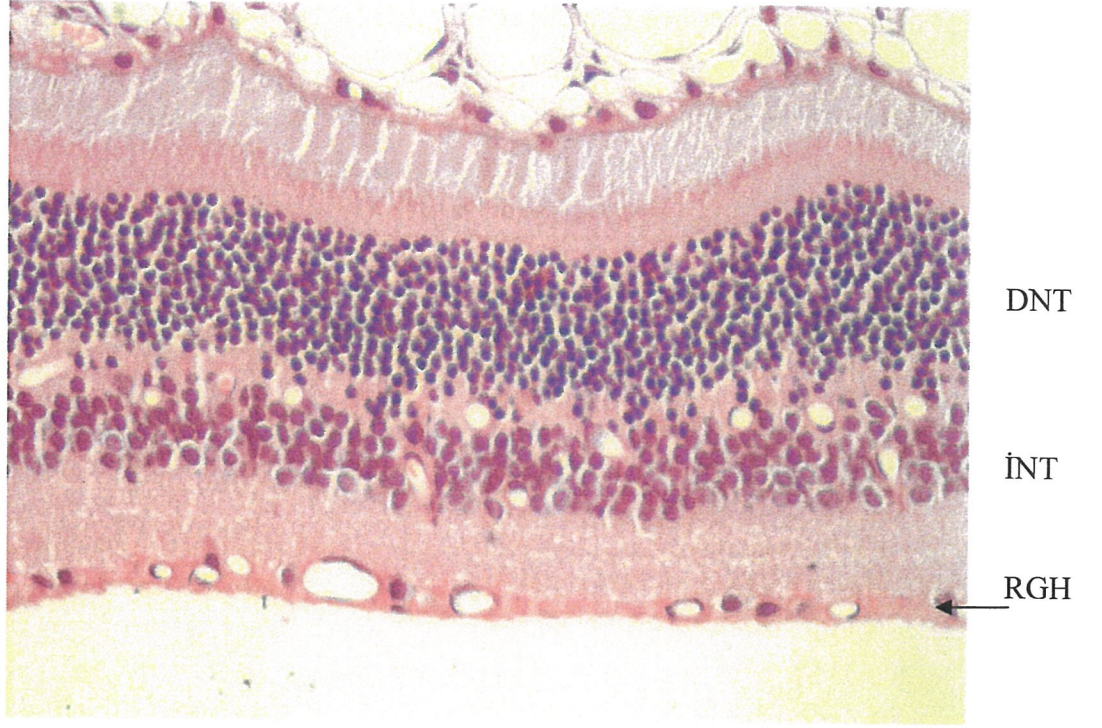
K	EG	0,000*
	GG	0,000*
	EMG	0,062
	GMG	0,000*
EG	K	0,000*
	GG	0,000*
	EMG	0,000*
	GMG	0,609
GG	K	0,000*
	EG	0,000*
	EMG	0,000*
	GMG	0,001*
EMG	K	0,062
	EG	0,000*
	GG	0,000*
	GMG	0,000*
GMG	K	0,000*
	EG	0,609
	GG	0,001*
	EMG	0,000*

Tablo-4.

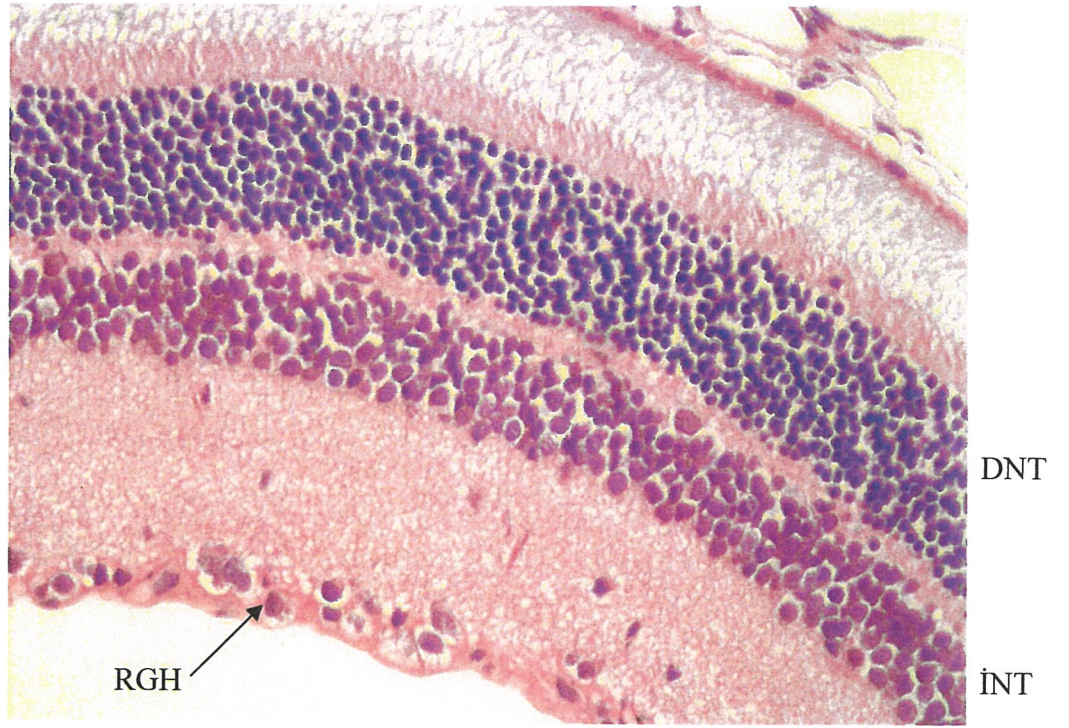
Tablo 4. Deney gruplarına ait retina kalınlığı değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Tukey testine göre p değerleri. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (*) kabul edilmiştir.



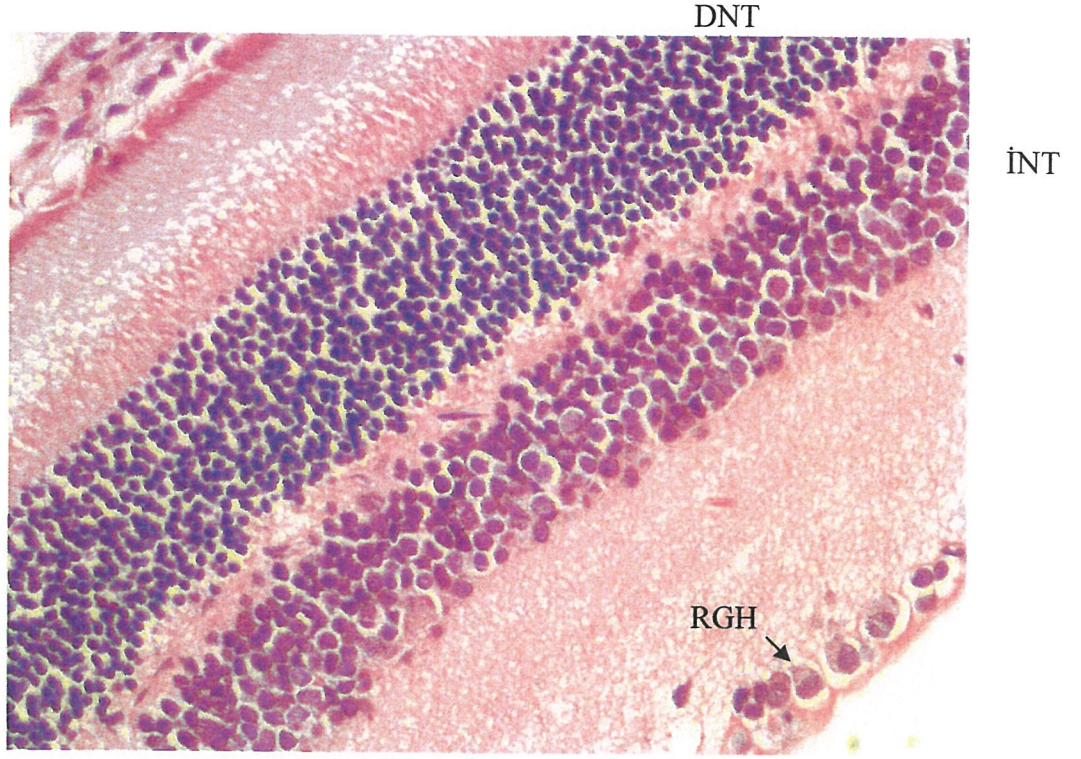
Şekil 13A. Geç glokom grubu (GG), x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı retinal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. Retinal katlarda belirgin atrofi, sinir lifi tabakasında incelme, RGH sayısında azalma, İNT ve DNT tabakalarında hücreler arası ayrışma görülüyor.



Şekil 13B. Geç memantin grubu (GMG), x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı retinal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. RGH, İNT ve DNT daki hücrelerin sayısında ve retinal katların kalınlığında ılımlı azalma, hücreler arası ayrışma gözlenmiyor.



Şekil 13C. Erken memantin grubu (EMG), x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı retinal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. Retinal katlar korunmuş, RGH leri minimal atrofik görünümlü ve düzensiz yerleşim gösterse de sayısında belirgin azalma gözlenmiyor.



Şekil 13D. Kontrol grubu (K), x400 Hematoksilen ve Eozin ile boyalı retinal kesitlerin ışık mikroskopik görünümü. Tüm retinal katlar doğal, RGH leri sayı ve anatomik yerleşim olarak normal görünümde.

4.4. APOPTOZ DEĞERLENDİRİLMESİ

Apopitotik hücre sayımları (mm^2 de ortalama sayı \pm standart deviasyon); K grubunda $0,42 \pm 0,34$, EG grubunda $1,97 \pm 0,44$, GG grubunda $4,14 \pm 0,42$, EMG grubunda $2,18 \pm 0,42$ ve GMG grubunda ise $2,87 \pm 0,33$ şeklinde idi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma analizinde gruplar arası farklılık anlamlı bulundu (ANOVA, $p < 0,05$).

K ve EG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, üçüncü haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama apopitotik hücre sayımı değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonucunda deneklerin apopitotik hücre sayılarında anlamlı artış görülmüştür.

K ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama apopitotik hücre sayımı değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonrası altıncı haftanın sonunda deneklerin apopitotik hücre sayılarında anlamlı artış mevcuttur.

K ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre; erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama apopitotik hücre sayımı değerlerinin, kontrol grubu deneklerin ortalama apopitotik hücre sayımı değerlerine göre anlamlı bir fazlalık gösterdiği görülmektedir. Bu, erken dönem başlanan memantin apopitotik süreci, tamamen durdurmadığını göstermektedir.

K ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, GMG grubunun ortalama apopitotik hücre sayımı değerleri K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir. Bu, geç dönem memantin başlanan grupta apopitotik sürecin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğunu göstermektedir.

EG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuca göre, altıncı haftanın sonunda

sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri, üçüncü haftanın sonunda sakrifiye edilen glokom indüksiyonu yapılmış grubun ortalama apoptotik hücre sayımı değerlerine göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Glokom indüksiyonu sonrası altıncı haftanın sonunda deneklerin apoptotik hücre sayılarında üçüncü haftanın sonuna kıyasla anlamlı derecede artış olduğu söylenebilir.

EG ve EMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,673$; $p>0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri ile erken dönem glokomlu grup ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu, erken dönem başlanan memantin apoptotik süreci önlemede anlamlı etki gösterebileceğini destekler yönde bir bulgu olarak kabul edilebilir.

EG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grup ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri, erken dönem glokomlu grup ortalama apoptotik hücre sayımı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fazlalık göstermektedir. Bu, geç dönem başlanan memantin apoptotik süreci anlamlı düzeylerde önleme yönünde bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

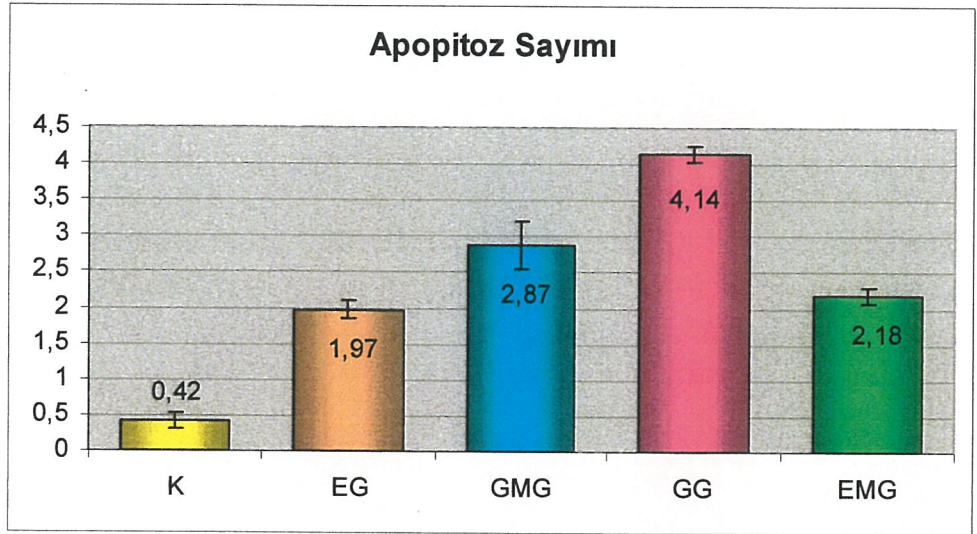
EMG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri, memantin verilmeyen glokomlu gruba göre anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur.

GMG ve GG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Bu sonuca göre, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri, memantin verilmeyen glokomlu gruba göre daha az bulunmuştur.

EMG ve GMG grupları karşılaştırıldığında iki grup arası farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu sonuca göre, erken dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu grupta ortalama apoptotik hücre sayımı

değerleri, geç dönem memantin verilmeye başlanan glokomlu gruba göre anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur.

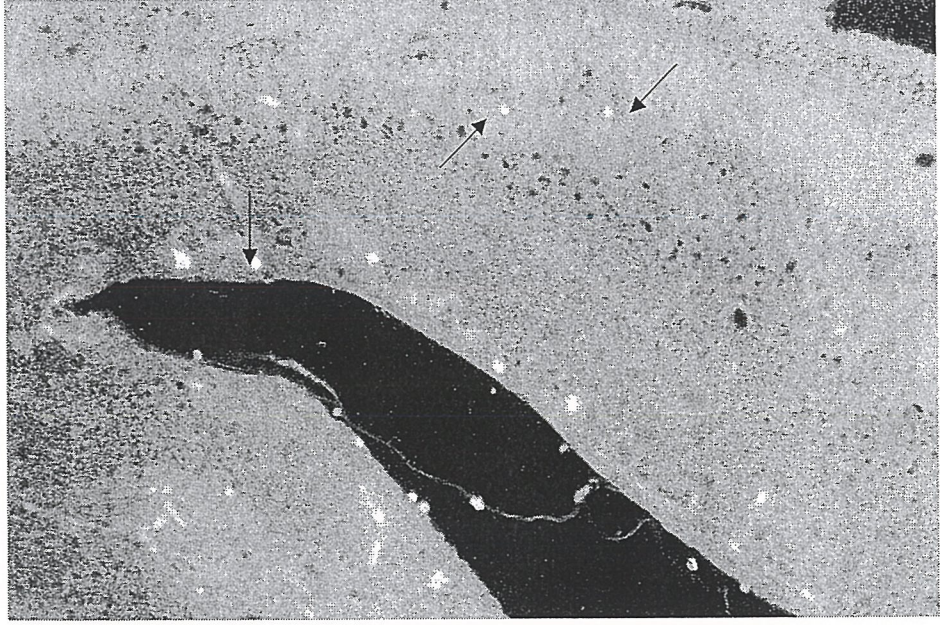
Grupların ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri Şekil 14’de gösterilmiştir. Tablo-5’te ise gruplar arası istatistiksel karşılaştırmaların (ANOVA, Post Hoc Tukey) anlamlılık değerleri özetlenmiştir. Gruplara ait TUNEL işaretli floresan ve ışık mikroskopik görüntüler Şekil 15 (A-K)’te sunulmuştur.



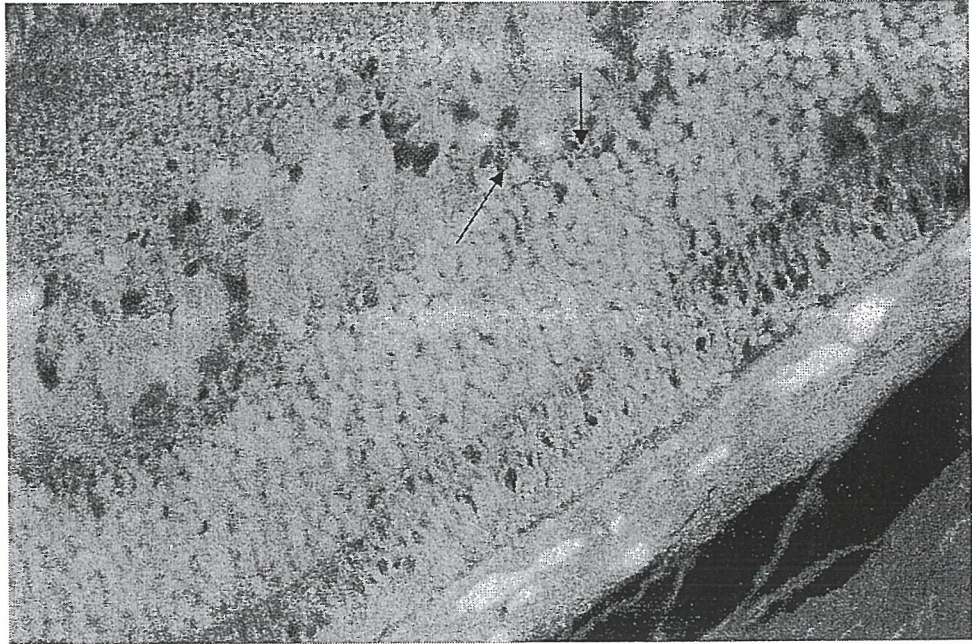
Şekil 14. Gruplara ait ortalama apoptotik hücre sayımı değerleri (Ortalama \pm Standart deviasyon).

<i>Grup</i>	<i>Karşılaştırılan Gruplar</i>	<i>p Değeri</i>
K	EG	0,000*
	GG	0,000*
	EMG	0,000*
	GMG	0,000*
EG	K	0,000*
	GG	0,000*
	EMG	0,673
	GMG	0,000*
GG	K	0,000*
	EG	0,000*
	EMG	0,000*
	GMG	0,000*
EMG	K	0,000*
	EG	0,673
	GG	0,000*
	GMG	0,000*
GMG	K	0,000*
	EG	0,000*
	GG	0,000*
	EMG	0,000*

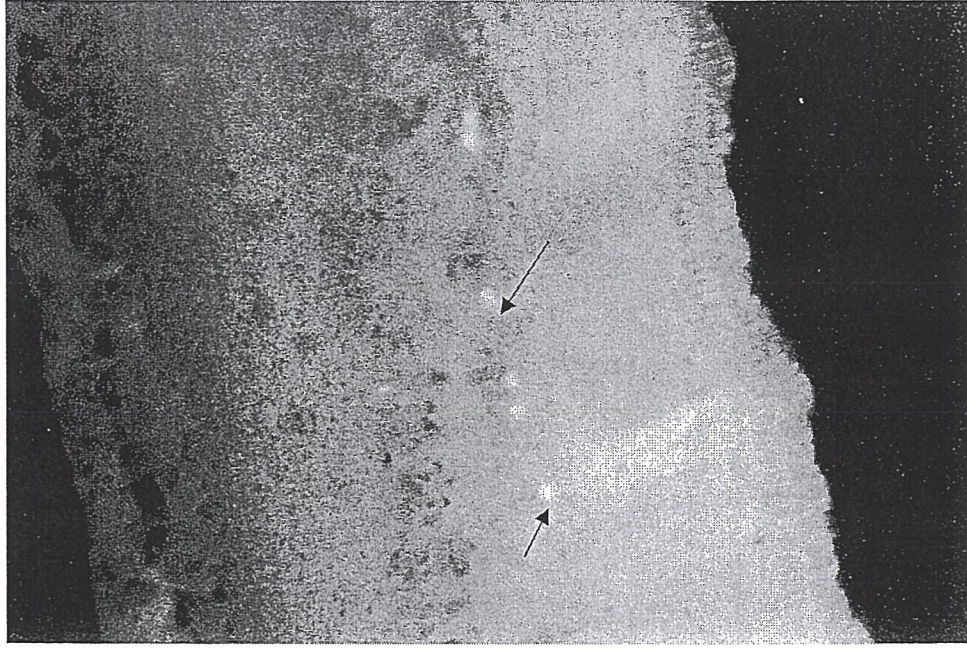
Tablo 5. Deney gruplarına ait apoptotik hücre sayımı değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA Post Hoc Tukey testine göre p değerleri. 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı (*) kabul edilmiştir.



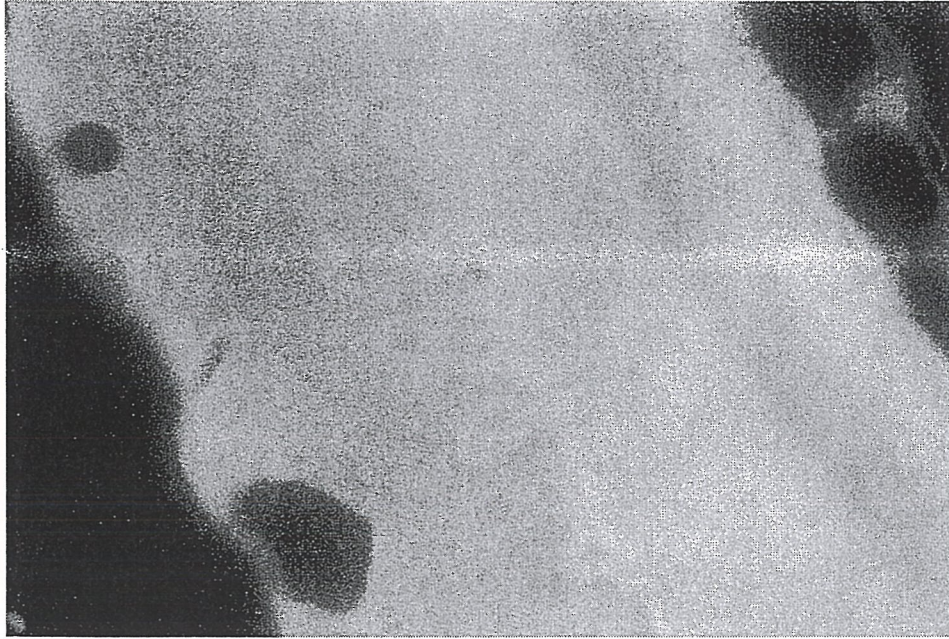
Şekil 15A. TUNEL metodu ile floresan mikroskopik görüntü. Geç glokom grubu, X400. RGH, İNT ve DNT daki yaygın apoptotik hücreler (oklar).



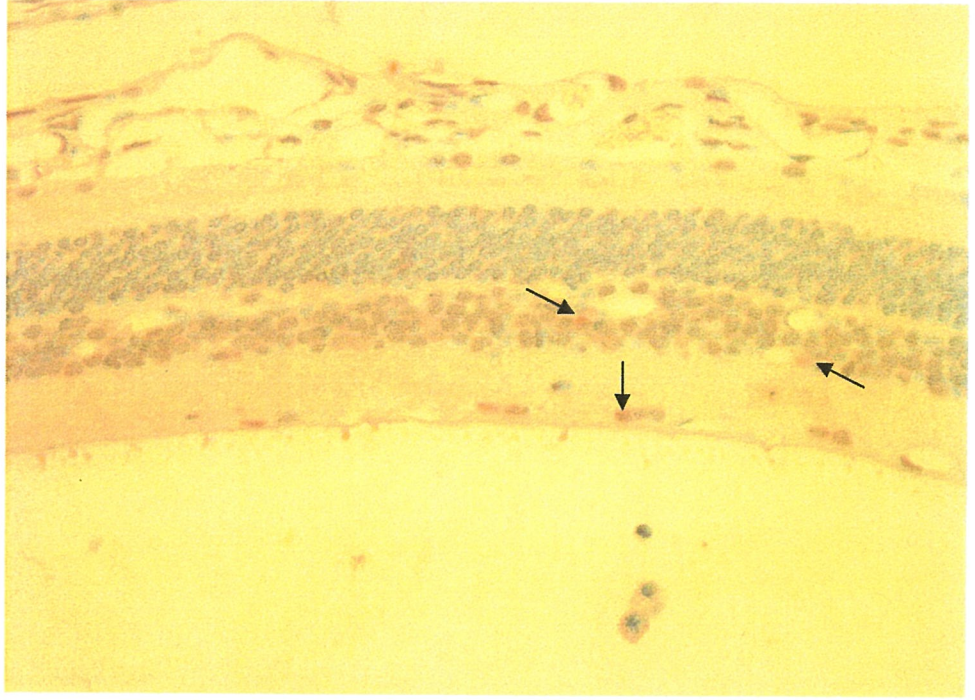
Şekil 15B. TUNEL metodu ile floresan mikroskopik görüntü. Geç memantin grubu, X400. İNT daki apoptotik hücreler (oklar).



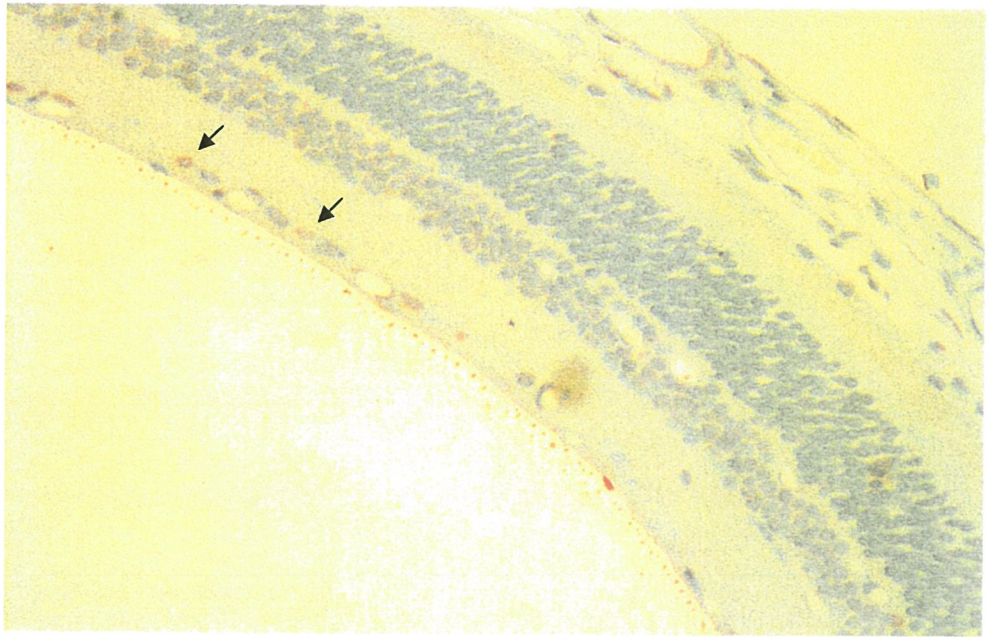
Şekil 15C. TUNEL metodu ile floresan mikroskopik görüntü. Erken memantin grubu, X400. Sadece iç ve dış nükleer tabakalar arası gözlenen apoptotik hücreler (oklar). RGH tabakası korunmuş görünüyor.



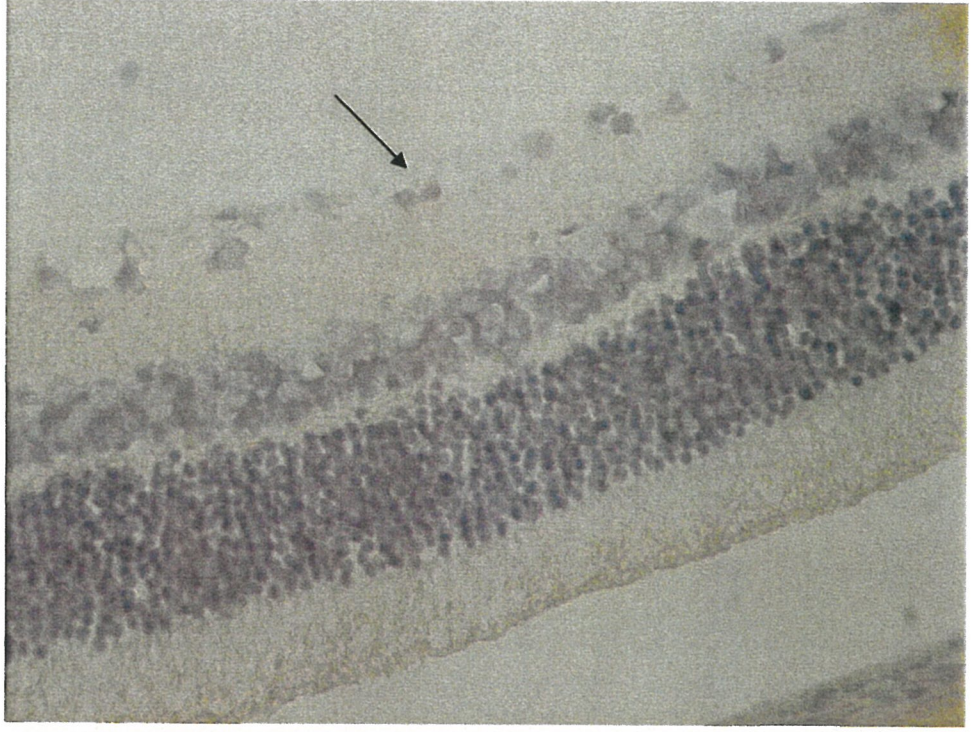
Şekil 15D. TUNEL metodu ile floresan mikroskopik görüntü. Kontrol grubu, X400. Apoptotik hücre gözlenmiyor.



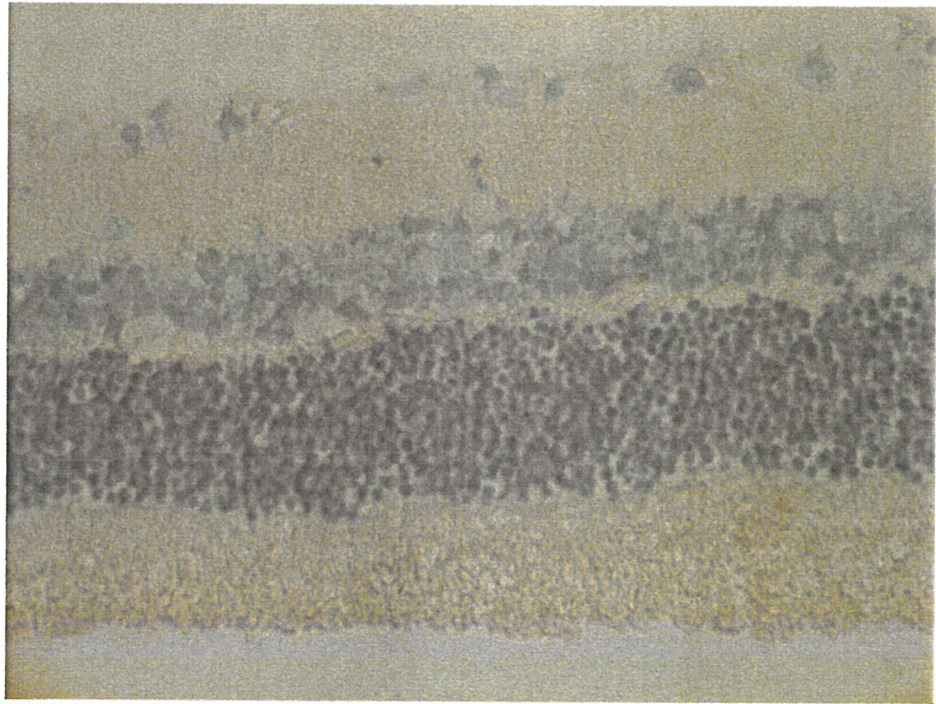
Şekil 15E. TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü. Geç glokom grubu, Counter stain - X400. RGH ve İNT daki apoptotik hücreler (oklar).



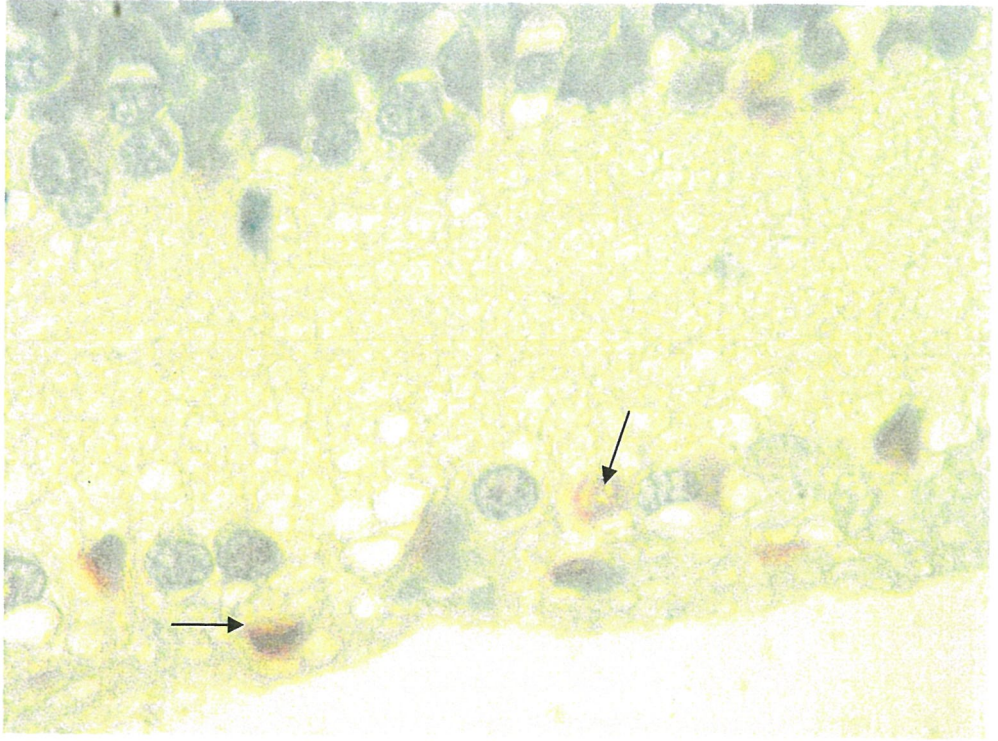
Şekil 15F. TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü. Geç glokom grubu, Counter stain - X400. RGH ve İNT daki seyrek apoptotik hücreler (oklar).



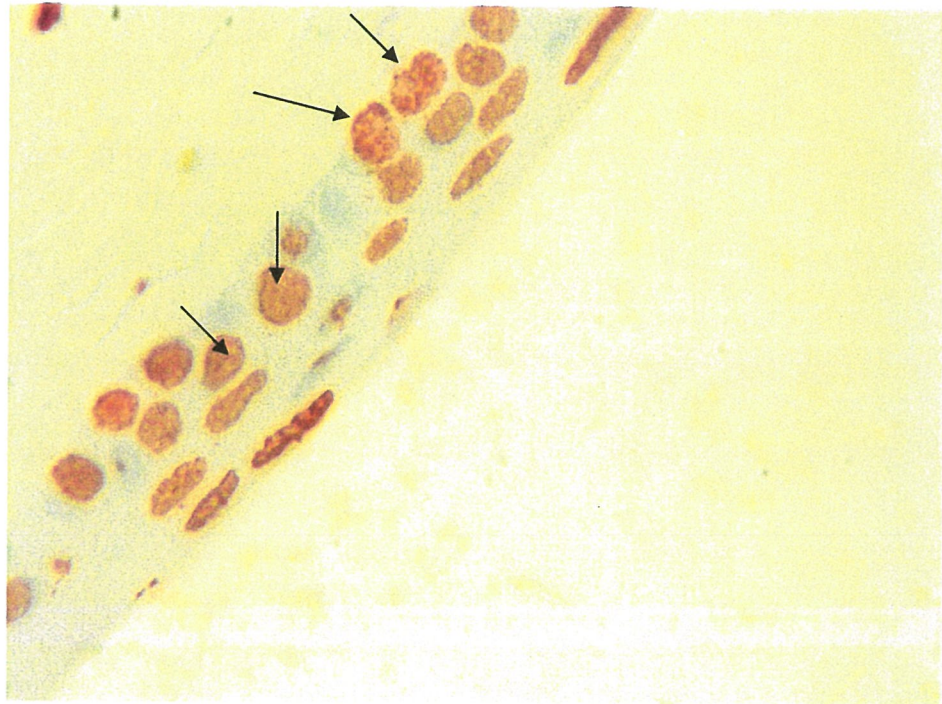
Şekil 15G. TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü. Erken memantin grubu, Counter stain - X400. RGH deki apoptotik hücre (ok).



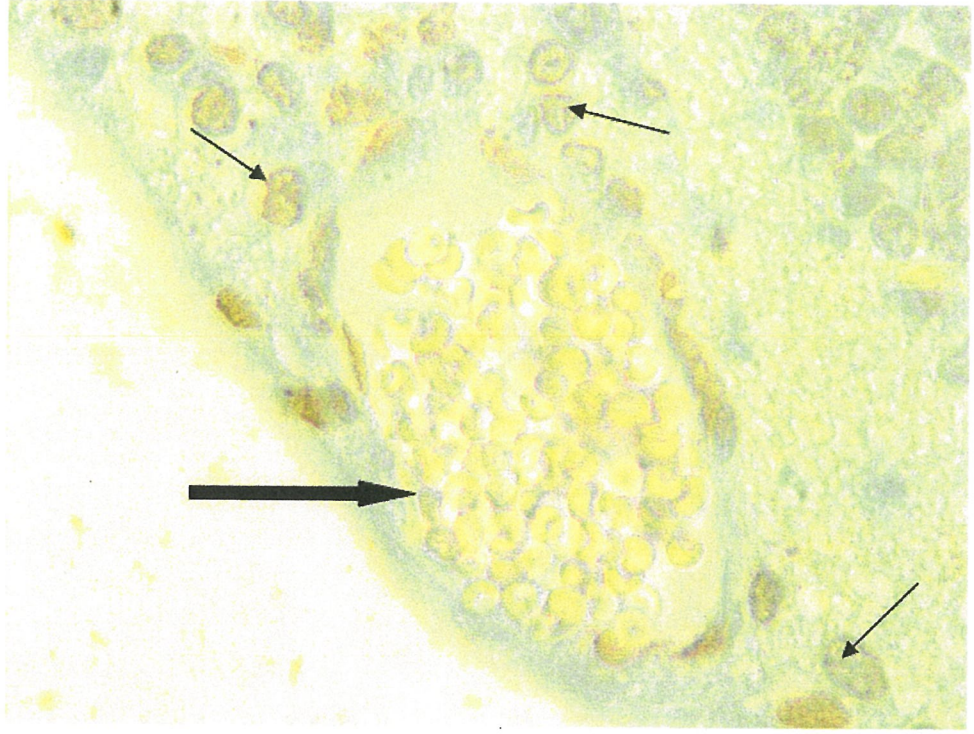
Şekil 15H. TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü. Kontrol grubu, Counter stain - X400. Apoptotik hücre gözlenmiyor.



Şekil 15I. TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü. Geç memantin grubu, Counter stain – X1000. RGH tabakasındaki seyrek apoptotik hücreler (oklar).



Şekil 15J. TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü. Geç glokom grubu, X1000. RGH tabakasındaki yoğun apoptotik hücreler (oklar).



Şekil 15K. TUNEL metodu ile ışık mikroskopik görüntü. Geç glokom grubu, X1000. RGH tabakasındaki yoğun apoptotik hücreler (oklar) ve retinal damarda belirgin vazodilatasyon (kalın ok).

Deney gruplarına ait göz içi basınç ölçümleri, RGH sayımları, retina kalınlığına ait ölçüm değerleri ve apoptotik hücre sayımlarının ortalama değerleri toplu olarak Tablo-6'da özetlenmiştir.

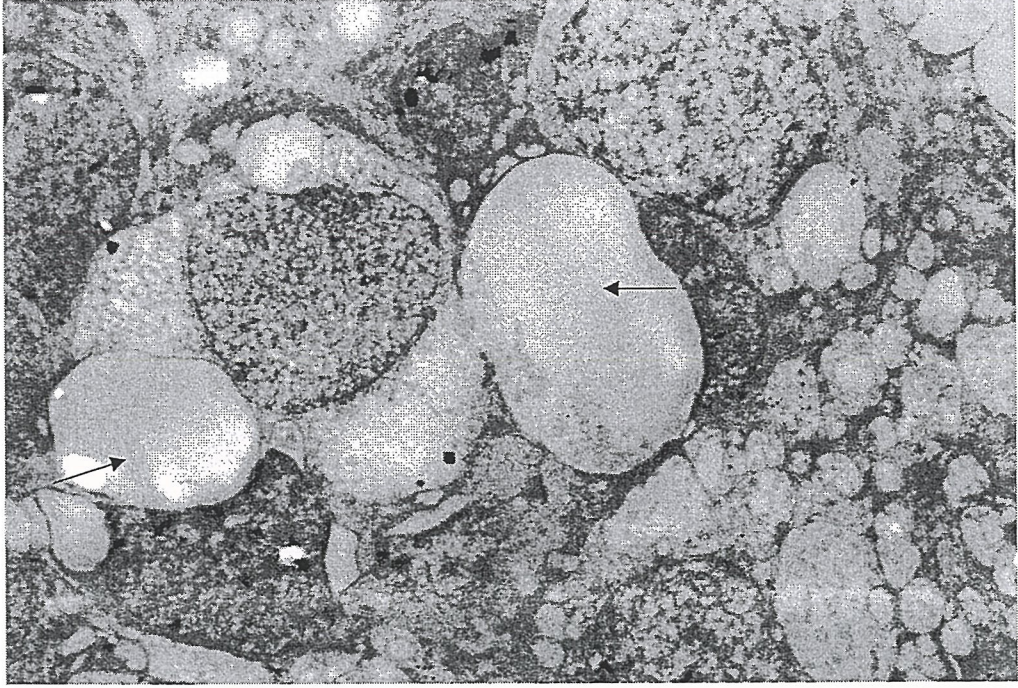
Gruplar	Göz İçi Basınç (mmHg)	Retina Ganglion Hücre Sayısı	Apoptoz Sayısı	Retina Kalınlığı (mikrometre)
K (n=10)	13,20 ± 1,31	1787,70 ± 8,94	0,42 ± 0,34	91,40 ± 3,56
EG (n=10)	34,30 ± 1,88	1566,90 ± 26,77	1,97 ± 0,44	70,30 ± 2,26
GG (n=15)	30,80 ± 2,04	1320,40 ± 18,05	4,14 ± 0,42	63,46 ± 3,50
EMG (n=15)	29,53 ± 1,72	1765,46 ± 14,35	2,18 ± 0,42	87,86 ± 3,06
GMG (n=13)	29,84 ± 1,99	1527,53 ± 68,57	2,87 ± 0,33	68,38 ± 3,17

Tablo-6. Deney gruplarına ait göz içi basınç ölçümleri, apoptotik hücre sayımları, RGH sayımları ve retinal kalınlığa ait ölçüm değerlerinin ortalama değerleri (± Standart Deviasyon)

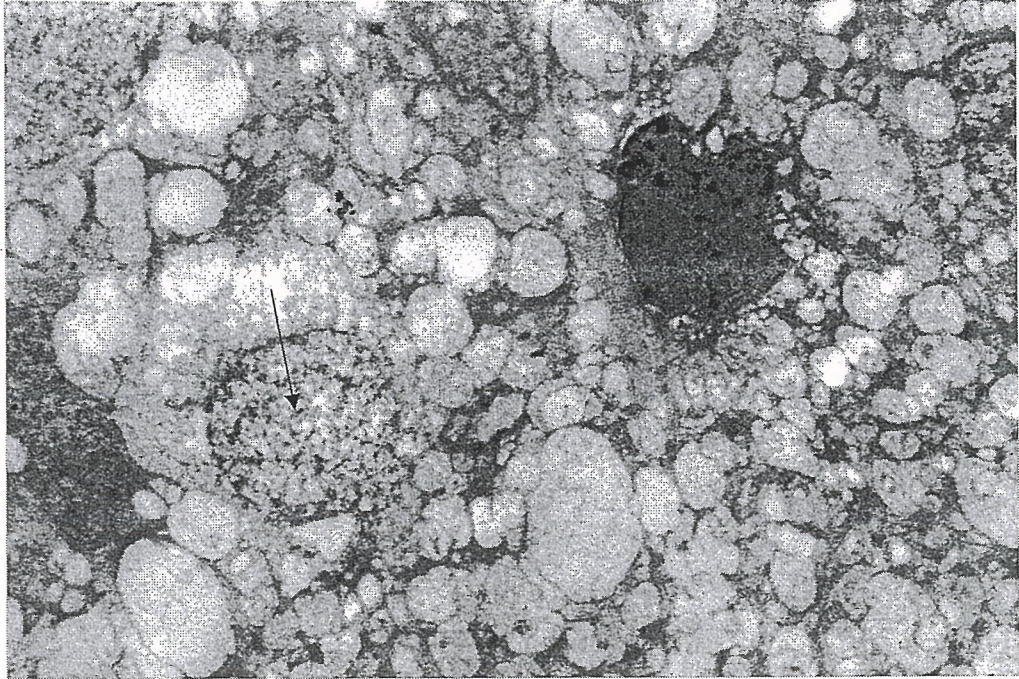
4.5. ULTRASTRÜKTÜREL DEĞERLENDİRME

4.5.1. RETİNAL ULTRASTRÜKTÜREL BULGULAR

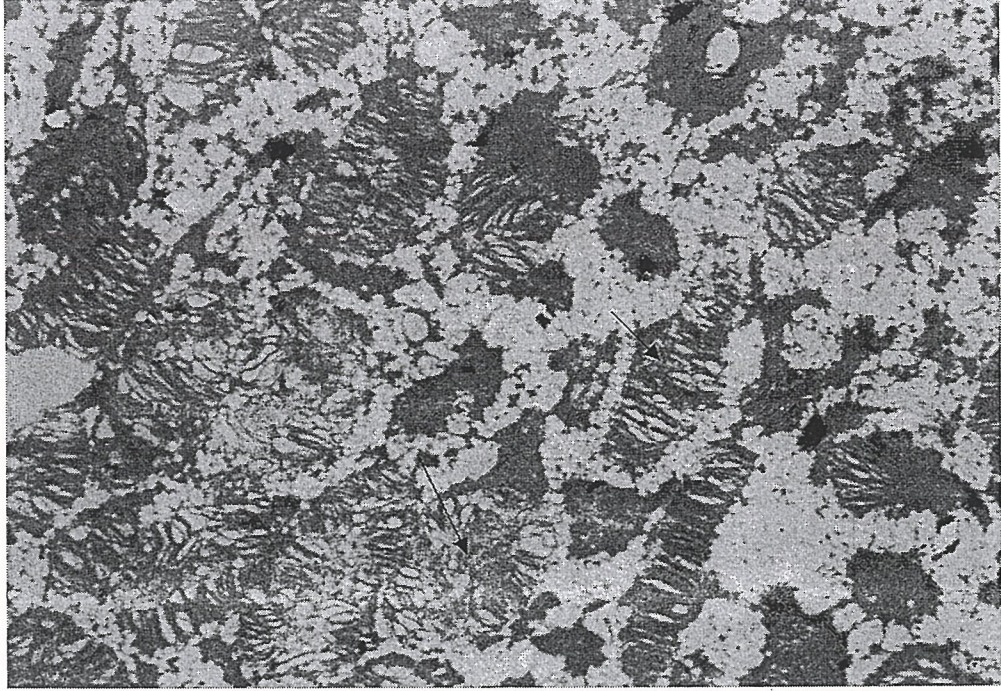
Elektron mikroskopik değerlendirmede, K grubunda retinadaki nöronal ve glial hücreler ile optik sinir bulguları normaldi. EG ve özellikle GG gruplarında belirgin olarak izlenen ganglion hücrelerinde ödem; sinir lifi tabakasında yaygın inklüzyon cisimcikleri, sinir lifi tabakasında lipidik vakuollerle özellik kazanan dejenerasyon; bipolar hücrelerin endoplazma retikulum sisternalarında ve aksonlarındaki nörotübüllerde belirgin dilatasyon; iç nükleer tabakadaki hücrelerin sitoplazma ve kromatin materyalinde yoğunlaşma, iç nükleer tabakadaki hücrelerde vakuolleşme ve ödem; dış pleksiform tabakada ayrışma; retina pigment epitelinin pigment granüllerinde azalma, inklüzyon cisimcikleri, vakuolizasyon, hücreler arası bağlantı kompleksinde ayrışma, villöz proseslerde kayıp; retinal damarların endotel hücrelerinde vakuolizasyon ve villöz transformasyon; fotoreseptör hücrelerdeki lameller cisimciklerde dejenerasyon; en sık ganglion hücre tabakası ve iç nükleer tabakada ve daha az sıklıkla dış nükleer tabakada ve yer yer fotoreseptör katında baskın olan apoptotik hücreler; EMG ve GMG gruplarında büyük ölçüde saptanmazken, GMG grubunda gangliyon hücrelerinde nükleer zar invajinasyonları ve retina pigment epitelindeki artmış fagozomlar dışında belirgin ultrastrüktürel dejenerasyon gözlenmedi. Memantin verilmiş olan gruplarda Müller hücrelerinde artmış fagozom varlığı gözlenirken, özellikle GG grubunda, koyu ve uzun mikrofilamentöz yapıları ile karakterize Müller hücrelerinin dejenere nöron bölgelerine dağılmış oldukları izlendi. Tüm retinal ultrastrüktürel bulgular, Şekil 16(A-J) de sunulmuş olup, Tablo-7'de özetlenmiştir.



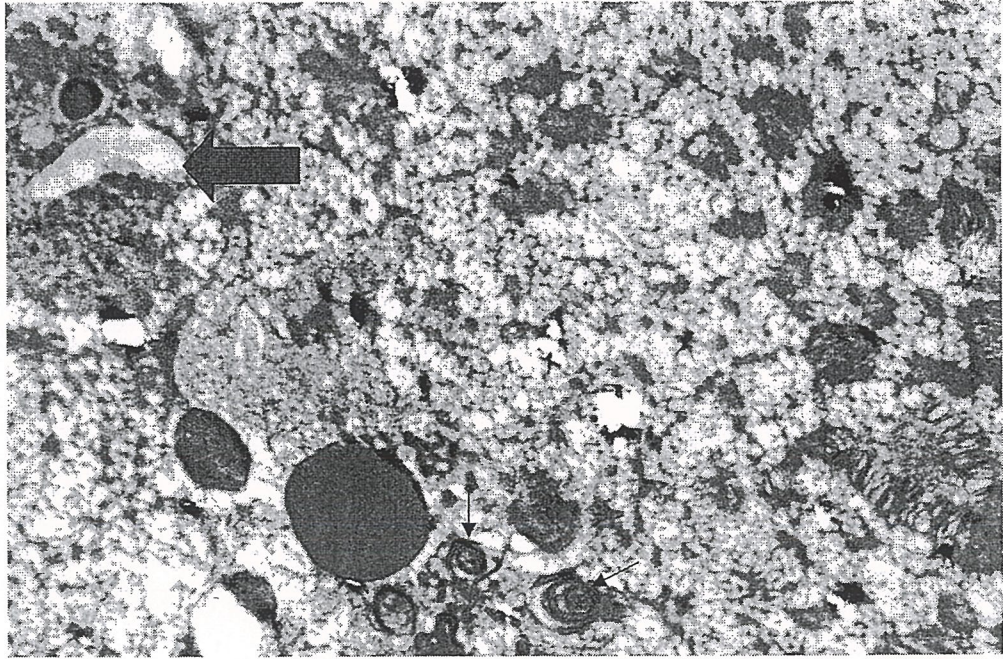
Şekil 16A. Glokom grubunda iç nükleer tabakadaki hücrelerde vakuolleşme (oklar) ve ödem, x5000.



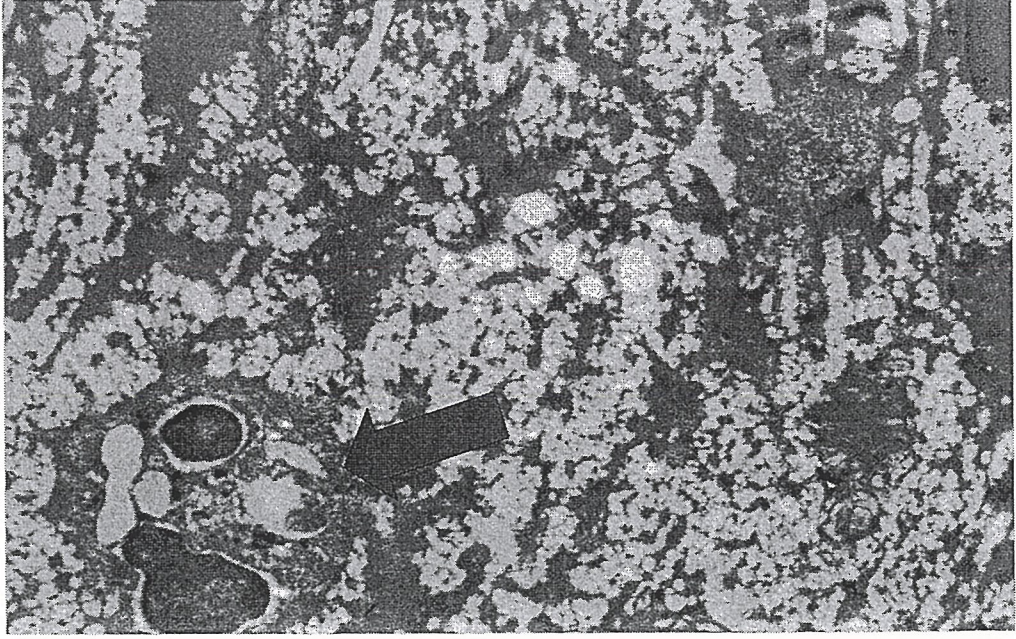
Şekil 16B. Glokom grubundaki bipolar hücrelerin bazılarında kromatinde yoğunlaşma (ok) ve endoplazma retikulumu sisternalarında yaygın dilatasyon, x5000.



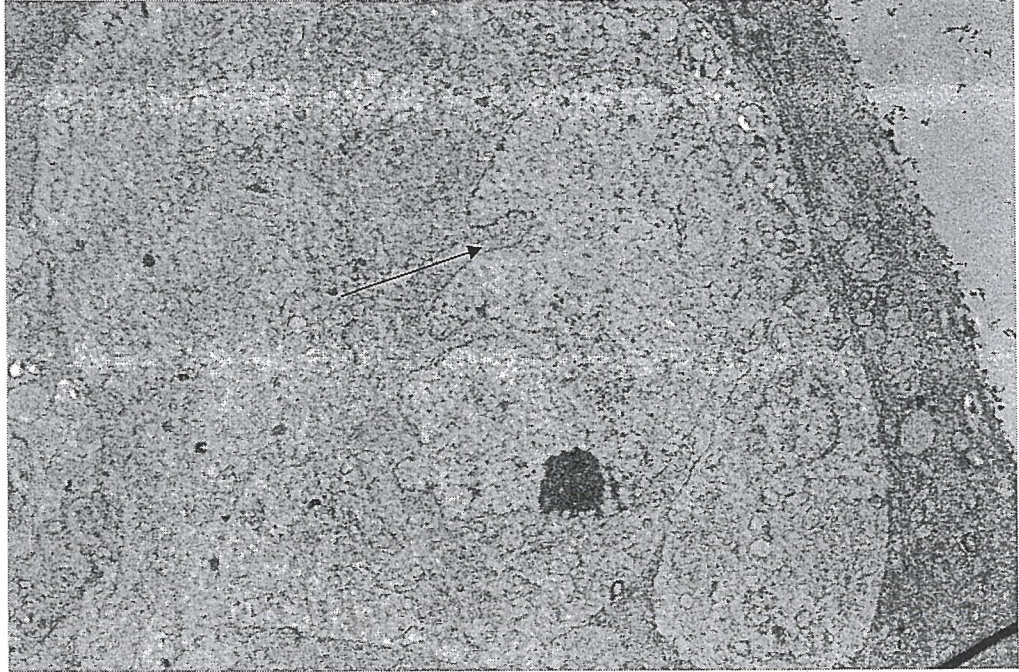
Şekil 16C. Glokom grubunda fotoreseptörlerdeki yaygın dejenerasyon (oklar), x5000



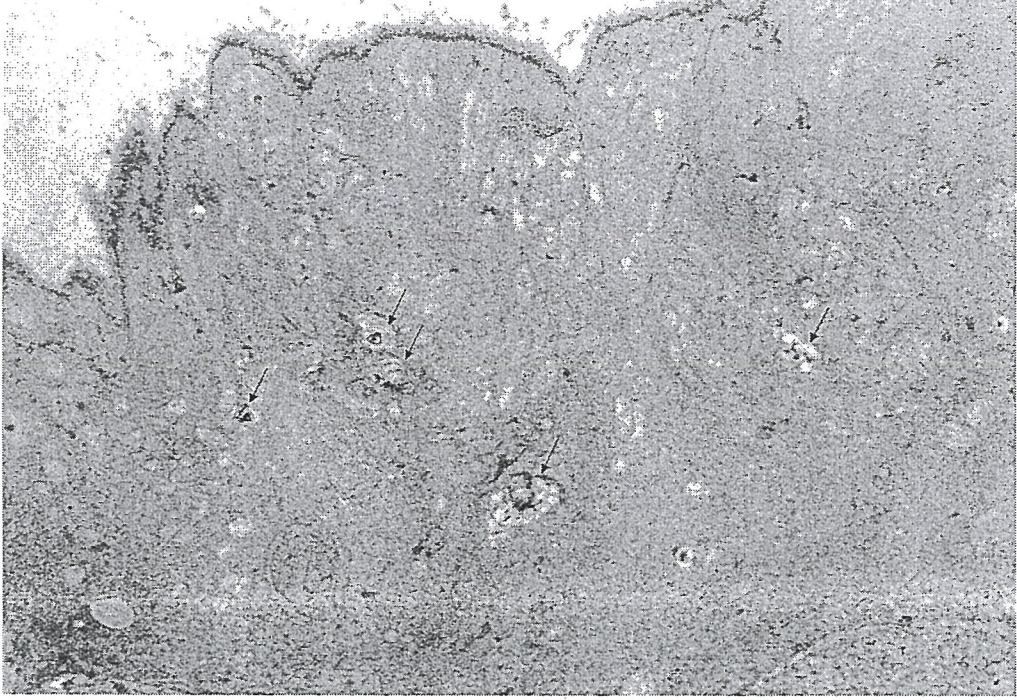
Şekil 16D. Glokom grubunda fotoreseptör hücrelerin iç segmentlerinde inklüzyon cisimleri (oklar) ve apoptotik cisimciklerle izlenen hücre hasarı (kalın ok), x5000



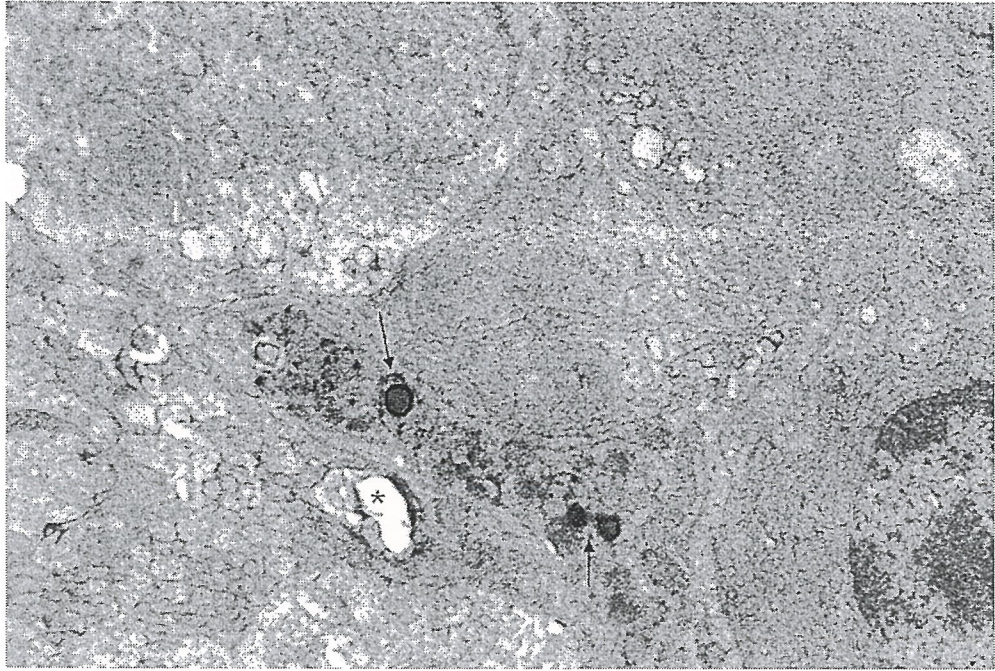
Şekil 16E. Dış nükleer tabakada apoptotik hücre (ok), x5000



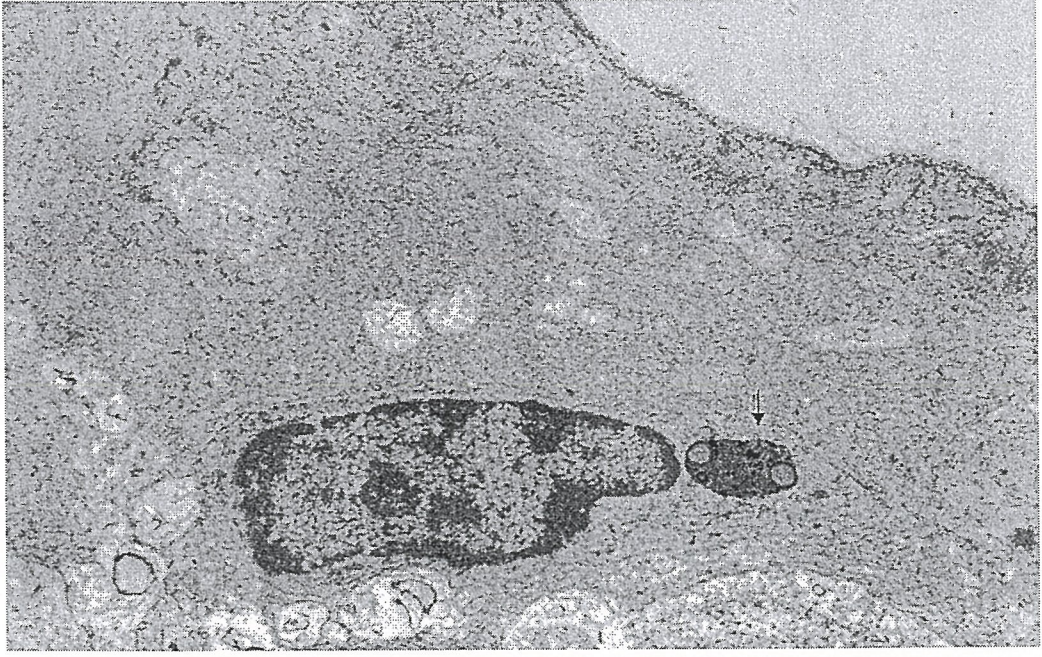
Şekil 16F. Geç memantin grubundaki gangliyon hücrelerinin nükleus zarında invajinasyon (ok), x5000



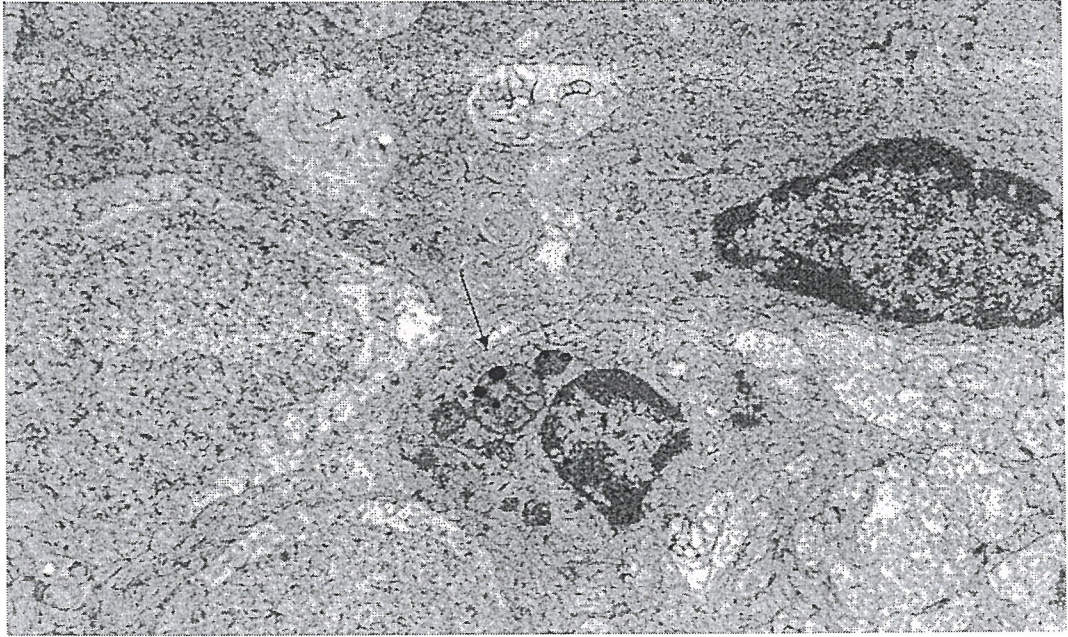
Şekil 16G. Erken glokom grubunda sinir lifi tabakasında yaygın inklüzyon cisimcikleri (oklar), x5000



Şekil 16H. İç nükleer tabakada apoptotik cisimler (oklar) ve iç pleksiform tabakadaki sinapslarda ayrışma (*), x5000



Şekil 16I. Erken membran grubunda fagozom (ok) içeren Müller hücresi, X5000



Şekil 16J. Erken glokom grubunda RGH leri ve aksonları arasında görülen apoptotik hücre (ok), X5000

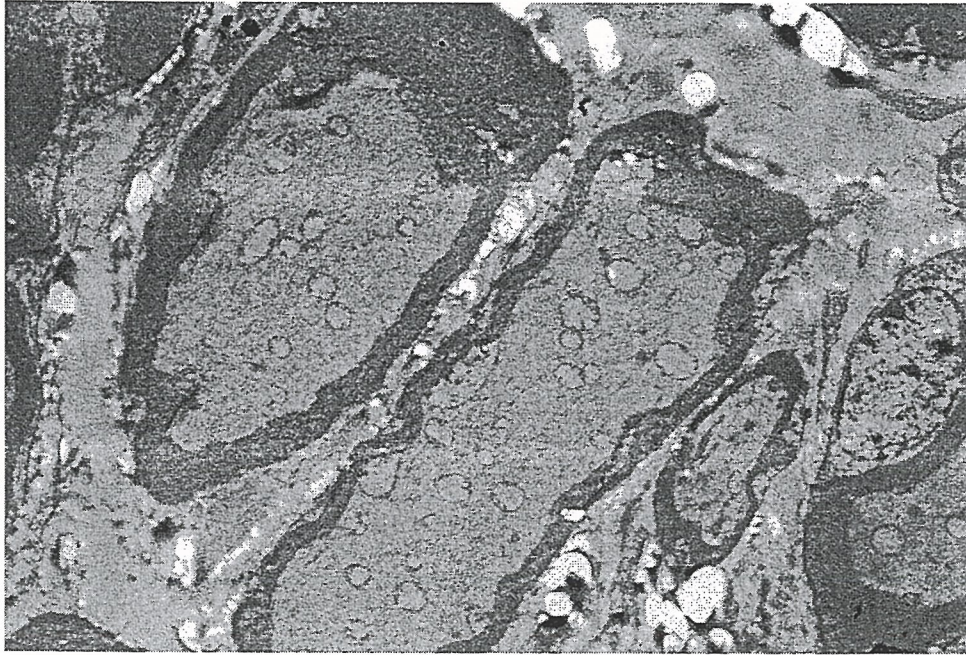
		EG	GG	EMG	GMG
Ganglion hücreleri	Ödem	++	+++	-	+
Sinir lifi tabakası	İnklüzyon cisimcikleri	+++	++++	-	-
	Lipidik vakuollerle özellik kazanan dejenerasyon	++	++++	-	-
Bipolar hücreler	Endoplazma retikulum sisternalarında ve aksonlardaki nörotübüllerde belirgin dilatasyon	+++	++++	-	-
İç nükleer tabaka	Hücrelerin sitoplazma ve kromatin materyalinde yoğunlaşma	+++	++++	-	-
	Hücrelerde vakuolleşme ve ödem	++	+++	-	+
Dış pleksiform tabaka	Tabakada ayrışma	++	+++	-	-
Retina pigment epiteli	Pigment granüllerinde azalma	++	++++	-	+
	İnklüzyon cisimcikleri	+++	++++	-	++
	Vakuolizasyon	++	+++	-	-
	Hücreler arası bağlantı kompleksinde ayrışma,	++	++++	-	+
	Villöz proseslerde kayıp	++	++++	-	-
Retinal damarlar	Endotel hücrelerinde vakuolizasyon ve villöz transformasyon	++	++++	-	-
Müller hücreleri	Fagozom içeriği	+	-	++	+++
	Dejenerasyon	++	+++	+	-
Fotoreseptör hücreler	Lameller cisimciklerde dejenerasyon	+++	++++	-	-
Apoptotik hücreler	Ganglion hücre tabakası	+++	++++	++	+
	İç nükleer tabaka	++	+++	+	-
	Dış nükleer tabaka	+	++	-	-
	Fotoreseptör hücreler	+	++	-	-

Tablo 7. Retinal ultrastrüktürel bulgular

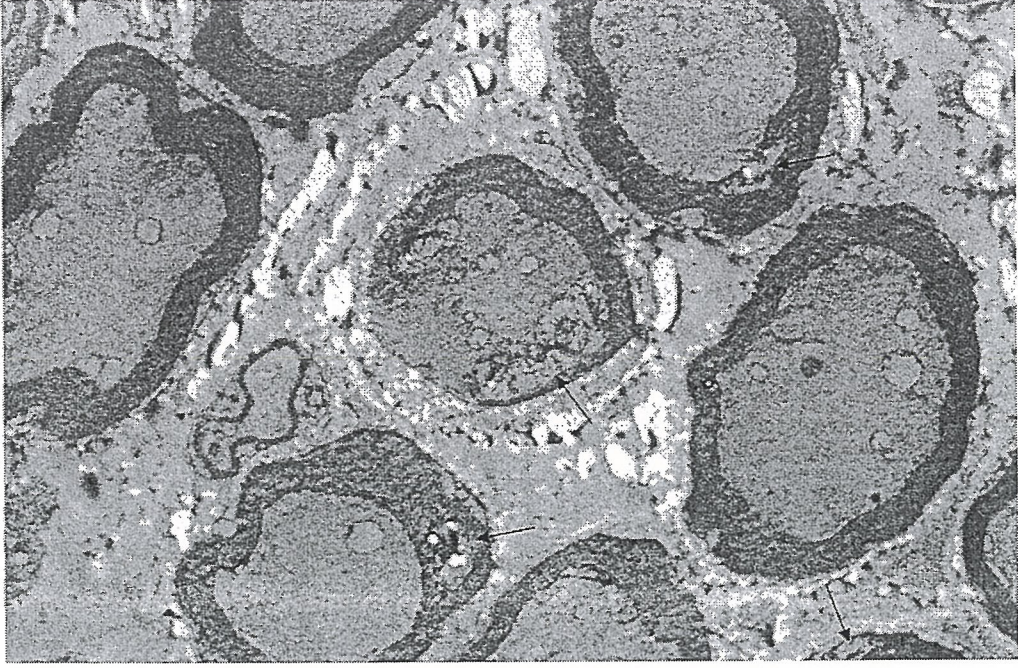
(-): yok, (+): çok az, (++): ılımlı, (+++): belirgin, (++++): çok belirgin

4.5.2. OPTİK SİNİR AKSONLARINA AİT ULTRASTRÜKTÜREL BULGULAR

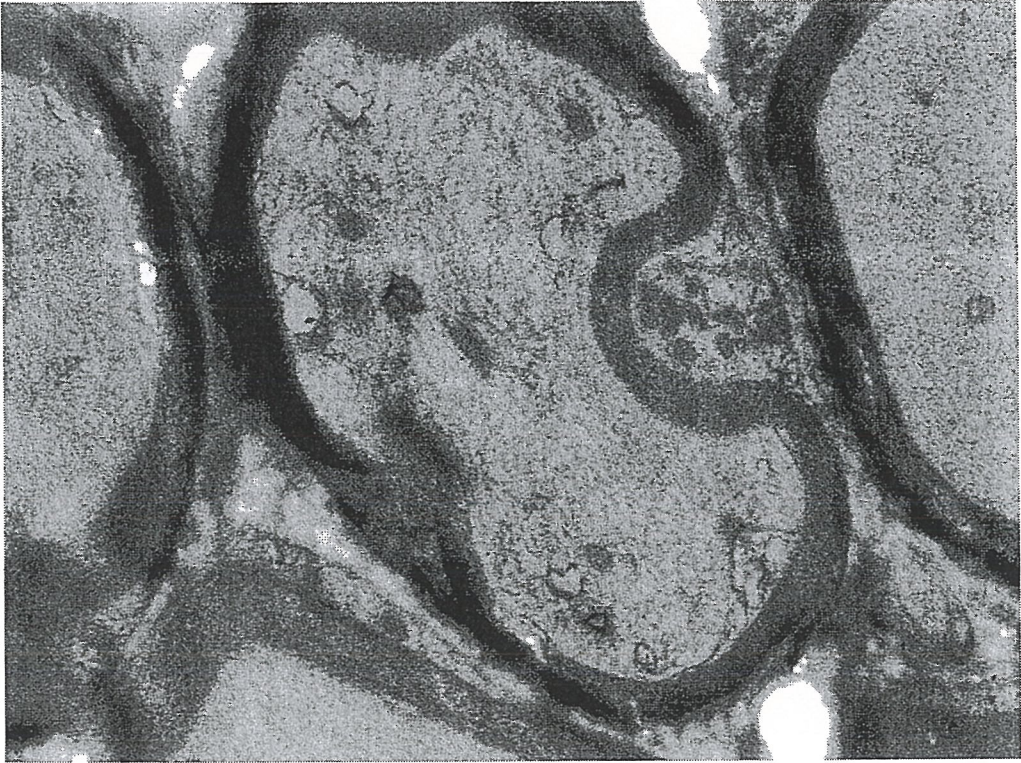
EMG grubunun optik sinir aksonlarında ılımlı miyelin dejenerasyonu izlendi ancak genel olarak akson bileşenlerinin korunduğu görüldü. GMG grubunda, Schwann hücre proliferasyonu, lokal demiyelinizasyon ve aksonlarda vakuolleşme ile özellik kazanan akson dejenerasyonu sergileyen fasiküllerin EG ve GG gruplarına göre daha az olduğu gözlemlendi. EG ve GG gruplarında aksonlarda ağır miyelin dejenerasyonu ve mitokondri kristallerinde silinme gözlemlendi. Optik sinir aksonlarına ait ultrastrüktürel bulgular, Şekil 17(A-D) de sunulmuş olup, Tablo-8'de özetlenmiştir.



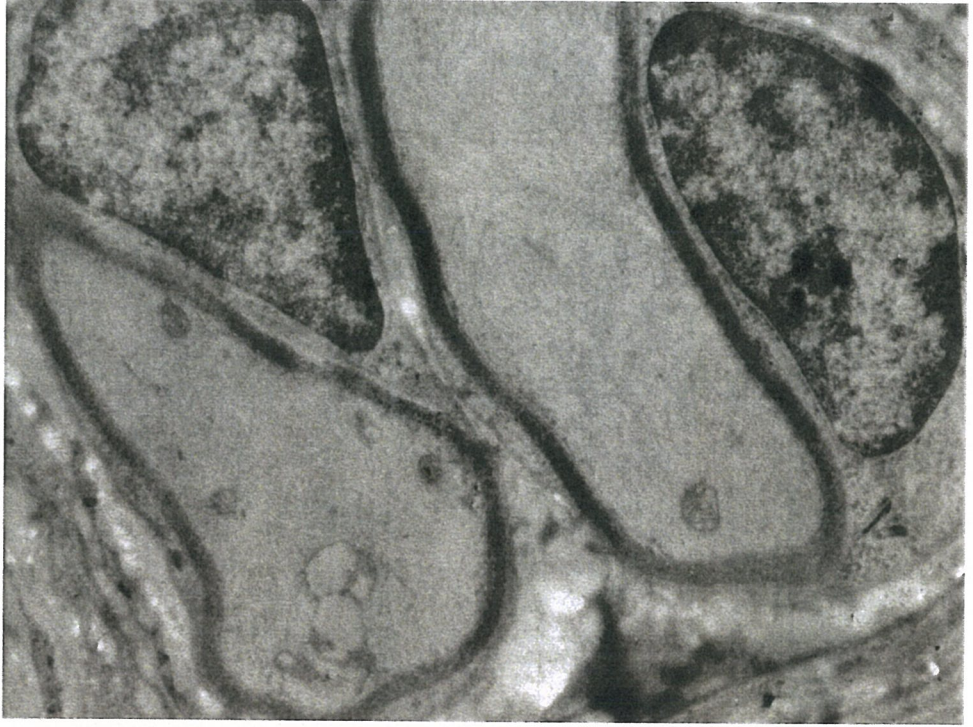
Şekil 17A. Erken glokom grubunda miyelin dejenerasyonu, x5000



Şekil 17B. Geç glokom grubunda aksonlarda ağır miyelin dejenerasyonu (oklar) ve mitokondri kristalarında silinme, x5000



Şekil 17C. Geç memantin grubunda aksonal dejenerasyon, x7500



Şekil 17D. Erken demantın grubunda ılımlı miyelin dejenerasyon ve korunmuş akson bileşenleri, x7500

	EG	GG	EMG	GMG
Miyelin dejenerasyon	+++	++++	++	+
Schwann hücre proliferasyonu	+++	++++	++	+
Aksonlarda vakuolleşme	++	++++	+	-
Mitokondri kristalarında silinme	++	+++	-	-

Tablo 8. Optik sinir aksonlarına ait ultrastrüktürel bulgular

(-): yok, (+): çok az, (++) : ılımlı, (+++) : belirgin, (++++): çok belirgin

5. TARTIŞMA

Glutamatın tetiklediği eksitotoksik nöronal hücre ölümü; aktive olmuş NMDA tipi glutamat reseptörlerinin aşırı miktarda Ca hücre içine alması ile başlamaktadır (77,78). 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 veziküler glutamatın Ca bağımlı salınımının iyice artması sonucu apoptoza giden yolun tetiklendiği gösterilmiştir (1,32,79-81,104).

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 (6). Retinal nöron hasarında da memantin nöroprotektif etkinliğine işaret eden çalışmalar mevcuttur (26, 32). Vorwerk ve ark. 3 ay boyunca her 5 günde bir 1µl 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. Intravitreal 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 memantin parsiyel protektif etkisi olduğunu gözlemişlerdir (6). Glokomda artmış glutamat düzeylerinin ve glutamat aracılı eksitotoksik nöron hasarlanmasının gündeme gelmesiyle, glutamat antagonistlerinin ve özellikle NMDA reseptör antagonisti olan memantin glokomdaki nöroprotektif etkisi yakın zamanda sıkça tartışılan konulardan birisidir (97,104).

Sıçanda oluşturulan deneysel glokom modelinin kullanıldığı bu çalışmada, sistemik olarak verilen memantin glokomun erken ve geç dönemlerindeki nöroprotektif etkinliği, RGH sayımı ve retina kalınlığı gibi iyi bilinen parametreleri sorgulayarak gösterilmeye çalışılmıştır. Ek olarak; memantin ile ilgili araştırmalarda henüz literatür verilerinin yetersiz olduğu apoptotik indeks ve ultrastrüktürel

değişimler de ayrıntılı olarak incelenmiştir. Özellikle apopitoz, glokomdaki eksitotoksik nöronal hücre kaybı sürecinde halen tartışılan bir konu olma özelliğindedir. Glokomda hücre ölümünün temel sebebinin apopitoz mu yoksa nekroz mu olduğuna dair tartışmalar uzun zamandır süregelmektedir (108,109). Öte yandan, glokomdaki eksitotoksik nöronal ölümün engellenmesine yönelik farmakolojik tedavi sürecinde, retina ve optik sinir aksonlarındaki ultrastrüktürel değişimler konusunda henüz yeterli veri mevcut değildir. Bu çalışmanın bir özelliği de, ayrıntıları gelecekte daha da iyi anlaşılacak olan bu sürece ait ultrastrüktürel verileri ilk kez tartışmaya sunuyor olmasıdır.

Çalışmada memantin verilmiş olan gruplarda; retina kalınlığının glokom gruplarına göre anlamlı düzeylerde korunmuş olduğu, ancak memantin hasarın başladığı anda verilmeye başlanmasının neredeyse kontrol grubuna yakın bir koruma sağladığı gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar, RGH sayımları karşılaştırıldığında da dikkat çekmektedir. Glokomun geç döneminde memantin verilmeye başlanan grupta dahi, glokom indüksiyonu ile birlikte erken dönemde memantin verilmeye başlanan grup kadar belirgin olmamakla birlikte, memantin verilmeyen glokom grubuna göre anlamlı düzeyde daha fazla RGH sayısına sahip olduğu görülmüştür. Altı haftalık süreç sonunda memantin verilmeyen deneklerde kontrol grubuna göre ortalama RGH sayısı %26,1' lik azalma gösterirken, erken dönemde memantin başlanan deneklerde bu kayıp sadece %1,23 olurken, 3.haftanın sonunda memantin başlanan deneklerde ise ortalama kaybın %14,5 oranında olduğu dikkat çekmektedir. WoldeMussie ve ark. sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada 1. gruba glokom indüksiyonundan hemen sonra 3 hafta süreyle 10 mg/kg memantin, 2. gruba GİB yükselmesinden 10 gün sonra 3 hafta süreyle 10 mg/kg memantini sistemik olarak vermişlerdir. Tüm gruplara toplam 3 hafta süreyle memantin uygulamışlardır. Bir grup denek, ilk lazerden 10 gün sonra RGH kaybını göstermek amacıyla kullanılmıştır. Birinci grupta memantin (10 mg/kg/gün) uygulamasının RGH kaybını % 67 azalttığını ve bu dozda RGH kaybının $12 \pm 3,6$ şeklinde olduğunu glokom grubunda 37 ± 3 olduğunu ifade etmişlerdir. 2. grupta ise 10. günün sonunda RGH kaybının, $19 \pm 2,5$ olduğu ve 10 gün sonra 10 mg/kg sistemik memantin başladıkları gruba RGH sayımı yaptıklarında 3. haftanın sonunda ek RGH kaybı görmediklerini rapor etmişlerdir (26). Sürenin sonunda RGH kaybını $19,1 \pm 3,6$ ve glokom grubunda

%32 ± 4,3 bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızın verileri de, WoldeMussie ve ark. bildirmiş oldukları sonuçları destekler gözükmektedir.

Memantinin glokom oluşturulmuş olan retinada, RGH sayısını ve dolayısıyla retina kalınlığını koruyucu etkisi, özellikle RGH de NMDA reseptörlerinin bulunması ile açıklanmaktadır (86). RGH lerindeki NMDA reseptörlerinin bu hücreleri glutamat toksisitesine karşı savunmasız ve kolay etkilenebilir hale getirdiği düşünülmektedir (86,87,110-112). Bu çalışmada, memantinin glokom sürecinde RGH sayımı ve retina kalınlığı parametrelerinde göstermiş olduğu anlamlı koruyucu etki, bu görüşleri desteklemektedir.

Ancak eksitotoksik nöronal hücre kaybının sadece RGH ile sınırlı olmadığı iyi bilinmektedir. Retinal katmanları oluşturan hücre gruplarının eksitotoksik hasara verdikleri yanıt, özellikle eksitotoksik sürecin tetiğini çektiği apoptozun incelenmesi ile daha iyi anlaşılabilir. Bu çalışmada, glokom süreciyle ortaya çıkan apoptotik hücreler TUNEL metodu kullanılarak incelenmiştir. EG ve GG gruplarında en fazla olmak üzere tüm gruplarda TUNEL pozitif hücrelere rastlanmıştır. Anlamlı apoptotik hücre yoğunluğunun ve apoptotik cisimciklerin elektron mikroskopik olarak dağılımının RGH ile birlikte iç nükleer, iç pleksiform ve dış nükleer tabakada da gözlenmiş olması dikkate değer bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Sisk ve Kuwabara'nın yetişkin albino sıçanlarda intravitreal glutamat vererek oluşturdukları eksitotoksikite modelinde de hasarın RGH ile birlikte iç nükleer tabakada da geliştiği ifade edilmiştir (113).

Memantin verilmiş olan gruplarda, bu bölgelerdeki TUNEL pozitif hücre sayısında farkedilir azalma olması, memantinin ganglion hücre tabakasını ve iç nükleer tabakayı eksitotoksik apoptoz sürecinden korumada etkili olabileceğini düşündürmektedir. Glokoma sekonder nöronal hasarın başladığı erken dönemde memantin verilmesinin apoptoz sürecinin engellenmesinde anlamlı rolü olabileceği, nöronal hasarın ortaya çıkmaya başladığı geç dönemde başladığında ise kalan mevcut hücreleri apoptotik süreçten koruyarak hastalığın progresyonunu yavaşlatabileceği (veya durdurabileceği) düşünülebilir. Ayrıca bu çalışmanın mevcut verileri, altı haftalık süre sonucunda memantin uygulanmamış glokomlu deneklerde saptanmış olan ortalama 4,14 değerindeki apoptotik indeksin, geç dönemde memantin başlanan deneklerde 2,87'ye gerilediğini, erken dönemde memantin

başlanan deneklerde ise bu değerin sadece 2,18 olduğunu göstermiştir. Bu veriler, glokom gruplarındaki belirgin apoptoz yoğunluğu ve eksitotoksik süreci engellediği bilinen memantin ile apoptotik prosesin azaltılabileceğini düşündürmekte ve aynı zamanda glokomda hücre ölümünün önemli ölçüde apoptoz yoluyla gerçekleştiğini savunan görüşleri de desteklemektedir. Kontrol grubunda saptanmış olan eser miktardaki apoptotik boyanmanın; nöronal hücrelerin fizyolojik döngülerine ait hücre ölümünden veya RPE veya koroidden kaynaklanıp retina yüzeyine dağılmış olabilecek melanin pigmentinin, TUNEL 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 (114). Geç glokom grubundan sadece bir denekte iç nükleer tabakada; komşu hücrelerle bağlantıları kopmuş, mitokondria genişlemeleri ve amorf yapıların gözlendiği, yoğun sitopazmik görünüm ve sitoplazmada miyelin figürlerin bulunduğu, küçülmüş hücre hacmine sahip, elektron mikroskopik görünümü ile nekroze uğramış hücreleri andıran dejenere hücrelerin civarında PMNL lere rastlanmıştır. Bununla birlikte, rutin takiplerde, klinik olarak belirgin enfeksiyon bulgularının olmaması ve hem elektron mikroskopik hem de ışık mikroskopik incelemelerde de PMNL infiltrasyonuna neden olacak belirgin bir patoloji saptanmaması nedeniyle, nekrotik benzeri hücrelerin komşuluğunda görülen bu lökositik infiltrasyonun, glokom etyopatogenezinde yeri olduğu düşünülen "sekonder nekrozis" bulguları arasında olup olmadığı tartışılabilir bir durumdur. Ancak sadece bir denekte nekrozis bulgularının olması ve spesifik ayırt edici bir özelliğin bulunmaması nedeniyle; apoptotik ölümün baskın bu ölüm tipinin nadir olması nedeniyle mi, yoksa bu infiltrasyonun glokomatöz ölüm sürecinden bağımsız bir nedene ait olması sebebiyle mi ayırt etmek mümkün olamamıştır. Ancak; glokomda nöronal hücre ölümü etyolojisinde apoptoz ile nekrozun birliktelik gösterebileceği, her iki ölüm yolunun birbiri ile kesişmesinin muhtemel olduğu akılda tutulmalıdır.

Choi ye göre; bir apoptoz inhibitörü kullanmak, hücre ölümü ile apoptozis arasındaki ilişkiyi tanımlamak için bir alternatif yol olabilir (82). Kwong ve ark. da aynı tezi savunmuştur (83). Her iki çalışmanın sonucunda apoptoz inhibitörleri kullanarak NMDA ilişkili eksitotoksistide apoptozun varlığı ve özellikli kaspasların retinada NMDA aracılı eksitotoksistide önemli rol oynadığını

gösterilmiştir (82,83). Buna göre bir antioksidant ajan kullanmak ta glomatöz hasarda eksitotoksitenin varlığını ortaya koymak için bir yol olabilir. Antioksidant bir ajanın glom oluşturulan deneklerde eksitotoksik hasarı bloklayarak nöron koruyucu olarak davranması aynı zamanda hasarın etyopatogenezini de ortaya koyacaktır. Çünkü geliştirilen nöron koruyucu ajan; RGH lerinin ölüm hızını yavaşlatmalıdır. Bu noktada ölüm hızını azaltmak için öncelikle hücrelerin nasıl öldüklerini bilmek gerekmektedir. Bugüne kadar yapılmış nöroproteksiyon çalışmalarında amaç, hem uygun ajanı bulmak hem de glom etyopatogenezini aydınlatmak olmuştur. Bu çalışmada memantin nöroprotektif özellik göstermesi glom etyolojisinde eksitotoksitenin varlığını destekler niteliktedir.

Hücre hasara uğradığında, apoptotik kaskadın başlaması ve ilerlemesinin çok hızlı hatta saatler içerisinde olduğu bilinmektedir (86,87). Bu, mevcut çalışma gibi TUNEL yöntemi ile apoptotik indeksi araştıran çalışmalarda, TUNEL pozitif hücrelerin miktarının herhangi bir an içinde görülür hale gelmesi ve süreç tamamlandığında kısa sürede azalması anlamına gelmektedir. Bu durumda, bizim çalışmamızda 6. haftanın sonunda halen apoptotik hücrelerin görülüyor olması bir çelişki gibi düşünülebilir. Ancak tüm RGH leri aynı zamanda mı ölmeye başlamaktadır? Aynı zamanda ölmeye başlasalar bile tüm hücrelerde proses aynı hızda mı gelişmektedir? Ek bir patoloji olmaksızın aynı sayıda ganglion hücrelerine sahip ve eşit GİB değerleri gözlenen hastalarda glom progresyonu her zaman aynı mı olmaktadır? Bu soruları cevaplamak için yapılan tartışmalar halen süregelmektedir. Glom hastalarının optik sinir hasarına farklı duyarlılık gösterdikleri bilinmektedir (114). Bu kişiden kişiye değişebilen hassasiyetin RGH deki apoptoz aktivasyonuna duyarlılık farklılığı nedeniyle olabileceği ileri sürülmüştür (114). Bu farklılığın literatürde daha önce açıklanan hücresel, moleküler ve biyokimyasal değişik temelleri mevcut olabilir (7). Sözgelimi; bu farklılıklardan biri endojen nörotrofinlerin RGH leri üzerine etkileri ile apoptoz aktivitesini azaltabilmeleri olabilir (115). Diğer bir sebep bazı RGH leri daha iyi doğal nöroprotektif mekanizmalara (şaperonlar, Ca bağlayıcı protein, metallothioneinler vb.) sahip olabilirler ya da RGH leri ile ilişkili farklı reseptör dağarcığı için bazı RGH'de ölüm diğerlerinden daha hızlı olduğuna dair bir açıklama sağlayabilir (7).

Bu nedenle kronik hasar altında olan nöronal doku hasara farklı şekillerde cevap vermektedir. Özetle, bu bir süreçtir ve hücrelerin hasarla karşılaşmaları ile direnç mekanizmalarının devreye girmesi, direncin sürmesi, bitmesi ve nihayetinde hücrenin ölümü de bu süreçte gizlidir. Bu nedenle kronik hasar altında olan nöronal doku hasara farklı şekillerde cevap vermektedir. Bu çalışmada da 6. haftanın sonunda halen apoptozun sürüyor olmasının sebebi bu süreçle açıklanabilir.

Çalışmada TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısı, glokomatöz hasarın derecesi ile karşılaştırıldığında beklenenden daha az oranda gibi gözükabilir. Bunun sebebi; apoptozdaki DNA yıkımının çok kısa sürede olmasına ve RGH lerinin farklı azalan oranlarda ölmeleri ile ilintili olabilir. Quigley ve ark. kontrol grubundan küçük ama anlamlı düzeyde farklı olmakla 2400 den fazla RGH si arasında tek bir tane apoptotik hücre tespit etmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise, yine kontrol grubundan anlamlı bir farklılık göstererek 100 000 RGH si arasında apoptotik hücre sayısı 20 olarak bulunmuştur (7,74).

RGH nin farklı zamanlarda ölüyor olması klinik açıdan önemli bir durumdur. Glokomda görmenin derece derece kaybolması RGH nin farklı zamanlarda ölmesi nedeniyledir (7). Bu hastalığın progresyonu açısından önem arzeder. İyi bir nöroprotektan bu progresyonu yavaşlatmalıdır. Bu nasıl olacaktır? Glokomatöz hasarın sürecine tekrar bakarsak; optik sinir başının kan dinamiğindeki değişimler, bu alandaki lamina kribrosa, RGH aksonları, astrositler ve santral retinal arteri de içeren komponentlerde hipoksi benzeri hasara neden olur. Astrositler birbirlerine sıkı bağlantılar ile bağlı olduklarından, optik sinir başında bir grup astrositte hasar oluşması, retina boyunca tüm astrositlere yayılabilir. Astrositler işlevlerini yapamaz hale geldiklerinde potasyum, glutamat ve diğer komponentleri salarlar. RGH aksonunda hipoksi benzeri hasar, RGH nin tümünün daha az etkili işlev görmesine yol açacaktır çünkü, bu hücreler glutamatla yüklü olduklarından, bu maddenin bir kısmı ekstraselüler aralığa sızma eğilimi gösterir. Ekstraselüler aralıkta çok fazla glutamat bulunması RGH için toksik etkilidir. Astrositler ve RGH den sızan ekstraselüler glutamatın, başlangıçta Müller hücreleri ile inaktive edildiği düşünülmektedir. Fakat bir süre sonra Müller hücreleri de fonksiyon göremez hale gelir. Bu durumda ekstraselüler nörotransmitter düzeyi iyice artar, bunlar arasında glutamat ilk sırayı alır. Glutamat, hücreleri depolarize ederek ölümüne yolaçar.

Özetle Müller hücre fonksiyonunun bozulmasını takiben ekstraselüler glutamat seviyelerinin yükselmesi, RGH nin farklı depolarizasyonuna ve değişen hızda ölümüne neden olur. Bizim çalışmamızda GİB artışı sonrası glokom oluşumundan, Müller hücre kaybına (Müller hücresi kaybı elektron mikroskopik düzeyde gösterilmiştir) kadar olan tüm hasar süreci gözlenmiştir. EMG da; RGH ve aksonları, Müller hücreleri, optik sinir aksonları kontrol grubuna yakın düzeyde korunmuş, GMG da ise tespit edilen hasarın ardından memantin başlandıktan sonra belirgin bir kötüleşme gözlenmemiştir. Memantin, verildiği gruplarda eşdağılımlı bir sonuç ortaya koymuş, nöron ölümünü verildiği tüm deneklerde bir seviyede sınırlamıştır. Bu noktada memantin, nöronların ölüm hızını azaltmak, glokom hastalığının progresyonunu yavaşlatmak için ideal bir nöroprotektan olmaya adaydır.

Ağır hasar almış veya ölmüş bir nöronun bir nöroprotektanla tekrar canlı ve fonksiyonel olamayacağı açıktır. Bu çalışmada da GMG da RGH sayım ve retina kalınlığında artış gözlenmemiş ancak ilaç başlandıktan sonra GG ile karşılaştırıldığında nöronal kayıpta anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. EMG da ise tüm nöral elemanlar korunmuştur. Bu noktada ajanın nöronal hasarın başlangıcında kullanılmaya başlanmasının, hasarın progresyonunu azaltmada önemli olduğu görülmektedir. Çünkü; erken dönemde uygulanan memantin, hasar yaratan etkene karşı farklı düzeylerde dirence sahip hücreleri koruduğu, ancak bu korumanın subselüler değişiklikler düzeyinde değil, hücre canlılığı düzeyinde gerçekleştiği söylenebilir. Bununla beraber; patolojik koşullara uyum sağlamış, daha az sayıda ancak sağlam hücrelerin varlığı da ileri evrede uygulanan memantin, hücre ölümüne gidişi durdurabildiğini düşündürmektedir.

Wang ve ark. deneysel glokom modeli oluşturdukları sıçanlardaki değişiklikleri TUNEL metodu ile immünohistokimyasal olarak ve elektron mikroskop ile ultrastrüktürel olarak değerlendirmişlerdir. 1., 3. haftalarda ve 3. ayda sakrifiye ettikleri deneklerde, en çok RGH, INT ve DNT'da olmak üzere çeşitli retina katlarında nöronal dejenerasyona bağlı değişiklikler izlemişlerdir. En fazla 3. ay, en az 1. haftada izledikleri ultrastrüktürel glokomatöz hasar bulguları; fragmente nükleus, karanlık hücre sitoplazması, membran enkapsüle apoptotik cisimcikler ve relatif intakt kalmış hücre membranı ve organelleri ile karakterize RGH, INT ve DNT tabakasındaki apoptotik dejeneresans gösteren nöronlar olarak bildirmişlerdir.

Ağır dejenere akson ve akson terminallerini (koyu renkli aksoplazm ve sinaptik vezikül birikintili) RGH, İPT, İNT ve DPT’da nöron ve aksonlar arasında gözlemişlerdir. Azalmış sinaptik veziküller, aksonal membran disintegrasyonu, hatta aksonal içeriğın azalması, bir miktar yaşayan RGH de organel bozuklukları rapor etmişlerdir. Bunlar, nukleus ve plazma membranlarında rüptür, mitokondrilerde dejenerasyon ve şişme, kaba endoplazmik retikulum polizomlarında ayrılma şeklindedir. Aktive astrositler, Müller hücreleri ve mikrogliaların özellikle RGH, İPT ve İNT’da 1 ve 3. hafta gruplarında olduğunu, Müller hücrelerinin bazı proseslerinin İPT arasında yayılmış olarak gözlendiğini, bunların kontrol grubunda görülmediğini ifade etmişlerdir. Elektron mikroskop ile gözlenen apoptotik cisimcikler ve TUNEL pozitif apoptotik hücrelerin, retinada benzer lokalizasyonda olduğunu bildirmişlerdir (116).

Retinal yapıların ultrastrüktürel incelenmesinde EG ve GG gruplarında nöronal yapıların hasarlı, glial dokuların ise reaktif proliferasyon gösterdiği görülmüştür. Memantin verilen gruplarındaki değışimlerin ise çok daha ılımlı olduğu dikkat çekmektedir. Apoptotik hücrelerin genel karakteristik özellikleri olan; kromatin kondansasyonu, nukleusta fragmantasyon ve granüler materyal birikimi, internukleozomal DNA fragmantasyonu, nukleer membranda lizis ve buna bağılı sitoplazmaya dağılmış koyu rezidüel nukleer materyal, organellerde şişme, mitokondrilerde belirgin dejenerasyon, sitoplazmada vakuolizasyon apoptotik olan tüm hücrelerde görülmektedir (114, 116). Bu çalışmada, TUNEL boyama yöntemi ile gösterilen retinal katlardaki apoptotik hücre yerleşimlerinin, elektron mikroskopik incelemede benzer ultrastrüktürel karakteristikleri gösterdiği görülmüştür.

Ultrastrüktürel incelemelerde, özellikle GMG grubunda; belirgin nöronal hücre kaybına yol açmayan gangliyon hücrelerinde nukleer zar invajinasyonları ve RPE deki artmış fagozomlar gibi bulgular saptanmış olsa da, özellikle GG grubunda izlenen yoğun değışikliklerin, her iki memantin grubunda da gözlenmemiş olması dikkat çekicidir.

Bu çalışmada dikkat çekici bir bulgu da; fotoreseptör hücrelerde belirgin harabiyet ve apoptotik hücre varlığının gösterilmiş olmasıdır. Bilindiğı gibi glokomda fotoreseptör hücrelerinin etkilenip etkilenmediğine dair tartışmalar mevcuttur (117). Pek çok çalışmada glokomlu hastalardaki ERG bulguları normal

olarak rapor edilmekte ve bu da fotoreseptörlerin intakt kaldığı şeklinde yorumlanmaktadır (117-119). Quigley ve ark. postmortem glokom hastalarında yaptıkları ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik incelemelerde sadece RGH ve bunların aksonlarında hasar olduğunu rapor etmişlerdir (120). Ancak bu görüşlerin aksine, ileri glokomda fotoreseptörlerin etkilendiğini ileri süren çalışmalar da mevcuttur (121). Bu çalışmanın bulguları, glokomatöz süreçte fotoreseptör hücrelerde harabiyetin söz konusu olabileceği görüşünü destekler yöndedir. Pigment epiteli uzun süre yüksek basınca direnç gösterse bile, zaman içinde bu hücreler de parçalanarak retina içine doğru pigment migrasyonuna yol açabilmektedir (122). Fotoreseptörlerdeki değişikliklerin yanı sıra RPE pigment granüllerinde azalma, vakuolizasyon, hücreler arası bağlantı kompleksinde ayrışma ve epitelin içerdiği inklüzyon cisimcikleri nedeniyle glokomun sadece retinanın iç katlarıyla sınırlı olmayıp dış katları da etkilediği düşüncesini desteklemektedir. Pigment epiteli fotoreseptörlerin fonksiyonunu idame ettirmesindeki yaşamsal dokudur. Fotoreseptörlerdeki hasar da bu nedenle direkt olarak RPE de etkileyecek, glokoma bağlı hasarın daha geniş bir alana yayılmasına neden olacaktır. Bizim çalışmamızda da glokom gruplarında (özellikle GG grubunda) her iki retina katında da yaygın hasar olduğu görülmüştür.

Yücel ve ark. deneysel glokom modelinde lateral genikulat nükleusta nöronlarda meydana gelen atrofik değişiklikleri göstermişlerdir (123,124). Ayrıca diğer çalışmaların sonuçlarını da dikkate alarak denilebilir ki; glokom, sadece RGH leri ve onların aksonal uzantıları ile değil fotoreseptörler dahil tüm retina katlarıyla ve sadece gözle sınırlı kalmayıp beyindeki ilgili merkezleri de içerisine alacak şekilde tüm vizüel sistemi içine alan nörodejeneratif bir hastalık olarak değerlendirilebilir (116, 122-124). Bizim çalışmamızda da; fotoreseptörler ve RPE dahil olacak şekilde dış retina katlarının da glokomatöz hasardan etkilendiği bulguları dikkat çekicidir. Yücel ve ark. diğer bir çalışmalarında da deneysel glokom modeli oluşturdukları maymunlarda nöroprotektif ajan olarak memantin denemişler, memantin kullandıkları grupların lateral genikulat nükleuslarında nöron koruyucu özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir (125).

Elektron mikroskopik incelemelerde, EG ve GG gruplarında Müller hücrelerinin; RGH'leri ve aksonal uzantılarının olması gereken alanda, koyu

mikroflamentöz uzantılarla karakterize bir şekilde, dejenere nöronların etrafında yerleşmiş oldukları görülmüştür. EMG ve GMG gruplarında ise; Müller hücrelerinin, daha ziyade yoğun fagozom içeren bir görüntü paterni içerisinde, diğer glial hücreler ile birlikte aktivasyon bulguları sergilediği dikkat çekmiştir.

Müller hücresi, bilindiği gibi, retinal ekstraselüler alanın homeostazisininin sağlanması, retinal anjiogenezinin kontrolü, retinal kan akımının regülasyonu ve patolojik koşullarda da reaktif yanıtların oluşturulması gibi önemli fonksiyonları olan, vertebralı retinasının en önemli glial hücresidir (126). Ayrıca eksitotoksitenin önlenmesinde primer etkili olduğu; eksitatör glutamatın retinal ekstraselüler alandan alınması ve bir antioksidan olan glutatyonun ortama verilmesi gibi görevleri olduğu bildirilmiştir (126). Bu çalışmanın bulgularında, memantin verilmiş olan gruplarda Müller hücreleri ile ilgili izlenmiş olan bu farklılığın, memantin sağladığı anti-eksitotoksik aktivite ile Müller hücreleri üzerinde bir ölçüde "iş yükü azaltıcı" etki ortaya çıkartmış olabilmesi şeklinde tartışılabilir. Memantin, bu şekilde hem direkt hem de dolaylı yoldan Müller hücreleri üzerinde koruyucu ve böylece bu hücrelerin nöroprotektif etkinliğini potansiyalize edici özellik gösteriyor olabilir.

Primatlarda optik sinir miyelinizasyonu posterior skleradan başlarken, ratlarda skleranın yaklaşık 0.5 mm posteriorundan başlar. Bizim çalışmamızda optik sinir kesitlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde; optik sinire ait normal akson görünüşleri, myelin kılıfları ve aksoplazmaları ile kontrol gruplarında tanımlanmıştır. GG ve EG gruplarında ise dejenere aksonlar; şişkin aksonal profilleri, aksoplazmaların yokluğu ve kollabe olmuş miyelin kılıfları ile aksonal dejeneresans bulguları göstermekteydi. EMG grubunun optik sinir aksonlarında miyelin dejenerasyonu izlenmiş ancak genel olarak akson bileşenlerinin korunduğu görülmüştür. GMG grubunda, aksonal dejenerasyon gösteren fasiküllerin glokom grubuna göre daha az olduğu belirlenmiştir.

Memantin gruplarının ikisinde de görülmeyen ancak özellikle GG grubunda sıkça karşılaşılan bir bulgu da iç retinal katlardaki kan damarlarının endotel hücrelerinde görülen vakuolizasyon ve villöz transformasyondur. Bu bulgu, glokom sürecinde retinal damarlarda normal büyük bakıda gözlenemeyen ancak, ultrastrüktürel olarak gösterilebilen bir dejenerasyon bulgusunun mevcut olabileceğini düşündürmektedir.

Memantin; diğer glutamat reseptörleri üzerinde etkisi olmaksızın NMDA reseptörlerini selektif olarak bloklayabilmektedir (6,27). İyon kanallarına kısa süreli bağlanması, bu nedenle reseptörün fizyolojik aktivitesini bloklamaması, uyuşukluk ve halüsinasyonlara yol açmaması nedeniyle klinik olarak iyi tolere edilebilir bir ilaç olarak değerlendirilir (102-104). Bu çalışmada deneklerde özellikli bir davranış testi kullanılmamıştır. Ancak hiç birinde davranış bozuklukları, uzamış uyku süreci ve koma hali gözlenmemiştir. Çok iyi bir eksitotoksisite blokleri olmasına rağmen, iyon kanallarına uzun süre bağlanma özelliği ve buna bağlı gelişen koma haline kadar ilerleyebilen yan etkiler nedeniyle MK-801 klinik kullanımda yerini alamamıştır (32,127) Hare ve ark. glokom meydana getirdikleri maymun gözlerinde sistemik olarak uygulanan memantin etkinlik ve güvenilirliğini araştırmışlardır. 18 makak maymunun sağ gözlerinde, ön kamara açısına lazer uygulayarak kronik oküler hipertansiyon modeli oluşturmuşlardır. Bunların 9 tanesine 4 mg/kg/gün memantin verilmiş, deneklere hem konvansiyonel hem de multifokal metodlarla, 3., 5. ve 16. aylarda ERG yapılmıştır. 16. ayın sonunda VECP uygulamışlardır. Kronik oküler hipertansiyon sonucunda ERG ve VECP yanıtlarında amplitüd azalması görülmüştür ancak memantin verilen grupta amplitüd azalmasının daha az olduğu gözlenmiştir. Memantin normotansif gözlerde ERG ve VECP yanıtlarının kinetiğine ve amplitüdüne etkisi olmadığı gösterilmiştir. Aynı modelde optik sinir başı topografisi, konfokal lazer görüntülemesi, 3. 5. ve 10. aylarda yapılmış, 16. ayın sonunda denekler sakrifiye edilerek RGH sayısı histolojik olarak bakılmıştır. Memantin verilen olguların, optik sinir başı topografisi ile intraoküler basınca bağlı değişiklikler açısından daha az etkilenmiş olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin hem cup hemde nöroretinal rim den yapılan ölçümlerde anlamlı fark gösterdiği bildirilmiştir. Normotansif gözlerde ise memantin tedavisinin herhangi bir histolojik ve morfolojik değişiklik yaratmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın RGH sayım sonuçları, Hare ve ark. nin sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (128,129).

Wheeler ve WoldeMussie'ye göre; iyi bir nöroprotektanın retina ve/veya optik sinirde bağlanabileceği özel reseptörü olması, bu hedef reseptörün aktive edilmesi ile nöronun strese karşı dayanıklılığını arttıracak yolları tetikleyebilmesi veya toksik saldırıyı bastırabilmesi, ilacın retina ve vitreusa farmakolojik olarak etkin konsantrasyonlarda ulaşabilmesi ve ajanın nöroprotektif aktivitesinin klinik

çalışmalar ile gösterilebilmesi bir ilacın nöron koruyucu adını alabilmesi için yeterlidir (130). Bu çalışmadaki memantin gruplarının glokom gruplarına göre iyi sonuçlara sahip olduğu gözönünde bulundurulursa memantinın retinaya etkin konsantrasyonda ulaşabildiği, yeterli reseptör etkileşiminde bulunduğu, nöronları toksik saldırıdan koruyabildiği söylenebilir. Memantin, yazarların saydığı özelliklerin ilk üçüne sahip gibi gözükmektedir. Son beklenen özellik ise, memantinın glokom hastalarında görme alanı kaybına etkilerini araştırmak üzere günümüzde halen sürmekte ve sonuçları 2007 de açıklanması beklenen geniş ölçekli, randomize çalışma ile ortaya koyulması beklenmektedir (27).

6. SONUÇ

Çalışmamızdaki histopatolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel bulgular, bir NMDA reseptör antagonisti olan memantinın glokomda GİB na anlamlı bir etkisi olmaksızın, anti-eksitotoksik etki ile nöronal koruma sağlayabileceğini işaret etmektedir. Verilerimiz, memantinın nöroprotektif etkinliğinin glokom sürecinin başlangıcında verilmesi ile daha da belirgin düzeyde olabileceğini düşündürür tarzdadır. Tüm bu sonuçlar, günümüzde giderek kabul gören glokomda glutamat tabanlı eksitotoksitenin nöronal hasarda etkin olduğu düşüncesini destekler gözükmektedir.

Çalışmamızın bulguları, deneysel glokom sürecinde anlamlı apopitoz varlığını göstermekte ve eksitotoksik süreci engellediği bilinen memantinın verilmesi ile apopitotik prosesin azaltılabileceğine işaret ederek, glokomda hücre ölümünün önemli ölçüde apopitoz yoluyla gerçekleştiğini savunan görüşleri de desteklemektedir.

Apopitotik indeks ve ultrastrüktürel bulgular, glokom sürecinde nöron kaybının sadece retinanın iç katlarında değil, fotoreseptör katını ve RPE'de içine alacak şekilde dış retinal alanlarda da mevcut olabileceğine dikkat çekmektedir.

Bizim çalışmamızda da olduğu gibi, deneysel olarak etkinliği gösterilen memantinın, glokomda klinik kullanılabilirliği, günümüzde halen sürmekte olan geniş ölçekli, randomize klinik çalışmaların sonucunda sonucunda ortaya konulabilecektir.

7. ÖZET

DENEYSEL GLOKOMDA ERKEN VE GEÇ DÖNEM MEMANTİN UYGULAMASININ NÖRON KORUYUCU ETKİSİ: HİSTOPATOLOJİK, İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE ULTRASTRÜKTÜREL İNCELEME

AMAÇ: Deneysel glokomun erken ve geç dönemlerinde verilen sistemik memantin nörön koruyucu etkinliğinin histopatolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel açıdan araştırılması

YÖNTEM-GEREÇLER: Wistar türü sıçanların ön kamaralarına 3 hafta süreyle Na hyaluronat enjekte edilerek glokom modeli oluşturulmuştur. Denekler, erken-dönem glokom grubu (EG, n=10), geç-dönem glokom grubu (GG, n=15), erken-dönem memantin grubu (EMG, n=15), geç-dönem memantin grubu (GMG, n=15) ve kontrol grubu (K, n=10) şeklinde sınıflandırılmıştır. EMG grubuna glokom indüksiyonu başlanmasıyla birlikte, GMG grubuna ise glokom indüksiyonu tamamlandıktan sonra 3 hafta süre ile 10 mg/kg/gün memantin intraperitoneal yoldan verilmiştir. Bu sürelerin sonunda denekler perfüzyon yöntemi ile tespit edilerek sakrifiye edilmiş ve ışık mikroskop ve elektron mikroskop incelemelerin yanı sıra TUNEL yöntemiyle retinal apoptotik indeks analizi yapılmıştır.

BULGULAR: EMG ve GMG gruplarında retina kalınlığının ve retinal ganglion hücre (RGH) sayılarının glokom gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde korunmuş olduğu saptanmıştır. Glokom gruplarında RGH yanı sıra iç nükleer tabakada da yoğun apoptoz varlığı gözlenmiştir. Memantin verilen gruplarda ise apoptoz sayısı bu gruplara göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Ultrastrüktürel incelemelerde, GMG grubunda; belirgin nöronal hücre kaybına yol açmamış ılımlı dejeneratif değişiklikler saptanmış olsa da, özellikle GG grubunda izlenen fotoreseptör hücreler dahil olmak üzere belirgin destrüktif değişikliklerin, memantin verilmiş olan gruplarda gözlenmemiş olması dikkat çekicidir.

Including the photoreceptor cells, marked ultrastructural changes were observed in the retinae of EG and GG groups. It was noteworthy that the ultrastructural changes were modest and without causing significant cell death in GMG group and the ultrastructural changes were being much less evident in EMG group.

DISCUSSION: Revealing that memantine may act as an effective neuroprotective agent in experimentally induced glaucoma, histological and ultrastructural data of this study also support that glutamate related excitotoxic neuronal death and apoptosis have significant roles in the pathogenesis of glaucoma. Also it seems possible that the neuroprotective effect of memantine may be much significant when administrated in the early phase of glaucoma process.

KEY WORDS: Apoptosis, electron microscopy, glaucoma, memantine, retina

9. KAYNAKLAR

1. Kaushik S, Pandav SS, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. *J Postgrad Med* 2003; **49**: 90-95.
2. The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators *Am J Ophthalmol* 2000; **130**: 429-440.
3. The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal –Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1998; **126**: 498-505.
4. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal –Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1998; **126**: 487-497.
5. Levin LA. Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2003; **48** (Suppl 1): 21-24.
6. 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**:1618-1624.
7. Osborne NN, Chidlow G, Nash MS et al. The potential of neuroprotection in glaucoma treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 1999; **10**:82–92.
8. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, et al. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1996; **114**: 299–305.
9. Dreyer E, Grosskreutz C. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). *Clin Neurosci* 1997; **4**: 270–273.
10. Yalvaç I, Önal M, Glokom, Bölüm 11, *Temel Göz Hastalıkları*, 1. Baskı, Aydın P, Akova YA eds, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001, 259-285.

11. Shields MB. *Textbook of glaucoma*. Williams and Wilkins, Baltimore Third edition, 1992, 84-125.
12. Boles-Carenini B, Brogliatti B, Boles-Carenini A, et al. Ischemia and glaucoma. *New Trends in Ophthalmol* **8**: 75-80, 1993.
13. Quigley HA, Hohman RM, Addicks EM et al. Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1983; **95**:673-691.
14. Van Buskirk EM, Cioffi GA. Predicted outcome from hypotensive therapy for glaucomatous optic neuropathy. *Am J Ophthalmol*. 1993; **116**:636-640.
15. Hernandez MR, Gong H. Extracellular matrix of the trabecular meshwork and optic nerve head. *The glaucoma, Glaucoma Therapy*, Vol 1. The Mosby Co. 2nd edition, 1996, 213-249.
16. Grunwald JE, Piltz JR, Hariprasad SM. Optic nerve blood flow in glaucoma: effect of systemic hypertension. *Am J Ophthalmol* 1999; **127**:516- 522.
17. Fechtner RD, Weinreb RN. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1994; **39**:23-42.
18. Lipton SA, Rosenberg RA. Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway in neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; **330**: 613-622.
19. Lipton SA. Molecular mechanisms of trauma-induced neuronal degeneration. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993; **6**: 588-596.
20. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L- glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 1957; **58**: 193-201.
21. Olney JW, Ho Ol. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 1970; **227**: 609-611.
22. Olney JW. Glutamate - induced retinal degeneration in neonatal mice: electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 1969; **28**: 455-474.
23. Brooks DE, Barcia GA, Dreyer EB. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res* 1997; **58**: 864-867.

24. Dreyer EB, Zhang D., Lipton SA. Transcriptional or translational inhibition blocks low dose NMDA- mediated cell death. *Neur Report* 1995; **6**: 942-944.
25. Osborne NN. Memantine reduces alterations to the mammalian retina, in situ, induced by ischaemia. *Vis Neurosci* 1998; **16**: 45-52.
26. WoldeMussie E, Yoles E, Schwartz M. et al. Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats. *J Glaucoma* 2002; **11**: 474-480.
27. Franzco RJC. Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clin and Exp Ophthalmol* 2006; **34**: 54-63.
28. Lucas DR, Newhouse JP. The effects of nutritional and endocrine factors on an inherited retinal degeneration in the mouse. *AMA Arch Ophthalmol* 1957; **57**: 224-35.
29. Curtis D, Phillis J, Watkins J. Chemical excitation of spinal neurons. *Nature* 1959; **183**: 611-612.
30. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; **164**: 719-21.
31. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 1999; **81**:163-221.
32. Lipton SA. Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol* 2003; **48** (Suppl 1): 38-46.
33. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG et al. Glutamate becomes neurotoxic via the *N*-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 1988; **451**: 205-12.
34. Henneberry RC, Novelli A, Cox JA et al. Neurotoxicity at the *N*-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons. An hypothesis for cell death in aging and disease. *Ann NY Acad Sci* 1989; **568**: 225-233.
35. Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, et al. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6161-6166.
36. Dawson VL, Dawson TM, London ED, et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6368-6371.

37. Trump BF, Berezesky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995; **9**: 219–228.
38. Kruman I, Guo Q, Mattson MP. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 1998; **51**:293–308.
39. Fiskum G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma* 2000; **17**: 843–855.
40. Matute C, Sanchez-Gomez MV, Martinez-Millan L. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8830–8835.
41. Schuettauf F, Naskar R, Vorwerk CK. Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 4313–4316.
42. Park E, Liu Y, Fehlings MG. Changes in glial cell white matter AMPA receptor expression after spinal cord injury and relationship to apoptotic cell death. *Exp Neurol* 2003; **182**: 35–48.
43. Sheng M, Cummings J, Roldan LA. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 1994; **368**: 144–147.
44. Stephenson FA. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2001; **2**: 233–239.
45. Grunder T, Kohler K, Kaletta A et al. The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat. *J Neurobiol* 2000; **44**: 333–342.
46. Vorwerk CK, Naskar R, Schuettauf F et al. Excitotoxicity can be mediated through an interaction within the optic nerve; activation of cell body NMDA receptors is not required. *Vet Ophthalmol* 2001; **4**: 201–4.
47. Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 462–8.
48. Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ. Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 3444–50.

49. Osborne NN, Chidlow G, Wood J et al. Some current ideas on the pathogenesis and the role of neuroprotection in glaucomatous optic neuropathy. *Eur J Ophthalmol* 2003; **13** (Suppl. 3): S19–26.
50. Dreyer EB. A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *J Glaucoma* 1998; **7**: 62–67.
51. Lam TT, Siew E, Chu R et al. Ameliorative effect of MK- 801 on retinal ischemia. *J Ocul Pharmacol Ther* 1997; **13**: 129–137.
52. El-Asrar AM, Morse PH, Maimone D. MK-801 protects retinal neurons from hypoxia and the toxicity of glutamate and aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: 3463–3468.
53. Weber M, Bonaventure N, Sahel JA. Protective role of excitatory amino acid antagonists in experimental retinal ischemia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; **233**: 360–365.
54. Kim TW, Kim DM, Park KH et al. Neuroprotective effect of memantine in a rabbit model of optic nerve ischemia. *Korean J Ophthalmol* 2002; **16**: 1–7.
55. Chung HS, Harris A, Evans DW et al. Vascular aspects in the pathophysiology of glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* 1999; **43** (Suppl. 1): S43–50.
56. Arend O, Plange N, Sponsel WE, Remky A. Pathogenetic aspects of the glaucomatous optic neuropathy: fluorescein angiographic findings in patients with primary open angle glaucoma. *Brain Res Bull* 2004; **62**: 517–524.
57. Wolf S, Arend O, Haase A et al. Retinal hemodynamics in patients with chronic open-angle glaucoma. *Ger J Ophthalmol* 1995; **4**: 279–282.
58. Hall JK, Andrews AP, Walker R et al. Association of retinal vessel caliber and visual field defects in glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2001; **132**: 855–859.
59. Flammer J. The vascular concept of glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1994; **38** (Suppl.): S3–6.
60. Grieshaber MC, Flammer J. Blood flow in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2005; **16**: 79–83.
61. Flammer J, Orgul S, Costa VP et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2002; **21**: 359–393.

74. Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, et al. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997, **115**:1031-1035.
75. Okisaka S, Murakami A, Mizukawa A, et al. Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. *Jpn J Ophthalmol* 1997, **41**:84-88.
76. Raffray M, Cohen GM: Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol Ther* 1997, **75**:153-177.
77. 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
78. Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G et al. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci* 1992; **8**: 567-573.
79. Ritch R. Neuroprotection: Is it already applicable to glaucoma therapy? *Curr Opin Ophthalmol* 2000; **11**:78-84.
80. Dreyer EB, Pan ZH, Storm S et al. Greater sensitivity of larger retinal ganglion cells to NMDA-mediated cell death. *Neuroreport* 1994, **5**:629-631
81. 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.
82. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol*. 1996; **6**: 667-672.
83. Kwong J, Lam T. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Induced Apoptosis in Adult Rabbit Retinas. *Exp Eye Res* 2000;**71**:437-444.
84. Quigley HA. Recognizing structural damage to the optic nerve head and nerve fiber layer in glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1998, **125**:563.
85. Hernandez MR, Pena JD. The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 1997, **115**:389-395.
86. Nickells RW. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why and the maybe. *J Glaucoma* 1996; **5**: 345-356.

87. 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.
88. McKinnon SJ. Glaucoma, apoptosis and neuroprotection. *Curr Opin Ophthalmol* 1997; **8**:28-37.
89. Varela HJ, Hernandez MR. Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 1997, **6**:303-313.
90. Otori Y, Wei JY, Barnstable CJ. Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, **39**: 972-981.
91. Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res* 1997, **37**:3483-3493.
92. Delbarre G, Delbarre B, Calinon F et al. Accumulation of amino acids and hydroxyl free radicals in brain and retina of gerbil after transient ischemia. *J Ocul Pharmacol* 1991, **7**:147-155.
93. Muller A, Villain M, Bonne C. The release of amino acids from ischemic retina. *Exp Eye Res* 1997, **64**:291-293.
94. The European Ad Hoc Consensus Group. Neuroprotection as initial therapy in acute stroke. Third Report of an Ad Hoc Consensus Group Meeting. *Cerebrovasc Dis* 1998, **8**:59-72.
95. Dyker AG, Lees KR. Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke. *Stroke* 1998, **29**:535-542.
96. Del Zoppo GJ, Wagner S, Tagaya M. Trends and future developments in the pharmacological treatment of acute ischaemic stroke. *Drugs* 1997, **54**:9-38.
97. 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**: 2611-2622.
98. Caprioli J. Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmol* 1997, **75**:364-367.
99. Osborne NN. Neuroprotection to the retina: relevance in glaucoma. In *Risk Factors and Neuroprotection in Glaucoma*. Edited by Drance SM. Amsterdam: Kugler Publications; 1997:139-155.

100. Danysz W, Parsons CG, Möbius HJ, et al. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease—a unified hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Res* 2000;**2**:85-97.
101. Kornhuber J, Weller M, Schoppmeyer K. Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *J Neural Transm* 1994; Suppl. **43**:91-104.
102. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist. *Neuropharmacology* 1999; **38**: 735-767.
103. 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.
104. Lipton SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Rev Drug Discov.* 2006; **5**; 160-170.
105. Beach TG, Tago H, Nagai T. Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation *J Neurosci Methods.* 1987 **19**(3):183-92.
106. Miller DC. Arch Comment on: Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. *Pathol Lab Med.* 1998; **122**(11):949.
107. Benozzi J, Nahum LP, Campanelli JL et al. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;**43**:2196–2200.
108. Ankarcona, M, Dypbukt, JM, Bonfoco E et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; **15**: 961-73.
109. Lam, TT, Abler AS, Kwong JMK et al. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; **40**; 2391-7.
110. Kim HS, Park CK. Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program. *Brain Research* 2005; **1057**: 17 – 28.
111. Ji J, Chang P, Pennesi M et al. Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Research* 2005; **45**: 169–179.

112. 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**: 163-172.
113. Sisk DR, Kuwabara T. Histologic changes in the inner retina of albino rats following intravitreal injection of monosodium L-glutamate. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1985; **223**: 250-258.
114. 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.
115. Mey J, Thanos S. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.*1993; **602**:304-317.
116. Wang X, Tay W et al. An electron microscopic study of neuronal degeneration and glial reaction in the retina of glaucomatous rats. *Histol Histopathol* 2002; **17**: 1043- 1052.
117. Trick G.L. Pattern reversal retinal potentials in ocular hypertensives at high and low risk of developing glaucoma. *Doc Ophthalmol* 1987; **65**: 79-85.
118. Korth M, Horn F, Storck B et al. The pattern-evoked electroretinogram (PERG): Age related alterations and changes in glaucoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989; **227**: 123-130.
119. Hare WA, Ton H, Ruiz G et al. Characterization of retinal injury using electroretinogram (ERG) measures obtained with both conventional and multifocal methods in chronic ocular hypertensive primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; **42**: 127-136.
120. Quigley HA, Green WR. The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmol* 1979; **86**: 1803-1830.
121. Panda S, Jonas JB. Decreased photoreceptor count in human eyes with secondary angle- closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: 2532-2536.
122. Eryilmaz T, Glokomda patoloji ve etyopatogenez, *Oftalmoloji*, 1992, **1**, 9-13.

123. Yucel YH, Zhang Q, Gupta N, et al. Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2000;**118**: 378-384.
124. Yucel YH, Zhang Q, Weinreb RN, et al. Atrophy of relay neurons in magno and parvocellular layers in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;**42**: 3216-3222.
125. Yucel YH, Gupta N, Zhang Q, et al. Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2006;**124**(2): 217-225.
126. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 2006; **25**: 397–424.
127. Chaudhary P, Ahmed F, Sharma SC. MK801—a neuroprotectant in rat hypertensive eyes. *Brain Research* 1998;**792**:154–158
128. Hare WA, WoldeMussie E, Lai RK et al. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, I: functional measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 2625–39.
129. Hare WA, WoldeMussie E, Weinreb RN et al. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, II: structural measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 2640–51.
130. Wheeler LA, Gil DW, WoldeMussie E. Role of alpha-2 adrenergic receptors in neuroprotection and glaucoma. *Surv Ophthalmol* 2001;**45**(Suppl)3: S290-296.