



İntrakameral Uygulanan İlaç ve Boyaların Kornea Endotel Hücre Apoptozisi Üzerindeki Etkilerinin Sıçan Modelinde *In Vivo* ve *In Vitro* Analizi

Effects of Intracameral Drugs and Dyes on Corneal Endothelial Cell Apoptosis in a Rat Model: An *In Vivo* and *In Vitro* Analysis

Sezin Akça Bayar*, Zeynep Kayaarası Öztürker**, Yonca Aydın Akova***, Banu Bilezikçi****, Gülten Karabay*****

*Başkent Üniversitesi, Ankara Hastanesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Başkent Üniversitesi, İstanbul Hastanesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

***Bayındır Kavaklıdere Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye

****Başkent Üniversitesi, Ankara Hastanesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

*****Başkent Üniversitesi, Ankara Hastanesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: İntrakameral uygulanan ilaç ve boyaların sıçan kornea endotelial apoptozisi ve hücre morfolojisi üzerine etkilerini değerlendirmek.

Gereç ve Yöntem: Toplam 72 sıçanın sağ gözüne %1 lidokain, %0,01 adrenalin, triamsinolon asetonid (TA) 4 mg/mL, %1 tripan mavisi (TM), %0,5 indosiyenin yeşili (İSY) ve kontrol olarak fortifiye dengeli tuz solüsyonu intrakameral olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan sonraki 1. gün ve 1. hafta kornea örnekleri alındı. Kornea endotel apoptozu TUNEL tekniği ile değerlendirildi ve her gruptaki apoptotik hücre oranı kontrol ile karşılaştırıldı. Kornea endotel hücre morfolojisi tüm gözlerde transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirildi.

Bulgular: İntrakameral adrenalin ile enjeksiyondan sonraki 1. gün ve 1. haftada ortalama apoptotik endotel hücre oranı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edilmiştir (sırasıyla, $p=0,03$ ve $0,021$). TM enjeksiyondan sonraki 1. haftada kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek apoptotik hücre oranına neden olmuştur ($p=0,043$). Lidokain verilen gözlerde, TA ve İSY ile karşılaştırıldığında 1. haftada daha yüksek apoptotik hücre oranı tespit edilmiştir, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,058$, $0,09$, $0,69$). Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan analizlerde tüm örneklerde apoptozis ile ilişkili morfolojik değişiklikler gözlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma, intrakameral adrenalin, TM ve lidokain enjeksiyonlarının kornea endotelinde histopatolojik değişikliklere neden olan toksisiteye sahip olduklarını göstermiştir. Göz içi cerrahisi uygularken bu ajanların kullanımında dikkatli olmak gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: İntrakameral enjeksiyon, kornea endotel, apoptozis, TUNEL tekniği, morfoloji

Abstract

Objectives: To evaluate the effects of intracameral drugs and dyes on rat corneal endothelial apoptosis and cell morphology.

Materials and Methods: The right eyes of 72 rats were injected intracamerally with 1% lidocaine, 0.01% adrenaline, triamcinolone acetate (TA) 4 mg/mL, 1% trypan blue (TB), 0.5% indocyanine green (ICG), and fortified balanced salt solution as control. Corneal samples were taken 1 day and 1 week post-injection. Corneal endothelial apoptosis was assessed by the TUNEL technique, and the ratio of apoptotic cells in each group was compared with the control. Corneal endothelial cell morphology was evaluated in each specimen by transmission electron microscopy.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Zeynep Kayaarası Öztürker, Başkent Üniversitesi, İstanbul Hastanesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

E-posta: zeynepkayaa@yahoo.com ORCID-ID: orcid.org/0000-0002-5513-9857

Geliş Tarihi/Received: 14.06.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 05.01.2022

Cite this article as: Akça Bayar S, Kayaarası Öztürker Z, Aydın Akova Y, Bilezikçi B, Karabay G. Effects of Intracameral Drugs and Dyes on Corneal Endothelial Cell Apoptosis in a Rat Model: An *In Vivo* and *In Vitro* Analysis. Turk J Ophthalmol 2022;52:379-385

Results: The mean apoptotic endothelial cell ratio was significantly higher at 1 day and 1 week after intracameral adrenaline injection when compared to controls ($p=0.03$ and 0.021 , respectively). TB caused a significantly higher apoptotic cell ratio when compared to controls at 1 week after injection ($p=0.043$). Lidocaine caused a higher apoptotic cell ratio compared to TA and ICG at 1 week, although not statistically significant ($p=0.058$, 0.09 , 0.69 , respectively). In all experimental specimens, transmission electron microscopy showed morphological changes associated with apoptosis.

Conclusion: This study showed that intracameral adrenaline, TB, and lidocaine injections may have toxic effects on corneal tissue, as indicated by ultrastructural and histopathological alterations. Therefore, these agents should be used with caution in intraocular surgery.

Keywords: Intracameral injection, corneal endothelium, apoptosis, TUNEL assay, morphology

Giriş

Oftalmolojide sıklıkla kullanılan intrakameral ilaçlar oküler anestezi, pupil dilatasyonu, güvenli kapsülörektis ve intraoküler enflamasyonun kontrolü için yararlı araçlardır. Bununla birlikte, bu ajanların kornea endotel üzerindeki etkileri ve toksisitesi hala araştırılmaktadır.

Apoptozis anatomik yapılara zarar vermeden veya fizyolojik fonksiyonları bozmadan ortaya çıkan bir hücre ölümü şeklidir.^{1,2} Endotel ve epitel hücrelerinin indüksiyonu ile kornea dokusunun modülasyonunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir.^{3,4} Apoptozisin bir özelliği, terminal deoksiniukleotidil transferaz aracılı dUTP çentik-uç etiketleme (TUNEL) ile ölen hücrelerde parçalanmış DNA'nın saptanabilmesidir. Daha önce yapılan çalışmalarda intrakameral ajanların indüklediği endotelial hücre apoptozunu saptamak için çeşitli teknikler kullanılmıştır. Ancak, TUNEL tekniğinden sadece birkaç raporda yararlanılmıştır.^{5,6,7} TUNEL testinin kornea endotelinde apoptotik hücreleri diğer tekniklere göre daha iyi belirlediği ve ölçülmesine olanak sağladığı gösterilmiştir.^{8,9}

Intrakameral ajanlarla ilgili önceki veriler çoğunlukla izole *in vivo* veya *in vivo* çalışmalarda elde edilmiştir. Bu çalışmada intraoküler cerrahilerde sıklıkla kullanılan intrakameral ajanlar tek bir çalışmada ultra yapısal analiz kullanılarak değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Bu ilaç ve boyaların kornea endotel hücre bütünlüğü üzerine etkilerini TUNEL tekniği ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile sıçan modelinde göstermeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Bu hayvan çalışması, Görme ve Oftalmoloji Araştırma Derneği'nin Oftalmoloji ve Görme Araştırmalarında Hayvanların Kullanımı Tebliği'ne uygun olarak gerçekleştirilmiş ve çalışma protokolü Başkent Üniversitesi Hastanesi Yerel Hayvan Bakım ve Kullanımı Etik Kurulu, Ankara, Türkiye tarafından onaylanmıştır (proje no: DA 27 04/02).

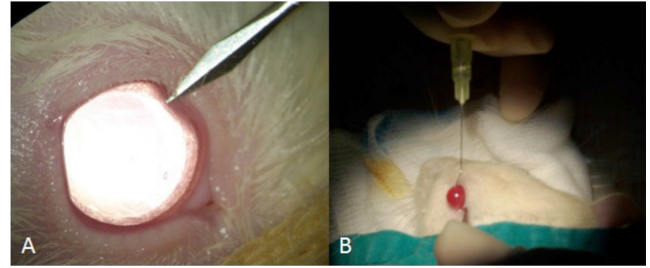
Çalışma, yaşları 6 ila 9 ay arasında değişen ve 301 ila 457 g (ortalama: $357 \pm 23,6$ g) ağırlığında toplam 72 erkek Wistar albino sıçan ile gerçekleştirildi. Kullanılan intrakameral ajanlar 0,05 mL %1 prezervansız lidokain, %0,01 prezervanlı adrenalin, 4 mg/mL triamsinolon asetonid (TA), %1 tripan mavisi (TM), %0,5 indosiyenin yeşili (İSY) [25 mg İSY/0,5 mL su bazlı çözütücü ve 4,5 mL dengeli tuz çözeltisinde (DTÇ)] ve sadece DTÇ idi. Sıçanlar randomize şekilde grup 1 (adrenalin), grup 2 (lidokain), grup 3 (TA), grup 4 (İSY), grup 5 (TM) ve kontrol grubuna (DTÇ) ayrıldı. İşlem öncesi sıçanlara intramüsküler 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Alfamin, Ege-Vet, Türkiye) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer, Almanya) enjeksiyonu

yapıldı. Her sıçanın sağ gözündeki, üst temporal kadranda uzun bir korneal tünelden MVR bıçağı ile ön kamaraya girildi ve 30 gauge kanül kullanılarak 0,05 mL aköz hümör alındı (Şekil 1A,B). Aynı hacimde bir ajan intrakameral olarak ayrı bir kanül ile enjekte edildi ve ön kamara DTÇ ile yıkanmadı (Şekil 2A-D). Her işlemde sadece bir ajan enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra 5 gün boyunca günde 3 kez topikal ofloksasin 3 mg/mL verildi.

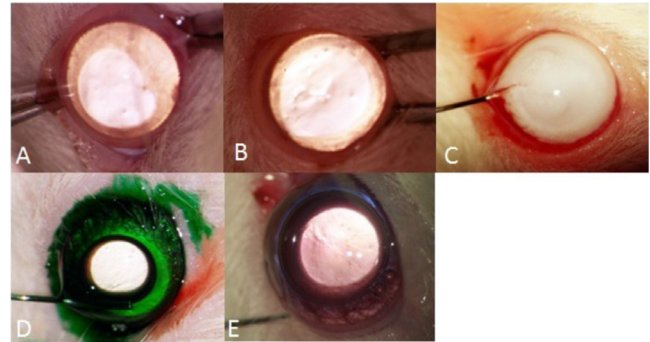
Sıçanların ötenazileri intrakameral enjeksiyondan 1 gün veya 1 hafta sonra yüksek dozda intramüsküler anestezi veya intrakardiyak potasyum klorür enjeksiyonu ile yapıldı. Her grupta 1. günde 6 sıçan ve 1. haftada 6 sıçan sakrifiye edilerek kornea örnekleri alındı. Kornea saydamlığı klinik olarak ötenaziden hemen önce spot ışık kullanılarak değerlendirildi. Sakrifiye edildikten hemen sonra kornealar TUNEL boyama ve TEM analizi için hazırlandı. Kornealar kenarında 1 mm sklera kalacak şekilde bıçak ve makas ile çıkarıldı ve iris diyaframı kornea endotelinden sıyrıldı.

Kornea Örneklerinin Hazırlanması

Kornealar iki parçaya ayrıldı ve bir parça glutaraldehit ile, diğer parça ise elektron mikroskobik analiz için %4



Şekil 1. Ön kamaraya üst temporal kornea kadrından MVR bıçağı (A) ile girildi ve bir intrakameral ajan enjekte edilmeden önce 30-gauge kanül (B) ile 0,05 mL aköz hümör boşaltıldı



Şekil 2. Sıçan ön kamarasına %1 prezervansız lidokain (A), %0,01 adrenalin (B), 4 mg/mL triamsinolon asetonid (C), %0,5 indosiyenin yeşili (4,5 mL DTÇ içinde 25 mg/0,5 mL su bazlı çözütücü) (D) ve %1 tripan mavisi (E) intrakameral enjeksiyonu

formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Formalinle fikse edilen ve parafine gömülen dokudan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitleri hematoxilen-eozin tekniği ile boyandı. ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptozis Kiti (Oncor, Gaithersburg, MD, ABD) kullanılarak 3 uç etiketleme ile DNA fragmentasyonu in situ olarak tespit edildi. Kornea örneklerindeki TUNEL boyalı apoptotik hücreler aynı kişi (B.B.) tarafından mikroskop altında 40x objektif lensi kullanılarak sayıldı. Etiketlenen hücreler toplam hücre sayısına oranlandı ve bu apoptoz oranı olarak ifade edildi. Apoptotik hücre yüzdeleri; Evre 0: %0, Evre 1: %1-5, Evre 2: %5-25, Evre 3: %25-50 ve Evre 4: ≥%50 olarak skorlandı.

TEM Analizi

Kornea örneklerinin TEM altında değerlendirilmesi için kornealar, fosfat tamponu içinde %2,5'lik glutaraldehit solüsyonunda 24 saat boyunca fikse edildi. %1'lik osmiyum tetroksit ve %0,5'lik uranil asetat ile post-fikse edildikten sonra sırasıyla aseton dizisi ile dehidrate edilerek reçineye gömüldü. %1 metilen mavisi ve %1 azure II içeren %1 boraks solüsyonunda ile kesitler alındı ve kontrastlandırıldı. Ultra ince kesitler elde edildikten sonra uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. Örnekler başlangıçta dodesenil süksinik anhidrit, Araldit CY212 (1:1, hacim/hacim) ve benzildimetilamin içine gömüldü. Bloklar 1 µm (kalın kesit) ve 0,05 µm (ince kesit) olacak şekilde ultramikrotom ile kesildi. İnce kesitler Carl Zeiss 906E (Oberkochen, Almanya) TEM ile incelenmek üzere uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı.

İstatistiksel Analiz

İntrakameral enjeksiyondan 1 gün ve 1 hafta sonra her grupta endoteldeki apoptotik hücrelerin yüzdesinin ortalaması kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Analiz için SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanıldı. Tüm gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmada 72 sıçan kullanıldı ve her grupta 12 göz yer aldı. Her grubun intrakameral enjeksiyondan 1 gün ve 1 hafta sonra TUNEL pozitif apoptotik hücreler oranının ortalaması Tablo 1'de gösterilmiştir. Postoperatif 1. günde adrenalin grubunda apoptotik hücre oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0,03$). Lidokain, TA, TM ve İSY gruplarındaki ortalama apoptotik hücre oranları kontrol grubundan anlamlı farklılık göstermedi ($p>0,05$). Postoperatif 1. hafta adrenalin ve TM gruplarının apoptotik hücre oranı ortalamaları kontrol grubu ve diğer ajan gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla $p=0,021$ ve $0,043$). Apoptotik hücre oranları skorlandığında tüm ajan gruplarında enjeksiyondan 1 gün ve 1 hafta sonra evre 1 ile evre 4 arasında değişen apoptozis saptandı (Şekil 3A-D). Enjeksiyondan 1 gün ve 1 hafta sonra sadece adrenalin verilen grupta evre 4 endotelial apoptozis gözlemlendi (Tablo 2).

Enjeksiyon sırasında iki sıçanda minimal iris prolapsusu meydana geldi. Ancak, iris uygun manipülasyonla yeniden konumlandırıldı. Evre 4 apoptozis görülen adrenalin grubundaki iki sıçan ile TM grubundaki bir sıçanda 1. haftada kornea ödemi izlendi. Üç sıçanda 1. günde ön kamarada minimal kanama izlendi. Enfeksiyon veya endoftalmi gelişmedi.

TEM analizinde kontrol grubunda DTÇ enjeksiyonundan 1 gün ve 1 hafta sonra endotelde hücreler arası bağlantıların ve organellerin normal görünümde olduğu izlendi (Şekil 4A). Apoptozun orta fazında, kornea örneklerinde kromatin kümeleri, mitokondriyal şişme ve vakuolizasyon görüldü (Şekil 4B). Geç apoptotik fazda mitokondriyal şişme, çekirdekte küçülme ve kromatin yoğunlaşması gözlemlendi (Şekil 4C).

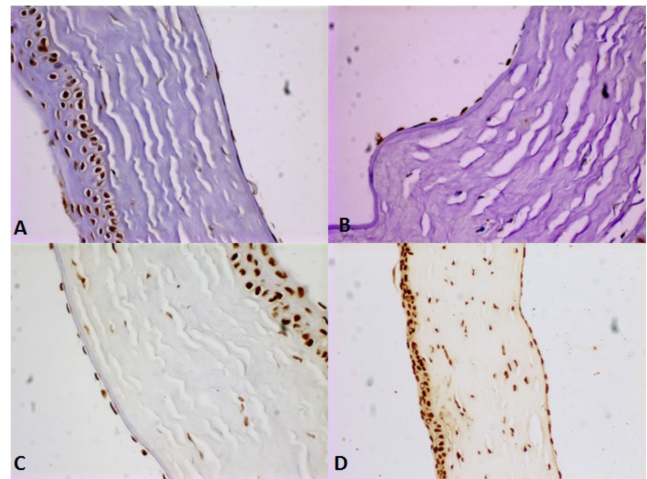
Tartışma

Sonuçlarımız, intrakameral adrenalin ve TM uygulamasının kornea endotelinde anlamlı düzeyde daha yüksek oranda

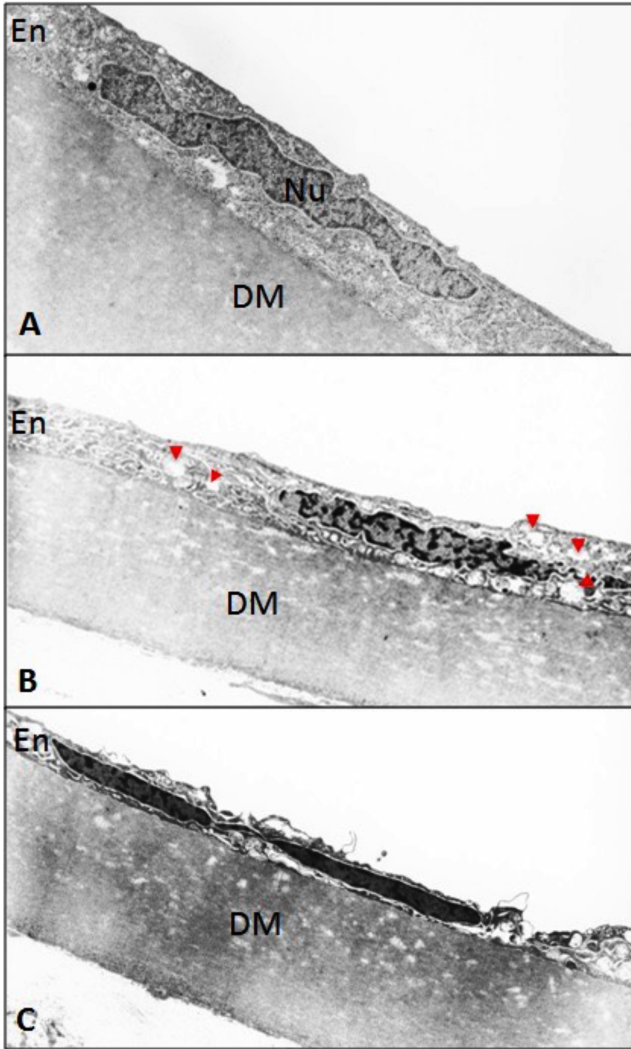
Tablo 1. İntrakameral enjeksiyonlardan 1 gün ve 1 hafta sonra her grupta ortalama TUNEL pozitif endotel hücre (apoptotik hücre) oranı

Ajan	Enjeksiyon sonrası 1. gün		Enjeksiyon sonrası 1. hafta	
	Ortalama ± SS	P değeri	Ortalama ± SS	P değeri
Adrenalin	0,403 ± 0,036	0,03	0,626 ± 0,081	0,021
Lidokain	0,188 ± 0,015	0,42	0,361 ± 0,026	0,058
TA	0,248 ± 0,021	0,24	0,295 ± 0,024	0,09
TM	0,233 ± 0,03	0,18	0,428 ± 0,032	0,043
İSY	0,210 ± 0,04	0,76	0,318 ± 0,027	0,69
DTÇ (kontrol)	0,220 ± 0,034	Ref.	0,316 ± 0,03	Ref.

TA: Triamsinolon asetonid, TM: Tripan mavisi, İSY: İndosiyenin yeşili, DTÇ: Dengeli tuz çözeltisi, SS: Standart sapma



Şekil 3. İntrakameral ajanların kornea katlantıları boyunca endotel hücre apoptozu üzerine etkisi TUNEL tekniği ile gösterilmiştir. Kromatin kondensasyonu olan hücreler boyandı ve toplam hücre sayısına oranlandı. Apoptoz oranı Evre 0 (%0), Evre 1 (%1-5) (A), Evre 2 (%5-25) (B), Evre 3 (%25-50) (C) ve Evre 4 (<%50) (D) olarak skorlandı



Şekil 4. Sıçan kornea endotelinin yüksek büyütme transmisyon elektron mikrografi görüntüleri. Normal endotel (En), Descemet membranına yapışmıştır, çekirdek (Nu) uzun görünür ve hücre (A) içinde dalgalı görünümündedir. Apoptozun orta fazındaki hücrelerde mitokondriyal şişme, sitoplazmik vakuolizasyon (oklar) ve kromatin kümelenmesi (B) gözlenir. (C) Geç apoptotik fazda yüzey hücre membranında hasar, kromatin kondensasyonu, mitokondriyal şişme ve nükleusta küçülme izlenir

apoptotik yanıtı neden olduğunu göstermiştir. Lidokain 1. haftada daha belirgin apoptotik değişikliklere neden olsa da kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı. Birinci gün ve 1. hafta analizleri karşılaştırıldığında, apoptotik hücrelerin oranı bir haftada bir güne göre daha yüksekti, bu da uzun süreli maruziyetle apoptotik etkinin artabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, TEM ile apoptozun ayırt edici özellikleri olarak kabul edilen karakteristik morfolojik özellikler görüldü. Bu özellikler arasında ilaç uygulamasından 1 gün ve 1 hafta sonra kornea endotelinde izlenen kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon, sitoplazmik vakuolizasyon ve mitokondriyal şişme sayılabilir.

Adrenalin, intraoküler cerrahi sırasında hızlı pupil dilatasyonu sağlamak ve gevşek iris sendromlu hastalarda iris hasarını en aza indirmek için kullanılan bir ajandır.^{10,11} İntrakameral adrenalin kullanımının güvenli ve etkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.^{12,13,14,15} Ancak olası endotel toksisitesi ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Liou ve ark.¹⁶ intrakameral adrenalin ve salin enjeksiyonu yapılan tavşanlarda hücre yoğunluğunda veya kornea kalınlığında anlamlı bir değişiklik olmadığını ve elektron mikroskopik analizi sonucunda tüm gruplarda endotel hücrelerinin sağlıklı görüldüğünü bildirmişlerdir. Hong ve ark.¹⁷ ayrıca, intrakameral adrenalin enjeksiyonunun (%1'e kadar) tavşan korneasındaki endotel hücrelerinin canlılığını veya morfolojisini etkilemediğini göstermiştir. Aksine, Hull ve ark.¹⁸ adrenalinin neden olduğu endotelial hasarın, ilacın stabilitesini artırmak için kullanılan %0,1 bisülfitten kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda ayrıca adrenalinin yüksek serbest radikal konsantrasyonuna sahip olduğunu ve bunun endotel toksisitesine katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir.^{19,20}

Çalışmamızda 1. haftada adrenalin grubunda kornea ödeminin eşlik ettiği evre 4 apoptoz görüldü. Yakın zamanda, intrakameral %2,5 adrenalin enjeksiyonundan sonra toksik ön segment sendromu geliştiği bildirilmiş ve buna uzun süreli maruziyetin neden olduğu düşünülmüştür.²¹

Lidokain, ön kamaradaki tüm sinir liflerini etkileyen etkili bir lokal anestezi ajandır. Yapılan bazı çalışmalarda düşük lidokain konsantrasyonlarının kornea endotel hücrelerini etkilemediği belirtilirken,^{22,23} diğer çalışmalarda daha yüksek konsantrasyonlarda intraoküler dokulara olumsuz etki gösterme

Tablo 2. İntrakameral ajanların enjeksiyonundan 1 gün ve 1 hafta sonra her sıçan için kornea endotelindeki apoptotik skorlar

Ajanlar	Enjeksiyondan 1 gün sonraki evre (n=6)						Enjeksiyondan 1 hafta sonraki evre (n=6)					
Adrenalin	1	1	2	2	2	4	2	3	2	2	4	1
Lidokain	1	1	2	1	1	1	3	3	2	1	2	1
TA	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	2	0
TM	0	2	1	0	1	1	1	3	2	2	3	1
İSY	2	1	1	1	2	0	3	1	2	0	2	1
DTÇ (kontrol)	0	1	1	0	2	0	0	1	2	1	1	0

TA: Triamsinolon asetonid, TM: Tripan mavisi, İSY: İndosiyani yeşili, DTÇ: Dengeli tuz çözeltisi

olasılığı tartışılmıştır.^{24,25,26,27} İntrakameral anestezi ajanlarının konsantrasyonu veya uygulama süresi ile ilişkili sitotoksik etkileri gösterilmiştir.^{22,23,25,26} Prezervan içeren veya içermeyen %2 lidokainin, tavşan kornea endotelinde önemli miktarda apoptozu indüklediği bildirilmiştir.^{6,28} Chang ve ark.,²⁶ süre açısından %1 veya %2 lidokaine 1 dakikalık maruziyetin tavşan endotel hücreleri için güvenli görüldüğünü, ancak daha uzun maruziyetin sitotoksitesine neden olabileceğini bildirmişlerdir. Atilla ve ark.²⁷ intrakameral lidokaine kısa süreli maruziyetin bile oküler dokularda histolojik değişikliklere ve fonksiyonel defektlere neden olabileceğini bulmuşlardır. Kim ve ark.²⁵ %1 lidokain enjeksiyonundan 1 gün sonra tavşan endotel hücrelerinde apoptoz gözlemlenmemişlerdir. Bununla birlikte, başka bir çalışmada, apoptotik endotel hücre kaybı ve morfolojik değişiklikler izlenmiş ancak bu bulguların geçici olduğu ve 1 haftada iyileştiği gösterilmiştir.⁶ Çalışmamıza göre 1 haftalık analizde DTÇ maruziyetine göre lidokain ile kornea endotelinde apoptoz riski artmıştır. Bu durum ajanın ön kamarada daha uzun süre kalmasına bağlanabilir.

TA, komplike katarakt cerrahisi sırasında ön kamarada vitreus kaybını görünür hale getirmek ve yönetmek için kullanılır.^{29,30,31} Ayrıca postoperatif enflamasyonu ve kistoid maküla ödemi azalttığı gösterilmiştir.³⁰ Oh ve ark.'nın³² çalışmasında tavşanların ön kamarasına TA verilmiş ve 2 saatte endotel hücre sayısında anlamlı bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Ancak, TA resüpsansiyon yapılmadan uygulandığında mikrovillus miktarının azaldığını gözlemlenmişlerdir. Başka bir çalışmada, kültürlenmiş tavşan endotelinde sitotoksik etkiler görülmüş ve buna çözüldüğü prezervan maddenin neden olduğu düşünülmüştür.³³ Retina pigment epitel hücreleri üzerinde yapılan histopatolojik çalışmalar da TA'nın toksik etkilerinin koruyucu olarak kullanılan %0,025 benzil alkolden kaynaklanabileceği fikrini desteklemektedir.^{34,35} Çalışmamızda enjeksiyondan 1 gün veya 1 hafta sonra TA'ya bağlı sitotoksik etki gözlenmedi.

TM, katarakt cerrahisinde kapsüloleksi için kullanılır. Ayrıca derin ön lamellar keratoplastide endoteli donör lentikülden sıyırma ve boyama işlemlerinde de kullanılmaktadır. Çeşitli klinik çalışmalarda, TM'nin ön segment yapılarına toksisitesi test edilmiş ve hepsinde %0,1 TM'nin iyi biyoyumluluk gösterdiği bildirilmiştir.^{36,37,38} Chung ve ark.³⁹ ayrıca olgun beyaz kataraktın ön kapsülünün daha iyi görünür hale getirilmesi için %1 TM'nin güvenliğini değerlendirmiş ve güvenli olduğunu bulmuşlardır. TM'nin güvenli olduğu gösterilse de doz ve süreye bağlı toksite görüldüğü de bildirilmiştir. Kornea endoteli ve kornea fibroblastlarının daha uzun süre ve daha yüksek konsantrasyonlara maruz bırakıldığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda TM toksisitesi görülmüştür.^{37,40,41,42} Klinikte kullanılan konsantrasyonun artırılması, endotel hücrelerinin canlılığında %38 ila %55 oranında bir azalmaya neden olmuştur. Yapılan bir çalışmada, intrakameral TM enjeksiyonunun kornea dokusuna zarar verebileceği oksidatif stres parametreleri ve histopatolojik değerlendirme ile gösterilmiştir.⁴³ Hayvan çalışmalarında da teratojenik ve kanserojenik etkili olduğu bulunmuştur.^{44,45} Bu sonuçlar göz önüne alındığında TM'nin

kornea dokusu için güvenli olup olmadığı konusunda belirsizlik vardır. Kısaca TM, hem katarakt cerrahisinde hem de kornea doku bankalarında yaygın olarak kullanılan konsantrasyonlarda kornea hücreleri için zararsızdır. Ancak, daha yüksek konsantrasyonlarda veya daha uzun süreli kullanılması durumunda dikkatli olunması önerilir.

İSY, dokuların görünürlüğünü iyileştirmek için katarakt cerrahisi ve vitreoretinal cerrahide intraoküler boya olarak kullanılmaktadır. Güvenli kapsüloleksi için ön kapsül intrakameral uygulama ile boyanmaktadır. Daha önce yapılan arka segment çalışmalarında İSY'nin retinaya toksik olabileceği gösterilmiştir.^{46,47} Klinik veriler retinal glial hücrelerin, sinir lifi tabakasının, retinal ganglion hücrelerinin ve optik sinirin henüz bilinmeyen mekanizmalar ile hasar görebileceğine işaret etmektedir. Göz cerrahi sırasında intrakameral İSY kullanımının kornea endoteli tarafından iyi tolere edildiği düşünülmektedir. McEnerney ve Peyman⁴⁸, İSY'nin ölü kornea endotel hücrelerini seçici olarak boyadığını ve canlı hücrelere zararlı görünmediğini bildirmiştir. Holley ve ark.⁴⁹ yaptıkları TEM çalışmasında insan korneasında İSY maruziyeti sonrası ultra yapısal hasar izlenmediğini belirtmişlerdir. Bir hayvan modelinde elde ettiğimiz sonuçlarımız da bu boyanın toksik etkili olmadığını desteklemektedir. Bununla birlikte, İSY'nin etkilerini daha iyi anlayabilmek için klinik ortamda yapılacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sıçanların ön kamarası düz ve iris stroması incedir, bu da enjeksiyon sırasında iris prolapsusuna yol açabilir. Çalışmamızda sadece iki sıçanda iris prolapsusu gelişti ve bunun düzeltilmesi sırasında apoptozu indükleyebilecek şekilde endotelial ile temas veya lens hasarı ortaya çıkmadı. Ön kamarada enflamasyona neden olan olaylar apoptozu indükleyebilir. Ancak tüm enjeksiyonlar aynı kişi tarafından aynı teknikle yapıldığından, tüm sıçanların aynı koşullara maruz kaldığını düşünüyoruz.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Amacımız, klinik uygulamada sık kullanılan ve daha önceki çalışmalarda güvenli olduğu belirlenen intrakameral ajanların kullanılan dozlarda apoptoz üzerine etkisi olup olmadığını araştırmaktır. Bu nedenle, intrakameral ajanların endotel hücre fonksiyonu üzerindeki uzun dönem veya farklı dozlardaki etkilerini değerlendirmedik. Çalışmamızın temel amacı oküler cerrahide kullanılan anestezi, midriyatik ve kapsül boyama ajanlarının etkilerini araştırmaktır. Cerrahi sonunda intrakameral olarak uygulandığında sefuroksimin apoptozu tetiklediği bulunmuştur.^{50,51} Ancak bu konu çalışmamızın kapsamı dışındadır.

Sıçanlar, insan korneasını incelemek için yaygın olarak deneysel model olarak kullanılmasına rağmen, insan korneası sıçan kornea endotelinden farklı yapısal bileşenlere ve endotelial strese sahip olabilir. Sıçan korneası, insan korneasına kıyasla merkezde daha kalın ve periferde daha incedir.⁵² Sıçan korneasında saptanan ancak insan korneasında bulunmayan vazoaktif intestinal peptid pozitif parasempatik sinir liflerinin nakil sonrası kornea endotel kaybını en aza indirdiği ve kornea

allogreft sağkalımını iyileştirdiği bildirilmiştir.⁵³ İnsan korneası ise toksik hasardan daha kalın bir endotel müsin tabakasının yanı sıra aköz hümodaki proteinler ve iyon konsantrasyonları ile korunmaktadır.^{54,55} Ayrıca, fakoemülsifikasyon sırasında viskoelastik kullanılması ve sürekli irigasyon yapılması ile bu toksik etkileri en aza indirebilir. Buna ek olarak, insan korneasının %90'ını stromal bileşen oluştururken, sıçanlarda bu oran %70'tir.⁵² Bu nedenle, insan gözü ve sıçan modeli arasındaki farklar, bulgularımız insana uyarlanmasında zorluk yaratabilir. İnsanlarda bu sonuçları desteklemek için gelecekte yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca DNA hasarının apoptozun kendine özgü bir özelliği olmadığı ve nekrozda da ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, TUNEL testine ek olarak başka bir bağımsız yöntem kullanmak, apoptozu doğrulamak ve karakterize etmek için gerekli olabilir.

Sonuç

İntrakameral %1 lidokain, 4 mg/mL TA ve %0,5 İSY enjeksiyonları sıçan kornea endotel hücrelerinde hasara neden olmamıştır. Ancak %0,01 adrenalin ve %1 TM intrakameral enjeksiyon kornea dokusunda mikroyapısal değişikliklere neden olabilir. Katarakt veya diğer oküler cerrahiler planlanırken bu husus göz önünde bulundurulmalıdır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Bu hayvan çalışması, Görme ve Oftalmoloji Araştırma Derneği'nin Oftalmoloji ve Görme Araştırmalarında Hayvanların Kullanımı Tebliği'ne uygun olarak gerçekleştirilmiş ve çalışma protokolü Başkent Üniversitesi Hastanesi Yerel Hayvan Bakım ve Kullanımı Etik Kurulu, Ankara, Türkiye tarafından onaylanmıştır (proje no: DA 27 04/02).

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: S.A.B., Konsept: S.A.B., Y.A.A., Dizayn: S.A.B., Veri Toplama veya İşleme: S.A.B., B.B., G.K., Analiz veya Yorumlama: S.A.B., Z.K.Ö., Literatür Arama: S.A.B., Z.K.Ö., Yazan: S.A.B., Z.K.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Liu SH, Gottsch JD. Apoptosis induced by a corneal-endothelium-derived cytokine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:3152-3159.
2. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today.* 1993;14:126-130.
3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-257.
4. Wilson SE, Bourne WM. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:1511-1519.

5. Kim EC, Park SH, Kim MS. A comparison of pupil dilation and induction of corneal endothelial apoptosis by intracameral 1% lidocaine versus 1:100,000 epinephrine in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2010;26:563-570.
6. Borazan M, Karalezli A, Oto S, Akova YA, Karabay G, Kocbiyik A, Celasun B, Demirhan B. Induction of apoptosis of rabbit corneal endothelial cells by preservative-free lidocaine hydrochloride 2%, ropivacaine 1%, or levobupivacaine 0.75%. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:753-758.
7. Chew AC, Tan DT, Poh R, H M H, Beuerman RW, Mehta JS. Effect of intracameral injection of fibrin tissue sealant on the rabbit anterior segment. *Mol Vis.* 2010;16:1087-1097.
8. Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2887-2893.
9. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, Delbosc B, Hervé P, Campos L. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol.* 2002;86:306-310.
10. Vasavada A, Singh R. Phacoemulsification in eyes with a small pupil. *J Cataract Refract Surg.* 2000;26:1210-1218.
11. Williams GP, Tsaloumas MD. The use of intracameral phenylephrine in the management of intraoperative floppy-iris syndrome with doxazosin. *Eye (Lond).* 2008;22:1094.
12. Lay Suan AL, Hamzah JC, Ken TS, Mansurali VN. Intracameral mydriatics versus topical mydriatics in pupil dilation for phacoemulsification cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2017;43:1031-1035.
13. Behndig A, Korobelnik JE. Mydriatic insert and intracameral injections compared with mydriatic eyedrops in cataract surgery: controlled studies. *J Cataract Refract Surg.* 2015;41:1503-1519.
14. Lundberg B, Behndig A. Intracameral mydriatics in phacoemulsification cataract surgery: a 6-year follow-up. *Acta Ophthalmol.* 2013;91:243-246.
15. Mori Y, Miyai T, Kagaya F, Nagai N, Osakabe Y, Miyata K, Amano S. Intraoperative mydriasis by intracameral injection of mydriatic eye drops: in vivo efficacy and in vitro safety studies. *Clin Exp Ophthalmol.* 2011;39:456-461.
16. Liou SW, Chiu CJ, Wang JJ. Effects of intraocular epinephrine on the corneal endothelium of rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2002;18:469-473.
17. Hong JW, Park JH, Kim ES, Kim JY, Kim MJ, Tchah H. Effect of intracameral injection of bisulfite-containing phenylephrine on rabbit corneal endothelium. *Cornea.* 2015;34:460-463.
18. Hull DS, Chemotti MT, Edelhauser HF, Van Horn DL, Hyndiuk RA. Effect of epinephrine on the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol.* 1975;79:245-250.
19. Lockington D, Macdonald EC, Young D, Stewart P, Caslake M, Ramaesh K. Presence of free radicals in intracameral agents commonly used during cataract surgery. *Br J Ophthalmol.* 2010;94:1674-1677.
20. Lockington D, Macdonald E, Gregory M, Stewart P, Caslake M, Ramaesh K. Presence of free radicals in commonly used ophthalmic preparations. *Br J Ophthalmol.* 2010;94:525-526.
21. Eggeling P, Pleyer U, Hartmann C, Rieck PW. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. *J Cataract Refract Surg.* 2000;26:1403-1408.
22. Bielory BP, Shariff A, Hussain RM, Bermudez-Magner JA, Dubovy SR, Donaldson KE. Toxic Anterior Segment Syndrome: Inadvertent Administration of Intracameral Lidocaine 1% and Phenylephrine 2.5% Preserved With 10% Benzalkonium Chloride During Cataract Surgery. *Cornea.* 2017;36:621-624.
23. Kadonosono K, Ito N, Yazama F, Nishide T, Sugita M, Sawada H, Ohno S. Effect of intracameral anesthesia on the corneal endothelium. *J Cataract Refract Surg.* 1998;24:1377-1381.
24. Iradier MT, Fernandez C, Bohorquez P, Moreno E, DelCastillo JB, Garcia J. Intraocular lidocaine in phacoemulsification: an endothelium and blood-aqueous barrier permeability study. *Ophthalmology.* 2000;107:896-900.

25. Kim T, Holley GP, Lee JH, Broocker G, Edelhauser HF. The effects of intraocular lidocaine on the corneal endothelium. *Ophthalmology*. 1998;105:125-130.
26. Chang YS, Tseng SY, Tseng SH, Wu CL. Cytotoxicity of lidocaine or bupivacaine on corneal endothelial cells in a rabbit model. *Cornea*. 2006;25:590-596.
27. Atilla H, Tekeli O, Can B, Karel F, Saran Y. Effects of intracameral lidocaine on ocular tissues. *Clin Exp Ophthalmol*. 2003;31:73-77.
28. Schellini SA, Crepe MC, Gregorio EA, Padovani CR. Lidocaine effects on corneal endothelial cell ultrastructure. *Vet Ophthalmol*. 2007;10:239-244.
29. Yamakiri K, Uchino E, Kimura K, Azad RV. Intracameral triamcinolone helps to visualize and remove the vitreous body in anterior chamber in cataract surgery. *Am J Ophthalmol*. 2004;138:650-652.
30. Karalezli A, Borazan M, Akova YA. Intracameral triamcinolone acetate to control postoperative inflammation following cataract surgery with phacoemulsification. *Acta Ophthalmol*. 2008;86:183-187.
31. Burk SE, Da Mata AP, Snyder ME, Schneider S, Osher RH, Cionni RJ. Visualizing vitreous using Kenalog suspension. *J Cataract Refract Surg*. 2003;29:645-651.
32. Oh JY, Wee WR, Lee JH, Kim MK. Short-term effect of intracameral triamcinolone acetate on corneal endothelium using the rabbit model. *Eye (Lond)*. 2007;21:812-818.
33. Chang YS, Tseng SY, Tseng SH, Wu CL, Chen MF. Triamcinolone acetate suspension toxicity to corneal endothelial cells. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32:1549-1555.
34. Hida T, Chandler D, Arena JE, Machemer R. Experimental and clinical observations of the intraocular toxicity of commercial corticosteroid preparations. *Am J Ophthalmol*. 1986;101:190-195.
35. Yeung CK, Chan KP, Chiang SW, Pang CP, Lam DS. The toxic and stress responses of cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:5293-5300.
36. Melles GR, de Waard PW, Pameyer JH, Houdijn Beekhuis W. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg*. 1999;25:7-9.
37. van Dooren BT, de Waard PW, Poort-van Nouhuys H, Beekhuis WH, Melles GR. Corneal endothelial cell density after trypan blue capsule staining in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2002;28:574-575.
38. Norn MS. Perioperative trypan blue vital staining of corneal endothelium. Eight years' follow up. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1980;58:550-555.
39. Chung CF, Liang CC, Lai JS, Lo ES, Lam DS. Safety of trypan blue 1% and indocyanine green 0.5% in assisting visualization of anterior capsule during phacoemulsification in mature cataract. *J Cataract Refract Surg*. 2005;31:938-942.
40. Jacob S, Agarwal A, Agarwal A, Agarwal S, Chowdhary S, Chowdhary R, Bagmar AA. Trypan blue as an adjunct for safe phacoemulsification in eyes with white cataract. *J Cataract Refract Surg*. 2002;28:1819-1825.
41. Thaler S, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU, Schuettauf F, Haritoglou C, Yoeuek E. Methyl blue and aniline blue versus patent blue and trypan blue as vital dyes in cataract surgery: capsule staining properties and cytotoxicity to human cultured corneal endothelial cells. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37:1147-1153.
42. Buzard K, Zhang JR, Thumann G, Stripecke R, Sunalp M. Two cases of toxic anterior segment syndrome from generic trypan blue. *J Cataract Refract Surg*. 2010;36:2195-2199.
43. Akal A, Ulas T, Goncu T, Adibelli ME, Kocarslan S, Guldur ME, Guler M, Ozkan U, Dusunur M, Demir T. Evaluation of the safety of intracameral trypan blue injection on corneal tissue using oxidative stress parameters and apoptotic activity: an experimental study. *Arq Bras Oftalmol*. 2014;77:388-391.
44. Veckeneer M, van Overdam K, Monzer J, Kobuch K, van Marle W, Spekrijse H, van Meurs J. Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239:698-704.
45. Ema M, Kanoh S. Studies on the pharmacological bases of fetal toxicity of drugs. (II). Effect of trypan blue on the pregnant rats and their offspring. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1982;79:369-381.
46. Yam HF, Kwok AK, Chan KP, Lai TY, Chu KY, Lam DS, Pang CP. Effect of indocyanine green and illumination on gene expression in human pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:370-377.
47. Enaida H, Sakamoto T, Hisatomi T, Goto Y, Ishibashi T. Morphological and functional damage of the retina caused by intravitreal indocyanine green in rat eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002;240:209-213.
48. McEnerney JK, Peyman GA. Indocyanine green: a new vital stain for use before penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 1978;96:1445-1447.
49. Holley GP, Alam A, Kiri A, Edelhauser HF. Effect of indocyanine green intraocular stain on human and rabbit corneal endothelial structure and viability. An in vitro study. *J Cataract Refract Surg*. 2002;28:1027-1033.
50. Ozkan U, Akal A, Ozkan K, Yilmaz OF, Adibelli FM. Investigating the effect of intracameral cefuroxime on oxidative stress and apoptosis in the rat cornea. *Arq Bras Oftalmol*. 2019;82:322-328.
51. Yilmaz F, Berk AT, Yilmaz O, Lebe BK, Keskinoglu P, Bagriyanik HA. Comparison of the local effects of different intracameral cefuroxime solutions on rabbit cornea. *Cutan Ocul Toxicol*. 2020;39:332-340.
52. Li HF, Petroll WM, Møller-Pedersen T, Maurer JK, Cavanagh HD, Jester JV. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr Eye Res*. 1997;16:214-221.
53. Satitpitakul V, Sun Z, Suri K, Amouzegar A, Katikireddy KR, Jurkunas UV, Kheirkhah A, Dana R. Vasoactive intestinal peptide promotes corneal allograft survival. *Am J Pathol*. 2018;188:2016-2024.
54. Chang YS, Tseng SY, Tseng SH, Chen YT, Hsiao JH. Comparison of dyes for cataract surgery. Part I: cytotoxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg*. 2005;31:792-798.
55. Kim EK, Cristol SM, Geroski DH, McCarey BE, Edelhauser HF. Corneal endothelial damage by air bubbles during phacoemulsification. *Arch Ophthalmol*. 1997;115:81-88.