

Gözde Yaşa Bağlı Değişikliklerin Histokimyasal ve İnce Yapı Düzeyinde İncelenmesi

Investigation of Age-Related Changes on Eye by Using Histochemical and Ultrastructural Methods

Ebru Çakmak, Gülnur Take Kaplanoğlu, Deniz Erdoğan, Mahmud Bağırzade, Güleser Göktaş

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, sıçanlarda doğumdan başlayarak yaşa koşut gelişimin kritik evrelerde kornea ve retinada olaylanan yapısal değişikliklerin histokimyasal yöntemler ile değerlendirilmesi ve ince yapı düzeyinde karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlandı.

Yöntemler: Çalışmamızda doğumdan sonra 1. ve 22. gününde, 10. hafta ve 22. ayında sıçan gözleri alınarak yaşa bağlı olarak kornea ve retinadaki değişiklikler PAS-ALSian mavisi boyama yöntemi kullanılarak incelendi. Yapılan ölçümler istatistiksel olarak değerlendirildi. Ayrıca kornea ince yapısı elektron mikroskop düzeyinde resimlendirildi.

Bulgular: Histokimyasal olarak yapılan boyamalarda yaşa koşut olarak Descement membranı, stroma, epitel kalınlığı ve genel kornea kalınlığında artış saptandı. Artan yaşa koşut kornea stromasında açılma, kollagen liflerde dalgalı uzanım ayırt edildi. Retinada yapılan incelemelerde, 22 günlük gruptan itibaren sinir lif katmanının belirginleştiği dikkati çekti. 10 haftalık grupta bazı alanlarda yaygın intrasitoplazmik ödem izlendi. Yirmi iki aylık grupta ganglion hücrelerindeki basıklaşma ve sinir lif katmanının kalınlaşması belirgindi. İnce yapı düzeyinde kornea incelendiğinde kornea epitel, Descement membranı ve stromanın 10 haftalık erişkin yapısını kazandığı, 22 ay grubunda ise tüm katmanlarda dejeneratif değişikliklerin olduğu belirlendi. İstatistiksel değerlendirmelerde; yaşın ilerlemesine koşut Descement membranı, stroma, epitel kalınlığı ve kornea kalınlığında artış saptandı.

Sonuç: Özellikle kritik gelişim dönemlerinde hem histokimyasal hem de ince yapı düzeyinde yapılan incelemelerde gözle ilgili yapıların da gelişim gösterdiği ancak yaşlanmaya koşut bu yapılarda dejeneratif değişikliklerin gerçekleştiği belirlendi. En belirgin dejenerasyon korneada saptandı. (*Gazi Med J 2011; 22: 72-8*)

Anahtar Sözcükler: Göz, yaşlanma, histokimya, ultrastrüktür

Geliş Tarihi: 15.05.2011

Kabul Tarihi: 14.08.2011

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study is to evaluate structural changes in the cornea and retina of rats during the critical periods of development in parallel with aging from birth onwards through the histochemical methods and to make comparative examination at the ultrastructural level.

Methods: In our study the changes in the cornea and retina in parallel with aging were examined through PAS-ALSian blue staining method by taking the eyes of rats on the 1st and 22nd day, and in the 10th week and 22nd month. Measurements made were evaluated statistically. Also the ultrastructure of the cornea was illustrated at electron microscopy level.

Results: In the histochemical stainings, an increase was determined in the descement membrane, stroma, epithelial thickness and general cornea thickness in parallel with aging. An opening in the cornea stroma and fluctuant extention in the collagen fibres in parallel with aging were distinguished. In the examinations made in the retina,

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Doç. Dr. Gülnur Take Kaplanoğlu, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Dekanlık Binası 4. Kat, 06500 Beşevler, Ankara, Türkiye Tel: +90 312 202 46 14 E-posta: gtake@gazi.edu.tr - gulnurtake@gmail.com

©Telif Hakkı 2011 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine www.gazimedicaljournal.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2011 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at www.gazimedicaljournal.org

doi:10.5152/gmj.2011.15

evidence of nerve fibre layers as from the 22nd-day group was striking. An intracytoplasmic edema was observed in some areas in the 10-week group. In the 22-month group it was clear that ganglion cells became flat and nerve fibre layer thickened. When the cornea was examined at ultrastructural level, it was determined that the cornea epithelium, descemet membrane and stroma gained the structure of the 10-week adult, there were degenerative changes in all layers in the 22-month group. According the statistical analysis, increased thickness in Descemet membrane, stroma and epithelial layer were observed in the cornea.

Conclusion: In the examinations made at histochemical and ultrastructural level, especially during the critical development periods, it was determined that the structures related to the eye developed but there were degenerative changes in these structures in parallel with aging. The most distinct degeneration was determined in the cornea. (*Gazi Med J 2011; 22: 72-8*)

Key Words: Eye, aging, histochemistry, ultrastructure

Received: 15.05.2011

Accepted: 14.08.2011

GİRİŞ

Yaşlanmanın sonucu olarak vücudun tüm dokularında olduğu gibi gözde de belirgin değişiklikler olaylanır. Yaşlanma ile birlikte gözün tüm dokularında gelişen hasarların, bir grup yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olduğu yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (1, 2).

Kornea yaşla birlikte daha düz, ince ve daha az saydam olur, Descemet membranı kalınlaşır. Yaşlanmaya koşut bazal membranın duplikasyonu olaylanır. Bazal membranın ikiye ayrılması epiteliyal erozyonlar ile ilişkilidir (3). Endotel hücrelerinde de pleomorfizm gözlenir. Doğumda endotel hücre yoğunluğu yaklaşık 4000 hücre/mm²'yken, bu sayı yaşa koşut azalır (4).

Yaşlanma ile birlikte koriokapillaris, Bruch membranı ve retina pigment epitelinde gelişen hasarlar bir grup anatomik ve fonksiyonel değişikliklere yol açmaktadır. Yaşa koşut makula dejenerasyonunda, bu değişikliklerin makula bölgesinde yoğunlaştığı ve bunun da önemli ölçüde görme azlığına yol açtığı görülmektedir (1). Yaşlı kişilerde santral retinal arterdeki sklerotik değişiklikler, optik sinir içindeki santral retinal damarların çevresini saran fibröz doku ve santral retinal vendeki endotelial proliferasyon santral retinal ven lümenini daraltır. Bunlar dolaşımda trombozise neden olur (5-7).

Bu çalışmada, literatür bilgileri doğrultusunda, sıçanlarda doğumdan başlayarak yaşa koşut gelişimin kritik evrelerde retina ve korneada olaylanan yapısal değişikliklerin histokimyasal yöntemler ile değerlendirilmesi ve ince yapı düzeyinde karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Deneysel Hayvanları ve Gruplandırma

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan Wistar Albino cinsi 24 erkek sıçandan 4 grup oluşturuldu; 1. grup: 1 günlük (n=6), 2. grup: 22 günlük (n=6), 3. grup: 10 haftalık (n=6), 4. grup: 22 aylık (n=6).

2. Histokimyasal Yöntem

Tespit edilen dokular alışılagelmiş ışık mikroskop izleme yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan parafin bloklardan lamlara 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak alsian mavisi-Periodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemi uygulandı. Elde edilen camlar Lecia DCM 4000 bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Lecia Q Vin. 3 programında değerlendirilerek resimlendirildi.

3. Elektron Mikroskopik Yöntem

1mm³'lük parçalara bölünen doku örnekleri 0.1M fosfat tamponlu %2.5'lik gluteraldehitte (pH 7.4) tespit edildiler. Tespit süresi bitiminde dokular %1'lik osmiyum tetroksite etkin bırakılarak post fiksasyonları yapıldı. Süre bitiminde dereceli alkol serilerinden geçirilen dokuların dehidrate olmaları sağlandı. Son olarak propilen oksite etkin bırakılan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyali ile blok haline getirildiler. 56°C'lik etüvde 48 saat polimerize edilen bloklardan alınan kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EM 900 elektron mikroskopta değerlendirilerek resimlendirildiler.

4. İstatistiksel Yöntem

Çalışmamızda sıçan gözünde yaşla birlikte Descemet membranı, stroma, epitel kalınlığı ve kornea kalınlığını değerlendirebilmek ereğiyle her denekten, rastgele seçilen altı alanda ölçümler yapılarak Kruskal Wallis test yöntemi ile gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Sonucunun anlamlı bulunduğu durumlarda, farka neden olan grupları tespit etmek amacıyla çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. p<0.05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Histokimyasal Bulgular

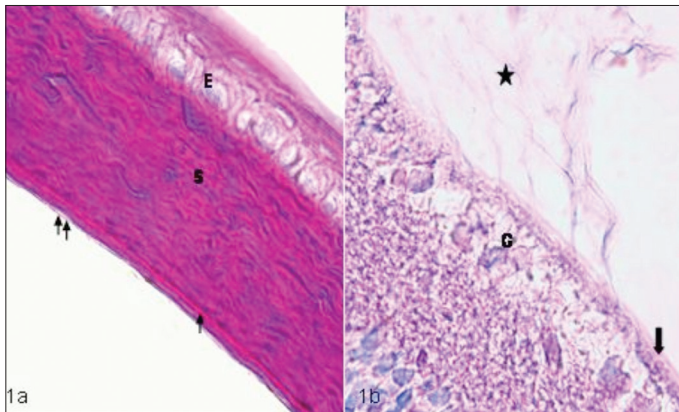
1 günlük grupta PAS - Alsian mavisi ile hazırlanmış preparatlarda kornea yapısı incelendiğinde epitelin oldukça ince olduğu belirlendi. Bazal katmanı oluşturan prizmatik hücreler belirgin olarak izlenirken, üst sıradaki hücrelerin henüz gelişimini tamamlamadığı ayırt edildi. Ara katmanın tam olarak oluşmadığı, prizmatik hücreleri izleyen katmanın doğrudan yassı hücrelerden oluştuğu ilgiyi çekti. Boyanma özellikleri değerlendirildiğinde, bazal hücrelerde tonofilamanların geliştiği, buna koşut olarak da PAS ile daha açık renk boyandığı gözlemlendi. Üst katman hücrelerinde ise tepkime daha kuvvetliydi. Bu bulgu üst katman hücrelerinin henüz tam olgunluğa ulaşmadığının göstergesi olarak değerlendirildi. Sitoplazmada şekilsiz temel madde içeriğinin yoğunluğuna bağlı olarak boyanmanın kuvvetli olduğu kanısına varıldı. Stroma incelendiğinde ise bu katmanın henüz oldukça ince olduğu belirlendi. Stromada enine yerleşim gösteren keratositler ve kollagen lifler belirgindi. PAS (+) reaksiyon oldukça yaygındı. Yer yer Alsian mavisi ile pozitif boyanan alanların gözlenmesi, bu bölgelerde sülfatlı proteoglikanların oluştuğunun bir göstergesi olarak kabul edildi. Kuvvetli PAS (+) ve ışık kırıcı olarak boyanan Descemet membran bu gruptan itibaren görülmeye başlandı. Descemet membranının altında endotel hücreleri izlendi (Resim 1a).

Aynı grupta retina ganglion hücreleri incelendiğinde, tek sıra halinde düzenlenmiş ganglion hücreleri yuvarlağımsı şekil ve çekirdekleriyle ayırt edildi. Hücre şekilleri ve çekirdek yerleşimleri birbirleriyle uyumluydu. Ancak ganglion hücrelerinin bazalinde seyir gösteren sinir liflerinin henüz tam düzenli demetler oluşturmadığı, yer yer ince iplikcikler şeklinde vitroz boşluğa doğru dağıldıkları ilgiyi çekti (Resim 1b).

Yirmi iki günlük grupta; kornea epitelini incelendiğinde, hücre katman sayısının ve buna bağlı olarak da epitel kalınlığının arttığı izlendi. Periyodik asit shift ile açık renk boyanan hücre katman sayısı bir önceki grupla karşılaştırıldığında artmıştı; bazal ve orta katman hücreleri, üst katman hücrelerine göre daha az boyanmış olarak izlendi. Bu bulgu orta tabakayı oluşturan hücrelerde de tonofilaman düzenleniminin başladığının göstergesiydi. Apikal hücre katmanının, şekilsiz temel madde zenginliğine koşut olarak halen PAS (+) boyandığı izlendi. Aynı grupta kornea stroması değerlendirildiğinde, 1 günlük grupla karşılaştırıldığında kalınlaştığı görüldü. Yirmi iki günlük grupta stromadaki en belirgin değişiklik, ekstrasellüler matriksteki sülfatlı proteoglikanların artmasıydı. Bu alanlar Alsian mavisi ile pozitif olarak boyanmıştı. Sülfatlı proteoglikan miktarının artması stromanın gelişmesinin bir göstergesi olarak kabul edildi. Descement membranını ve endotel katmanını belirgindi (Resim 2a).

Aynı grupta retina ganglion katmanını incelendiğinde, 1 günlük grupla benzer olarak hücre ve çekirdek şekillerinin birbirleriyle uyumlu olduğu gözlemlendi. Ancak bu grupta gelişmenin bir göstergesi olarak sinir lif tabakasının daha belirginleştiği dikkati çekiyordu (Resim 2b).

On haftalık grupta kornea epitel kalınlığının belirgin olarak arttığı ve en kalın bu grupta olduğu izlendi. Epitel hücrelerinin PAS ile reaksiyon düzeyleri değerlendirildiğinde bazaldan apikale kadar artan tonofilaman miktarına bağlı olarak zayıf reaksiyon gözlemlendi. Ancak yer yer yüzeysel hücre katmanında kuvvetli PAS pozitiflik ilgiyi çekiyordu. Bu bulgu yüzeysel hücrelerde tonofilaman oluşumunun halen sürdüğünün yapısal göstergesi olarak kabul edildi. Stroma oldukça kalındı. PAS (+) gözlenen birbirine koşut uzanan kollagen liflerin arasında Alsian mavisi ile (+) boyanmış alanlar gözlemlendi. Bir önceki grupla karşılaştırıldığında, Alsian mavisi (+) alanların azalması, stromanın bu grupta tamamen erişkin özellik kazandığının bir göstergesi olarak kabul edildi. Alsian mavisi (+) alanlar daha çok keratositlerin çevresinde izlenirken, bu bölgede yer yer minimal açılmalar ilgiyi çekti. Descement membranının diğer gruplara karşın belirgin olduğu, endotel katmanının gelişkinliği gözlemlendi (Resim 3a).



Resim 1 a, b. Bir günlük grup. (a); Kornea kesiti. (E): Epitel, (S): Stroma, (↑): Descement Membrani, (↑↑): Endotel. (b); Retina ganglion hücre katmanı. (G): Ganglion hücreleri, (★): Henüz organize olmamış sinir lifleri, (⬆): Organize sinir lif demeti (PAS-Alsian Mavisi x 400)

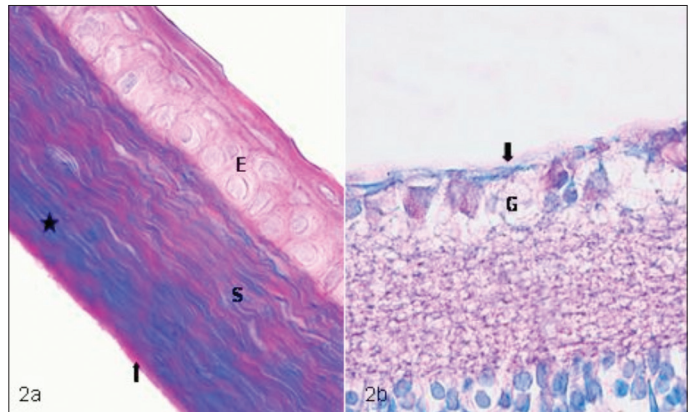
Aynı grupta retina ganglion hücre katmanını incelendiğinde, bir önceki grupla benzer olarak çekirdek ve hücre şeklinin birbirleriyle uyumlu olduğu, bazı alanlarda yaygın intrasitoplazmik ödem varlığı ilgiyi çekiyordu. Çekirdeğin, ödem nedeniyle kenara itildiği saptandı. Sinir lif tabakası normaldi (Resim 3b).

Yirmi iki aylık grupta, kornea genel görünümüyle 10 haftalık gruba benzerdi. Ancak yer yer artmış dejeneratif değişiklikler ilgiyi çekti. Özellikle bazal katmandaki epitel hücrelerinde çekirdek çevresinde açılmalar ilgiyi çekerken, stromada da yer yer açılmalar gözleniyordu. Stromada diğer gruplardan ayrıcalığı olarak kollagen liflerin daha fazla ondülasyon oluşturduğu ilgiyi çekti. Descement membranını diğer gruplarla karşılaştırıldığında oldukça belirgindi. Kuvvetli PAS (+) boyanmıştı. Endotel katmanının yer yer Descement membranından ayrıldığı ve sitoplazmada vakuoller içerdiği gözlemlendi (Resim 4a).

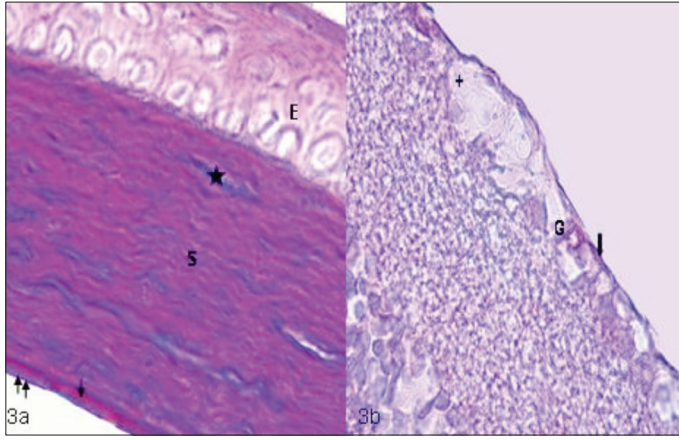
Yirmi iki aylık grupta ganglion hücrelerindeki en belirgin değişiklik, hücrelerin basıklaşmasıydı. Sinir hücre katmanının belirgin olarak kalınlaştığı ayırt ediliyordu (Resim 4b).

Elektron Mikroskop Bulgular

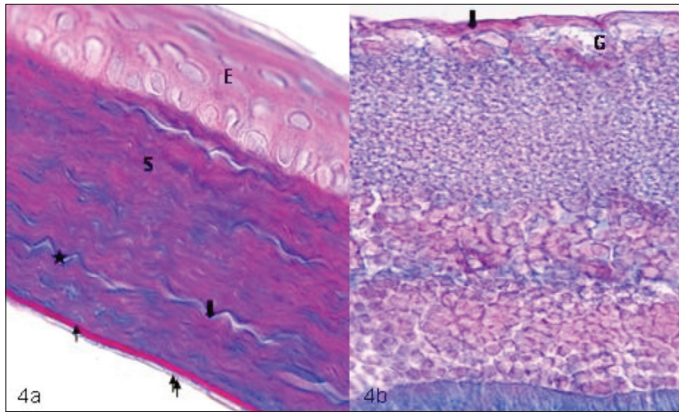
Bir günlük grupta, ince yapı düzeyinde kornea yapısı incelendiğinde, epitelin ince olduğu, 2-3 sıra halinde düzenlendiği belirlendi. Bazal hücrelerin yan yüzlerinde, bağlantı birimlerinde aralık ayırt edildi. Bazal hücre sitoplazmasının oldukça yoğun boyandığı dikkati çekti. Çekirdekler çoğunlukla çentikli ve lobüler yapıdaydı. Çekirdek heterokromatini genellikle çekirdek zarının altında yoğun, orta bölümlerin ökromatik olduğu gözlemlendi. Bazal hücrelerde en belirgin organelin serbest ribozomlar olduğu dikkati çekiyordu. Mitokondriyonlar çoğunlukla yuvarlak şekilli ve sık kristalidydi. Bu nedenle yoğun boyanmışlardı. Üst sıra hücreler açık renkli izleniyordu, oldukça yassıydı ve çekirdek şekli de buna uyumluydu. Yüzeysel hücreler ile alt katman hücreleri arasında bağlantı birimleri gözlemlendi ancak bağlantı birimleri arasında yer yer geniş aralıklar saptandı. Yüzeysel hücrelerin sitoplazmaları organelden fakirdi. Yuvarlak mitokondriyonlar, birkaç granüllü endoplazmik retikulum tubulusu ve serbest ribozomlar dikkati çekiyordu. Çekirdek diğer hücrelere karşın ökromatiktir (Resim 5a). Stromal doku incelendiğinde; kollagen liflerin değişik yönlerde seyir gösterdiği ayırt ediliyordu. Arada keratositler, oval ve yuvarlak şekilleriyle belirgindi. Keratositlerde sitoplazmanın son derece gelişkin olduğu, ortalama tümünün salgılama evresinde olduğu ayırt edildi. GER tubulusları gelişkin ve az yoğun salgı materyali dolu olarak gözleniyordu. Mitokondriyonlar gelişkindi, Golgi bölgeleri oldukça yaygındı. Yer yer sitoplazmada primer lizozomlar



Resim 2 a, b. Yirmi iki günlük grup. (a); Kornea kesiti. (E): Epitel, (S): Stroma, (↑): Descement Membrani, (★): Alsian Mavisi ile boyanan ekstrasellüler matriks. (b); Retina ganglion hücre katmanı. (G): Ganglion hücreleri, (⬆): Demetler oluşturmuş sinir lifleri (PAS-Alsian Mavisi x 400)



Resim 3 a, b. On haftalık grup. (a); Kornea kesiti. (E): Epitel, (S): Stroma, (↑): Descemet Membrani, (↑↑): Endotel, (★): Alsian Mavisi ile boyanan ekstrasellüler matris. (b); Retina ganglion hücre katmanı. (G): Ganglion hücre katmanı, (↑): Demetler oluşturmuş sinir lifleri, (+): Ganglion hücrelerinde intrasitoplazmik ödem. (PAS-Alsian Mavisi x 400)

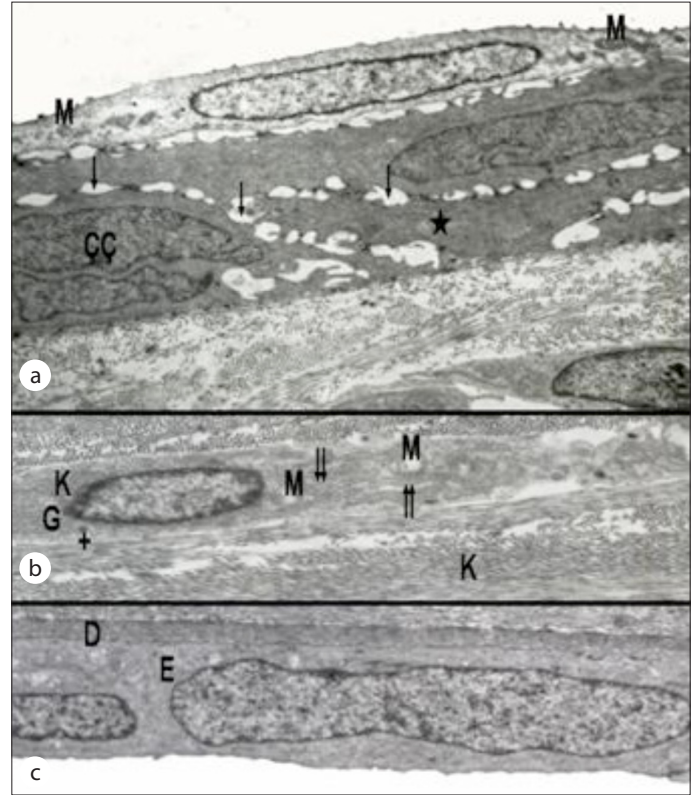


Resim 4 a, b. Yirmi iki aylık grup. (a); Kornea kesiti. (E): Epitel, (S): Stroma, (↑): Descemet Membrani, (↑↑): Endotel, (★): Alsian Mavisi ile boyanan ekstrasellüler matris. (↑): Dalgalı seyreden kollagen lifler. (b); Retina gangliyon hücre katmanı. (G): Basıklaşmış ve ışık mikroskopik yapısı bozulmuş gangliyon hücreleri. (↑): Kalın sinir lif tabakası (PAS-Alsian Mavisi x 400)

dikkati çekiyordu (Resim 5b). Descemet membran az gelişmişti ve endotel izlendi (Resim 5c).

Yirmi iki günlük grupta, epitel katmanın gelişimini sürdürdüğü, orta hücre katmanının oluşmaya başladığı ilgiyi çekiyordu. Bazal epitel hücrelerinin oldukça gelişkin olduğu, çekirdek ve sitoplazma yapılarının farklılığı ve buna koşut bağlantı birimi bölgelerinde hücreler arası açıklığın ortadan kalktığı, bağlantı birimlerinin daha belirgin olduğu ilgiyi çekiyordu (Resim 6a). Stroma ve epitelin bağlantı bölgelerinde hemidesmozomların gelişkin olduğu dikkati çekti (Resim 6b). Stroma kollagen liflerinin daha düzenli ve yoğun olduğu belirgindi. Keratositler aktif yapılarıyla dikkati çekiyordu (Resim 6c). Descemet membran 1 günlük gruba karşı kalındı. Endotel hücreleri gelişkindi (Resim 6d).

On haftalık grupta, epitel tümüyle erişkin yapısına kavuşmuştu. Hücreler arası aralık bazalde darken, apikalde daha genişti (Resim 7a). Bağlantı bölgelerinde hemidesmozomlar yaygındı (Resim 7b). Stroma kollageninin erişkin yapıya ulaştığı ve genelde birbirine koşut olduğu dikkati çekti. Keratositler çoğunlukla inaktif durumdaydı (Resim 7c). Descemet membranı diğer iki gruba karşı gelişkindi. Endotel hücreleri yapılarını korumuştur (Resim 7d).



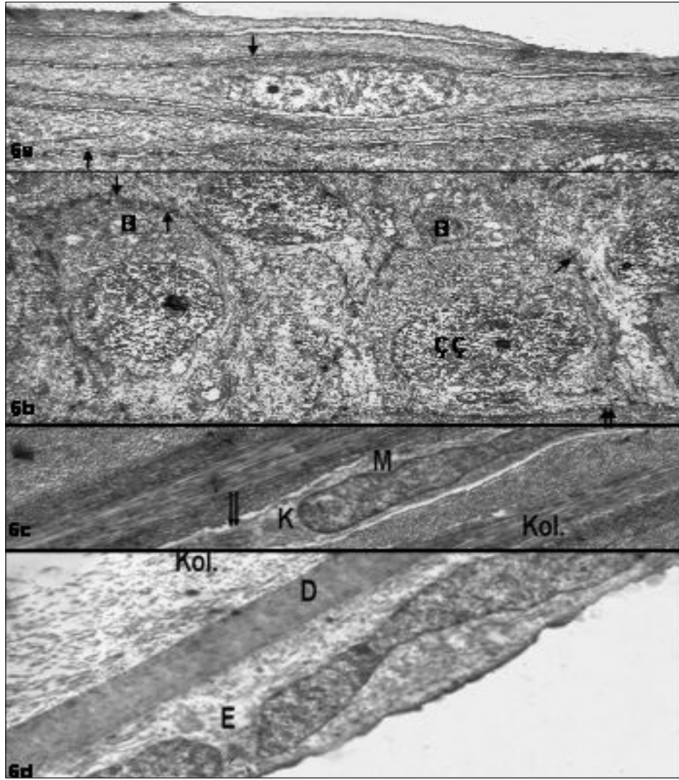
Resim 5 a, b, c. Bir günlük grupta kornea elektron mikroskopik inceleme. (↑): Ayrık yan yüz bağlantı birimleri, (↑↑): Gelişkin GER tubulusları, (★): Elektron yoğun sitoplazma, (M): Mitokondriyon, (ÇÇ): Bazal hücrelerin çentikli çekirdeği, (K): Keratosit, (G): Golgi bölgesi, (+): Primer lizozom, (D): Descemet membranı, (E): Endotel (Uranyl asetat-Kurşun sitrat x a:4400, b: 7000, c: 4400)

Yirmi iki ay grubunda kornea epitel hücrelerinde, açık ve koyu hücrelerin varlığı dikkati çekerken, hücreler arası aralığın oldukça genişlediği, yer yer açılmalar olduğu ilgiyi çekiyordu. Hücre sitoplazmasında tonofilamanların yaygın demetler oluşturduğu gözlemlendi. Sitoplazmanın çok sayıda irili ufaklı vakuollerin biçimlendiği ayırd edildi. Hücre organelleri biriken tonofilamanlar nedeniyle çekirdek çevresinde izleniyordu (Resim 8a). Epitelin stroma bileşkesinde, tonofilaman yapısının daha gevşek olduğu gözlemlendi (Resim 8b). Stromada kollagen lifler yoğunlaşmıştı, keratositler inaktifti. Keratositlerde yer yer bozulmalar, çekirdek yoğunlaşması ilgiyi çekiyordu (Resim 8c, küçük resim). Descemet membranı son derece kalınlaşmıştı. Endotel hücrelerinin diğer gruplara karşı daha yoğun sitoplazmalı olduğu dikkati çekiyordu (Resim 8d).

İstatistiksel Bulgular

Gruplar arasında descemet membranı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. ($p<0.001$). 1. gün ile 22. gün arasında anlamlı fark yok iken ($p=0.407$), 1. güne göre 10. hafta ve 22. ay gruplarında descemet membran kalınlığı istatistiksel anlamlı olarak daha fazla idi ($p<0.001$ ve $p<0.001$) (Şekil 1).

Gruplar arasında epitel kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$). 1.güne göre sırasıyla; 22. gün, 10. hafta ve 22. ay gruplarında epitel kalınlığı istatistiksel anlamlı olarak daha fazla idi ($p<0.001$, $p<0.001$ ve $p<0.001$). Ayrıca, 22. güne ve 22. ay gruplarına göre 10. haftadaki epitel kalınlığı istatistiksel anlamlı olarak daha fazla iken ($p<0.001$ ve $p<0.001$), 22. gün ile 22. ay grupları arasında epitel kalınlığı istatistiksel olarak benzer idi ($p=0.407$) (Şekil 2).



Resim 6 a, b, c, d. Yirmi iki günlük kornea elektron mikroskop resmi (B): Bazal hücre, (ÇÇ): Bazal hücrelerin çentikli çekirdeği, (↑): Yan yüz bağlantı birimleri, (↑↑): Hemidesmozomlar, (K): Keratosit, (Kol): Kollagen lif, (↑↑): Aktif GER tubulusları, (M): Mitokondriyon, (D): Desceмент membranı, (E): Endotel. (Uranil asetat-Kurşun sitrat x a-b: 3000, c: 7000, d: 4400)

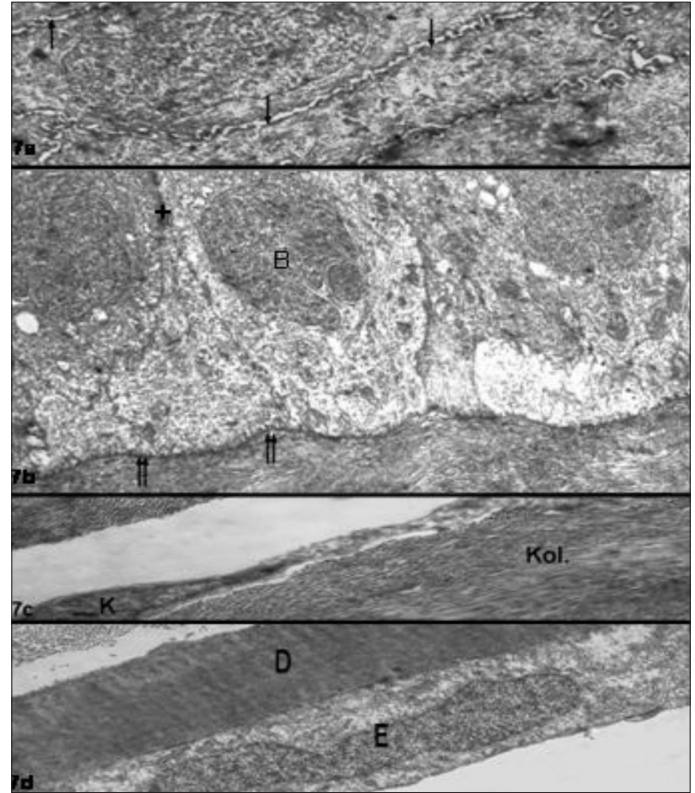
Gruplar arasında stroma yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). 1. güne göre sırasıyla; 22. gün, 10. hafta ve 22. ay gruplarında stroma istatistiksel anlamlı olarak daha kalın idi ($p < 0.001$, $p < 0.001$ ve $p < 0.001$) (Şekil 3).

Gruplar arasında kornea kalınlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). 1. güne göre sırasıyla; 22. gün, 10. hafta ve 22. ay gruplarında kornea kalınlığı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek idi ($p < 0.001$, $p < 0.001$ ve $p < 0.001$). 10. hafta ile 22. ay grupları arasında kornea kalınlığı istatistiksel olarak benzer idi ($p = 0.173$) (Şekil 4).

TARTIŞMA

Yapılan birçok çalışmada; yaşlanmaya koşut oküler dokularda anatomik ve fizyolojik değişiklikler araştırılmıştır. Çalışmaların sonucunda, korneanın yaşla birlikte daha düz, ince ve az saydam olduğu, endotel hücre sayısının azaldığı, endotel hücrelerinde polimegatizm ve pleomorfizmin arttığı belirlenmiştir. Desceмент membranının kalınlaştığı gözlenmiştir (1). Yaşla bağlantılı olarak ganglion hücre katmanındaki hücre yoğunluğunun ve fotoreseptör hücre sayısının azaldığı bildirilmiştir (6, 7).

1988 yılında Meyer ve arkadaşlarının (8) sıçan gözünde yaptıkları çalışmada, yaşlanmaya koşut korneadaki endotel hücre yapısındaki değişiklikler incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, çoğu memelilerde olduğu gibi endotel hücre yoğunluğunun ve sayısının artan yaşla azaldığı, 34 haftadan sonra endotel hücrelerinin biçim ve boyutlarındaki değişikliklerinin arttığı gözlenmiştir. Çalışmanın ilk 8 haftasında



Resim 7 a, b, c, d. On haftalık grup korneaya ait elektron mikroskop resmi. (↑): Hücreler arası aralık, (↑↑): Hemidesmozomlar, (B): Bazal hücre, (+): Tamamen bazal hücrelerle kapalı hücreler arası mesafe, (K): Keratosit, (Kol): Kollagen lifler, (D): Gelişkin Desceмент membranı, (E): Endotel (Uranil asetat-Kurşun sitrat x a-b: 3000, c: 7000, d: 4400)

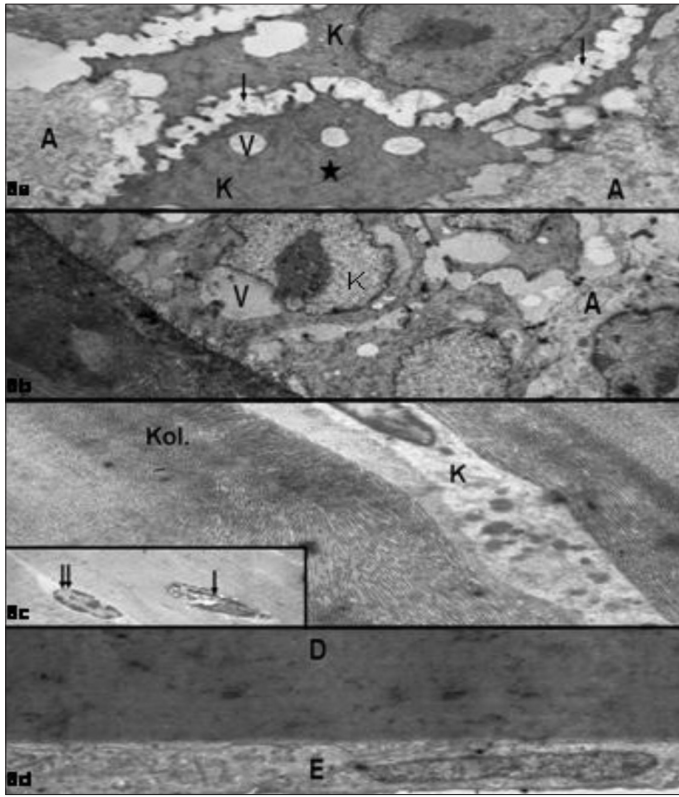
artan yaşla hücre yoğunluk azalmasının daha hızlı olduğu bildirilmiştir. Sıçan kornea endotelinin gösterdiği değişikliklerin insan korneasına benzer olduğu gözlemlenmiştir.

Jun ve arkadaşları (4) tarafından yapılan bir çalışmada; yaşa bağlı olarak kornea endotel hücre sayısındaki değişimleri saptamak amacıyla 102 hasta 6 yaş grubunda incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, normal kişilerde kornea endotel hücre sayısı azalması yaşa koşut belirginleşmiş, 50 yaş üzerinde pleomorfizmde anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmadan farklı olarak Wilson ve arkadaşlarının (9) 275 normal insan gözünde yaptıkları bir çalışmanın sonucunda 50 yaşına değin endotel hücre sayısında azalmanın olduğunu, 50 yaşından sonra ise anlamlı düşüş olmadığı vurgulanmıştır.

Wilson ve Közer'den farklı olarak Bourne ve arkadaşları (10) yaptıkları çalışmada, normal insan kornea endotelindeki uzun süreli morfolometrik değişiklikler araştırılmışlar ve 5-15 yaşları arasındaki örneklerin hücre yoğunluklarında artan yaşla hızla azalma olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar 18 yaşından sonra hücre kaybı oranında bir değişiklik belirlenemediğini saptamışlardır.

Faragher ve arkadaşlarının (11) yaptığı bir diğer çalışmada, kornea endotelinde yaşa bağlantılı olarak ortaya çıkan değişiklikler klinik ve deneysel olarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda; 20 ve 80 yaşları arasında yıllık hücre yoğunluk azalmasının yaklaşık %6 olduğu ve beraberinde polimegatizm ve pleomorfizmde artış olduğu saptanmıştır. Desceмент membranının kalınlaştığı gözlenmiştir. Yaşlanma sırasında endotel hücre kaybı olmasının; hormonal değişiklikler, ultraviyole ışınları ve kimyasal toksite gibi çevresel etkilerle olabileceği düşünülmüştür.

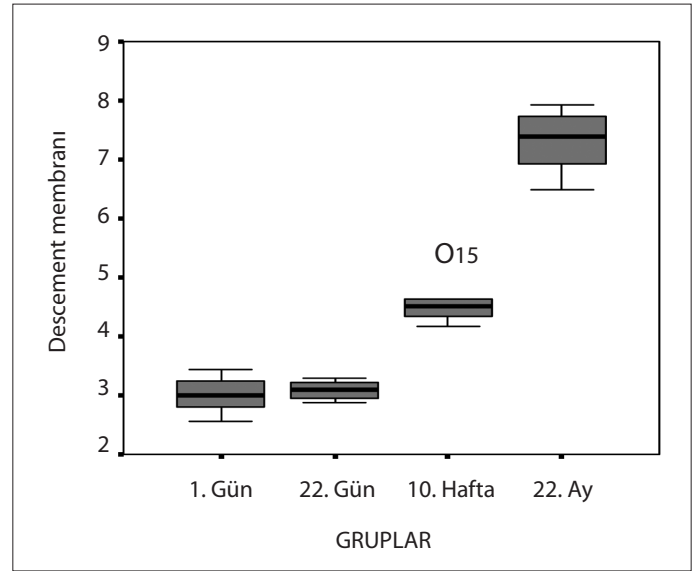


Resim 8 a, b, c, d. Yirmi iki aylık grupta kornea elektron mikroskop resmi. (A): Açık renk sitoplazmalı hücreler, (K): Koyu renk sitoplazmalı hücreler, (↑): Hücreler arası aralık, (V): Hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda vakuol, (★): Hücre sitoplazmalarındaki tonofilamanlar, (Kol): Kollagen lif demetleri, (K): Keratosit, (↑): Dejenere keratosit, (↑↑): Çekirdek yoğunlaşması gösteren keratosit, (D): Göreceli olarak kalın Descemet membranı, (E): Endotel. (Uranil asetat–Kurşun sitrat x a,b:3000, c: 7000, d: 4400)

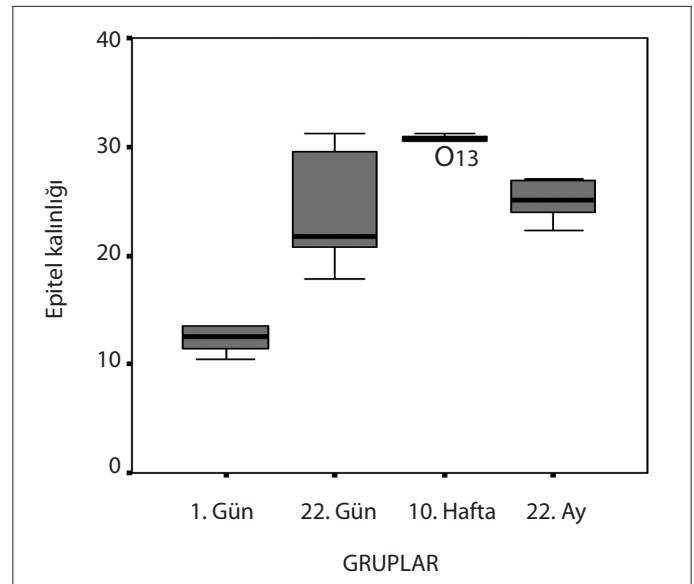
Bizim çalışmamızda da 1 günlük gruptan itibaren endotel hücrelerinin izlenmesine karşın, 22 günlük ve 10 haftalık grupta endotel katmanının kalınlığının belirgin derecede arttığı saptandı. 22 aylık grupta ise endotel katmanının yer yer Descemet membranından ayrıldığı ve hücrelerin sitoplazmalarında belirgin vakuoller içerdiği gözlemlendi. Yine gruplar arasında yapılan karşılaştırmaya göre 22 aylık grupta endotel hücrelerinin sitoplazmalarının diğer gruplara göre daha yoğun olduğu dikkati çekti.

Murphy ve arkadaşları (12) tarafından insan Descemet membranında yapılan çalışmada Descemet membranının kalınlaşma ve farklılaşması ışık ve elektron mikroskop düzeyinde gebeliğin 12. haftasından 98 yaşa değin incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda; Descemet membranındaki yaşla bağlantılı kalınlaşmanın bu membranın kornea endotelince sürekli senteziyle bağlantılı olduğu düşünülmüştür.

Bizim çalışmamızda Murphy ve arkadaşlarının çalışmasından ayrıcalıklı olarak sıçan gözleri kullanılarak deneysel bir çalışma planlanmıştır. Yaşa koşut Descemet membran kalınlığında yeni doğandan başlayarak artış olduğu bulunmuştur. 22 aylık grupta ise son derece kalınlaşmış olarak izlenen Descemet membranının yapısının bozulduğunu gösteren görünüm dikkat çekiciydi. Descemet membran kalınlığının yaşa koşut gerçekleşen artışı, istatistiksel olarak yapılan değerlendirmede de ($p < 0.001$) anlamlı olarak saptandı. Bulgularımızda 1 günlük grupta Descemet membranının son derece ince olması Descemet membran oluşumunun fetal dönemin sonlarında başladığının göstergesi olarak kabul edildi. Bu bulgu Murphy ve ar-



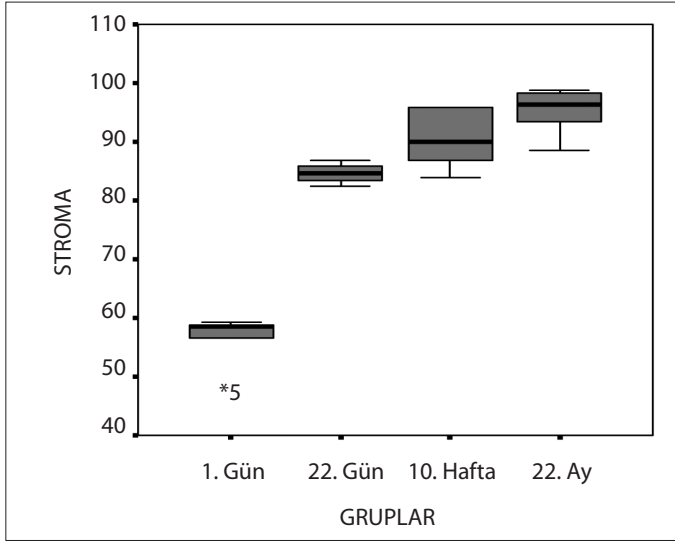
Şekil 1. Sıçanlarda yaş gruplarına göre Descemet membranına ait ortalama değerler



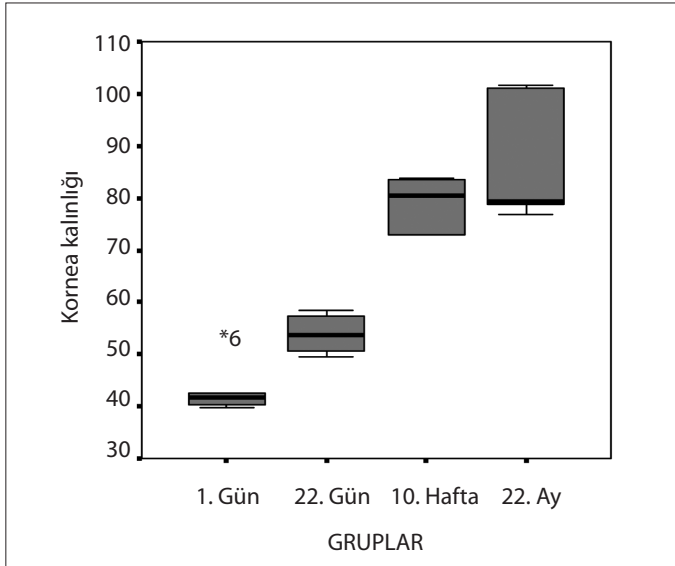
Şekil 2. Sıçanlarda yaş gruplarına göre epitel kalınlığına ait ortalama değerler

kadaşlarının bulgularıyla karşılaştırıldığında insan ve sıçan gözünde Descemet membranının farklı fetal dönemlerde oluştuğunun göstergesi olarak değerlendirildi.

Kiyosawa'nın (13) yaptığı çalışmada, sıçanlarda yaşlanmaya bağlı görülebilen değişiklikler araştırılmıştır. Yapılan histopatolojik çalışmanın sonucunda, retina'nın kalınlığının yaşla birlikte azaldığı gözlemlenmiştir. İncelmenin 1-9 hafta arasındaki sıçanlarda fazla olduğu, ilerleyen haftalarda incelmenin azaldığı saptanmıştır. 80. haftadan sonra ise incelmenin yeniden arttığı gözlemlenmiştir. 13-80 haftalık Wistar albino sıçanlarda azalmanın en fazla rod ve koni katmanlarında olduğu belirlenmiştir. Ganglion hücre katmanı, iç nükleer tabaka ve dış nükleer katmandaki çekirdek sayılarının incelen katmanlarla birlikte azalma gösterdiği saptanmıştır. 106 haftalık Wistar albino sıçanlarda ise korneada infiltrasyon, retinal arter ve venlerde daralma saptanmıştır.



Şekil 3. Sıçanlarda yaş gruplarına göre stromaya ait ortalama değerler



Şekil 4. Sıçanlarda yaş gruplarına göre kornea kalınlığına ait ortalama değerler

Bizim çalışmamızda da Kiyosawa'nın araştırmasına koşut olarak yaşa bağlı gözün çeşitli bölgelerinde yapısal değişiklikler incelenmiştir. Araştırmacının bulgularından ayrıcalıklı olarak retina gangliyon hücre katmanı hücre özellikleri yönünden 10 haftalık gruptan başlayarak dejeneratif değişiklikler göstermiştir; bazı alanlarda yaygın intrasitoplazmik ödem varlığı ilgiyi çekerken, 22 aylık grupta ise gangliyon hücrelerindeki en belirgin değişiklik, hücrelerin basıklaşması olarak saptanmıştır.

Harwerth ve arkadaşlarının (14) 2007 yılında yaptıkları çalışmada, yaşlanmaya koşut sinir lif katmanı kalınlığı incelenmiştir. Yapılan çalışmada, artan yaşla birlikte retina sinir fibril katının incelendiği ve akson yoğunluk kaybının olduğu saptanmıştır.

2003 yılında Alamouti ve Funk'ın (15) yaptığı çalışmada, retina kalınlığının yaşa koşut azalması incelenmiştir. Çalışmanın sonucun-

da, retina ve sinir lif katı kalınlığının artan yaşla birlikte, birbirleriyle uyumlu oranda azaldığı belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda ise ışık mikroskopik düzeyde sinir lif tabakasında yapılan incelemelerde, 1 günlük grupta sinir liflerinin henüz tam düzenli demetler oluşturmadığı, yer yer ince iplikcikler şeklinde vitröz boşluğa doğru dağıldıkları görüldü. 22 günlük grupta sinir lif tabakasının daha belirginleştiği dikkati çekti. Bu bulgu erken dönem gelişimin göstergesi olarak kabul edildi. 10 haftalık grupta sinir lif tabakası normal olarak belirlenmekle birlikte, 22 aylık grupta gangliyon hücre tabakasında dejeneratif değişiklikler ile birlikte, sinir lif katmanında kalınlaşma saptandı.

SONUÇ

Özellikle kritik gelişim dönemlerinde hem histokimyasal hem de ince yapı düzeyinde yapılan incelemelerde gözle ilgili yapıların da gelişim gösterdiği ancak yaşlanmaya koşut bu yapılarda dejeneratif değişikliklerin gerçekleştiği belirlendi. En belirgin dejenerasyon korneada gözlemlendi.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Pelit A, Aydın P. Oküler yaşlanma. Turkish Journal of Geriatrics 2001; 4: 28-32.
2. Van Haeringen NJ. Aging and the lacrimal system. Br J Ophthalmol 1997; 81: 824-6. [CrossRef]
3. Jun AS, Chakravarti S, Edelhauser HF, Kimos M. Aging changes of mouse corneal endothelium and Descemet's membrane. Exp Eye Res. 2006; 83: 890-6. [CrossRef]
4. American Academy of Ophthalmology. Basic and clinical science course External disease and cornea. 1999-2000; Section 8, s 337-335.
5. Harman A, Abrahams B, Moore S, Hoskins R. Neuronal density in the human retinal ganglion cell layer from 16-77 years. 2000; 260: 124-31.
6. Bonnel S, Mohand S, Sahel JA. The aging of the retina. 2003; 8: 825-31.
7. Lai YL, Jacoby RO, Jonas AM. Age related and light associated retinal changes in Fischer rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 1978; 17: 634-8.
8. Meyer LA, Ubels JL, Edelhauser HF. Corneal endothelial morphology in the rat. Effects of aging, diabetes, and topical adolose reductase inhibitor treatment. Invest Ophthalmol Vis Sci 1988; 29: 940-8.
9. Wilson RS, Roper-Hall MJ. Effect of age on the endothelial cell count in the normal eye. Br J Ophthalmol 1982; 66: 513-5. [CrossRef]
10. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten year period. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38: 779-82.
11. Faragher RGA, Mulholland B, Tuft SJ, Sandeman S, Khaw PT. Aging and the cornea. Br J Ophthalmol 1997; 81: 814-7. [CrossRef]
12. Murph C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and Postnatal growth of the human Descemet's membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 1984; 25: 1402-15.
13. Kiyosawa I. Age-related changes in visual function and visual organs of rats. Exp Anim 1996; 45: 103-14. [CrossRef]
14. Harwerth RS, Wheat JL. Modeling the effects of aging on retinal ganglion cell density and nerve fiber layer thickness. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2008; 246: 305-14. [CrossRef]
15. Alamouti B, Funk J. Retinal thickness decreases with age: an OCT study. Br J Ophthalmol 2003; 87: 899-901. [CrossRef]