

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TAVŞANLARDA DENEYSEL EKSTRAOKÜLER KAS CERRAHİSİ SONRASI
TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ NİNTEDANİB KULLANIMININ POSTOPERATİF
İNFLAMASYON, ADEZYON VE FİBROZİS GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI

ARŞ. GÖR. DR. GÖZDE BIÇAKLIOĞLU

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TAVŞANLARDA DENEYSEL EKSTRAOKÜLER KAS CERRAHİSİ SONRASI
TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ NİNTEDANİB KULLANIMININ POSTOPERATİF
İNFLAMASYON, ADEZYON VE FİBROZİS GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI

ARŞ. GÖR. DR. GÖZDE BIÇAKLIOĞLU

GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ DİLARA PİRHAN

ETİK KURUL ONAYI: 28.02.2019 KOÜ HADYEK 2/2-2019

2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	3
TEŞEKKÜR.....	5
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZELGESİ.....	6
ÇİZELGELER DİZELGESİ	7
ÇİZİMLER DİZELGESİ	8
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	11
2. GENEL ANATOMİK BİLGİLER.....	13
2.1. EKSTRAOKÜLER KASLARIN ANATOMİSİ.....	14
2.1.1.Rektus kasları.....	14
2.1.2.Oblik kaslar	16
2.1.3. EKSTRAOKÜLER KASLARIN KANLANMASI.....	17
2.1.4. EKSTRAOKÜLER KASLARIN İNNERVASYONU.....	17
2.2. EKSTRAOKÜLER KASLARI ÇEVRELEYEN FASYALARIN ANATOMİSİ.....	18
2.2.1.Kas Kapsülü.....	18
2.2.2.İntermüsküler Septum.....	18
2.2.3.Tenon Kapsülü.....	18
2.2.4.Lockwood Ligamenti.....	19
2.2.5.Check Ligamentleri.....	19
3.ŞAŞILIK.....	20
4.YARA İYİLEŞMESİ.....	22
4.1.YARA İYİLEŞMESİNİN EVRELERİ.....	23
4.1.1.İnflamasyon Evresi.....	23
4.1.2.Proliferasyon Evresi.....	23
4.1.3.Yeniden Şekillenme Evresi.....	23
4.2.YARA İYİLEŞMESİNDE ROL OYNAYAN BÜYÜME FAKTÖRLERİ.....	24
4.2.1.Epidermal Büyüme Faktörü (EGF).....	24
4.2.2.Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF)	24
4.2.3.Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	24
4.2.4.Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF-β).....	24
4.2.5.Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF).....	24

5.ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN AJANLARIN ÖZELLİKLERİ.....	26
5.1.NİNTEDANİB.....	26
5.2.TRIAMSİNOLON ASETONİD.....	29
6. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
6.1.İLAÇLARIN HAZIRLANIŞI.....	30
6.1.1.Nintedanibin Hazırlanışı.....	30
6.1.2.Triamsinolon Asetonidin Hazırlanışı.....	31
6.1.3.Serum Fizyolojik.....	31
6.2.CERRAHİ ÖNCESİ HAZIRLIK.....	32
6.3.CERRAHİ YAKLAŞIM.....	32
6.4.PATOLOJİK İNCELEME.....	36
6.4.1.Histopatolojik İnceleme.....	36
6.4.2.İmmünohistokimyasal boyama.....	38
7.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.....	40
8. BULGULAR.....	41
8.1.HİSTOPATOLOJİK İNCELEME BULGULARI.....	41
8.2.İMMÜNOHİSTOKİMYA İNCELEME BULGULARI.....	57
8.2.1. α -sma immünohistokimyası.....	57
8.2.2.TGF- β immünohistokimyası.....	59
8.2.3.MMP-2 immünohistokimyası.....	62
9. TARTIŞMA.....	66
10. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
11. ÖZET.....	81
12.İNGİLİZCE ÖZET.....	82
13.KAYNAKLAR.....	83

TEŞEKKÜR

Kliniğimiz ve üniversitemiz kurucularından, uzmanlık eğitimim sürecinde tanımaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Yusuf Çağlar' a, mesleki anlamda bizlerle tecrübelerini her zaman paylaşan ve biz asistanların herhangi bir sorunu olduğunda sabırla dinleyip yardımcı olan anabilim dalı başkanımız kıymetli hocam Prof. Dr. Nurşen Yüksel'e, cerrahi becerinin sabır, disiplin ve çok çalışmakla oluşabileceğini kendi meslek hayatıyla bize gösteren, cerrahi eğitimimde büyük yeri olan ve bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Veysel Levent Karabaş' a, asistanlığımızda bizlere çok zor gelen pediatrik oftalmolojiyi anlamamızı sağlayıp, sevdiren ve mesleğinde titizliği hiç elden bırakmayan değerli hocam Prof. Dr. Özgül Altıntaş' a, cerrahi eğitim ve meslek hayatıyla örnek olan sevgili hocam Doç. Dr. Berna Özkan' a, asistanlığım süresince mesleki anlamda desteğini esirgemeyen, cerrahiye başlarken emekleme dönemlerimde sabırla yanımda olan ve her zaman desteklerini yanımda hissettiğim tez danışmanım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Dilara Pirhan' a, asistanlık sürecimde önce kıdemlim olarak sonra da hocam olarak mesleki anlamda desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Sevgi Özel Subaşı'na sonsuz şükran ve minnet duygularımı sunarım.

Tez sürecinde benden yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Yusufhan Yazır' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemi sağlayan, ömrüm boyunca layık olmaya çalışacağım babama, anneme, ablama ve tüm asistanlık sürecim boyunca bana destek olan ve yol gösteren eşime sonsuz minnet duygularımı ve sevgilerimi sunarım.

Eğitimim boyunca beraber pek çok şey paylaştığımız, birlikte olmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarımın her birine, kliniğimizde çalışan hemşire ve personelimize desteklerinden ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gözde BIÇAKLIOĞLU

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZELGESİ

PDGF: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

PDGFR: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü

FGFR: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü

VEGFR: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü

TIMP: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü

MMP-2: Matriks Metalloproteinaz 2

α -SMA: Alfa smooth muscle actin

SRK: Superior Rektus Kası

DMSO: Dimetilsülfoksit

TA: Triamsinolon asetonid

SF: Serum Fizyolojik

HE: Hematoksilen Eozin

Mit-C: Mitomisin-C

5-FU: 5 Fluorourasil

PTFE/PLGA: Politetrafloroetilen/polilaktid-co-glikolid

ET: Ezotropy

XT: Ekzotropy

ÇİZELGELER DİZELGESİ

Tablo 1: Olmsted County, Minnesota bölgesinde Ocak 1985-Aralık 1994 yılları arasında 19 yaş altı 627 hastada görülen şaşılık tipleri ve dağılımı

Tablo 2: Büyüme faktörleri ve sitokinlerin yara iyileşmesi üzerine etkileri

Tablo 3: Hayvanlara uygulanan tedavi şekli

Tablo 4: Chun BY ve Rhiu S skorlama sistemi

Tablo 5: Kassem RR ve arkadaşlarının skorlama sistemi

Tablo 6: Gruplara göre konjonktival inflamasyonun, skleral inflamasyonun ve konjonktival vaskülaritenin dağılımı

Tablo 7: Gruplara göre perimüsküler fibrozisinin, rektus kas fibrozisinin ve adezyonun dağılımı

ÇİZİMLER DİZELGESİ

Şekil 1: Göz küresinin eksenleri ve rotasyon merkezi

Şekil 2: Tillaux Spirali

Şekil 3: Ekstraoküler kasların yandan ve önden görünümü

Şekil 4: Nintedanibin kimyasal yapısı

Şekil 5: Fibroblast büyüme faktör reseptörü-1' in kinaz alanının aktif bölgesine bağlanmış nintedanibin kristal yapısı.

Şekil 6: Nintedanibin polifarmakolojisi ve sinyal yolları

Şekil 7: Triamsinolon asetonidin kimyasal yapısı

Şekil 8: Nintedanib 50 mg toz

Şekil 9: Kenacort-A 40 mg ampul

Şekil 10: Cerrahi İşlemin Basamakları

Şekil 11: Kontrol grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Konjonktival epitelde devamlılık ve subkonjonktival dokuda sağlıklı morfoloji gözlemlenmektedir. H&E, 200X magnifikasyon

Şekil 12: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Siyah ok, konjonktival epitelde dökülmeleri; yıldız, subkonjonktival dokuda ödemi göstermektedir. H&E, A-200X ve B-400X magnifikasyon

Şekil 13: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Siyah ok, şiddetli lökositik infiltrat; ok başı, artan vaskülarizasyonu göstermektedir. H&E, A-200X ve B-400X magnifikasyon

Şekil 14: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Artan vaskülarizasyon ve ödem dikkat çekmektedir. H&E, 400X magnifikasyon

Şekil 15: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Sütür materyalinin etrafında yabancı cisim inflamasyonu (siyah ok) ve lökositik infiltrasyon (siyah halka) dikkat çekmektedir. H&E, 400X magnifikasyon

Şekil 16: 1 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. H&E, 200X magnifikasyon

Şekil 17: 5 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. H&E, 200X magnifikasyon

Şekil 18: 10 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. H&E, 200X magnifikasyon

Şekil 19: Triamsinolon asetonid grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf H&E, 200X magnifikasyon

Şekil 20: Gruplar arasında konjonktival inflamasyon derecesi dağılımı

Şekil 21: Gruplar arasında konjonktival vaskülarizasyon derecesi dağılımı

Şekil 22: Kontrol grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-100X, B-200X magnifikasyon

Şekil 23: Sham grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Yıldız, şiddetli kollajen birikimine işaret etmektedir. Masson trikrom, A-100X, B-200X, C ve D-400X magnifikasyon

Şekil 24: Sham grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-100X, B-400X magnifikasyon

Şekil 25: 1 µM nintedanib grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, 200X magnifikasyon

Şekil 26: 5 µM nintedanib grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-100X, B-200X, C-400X magnifikasyon

Şekil 27: 10 µM nintedanib grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-200X, B-400X magnifikasyon

Şekil 28: Triamsinolon asetonid grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-100X, B-400X magnifikasyon

Şekil 29: Gruplar arasında perimüsküler fibrozis derecesi dağılımı

Şekil 30: Gruplar arasında skleral inflamasyon derecesi dağılımı

Şekil 31: Gruplar arasında rektus kas fibrozisi derecesi dağılımı

Şekil 32: Gruplar arasında adezyon derecesi dağılımı

Şekil 33: Kontrol grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de α -SMA immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.

Şekil 34: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de α -SMA immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. Siyah ok, α -SMA negatif (-) hücreleri; beyaz ok, α -SMA pozitif (+) hücreleri göstermektedir. 400X magnifikasyon

Şekil 35: 1 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de α -SMA immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 36: 5 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de α -SMA immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 37: 10 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de α-SMA immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 38: Triamsinolon asetonid grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de α-SMA immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 39: Kontrol grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de TGF-β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. Siyah ok, α-SMA pozitif (+) hücreleri; beyaz ok, α-SMA negatif (-) hücreleri göstermektedir. 400X magnifikasyon

Şekil 40: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de TGF-β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. Siyah ok, α-SMA negatif (-) hücreleri; beyaz ok, α-SMA pozitif (+) hücreleri göstermektedir. 400X magnifikasyon

Şekil 41: 1 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de TGF-β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 42: 5 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de TGF-β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 43: 10 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival doku (A) ve SRK (B)' de TGF-β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 44: Triamsinolon asetonid grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de TGF-β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 45: Kontrol grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 46: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 47: 1 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 48: 5 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival doku (A) ve SRK (B)' de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 49: 10 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 50: Triamsinolon asetonid grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B)' de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon

Şekil 51: Postoperatif 3. günde, 1. haftada, 2. haftada ve 4. haftada yara yerlerinin makroskopik görünümü

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Şaşılık oftalmoloji pratiğinde özellikle de çocukluk çağında sık karşılaşılan bir hastalıktır. Kozmetik ve psikolojik problemlere yol açmasının yanı sıra ambliyopiye neden olduğu için özenle tedavi edilmesi gerekir. Şaşılığın tedavisinde cerrahi tedavi; optik, ortoptik ve farmakolojik tedaviler kadar yaygın ve önemlidir. Cerrahi tedavide amaç görme eksenlerindeki kaymanın düzeltilmesidir. Bu sayede binoküler tek görme sağlanmaya ve aynı zamanda kozmetik açıdan iyi bir görünüm elde edilmeye çalışılır (1).

Cerrahi müdahale, vücut için bir travmadır. Bütün travmalarda olduğu gibi bir yara iyileşmesi sürecini beraberinde getirir. Bu süreçte cerrahi sahada adezyonlar oluşmaktadır. Şaşılık cerrahisindeki en önemli problemlerden biri özellikle birden fazla cerrahi geçirmiş vakalarda postoperatif adezyon gelişimidir. Konjonktiva, tenon kapsülü, orbital yağ dokusu, sklera ve ekstraoküler kasları etkileyebilen bu adezyonlar cerrahi sonuçları etkileyebilecek hareket problemlerine yol açabilmektedir (2). Ek olarak, kas insersiyosu ve sklera arasındaki düzgün adezyonlar yara iyileşmesinin kritik bileşeni olmasına rağmen, yara dokusu ya da ciddi yapışıklıklar ekstraoküler kasın normal kontraksiyon fonksiyonunu sınırlayıp cerrahi sonuçları etkileyebilir ve çevre dokuların yapısını bozabilir (3,4). Oluşmuş olan adezyonu tedavi etmek zor olduğu için ilk cerrahi sırasında skar gelişimini önlemek önem kazanmaktadır. Başarısız cerrahi teknik, aşırı kanama, koter uygulanması, multipl prosedür, aşırı sütür ya da doku reaksiyonu ve enfeksiyon postoperatif yapışıklıklara neden olabilmektedir (5). Travmatik doku hasarı, kanama ve cerrahiye sekonder inflamasyon kaçınılmazdır. Bir miktar postoperatif adezyon gelişimi doğaldır. Şaşılık cerrahisinde adezyon gelişimini ve restriktif kas disfonksiyonunu önlemek amacıyla silikon bariyer, Adcon-L, interceed, seprafilm, poliüretan film, politetrafloroetilen, sodyum hyaluronat, politetrafloroetilen/polilaktid-co-glikolid (PTFE/PLGA), viscoat gibi çeşitli sentetik ve biyolojik implant ile mitomisin C (Mit-C), 5-fluorourasil (5- FU), daunorubisin, steroid ajanlar, bleomisin, vinkristin, vinblastin gibi antifibrotik ajanlar kullanılmıştır (4-17). Bu şekilde yapışıklıkların önlenmesi ve daha düzgün bir yara iyileşmesi hedeflenmiştir. Ancak bu ajanların hiçbiri şaşılık cerrahisi için klinik uygulamada yer bulamamıştır.

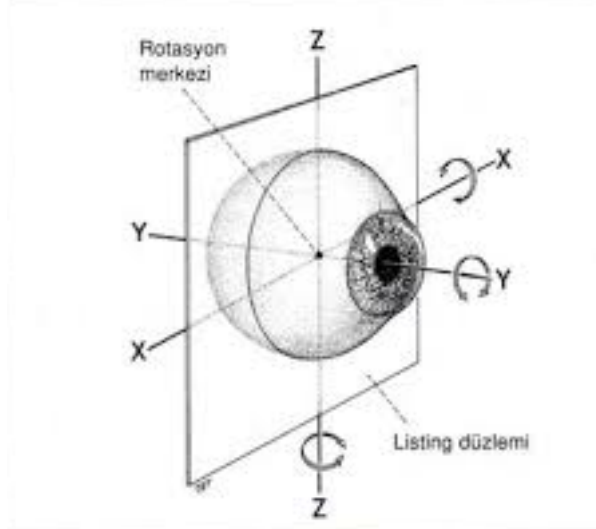
Çalışmamızda deneysel şaşılık cerrahisi modeli oluşturulacak tavşanlarda multipl tirozin kinaz inhibitörü nintedanib ve uzun etki süresine sahip steroid ajan olan triamsinolon asetonidin postoperatif adezyonu, inflamasyonu ve fibrozisi önlemedeki etkinliğini

incelemeyi amaçladık. Triamsinolon asetonid literatürde daha önceden çalışılmış olup subkonjonktival fibrozisi ve şaşılık cerrahisi sonrası inflamasyonu azaltmada etkili olabileceği gösterilmiştir (18,19). Literatürde henüz şaşılıkta postoperatif adezyonu önleme çalışmalarında kullanılmamış olan multipl tirozin kinaz inhibitörü antifibrotik ajan nintedanib ise pulmoner fibrozis modellerinde denenmiş olup başarılı bulunmuştur (20-21). Akciğer fibroblastları üzerinde antifibrotik etkinliği hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir (22). İdiyopatik pulmoner fibrozis tedavisinde kullanılmaktadır (20). 2019 yılında yayınlanan in vitro bir çalışmada nintedanibin insan tenon fibroblastları üzerinde antifibrotik etkinliğe sahip olduğu ve subkonjonktival fibrozis için etkili terapötik ajan olarak kullanılabilirliği ileri sürülmüştür (23). Bu özelliklerinden dolayı şaşılık cerrahisi ile ilişkili postoperatif adezyonları önlemede etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

2.GENEL ANATOMİK BİLGİLER

Orbita içerisine yerleşmiş göz, ön beynin dışarıya doğru uzantısı olan sensöryel bir organdır. Ortalama ağırlığı 7.5 gr., ortalama hacmi 6.5 cc.ve spesifik yoğunluğu 1.02-1.09 kadardır (24). Vücuttaki duyu organları içerisinde en fazla bağımsız hareket yeteneğine sahip olması, göze geniş bir görme alanı, görme alanının büyük bir kısmında foveal vizyon hem uzak hem de yakın mesafe için binoküler görme özelliklerini sağlar. Bu değerli organ, dış ortama karşı orbita kemikleri ve yapısında kıkırdak dokusu da bulunan göz kapakları tarafından korunma altına alınmıştır. Bununla birlikte gözyaşı bezi, drenaj sistemi, kirpikler gibi yardımcı organları ve zengin bir damarlanma sistemi vardır. Göz ve orbita arasındaki kasların bağlanma şekilleri ve bunları çevreleyen fasyalar, gözün hareketini sağlayan ve sınırlayan mekanik özellikleri belirler. Her kasın kendine ait bir kapsülü bulunmaktadır. Kaslar, kasları saran kapsüller ve bu kapsüllerden kaslar arası bölgelere doğru olan uzantılar kas konusu denen yapıyı oluştururlar. Arkada Zinn halkasına yapışan kas konüsü, gözün arka bölümünü çepeçevre sarar. Orbita yağ dokusu ise gözün arka yüzeyi ile Zinn halkası arasında uzanır. Bu yağ yastıkçığı ve kas konüsünün içerisinde optik sinir, oftalmik arter ve ven, okülomotor sinir dalları ve silier ganglion bulunmaktadır. Göz hareketleri tarif edilirken teorik eksen ve düzlemlerden bahsedilir. Göz küresinden geçen X, Y ve Z eksenleri Fick eksenleri olarak adlandırılırlar. X eksen, ekvator hizasından göz küresini transvers olarak keser ve vertikal hareketler bu eksen etrafında gerçekleşir. Y eksen, pupillanın ortasından geçen önden arkaya uzanan sagittal eksendir ve torsiyon hareketleri bu eksen etrafında olur. Z eksen ise yukardan aşağıya uzanır ve horizontal göz hareketleri bu eksen etrafında yapılır. X ve Z eksenini içerecek gözün rotasyon merkezinden geçen, Y eksenini ise dik olarak kesen düzlem Listing düzlemi olarak adlandırılır.

Göz hareketleri oldukça karmaşık fakat çok düzenli esaslar dahilinde gerçekleşmektedir. Göz dışı kaslardan hiçbiri tek başına kontrakte olamaz. İnnervasyonel inhibisyonel impulslar eş zamanlı olarak bütün kaslara yayılırlar. Kasın glob üzerindeki yapışma yeri, optik aksla yaptığı açı ve globun orbita içindeki durumu gibi faktörlerin etkisi altında çok çeşitli göz hareketleri ortaya çıkar. Göz küresinin hareketi altı adet göz dışı kas ile sağlanmaktadır. Bunlardan dördü rektus (iç, dış, üst, alt), diğer ikisi ise oblik (üst, alt) kaslardır (24-26).

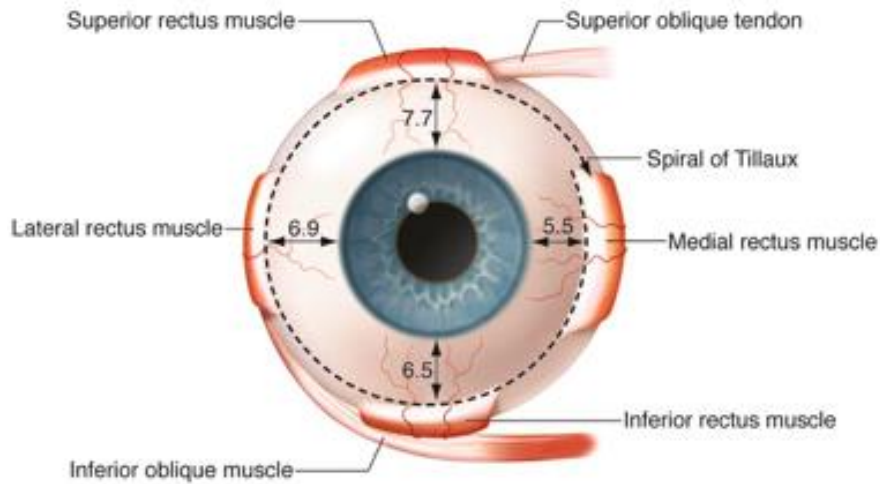


Şekil 1: Göz küresinin eksenleri ve rotasyon merkezi

2.1.EKSTRAOKÜLER KASLARIN ANATOMİSİ

2.1.1.Rektus Kasları

Rektus kasları orbitanın apeksinden köken alırlar, kasların orjinleri yaklaşık olarak sirküler bir yapıdadır ve bu bölge Zinn halkası olarak adlandırılır. Rektus kasları orbitanın önüne doğru bir kavis yaparlar ve tendinöz bir yapı aldıktan sonra skleraya sıkı bir şekilde yapışırlar. Kasların tendon uzunlukları medial rektusta 3.7 mm, lateral rektusta 8.8 mm, superior rektusta 5.8 mm, inferior rektusta ise 5.5 mm' dir. Rektus kaslarının skleraya yapışma yerleri çizgi ile birleştirilirse spiral bir şekil ortaya çıkar ve bu Tillaux spirali olarak adlandırılır (24).



Şekil 2: Tillaux spirali

2.1.1.1.İç Rektus Kası

İç rektus kası, tendon halkasının medialinden köken alır ve optik sinirin dural kılıfına yapışmıştır. Orbita medial duvarına yakın olarak ilerleyip fasyayı geçtikten sonra 3.7 mm' lik tendonu ile medial limbustan 5.5 mm geride skleraya yapışır. Fasya tarafından oluşturulan kılıfla sarılı olup bu kılıftan orbita medial duvarına medial check ligamanı uzanır. Medial rektus üstünde superior oblik kası, oftalmik arter ve dalları, nazosilier sinir altında ise orbita alt duvarı bulunur (27). Tendon uzunluğu 4.5 mm kadar olduğundan kısaltma ameliyatları geriletme ameliyatlarından daha kanlı olabilmektedir. Okülomotor sinirin alt dalı ile innerve olan iç rektus kasının kasılmasıyla addüksiyon meydana gelir.

2.1.1.2.Dış Rektus Kası

Tendon halkasının lateral kısmı ile sfenoid kemiğin büyük kanadının orbital yüzünden köken alır. Orbita lateral duvarı yakınında ilerleyerek fasyayı geçer ve 8.8 mm' lik tendonu ile lateral limbustan 6.9 mm geride skleraya yapışır. Fasya tarafından oluşturulan kılıfla sarılı olup bu kılıftan orbita duvarına lateral check ligamanı uzanır. Lateral rektusun üstünde lakrimal sinir ve arter, altında orbita alt duvarı ve medialinde abduzens sinir ile orbita yağ dokusu bulunur. İnnervasyonu orta hattın gerisinden giren abduzens sinir tarafından sağlanır. Görevi abdüksiyondur (27).

2.1.1.3.Üst Rektus Kası

Üst rektus kası, fibröz halkanın üst kısmından köken alır ve kökeni optik sinirin dural kılıfına yapışmıştır. Kas öne ve bir miktar laterale doğru ilerleyerek göz küresi fasyal kılıfını geçer. 5.8 mm uzunluğundaki bir tendon ile üst limbustan 7.7 mm geride skleraya yapışır. Superior rektus ve levator palpebra superiorun fasyal kılıfı bir bağ dokusu kılıfı ile birbirine bağlandığı için beraber hareket eder. Superior rektus kası üzerinde levator palpebra superioris, frontal sinir ve orbita üst duvarı, altında optik sinir, oftalmik arter ve nazosilier sinir bulunur. Tendonun altında superior obliğin tendonunun insersiyonu yer alır. Superior rektus kası 3. sinirin üst dalından innervasyon alır ve siniri arka ve orta üçte birlik kısımların ortasından, alt yüzden kasa girer. Aynı sinir, kasın içinden geçip levator palpebra superiorisi innerve eder (27). Kasın uyarılmaya cevabı görme eksenini ile kas düzlemi arasında 23 derecelik bir açı olması nedeni ile değişiklik gösterir. Primer bakış pozisyonu denilen gözlerin düz olarak ileriye doğru baktığı durumda iken üst rektus kası uyarılacak olursa gözde esas olarak elevasyon, ikincil olarak da intorsiyon ve addüksiyon

gözlenir. Göz 23 derece abdüksiyonda iken sadece elevasyon, 67 derece addüksiyonda (pratik olarak mümkün değildir.) iken ise sadece intorsiyon gözlenir.

2.1.1.4. Alt Rektus Kası

Tendon halkasının alt kısmından köken alır, öne ve hafif laterale doğru hareket ederek fasyayı geçer. Tendon uzunluğu 5.5 mm olup alt limbustan 6.5 mm geride skleraya yapışır. Inferior rektusta fasyadan bir kılıf edinir. Inferior rektus ve obliğin kılıfları birbirine ve gözün asıci ligamentine bağlıdır. Ayrıca alt kapağa da bir bağlantı vardır. Inferior rektus üzerinde okülomotor sinir optik sinir ve göz küresi, altında inferior oblik, orbita alt duvarı, infraorbital damarlar, sinir ve maksiller sinüs bulunur. Okülomotor sinirin inferior dalından innervasyon alır (27). Primer pozisyonda esas olarak depresyon, ikincil olarak da ekstorsiyon ve addüksiyon gözlenir. Göz 23 derece abdüksiyonda iken sadece depresyon, 67 derece addüksiyonda (teorik olarak geçerlidir.) iken ise sadece ekstorsiyon gözlenir.

2.1.2. OBLİK KASLAR

2.1.2.1. Üst Oblik Kası

Tendon halkasının hemen dışında optik foramenin medial ve üst kısmında sfenoid kemiğin gövdesinden köken alır, üst ve medial orbita duvarları arasında öne doğru seyrederek, yuvarlak bir tendon oluşturur. Tendonu frontal kemiğin oluşturduğu trokleadan geçer, bu esnada sinovyal bir kılıf edinir. Trokleadan çıktıktan sonra optik eksenle 54 derece açı yaparak aşağı, arkaya ve laterale doğru yönelir, gözün fasya kılıfından çıkar ve superior rektus kasının altından geçer. Ekvatorun gerisinde yelpaze gibi yayılarak skleraya yapışır. Kasın 1/3 distal kısmı tendondur. Superior oblik kasın üstünde orbita üst duvarı, altında ise oftalmik arter ve dalları ile nazosilier sinir bulunur. Supratroklear sinir kasın üst lateralinde kalır. Innervasyonu orijine yakın olarak üst yüzünden giren troklear sinirden olur. Superior oblik kasın birincil görevi intorsiyon, ikincil görevi ise abdüksiyon ve depresyondur. Göz 54 derece addüksiyonda iken aşağı bakış ve bir miktarda intorsiyon yaptırır. Göz abdüksiyonda iken öncelikle intorsiyon yaptırır, ikincil görevi abdüksiyondur (27).

2.1.2.2. Alt Oblik Kası

Alt oblik kası orbita tabanında lakrimal çukurcuğun yanındaki maksiller kemiğin orbital parçasına ait ön iç köşesinden orijin alır. Arkaya, dışa ve birazda yukarıya doğru orbita duvarı ile 51 derece açı yapacak şekilde ilerleyerek, alt rektusun altından geçer. Ekvatorun

gerisinde, horizontal meridyenin altında globun alt temporal kadranına yapışır. Yapışma uzunluğu 5-14 mm arasında değişir, ortalama olarak 9 mm kabul edilebilir.

Kasın yapışma yerinin ön ucu, dış rektusun yapışma yerinden geriye doğru ortalama 7-10 mm uzaklıktadır. Aktif kas uzunluğu 37 mm olup, tendon uzunluğu 1mm kadardır.

Yaklaşık 15 mm' si glob ile yakın temastadır. Alt oblik kasın makula ile de çok yakın komşuluğu vardır. Yapışma yerinin arka ucu makulanın 1 mm aşağısında ve 1-2 mm kadar önündedir. Üçüncü sinirin alt dalı ile innerve olan kasın primer pozisyonda uyarılmasıyla esas olarak ekstorsiyon, ikincil olarak da abdüksiyon ve elevasyon ortaya çıkar. Göz 51 derece addüksiyonda iken esas görev elevasyon olmakla birlikte bir miktar ekstorsiyon da yaptırır. Göz 39 derece abdüksiyonda iken ise esas görevi ekstorsiyon, ikincil olarak da abdüksiyondur (25,27,28).

2.1.3.EKSTRAOKÜLER KASLARIN KANLANMASI

Bütün ekstraoküler kaslar, oftalmik arterin medial ve lateral musküler dalları tarafından kanlanır. Lateral dal, lateral ve superior rektus ile superior oblik kas ve üst göz kapağının levator kasını besler. Medial dal ise inferior ve medial rektus ile inferior oblik kası besler. Inferior rektus kası ve inferior oblik kası ayrıca infraorbital arterden dal alırken, medial rektus kası da lakrimal arterden dal alır. Gözün ön segmentini besleyen ön siliyer arterler rektus kaslarından geçerek ve insersiyoların önünde sklerayı delerek göz küresinin içine girerler. Dış rektusta bir adet, diğer rektuslarda ise ikişer adet siliyer arter bulunur. Cerrahi ile bu damarlar kesildiğinde zamanla uzun posterior siliyer arterlerden kollateral dolaşım gelişebilmektedir. Ekstraoküler kasların venleri üst ve alt orbital venlere boşalır (29). Ekvator gerisinde yerleşen genellikle dört adet olan “vorteks” venleri vardır ve bunlar sıklıkla alt ve üst rektus kaslarının nazal ve temporal kenarlarının yakınında yer alırlar. Koroid ve irisin tüm kanını alan vorteks venlerinin dalları ışınal olarak dizilmiştir ve isimlerine uygun olarak helezonik bir görünüm oluşturmak üzere kıvrımlar yaparlar.

2.1.4.EKSTRAOKÜLER KASLARIN İNNERVASYONU

Gözün dış kaslarının innervasyonu, 3., 4. ve 6. sinirler tarafından sağlanır. Bu sinirler kavernoöz sinüsün dış yan bölümünde öne doğru ilerleyerek üst orbital fissürden orbitaya girerler. Üçüncü ve altıncı sinirler Zinn halkasının içinden geçerek kas konüsü içinde yol alırlar. Üçüncü sinir, üst ve alt olmak üzere orbita içinde iki dala ayrılır. Üst dalın bazı

lifleri direkt olarak üst rektusta sonlanırken, diğer lifleri bu kası çaprazlayarak “Levator palpebra superior” kasında sonlanırlar. Alt dal önce iç ve alt rektusa lifler verir ve sonra optik sinirin altından geçerek dış ve alt rektus arasında orbita tabanına doğru ilerleyip alt oblik kasta sonlanır. Altıncı sinir ise direkt olarak dış rektusta sonlanır. Dördüncü sinir, üst orbital fissürden orbitaya girdikten sonra orbita tavanında seyreder ve levator kasın üzerinden geçerek üst oblik kasa ulaşır (26,29).

2.2.EKSTRAOKÜLER KASLARI ÇEVRELEYEN FASYALARIN ANATOMİSİ

2.2.1.Kas Kapsülü

Gözün dış kaslarını ve onların tendonlarını çevreleyen bağ dokusundan oluşmuş yapıya perimisyum denir. Kapsülün görünüşü avasküler olup, parlak ve düz yüzeyledir, böylece kasın diğer dokular içerisinde öne ve arkaya hareketliliği sağlanır. Kapsülün iç yüzeyi, çevresel olarak sarmış olduğu vasküler özellik taşıyan kas liflerine yapışıktır. Kasa yapılan cerrahi girişimler esnasında kanama olur. Kanama kas içine olursa intramusküler hematoma meydana gelir. Kasın vasküler sisteminin bütünlüğünün sağlanabilmesi için kas kapsülünün intakt olması esastır. Ancak bazı cerrahi girişimler bunu imkansız kılar. Rektus kaslarının tendinöz bölümleri, ön silier arter ve venler hariç avasküler yapıya sahiptir, bu yüzden tendona yapılacak cerrahi girişimler kapsül içine kanamaya neden olmazlar.

2.2.2.İntermusküler Septum

Kas kapsülünden yakınındaki komşu göz dışı kaslarına doğru uzanan, ince avasküler bir doku bütün kasları birbirine bağlar. Böylelikle bütün göz dışı kaslar intermusküler septum denen bir fasya ile birbirine bağlanırlar. Bu fasya globun arkasındaki orbita yağ dokusunu, kas konusu içi ve kas konusu dışı olmak üzere iki bölüme ayırmaktadır.

2.2.3.Tenon Kapsülü

Tenon kapsülü gözü ve gözün dış kaslarını çevreleyen elastik bağ dokusundan ibaret, oldukça sıkı saydam vaskülerize, limbustan optik sinire kadar uzanan bir fasyal tabakadır. Gözün bütün dış kasları rektuslar ekvator gerisinde, oblikler ise ekvator önünde olmak üzere tenonu penetre ederler. İç yüzeye düz ve parlak olan tenon kapsülü ön ve arka olmak üzere iki bölüme ayrılır. Ön tenon kapsülü, rektus kaslarının penetrasyon yerinden limbusta kadar uzanan bölümü kapsar. Limbusta konjonktiva ile birleşir. Ön tenon kapsülü ile sklera arasında potansiyel bir boşluk mevcuttur. Limbustan yapılan cerrahi girişimlerde hemen

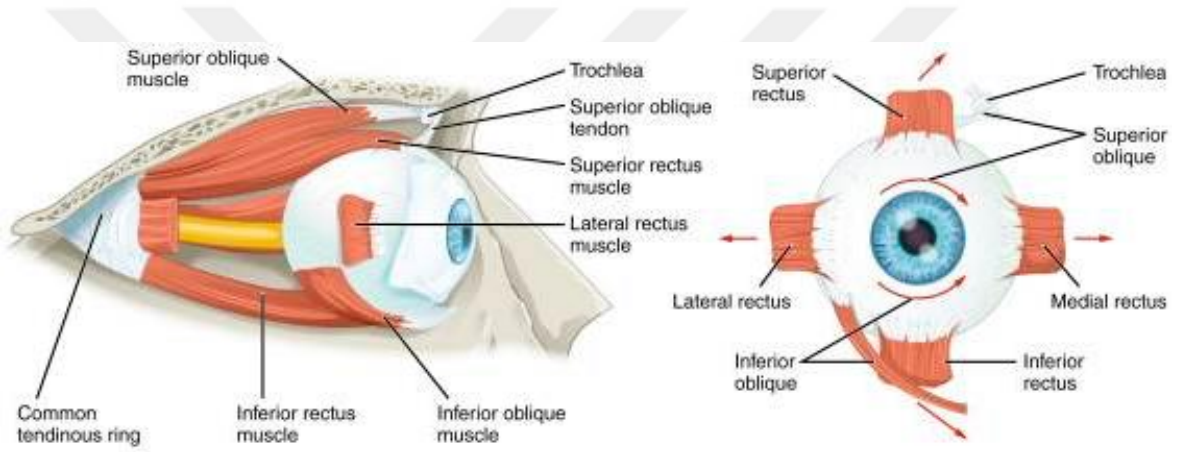
skleraya ulaşılabilirken limbustan uzak yapılarda kesilerde konjonktiva, tenon kapsülü ve intermusküler septumu ayrı ayrı kesmek ve ayırmak gerekmektedir (26).

2.2.4.Lockwood Ligamenti

Alt oblik ve alt rektus arasındaki kılıf birbiri ile birleştikten sonra yukarıya doğru uzanır. İç ve dış rektusun kas kılıfları ile altta birleşir ve bir hamak şeklini alır. Göz küresini yukarıya doğru asan bu dokuya Lockwood ligamenti denilmektedir.

2.2.5.Check Ligamentleri

Sadece iç ve dış rektusların check ligamentleri mevcut olup, iç ve dış rektusların fibröz membranlarının kasın dış yüzünden uygun orbita duvarlarına doğru yelpaze şeklinde uzanmasıyla ortaya çıkan üçgen şeklindeki yapılardır (26).



Şekil 3: Ekstraoküler kasların yandan ve önden görünümü

3.ŞAŞILIK

Strabismus terimi Yunan dilinde kayık bakmak, çapraz bakmak veya şaşılı bakmak anlamına gelen Strabismos kelimesinden türetilmiştir. Anlamı, oküler paralelliğin, binoküler tek görme bozuklukları veya oküler motilitenin nöromüsküler kontrol bozuklukları nedeniyle ortadan kalkmasıdır. Türkçe’ de şaşılık olarak isimlendirilen görme akslarının paralelliğinin bozulması supranükleer olaylar dışında gözün tüm nöromüsküler anomalilerinin en yaygın belirtisidir (30). Hasarlı gözün kaymaya yol açtığı temel alındığından, kayan gözün tesbiti önemlidir. Bu özellikle vertikal, restriktif, parolitik kaymalarda ve ifade edemeyen çocukların ambliyopisinin tanımlanmasında yardımcıdır. Farklı etnik gruplarda sıklığı değişmekle birlikte toplum içerisinde ortalama % 2-4 oranında görülür (31-34). Batı toplumlarında daha sık rastlanan şaşılık tipi ezodeviasyon (içe kayma) olup, Asya toplumlarında ise ekzodeviasyonlar (dışa kayma) daha sık olarak görülmektedir (35,36). Özellikle pediatrik yaş grubunda en sık görülen şaşılık tipleri Tablo 1' de belirtilmiştir (31).

Tablo 1: Olmsted County, Minnesota bölgesinde Ocak 1985-Aralık 1994 yılları arasında 19 yaş altı 627 hastada görülen şaşılık tipleri ve dağılımı (36)

Şaşılık Tipi	Yüzdesi
Akomodatif ezotropanya (tam veya parsiyel)	% 27,9
İntermittant ekzotropanya	% 16,9
Akkiz Non-akomodatif ezotropanya	% 10,2
Santral sinir sistemi kökenli ezotropanya	% 7,0
Konverjans yetmezliği	% 6,4
İnfanıl ezotropanya	% 4,8
Santral sinir sistemi kökenli ekzotropanya	% 4,8
Paralitik ezotropanya	% 4,0
Duyusal ezotropanya	% 4,0
Duyusal ekzotropanya	% 2,7
Dördüncü kraniyal sinir felci	% 2,1
Paralitik ekzotropanya	% 1,3
Primer alt oblik aşırı fonksiyonu	% 1,1
Brown sendromu	% 0,8
Diğer	% 3,6

Şaşılığın tedavisinde optik tedaviler, prizmalar, ortooptik egzersizler, göz damlaları, botulinum toksin uygulamaları, ambliyopi ve diplopi tedavileri cerrahi olmayan yöntemlerdir. Ancak şaşılığın yönetilmesinde cerrahi tedavinin yeri yadsınamaz. Cerrahi tedavide binoküler görmenin gelişmesini veya kurtarılmasını sağlamak temel amaçlardır. Bunun yanı sıra kozmetik, psikolojik kazanımlar da hedeflenebilir (38).



4.YARA İYİLEŞMESİ

Yara, canlı dokunun anatomik ve işlevsel bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara iyileşmesi ise hücrel ve biyokimyasal bir süreç sonunda yeni bir dokunun oluşumudur. Bu süreçte epitel, endotel, inflamatuvar hücreler, trombositler, fibroblastlar belli bir düzenle görevlerini gerçekleştirirler. Doku bütünlüğü bozulduğunda oluşan doku yanıtının bazı öğeleri vardır. Bunlar;

- 1) Koagülasyon
- 2) İnflamasyon
- 3) Fibroblast proliferasyonu
- 4) Matriks proliferasyonu
- 5) Anjiogenezis
- 6) Epitelizasyon
- 7) Kontraksiyon

Bu olaylar yara iyileşmesinin 3 farklı evresi olan inflamasyon evresi, proliferasyon evresi ve remodeling evresinde farklı işlevler görmektedir (39,40). Bu fazların her biri çok sayıda büyüme faktörünün etkisi altındadır. Bu büyüme faktörleri kemotaksis, hücre proliferasyonu, protein sentezi gibi değişik aşamalarda rol alır. Özellikle proliferasyon fazı esnasında büyüme faktörlerinin uyarımıyla selüler aktivite artışı görülür (41). Yara iyileşmesi esnasında bu faktörler değişik hücreler tarafından farklı düzeylerde salgılanır. Trombositler trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor, PDGF), transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming Growth Factor- β , TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (Insulin like Growth Factor, IGF), epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF), transforme edici büyüme faktörü alfa (Transforming Growth Factor- α , TGF- α) salgırlar. Fibroblastlar, fibroblast büyüme faktörü izomerleri (Fibroblast Growth Factor, FGF-1, FGF-2, FGF-7), insülin benzeri büyüme faktörü 1 ve 2 (IGF 1 ve 2) ile interlökin (IL), interferon ve koloni uyarıcı faktörler salgırlar (42). Kanda bulunan monositler yara iyileşmesi sırasında dokuya ulaşarak makrofajlara dönüşürler. Aktive olmuş makrofajlar yara iyileşmesi sırasında PDGF, TGF- α ve β , EGF, FGF, IGF-1, tümör nekrozis faktör (TNF), IL-1 gibi büyüme faktörlerini ve sitokinleri üretir (42,43).

4.1. Yara İyileşmesinin Evreleri

Yara iyileşmesi 3 evrede incelenir.

4.1.1. İnflamasyon Evresi

Doku yaralanması ile başlayan ve 3-5 gün süren erken dönemdir. Travmaya kan damarları vazokonstriksiyonla yanıt verir. Peşinden intravasküler hücreler damar duvarından ekstravasküler alana geçer. Burada vazoaktif maddeler önemlidir. Kanama sahasında trombositler tarafından salgılanan pıhtılaşma faktörleri sayesinde bir fibrin tıkaç oluşur. Bu fibrin ağ inflamasyon hücrelerinin göçüne zemin hazırlar. Bu ortam yara iyileşmesine temel oluşturur ve doku tamirinin ilk basamağıdır. Bu aşamada trombositler büyüme faktörleri salgılar ve büyüme faktörlerine yanıt olarak epitelyal ve endotel hücreler ve bağışıklık hücreleri travma sahasına gelirler. Yirmi dört saat içinde polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve makrofajlar bölgede hakimdir. Bu dönemde trombositlerden salgılanan büyüme faktörleri özellikle PDGF, TGF- β ve EGF gibi faktörlerdir (43).

4.1.2. Proliferasyon Evresi

Bu evrede granülasyon dokusunu oluşturmak üzere hücreler ve hücreler arası matriks elemanlarında büyük artış gözlenir. Fibroblastlar ve endotel hücreler bu evre boyunca proliferasyona uğrayan esas hücrelerdir. Makrofajlar ve perisitler ise diğer önemli hücrelerdir. Ekstraselüler matriks elemanları ise fibronektin, laminin, kollajen ve proteoglikanlardır. Kollajen başta tip III kollajen formasyonunda iken, iyileşmenin ileri aşamalarında yerini tip I kollajene terk eder. Bu evrede makrofajlar, fibroblastlar ve kan damarları yara bölgesine göç ederler. Makrofajlar aktive olur, fibroblastlar farklılaşır bölünür ve kapillerlere yataklık yapacak matriks dokusunu sentezlerler. Yeni damar oluşumu proliferasyon evresinde gözlenen önemli olaylardan biridir. Yeni damarlar dokunun ve yara bölgesinde işlev gören hücrelerin gereksinimi olan besin ve oksijeni taşır. Damar oluşumu sürecinde endotel göçü çok önemlidir. Çünkü damarlanma sadece kemotaktik ve mitojenik faktörlere bağlı olmayıp, endotel hücre göçü için uygun ortama da bağlıdır (42,43).

4.1.3. Yeniden Şekillenme Evresi

Bu evrede hem akut hem kronik inflamasyon hücreleri azalır, angiogenesis ve fibroplazi sonlanır. Hem kollajen hem de kollajenaz ve matriks metalloproteinaz üretiminin sürdürüğü bu evrede, sonuçta kollajen sentezi ve yıkımı arasında bir denge kurulur ve matür bir skar

dokusu oluşur. Bu evrede TGF- β başta olmak üzere bazı büyüme faktörlerinin düzeyi artar (44-46).

4.2.Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Büyüme Faktörleri (42)

Yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri ve sitokinler Tablo-5' te özetlenmiştir. Bunlar içinde en önemlileri şunlardır:

4.2.1.Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Trombositler ve makrofajlardan salgılanır. Tükürük, idrar, süt, plazmadan izole edilmiştir. Keratinosit ve fibroblastlar için mitojeniktir ve granülasyon dokusunun formasyonunu stimüle eder.

4.2.2.Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF)

Trombositlerde alfa granüllerde depolanır ve trombositlerde aktivasyonu ile serbestleşir. Ek olarak aktive makrofaj, endotel, düz kas hücreleri, keratinositler ve bazı tümör hücreleri tarafından üretilebilir. PMNL' ler, makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaktiktir. Fibroblastlar, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri için mitojeniktir. Anjiogenezisi ve yara kontraksiyonunu stimüle eder. İntegrin ekspresyonunu düzenler.

4.2.3.Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Makrofajlar, mast hücreleri, T lenfositler, endotel hücreleri ve fibroblastlarca salgılanır. Anjiogenezisin tüm aşamaları için gereklidir. Fibroblastlar için kemotaktik ve mitojeniktir. Keratinositler için mitojeniktir. Keratinosit migrasyonunu sağlar. Yara kontraksiyonu ve matriks oluşumunu stimüle eder.

4.2.4.Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- β)

Makrofajlar, mast hücreleri, T-lenfositler, endotel hücreleri, keratinositler, düz kas hücreleri, plateletler ve fibroblastlar tarafından salgılanır. PMNL' ler, makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaktiktir. PDGF üretim ve sekresyonunu artırır (indirekt mitojenik etki). Keratinosit migrasyonunu stimüle eder. Anjiogenezis ve fibroplaziyi stimüle eder. İntegrin ve diğer sitokinlerin ekspresyonunu düzenler ve TGF- β üretimini indükler.

4.2.5.Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Keratinositler tarafından sentezlenir. Vasküler geçirgenliği artırır, endotel hücreleri için mitojeniktir.

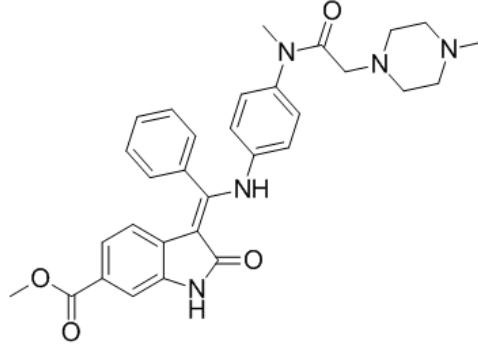
Tablo 2: Büyüme faktörleri ve sitokinlerin yara iyileşmesi üzerine etkileri (42)

Sitokinler ve Büyüme Faktörleri	Sembol	Kaynak	Görevi
Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü	PDGF	Trombosit, makrofajlar, endotel hücreler, keratinositler, düz kas hücreleri	PMNL, makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaktiktir. PMNL, makrofaj ve fibroblastları aktive eder. Fibroblast, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri için mitojeniktir. Matriks metalloproteinaz, fibronektin ve hyalüronik asit üretimini stimüle eder. Anjiogenez ve yara kontraksiyonunu stimüle eder. Yeniden şekillenme evresinde etkilidir. Trombosit agregasyonunu inhibe eder. İntegrin ekspresyonunu düzenler.
Transforme Edici Büyüme Faktörü	TGF- β	Trombosit, T-lenfosit, makrofaj, fibroblast, endotel hücreler, keratinositler, düz kas hücreleri	PMNL, makrofaj, lenfosit, fibroblast ve düz kas hücreleri için kemotaktiktir. TIMP sentezini, keratinosit migrasyonunu, anjiogenezi ve fibroplaziyi stimüle eder. Matriks metalloproteinazların üretimini ve keratinosit proliferasyonunu inhibe eder. İntegrin ve diğer sitokinlerin ekspresyonunu düzenler ve TGF- β üretimini indükler.
Epidermal Büyüme Faktörü	EGF	Trombosit, makrofajlar, tükürük, süt ve plazma	Keratinosit ve fibroblastlar için mitojeniktir. Keratinosit migrasyonu ve granülasyon dokusu formasyonunu stimüle eder.
Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa	TGF- α	Makrofajlar, T lenfositler, keratinositler ve çeşitli dokular	EGF benzeri etkiler
Fibroblast Büyüme Faktörü 1 ve 2	FGF	Makrofajlar, mast hücreleri, T-lenfositler, endotel hücreler, fibroblastlar ve çeşitli dokular	Fibroblastlar için kemotaktiktir. Fibroblastlar ve keratinositler için mitojeniktir. Keratinosit migrasyonunu, anjiogenezi, yara kontraksiyonunu ve matriks depolanmasını stimüle eder.
Keratinosit Büyüme Faktörü	KGF	Fibroblastlar	Keratinosit migrasyonu, proliferasyonu ve farklılaşmasını stimüle eder.
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü	IGF-1	Karaciğer, makrofajlar ve fibroblastlar	Sülfat proteoglikanların ve kollajenin sentezini, keratinosit migrasyonunu ve fibroblast proliferasyonunu stimüle eder. Büyüme hormonuna benzer endokrin etkileri vardır.
Bağ Dokusu Büyüme Faktörü	CTGF	Endotel hücreler ve fibroblastlar	Bazı konnektif doku hücreleri için kemotaktik ve mitojeniktir.
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü	VEGF	Keratinositler	Damar geçirgenliğini artırır, endotel hücreler için mitojeniktir.
Tümör Nekrozis Faktör	TNF	Makrofajlar, mast hücreleri ve T-lenfositler	Makrofajları aktive eder. Fibroblastlar için mitojeniktir. Anjiogenezi stimüle eder. Diğer sitokinleri düzenler.
İnterlökinler	IL-1	Makrofajlar, mast hücreleri, keratinositler, lenfositler ve bazı dokular	PMNL' ler (IL-1) ve fibroblastlar (IL-4) için kemotaktiktir. Matriks metalloproteinaz-1 sentezini (IL-1), anjiogenezisi (IL-8), TIMP sentezini (IL-6) stimüle eder ve diğer sitokinleri düzenler.
İnterferonlar	INF- α	Lenfositler ve fibroblastlar	Makrofajları aktive eder. Fibroblast proliferasyonunu ve matriks metalloproteinazların sentezini inhibe eder ve diğer sitokinleri düzenler.

5.ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN AJANLARIN ÖZELLİKLERİ

5.1.NINTEDANİB

BIBF 1120 koduyla geliştirilen, FGFR-1 (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü)' in ve VEGFR-2 (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü)' nin ATP (adenozin trifosfat) yarışmalı inhibitörü olarak tasarlanan küçük bir moleküldür. Tüm bu reseptörler proanjyogenik reseptör tirozin kinazlarıdır ve nintedanib kanser tedavisinde antianjyogenik olarak dizayn edilmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolorektal kanser ve ovaryan kanseri içeren kanser tedavilerinde nintedanibin etkinlik çalışmaları devam etmektedir. Nintedanib aynı zamanda PDGFR (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü)- α ve β 'yi da inhibe etmesi nedeniyle idiyopatik pulmoner fibrozis tedavisinde etkili bir ajan olarak geliştirilmek için seçilmiştir (21).

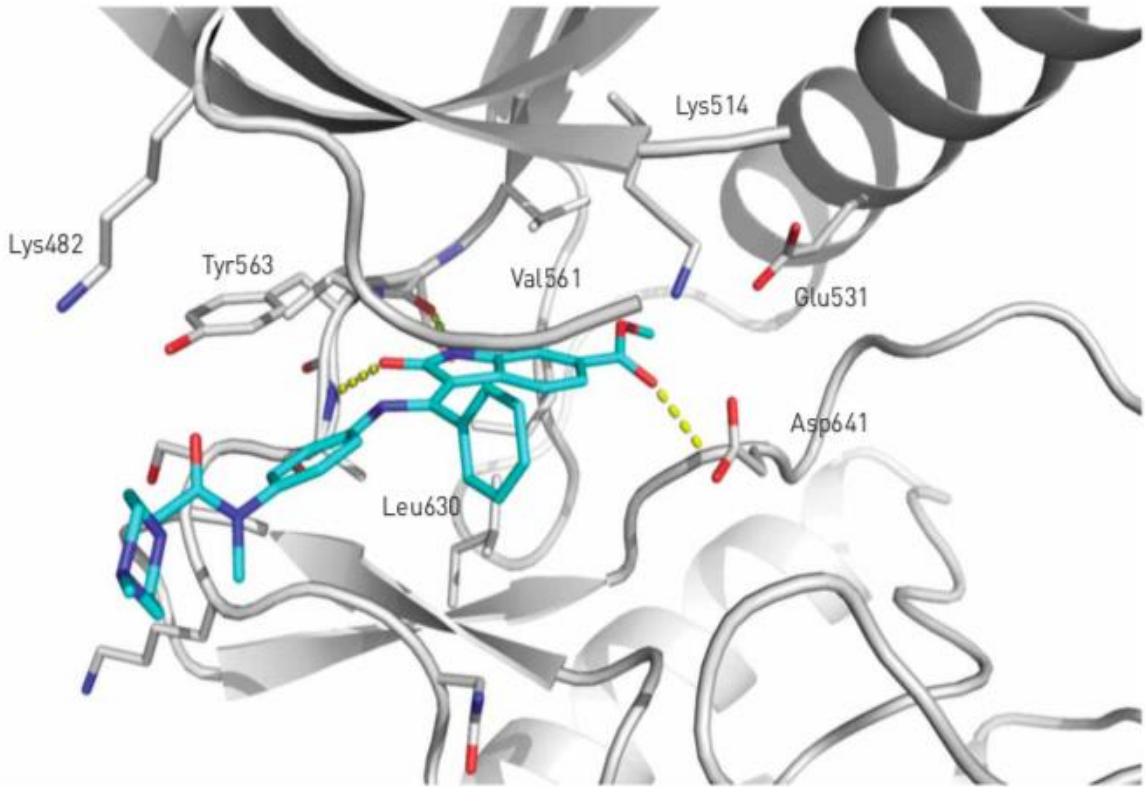


Şekil 4: Nintedanibin kimyasal yapısı

Nintedanib, spesifik tirozin kinazların intraselüler ATP bağlayan ceplerini doldurarak kinaz aktivitesini bloke eder. Bağlanma özelliği FGFR-1 ve VEGFR-2 için araştırılmıştır. Nintedanib, sırasıyla 59 and 65 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC_{50} (maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı) değerlerinde reseptör tirozin kinazlar PDGFR- α ve β 'nin inhibitörüdür. Nintedanib, sırasıyla 69, 37, 108 and 610 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC_{50} değerlerinde FGFR-1, 2, 3, ve 4'ü; sırasıyla 34, 21, 13 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC_{50} değerlerinde VEGFR-1, 2 ve 3'ü inhibe eder. Nintedanib, 26 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC_{50} değerinde FMS-benzeri tirozin kinaz-3 (Flt-3)'ü de inhibe eder. Flt-3 birçok hematopoetik progenitör hücrenin yüzeyinde eksprese edilir ve hematopoezde önemli rol oynamaktadır (21).

Nintedanib aynı zamanda Src ailesinin nonreseptör tirozin kinazlarını; 156 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC_{50} değerinde Src'yi, 16 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC_{50} değerinde Lck'yi ve 195 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IC_{50} değerinde

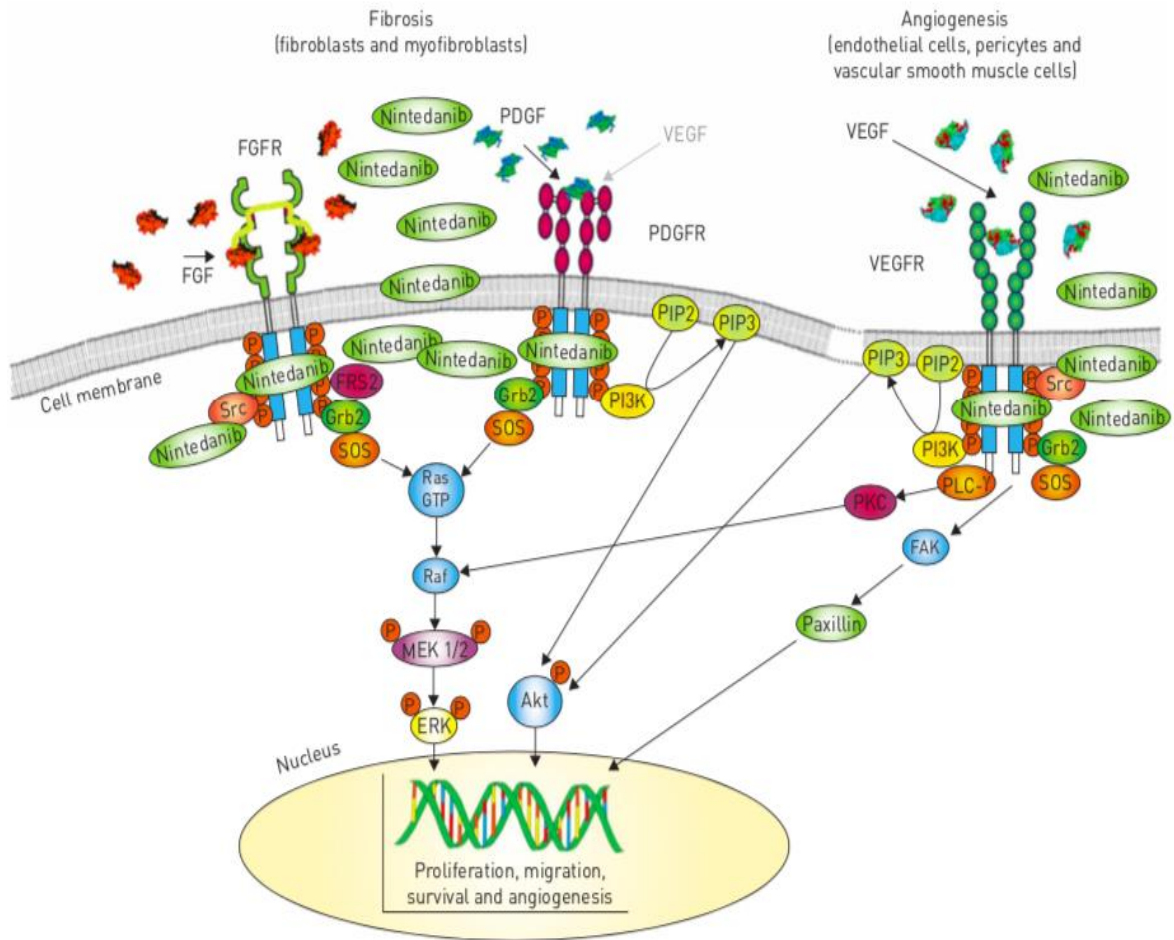
Lyn' yi inhibe eder (21). Src içinde proliferasyon, diferensiasyon, motilite ve adezyonun sayılabileceği birden fazla selüler olayın kontrolünde etkindir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada nintedanibin bleomisin ile oluşturulmuş akciğer fibrozisi modelinde ve insan akciğer fibroblastlarında antifibrotik etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (22). Lck, T hücre reseptörü aracılıklı T hücre aktivasyonu için ve olasılıkla T hücre sağkalımı için gereklidir. Lyn, B hücre antijen reseptör sinyal yolunda hem pozitif hem de negatif etkiye sahiptir. B hücre antijen reseptör sinyalinin başlamasında ve B hücre proliferasyonunda rol oynamaktadır.



Şekil 5: Fibroblast büyüme faktör reseptörü-1' in kinaz alanının aktif bölgesine bağlanmış nintedanibin kristal yapısı. Sarı noktalar hidrojen bağlarını göstermektedir.

Nintedanib, idiyopatik pulmoner fibrozis tedavisi için geniş çapta klinik araştırmalarda değerlendirilmiş oral uygulanan tirozin kinaz inhibitörü küçük bir moleküldür. Nintedanibin PDGF ve VEGF reseptörleri üzerine ve Src gibi nonreseptör kinazlar üzerine polifarmakolojisi, fibroblastların ve miyofibroblastların sinyal yollarında ve ek olarak akciğerde anjiyogenezde etkili hücrelerde geniş inhibitör etkiye sahip olmasına neden olmaktadır. Nintedanib insan akciğer fibroblastlarının proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde potent inhibitör aktivite göstermiştir. Ek olarak, daha yüksek dozlarda

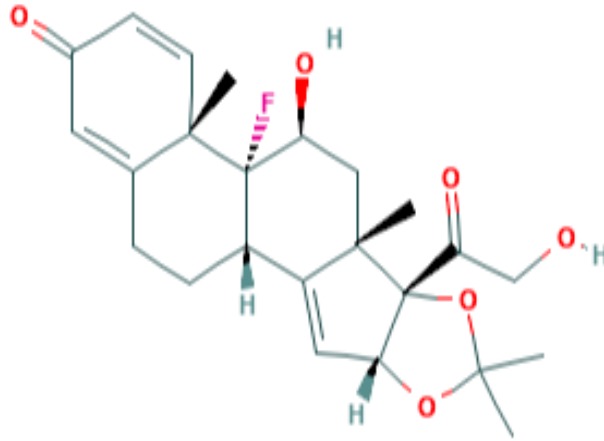
fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını ve ekstraselüler matris depolanımını azaltmıştır. Nintedanib, idiyopatik pulmoner fibrozis patogeneğinde ana faktörler olan PDGF, FGF ve VEGF yollarında etki eder (20). Tüm hüresel aktiviteleri, stimulan bağımsız bir şekilde akciğer fibrozis hayvan modellerinde sabit antifibrotik ve antiinflamatuvar aktivite göstermesini sağlamaktadır. Xianchai Lin ve arkadaşlarının insan tenon fibroblastları üzerinde yaptığı in vitro çalışmada nintedanibin fibrozis ve skar oluşumu sırasında temel olaylar olan hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu, fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını ve 3D kollajen jel kontraksiyonunu inhibe ederek insan tenon fibroblastlarında güçlü antifibrotik etkinlik gösterdiği kanıtlanmıştır. Yine bu çalışmada nintedanibin TGF- β ' nın klasik Smad 2/3 sinyal kaskadının ve klasik olmayan p38MAPK ve ERK 1/2 yollarının fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (23).



Şekil 6: Nintedanibin polifarmakolojisi ve sinyal yolları

5.2. TRIAMSİNOLON ASETONİD

Triamsinolon asetonid, antiinflamatuvar ve immünsüpresör özellikleri nedeniyle tedavi amaçlı geniş alanda kullanılan bir glukokortikosteroiddir (47). Kortizonun 4 ya da 5 katı kadar potent bir steroiddir. Oftalmolojide şalazyon ve kapak hemanjiomlarında lezyon içine uygulansa da esas olarak akut ve kronik anterior ya da posterior üveitlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Fibroblastlar üzerinde inhibitör etkileri mevcuttur (48). Reaktif skar oluşumunu azaltır (49). Kortikosteroidler, inflamasyon ve fibrozisi azaltmak amaçlı şaşılık cerrahileri sonrasında kullanılmaktadır. Triamsinolon asetonid aköz solüsyonlarda zayıf çözünür ve enjeksiyon alanında 6-8 hafta arasında etki gösterebilmektedir (50). Beyaz bir plak şeklinde görülebilmesi, enjeksiyon sırasında ilacın yerleşiminin kontrol edilebilmesini sağlamaktadır. Vitreoproliferatif retinopati geliştirilmiş tavşan deneyi modelinde neovasküler ve fibroproliferatif olayları önlediği gösterilmiştir (50). 2007 yılında yapılmış bir çalışmada ise tavşanlarda oluşturulmuş şaşılık cerrahisi modelinde inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (51). Çalışmamızda triamsinolon asetonidin tek seferlik uygulanıp uzun etkiye sahip olması nedeniyle pratik uygulamasının yanı sıra antiinflamatuvar ve antifibrotik etkinliği sayesinde şaşılık cerrahisi sonrası gelişebilecek inflamasyon ve adezyonu önlemede etkili olabileceğini düşündüğümüz için triamsinolon asetonid deney grubu oluşturulmuştur.



Şekil 7: Triamsinolon asetonidin kimyasal yapısı

6.GEREÇ VE YÖNTEM

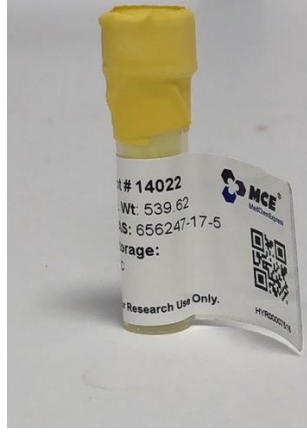
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu' nun onayı ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Kurulu' nun izni ile başlanan çalışma Bursa, Aykut Bolu Deneysel Hayvan Üretim ve Tedarik Merkezi tarafından yetiştirilen ve Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi' nde bakımı yapılan 32 Yeni Zelanda albino tavşanı ile yapıldı. Proje kodu: 2019/029 olan bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi fonu tarafından desteklendi.

Bu çalışmaya 32 adet tavşanın 32 gözü dahil edilmiştir. Tavşanların 11 tanesi erkek, 21 tanesi dişi olup, yaşları 15 ile 20 hafta ve ağırlıkları 2500 gr ile 4000 gr (ortalama 3500 gr) arasında değişmekteydi. Tavşanların tümü anatomik olarak sağlam gözlere sahipti. Tavşanlar rastgele seçildi. Bütün tavşanlara 1 ile 32 arasında numara verildi ve kulakları numaralandırıldı. Sağ gözler çalışma gruplarına, sol gözler ise işlem uygulanmayan kontrol grubuna alındı. Tavşanlardan random olarak 5 grup oluşturuldu. Çalışma grubu olarak triamsinolon asetonid ve 1 µM, 5 µM, 10 µM dozlarında nintedanib kullanılan ve her biri 6 göz içeren 4 grup oluşturuldu. Sahte deney grubu olarak bilinen sham grubunda sadece serum fizyolojik (SF) kullanıldı. Sham grubuna 8 tavşanın 8 gözü dahil edildi. Kontrol grubu olarak işlem uygulanmayan sol gözler kullanıldı.

6.1.İlaçların Hazırlanışı

6.1.1. Nintedanibin Hazırlanışı

MedChemExpress firmasından elde edilen nintedanib 50 mg toz kullanıldı. Gerekli olan nintedanib miktarı hassas terazi (Shimadzu, Japonya) ile tartıldı ve DMSO (Dimetilsülfoksit) (SantaCruz, Amerika) içinde çözülerek 1 mM' lık stok nintedanib solüsyonu hazırlandı. Elde edilen stok solüsyondan 1 µM, 5 µM ve 10 µM' lık çalışma solüsyonları hazırlandı ve steril flakonlara koyularak cerrahi sahaya taşındı. Toz halindeki nintedanibden çalışma solüsyonlarının hazırlanması ve cerrahi işlemlerin uygulanması aynı gün içinde yapıldı. Toz halindeki nintedanib saklama koşullarına uygun olarak +4 °C' de saklandı. Şaşılık cerrahisi gerçekleştirildikten hemen sonra ve postoperatif 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerde 0,1 ml subkonjonktival perimüsküler enjeksiyon şeklinde uygulandı.



Şekil 8: Nintedanib 50 mg toz

6.1.2. Triamsinolon Asetonidin Hazırlanışı

DEVA firmasından elde edilen Kenacort-A 40 mg/ml ampul kullanıldı. Herhangi bir işlem uygulanmadan direkt ppd enjektörüne çekildi ve steril olarak cerrahi sahaya taşındı. Şaşılık cerrahisi gerçekleştirildikten hemen sonra 0,1 ml (4 mg) subkonjonktival perimüsküler enjeksiyon şeklinde tek seferlik uygulandı.



Şekil 9: Kenacort-A 40 mg ampul

6.1.3. Serum Fizyolojik

Herhangi bir işlem uygulanmadan direkt ppd enjektörüne çekildi ve steril olarak cerrahi sahaya taşındı. Sham grubunda şaşılık cerrahisi gerçekleştirildikten hemen sonra ve postoperatif 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerde 0,1 ml subkonjonktival perimüsküler enjeksiyon şeklinde uygulandı.

Tablo 3: Hayvanlara uygulanan tedavi şekli

GRUP	TEDAVİ
SERUM FİZYOLOJİK	0.1 ml, cerrahi gerçekleştirildikten hemen sonra ve postoperatif 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerde subkonjonktival enjeksiyon
TRİAMSİNOLON ASETONİD	0.1 ml, cerrahi gerçekleştirildikten hemen sonra 4 mg (40 mg/ml) subkonjonktival enjeksiyon
1 µM NİNTEDANİB	0.1 ml, cerrahi gerçekleştirildikten hemen sonra ve postoperatif 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerde subkonjonktival enjeksiyon
5 µM NİNTEDANİB	0.1 ml, cerrahi gerçekleştirildikten hemen sonra ve postoperatif 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerde subkonjonktival enjeksiyon
10 µM NİNTEDANİB	0.1 ml, cerrahi gerçekleştirildikten hemen sonra ve postoperatif 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerde subkonjonktival enjeksiyon

6.2.Cerrahi Öncesi Hazırlık

Operasyondan önce tavşanlar 6 saat süreyle aç bırakıldılar. Tavşanlara ketamin hidroklorid 40 mg/kg ve xylazine hidroklorid 5 mg/kg intramusküler yapılarak anestezi sağlandı. Tavşanlar operasyon masasına yan yatırılarak başa pozisyon verildi. Peroperatif cerrahi antisepsis, betadine (povidone iyodin % 10) solüsyonu steril spanç yardımı ile kapaklara ve konjonktivaya uygulanarak elde edildi. Cerrahi sahaya 20 cm x 15 cm boyutlarında steril drape örtüldükten sonra göz kapak aralığına uyan bölge makasla kesildi. Blefarosta yardımıyla göz kapaklarının ekartasyonu sağlandı. Oküler yüzey topikal proparakain (Alcaine, Alcon) yardımıyla anestetize edildi. Ameliyata başlamadan önce kanamayı azaltmak üzere %2,5'lik fenilefrin göz damlası (mydfrin) tek seferlik damlatıldı.

6.3.Cerrahi Yaklaşım

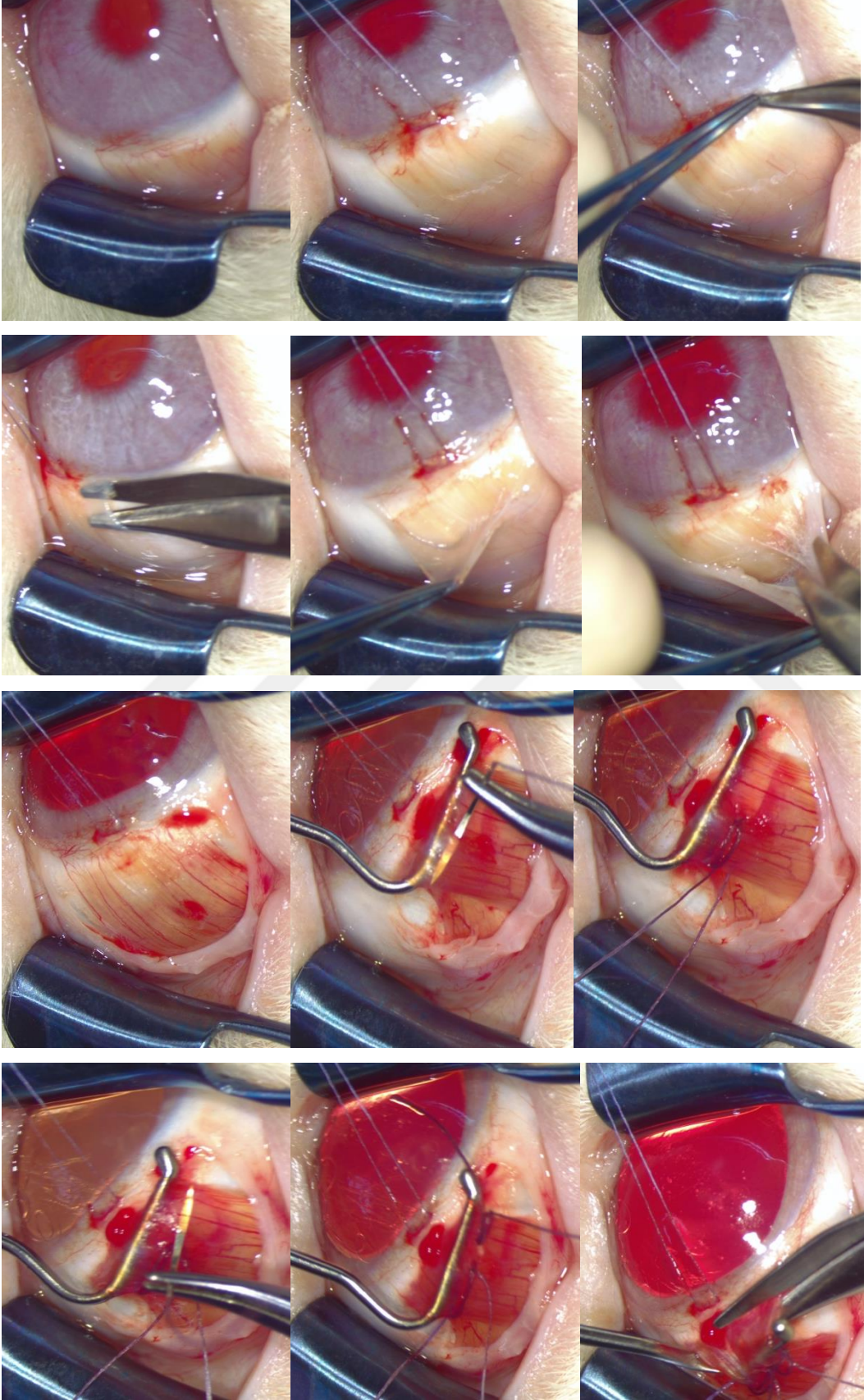
Tüm cerrahi işlemler tek bir cerrah tarafından tüm gruplarda aynı prosedür ile gerçekleştirildi. Bütün gruplarda üst rektus kasında çalışıldı. Üst limbal konjonktival insizyonu takiben Westcott makası ile künt diseksiyon yapılarak üst rektus kası ekspoze edildi. Superior konjonktiva ve tenon kapsülü açıldıktan sonra intermusküler membranlar Westcott makası ile diseke edildi, eküvyon çubuğu ve kas hooku ile üst rektus kası etrafındaki dokulardan izole edildi. Üst rektus kasının insersiyosunun 1 mm gerisine kastan önce lameller sonra penetran geçecek şekilde çift iğneli 6/0 vikril (Ethicon) suture konuldu,

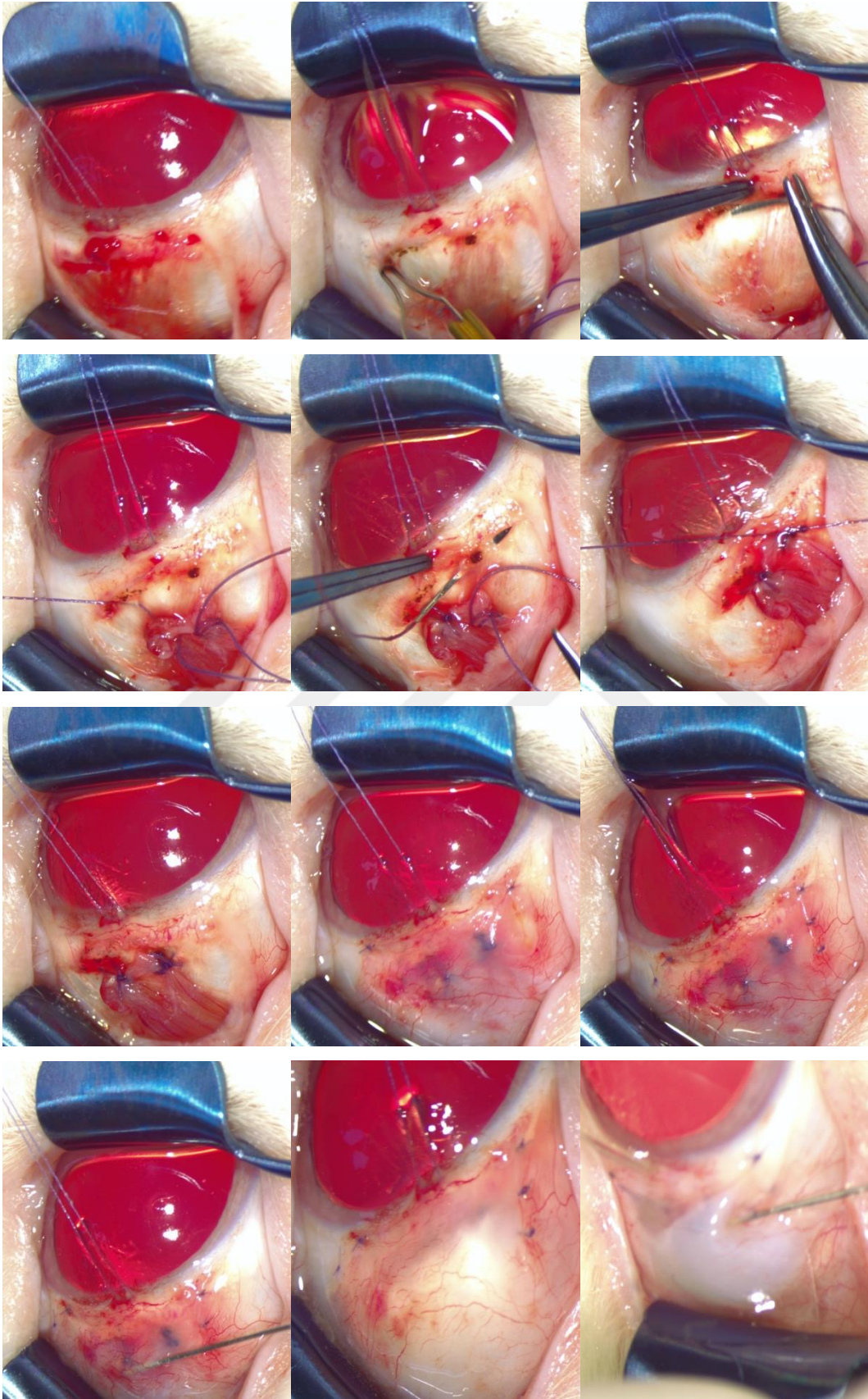
iki yanlarda kilitlendikten sonra kas insersiyon bölgesinden kesilerek ayrıldı. Kanama kontrolü ve inflamasyonun şiddetini arttırmak için skleral yatağın 1 cm²' sine koter uygulandı. Kas tekrar orijinal insersiyon yerindeki skleraya suture edildi. Konjonktiva orijinal anatomik yerine 8/0 vikril (Ethicon) suture ile suture edildi. Cerrahi sonlandırıldı. Kas insersiyosunun üzerindeki subkonjonktival bölgeye 30 gauge enjektör ile girilerek ajan 20 saniye boyunca yavaşça enjekte edildi.

Bütün gruplarda postoperatif sürede enfeksiyon oluşumunun önlenmesi amacıyla ilk 7 gün boyunca topikal moksifloksasin (Vigamox-Alcon) damla 3x1 dozunda kullanıldı.

28. gün sonunda deneklere ötenazi uygulandı. Üst rektus kasının bulunduğu alana tanınmasını kolaylaştırmak amacıyla konjonktival suture yerleştirildi. Ötenazi sonrası deneklerden alınan doku bloğu histopatolojik ve immünohistokimyasal işlemler için histoloji laboratuvarına teslim edildi. Doku spesimeni; üzerindeki ve kendisini saran tenon kapsülü, konjonktivası ve sklerası ile birlikte sağlam üst rektus kası bloğu içeriyordu. Bu blok önde limbustan başlayıp 12 mm arkaya kadar, her iki tarafta saat 3 ve 9 kadrantları arasına uzandırıldı.

Şekil 10: Cerrahi İşlemin Basamakları





6.4. Patolojik İnceleme

Sakrifiye edilen tavşanların gözlerinden doku bloğu alındıktan sonra üst rektus kası ve çevre dokusu %10'luk nötral tamponlanmış formalin solüsyonu içerisine koyuldu ve 48 saat boyunca immersiyon yöntemiyle fiksasyonu sağlandı. Akan çeşme suyunda yıkama işleminin ardından dokular, kademeli olarak artan etil alkol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96, %100) (Merck) geçirilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi. 30 dakika (dk) toluen (Merck) ile şeffaflandırma işlemi takiben dokular 58 °C' lik etüvde 30 dk boyunca 1:1 oranında hazırlanmış toluen-parafin karışımında bekletildi. Ardından saf parafin içerisinde 2 saat kadar tutulan dokular, oda sıcaklığında parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica SM 2000R) ile 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Tüm seri kesitler sklera, üst rektus kası, tenon kapsülü ve konjonktivayı içerecek şekilde hazırlandı. Kesitlerin boyanmasına cerrahi uygulanan üst rektus kasının insersiyosundan başlandı. Alınan kesitlere, morfolojik incelemeler, adezyon ve inflamasyonu belirlemek için Hematoksilen & Eozin (H&E) boyaması yapılırken, kollajen yoğunluğunu göstermek için Masson trikrom (MT) boyamaları yapıldı. İmmünohistokimyasal inceleme için MMP-2 (matrix metalloproteinase-2), TGF-β ve α-sma (alpha-smooth muscle actin) ekspresyonlarına bakıldı. Boyanan tüm kesitler Leica DM 1000 model ışık mikroskobu ile incelendi.

6.4.1.Histopatolojik İnceleme

Hematoksilen&Eozin (H&E) Boyaması:

58 °C' lik etüvde deparafinize edilen kesitler toluen içerisine alınarak parafinden iyice arındırıldı. Ardından, kademeli olarak azalan etil alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70) geçirilen kesitler distile suya kadar indirgenerek rehidrasyon işlemi sağlandı. Mayer hematoksilen ile 5 dk boyanmanın ardından 2 kez distile su ile yıkanan kesitler 10-15 saniye bluing reagent ile inkübe edildi. 2 kez distile sudan geçirilen örnekler absolute etanole daldırıldı. Daha sonra 2-3 dk Eosin Y (modifiye alkolik) solüsyonunda inkübe edilen kesitler absolute alkolde yıkanarak dehidre edildi. Son olarak toluende yaklaşık 30 dk bekletilen dokular Entellan aracılığıyla lamel ile kapatıldı. Konjonktival inflamasyon ve vaskülarizasyon skorlaması için Kassem RR ve arkadaşlarının skorlama sistemi (Kassem RR ve ark, 2013) referans alınmıştır (2, 55).

Masson Trikrom (MT) Boyamaları:

H&E metodunda olduğu gibi distile suya indirgenen kesitler eşit hacimde Weigert A ve Weigert B karışımından oluşan solüsyonun içerisinde 5 dk inkübe edildikten sonra 2 dk çeşme suyu ile yıkandı. Distile sudan geçirilen kesitler asit fuksin solüsyonunda 15 dk bekletildikten sonra distile su ile yıkandı. Ardından kesitler fosfotungustik asit ile 15 dk diferensiyeye edildi ve yıkama işlemi olmadan 5-10 dk süreyle Anilin blue solüsyonuna alındı. Distile su ile yıkamanın ardından asetik asit solüsyonunda 3-5 dk bekletilen kesitler hızlıca iki kez %96 alkolden ve ardından %100 alkolden geçirilerek dehidre edilen kesitler toluen içerisine alındı. Son olarak entellan ile kapama işlemi gerçekleştirildi. Üst rektus kası fibrozisi ve perimüsküler fibrozis Kassem ve arkadaşları referans alınarak skorlanırken (2, 55); adezyon Chun BY ve Rhiu S, 2017 baz alınarak skorlanmıştır (56).

Tablo 4: Chun BY ve Rhiu S skorlama sistemi (56)

Adezyon	0: Fibrozis yok
	1: Sklera ve üst rektus kası arasında fibröz doku varlığı
	2: Sklera ve üst rektus kası arasında fibröz doku varlığı + üst rektus kas lifleri arasında fibröz septa varlığı
	3: Sklera ve üst rektus kası arasında fibröz doku varlığı + üst rektus kas lifleri arasında fibröz septa varlığı + Tenon kapsülü ve subkonjonktival alana fibröz doku ekspansiyonu

Tablo 5: Kassem RR ve arkadaşlarının skorlama sistemi (2, 55)

Konjonktival inflamasyon	0: İnflamasyon yok
	1: Epitelyum altında az miktarda lenfosit ve plazma hücresi
	2: Epitelyum altında lenfositlerden, plazma hücrelerinden ve polimorfonükleer lökositlerden oluşan hafif derecede inflamatuvar infiltrat ve konjesyon
	3: Grad 2 + epitelyumda nötrofiller
	4: Hem intraepitelyal hem de subepitelyal lenfositler, plazma hücreleri, polimorfonükleer lökositler ve histiyositlerden oluşan yüksek derecede koleksiyon ve ülserasyon

Skleral inflamasyon	0: Yok
	1: Var
Konjonktival vaskülarite	0: Beyaz avasküler konjonktiva
	1: Bir miktar avaskülarite
	2: Normal vaskülarite
	3: Mevcut inflamasyonun göstergesi olan hafif derecede artmış vaskülarite
	4: Orta derecede artmış vaskülarite
5: Ciddi derecede artmış vaskülarite	
Rektus Kas Fibrozisi	0: Yok
	1: Var
Perimüsküler Fibrozis (Masson Trikrom Boyama)	0: Fibrozis yok
	1: Hafif derecede perimüsküler fibrotik reaksiyon (Hemen kas komşuluğunda sadece ince bantlar şeklinde kollajen boyanır.)
	2: Kolay görülebilen kalın bantlar
	3: Tam oluşmuş yoğun kollajen bantları
4: Büyük alanları dolduran ciddi fibrotik yanıt	

6.4.2.İmmünohistokimyasal boyama

Parafin bloklardan polilizinli lamalar üzerine alınan 4 µm'lik kesitlerin 1 gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve toluende 3' er kez 5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Ardından, sırasıyla 2x5 dk 100° alkolde, 1x5 dk 96° alkolde, 1x5 dk 90° alkolde, 1x5 dk 70° alkolde ve son olarak 2x5 dk distile su içinde bekletildi. Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS)-Tx solüsyonu içerisinde 5 dakika bekletilen kesitler antijen retrieval işlemi için sitrik asit solüsyonuna alınarak mikrodalgada 10 dk kaynatıldı ve soğuması için 20 dk bekletildi. Hidrofobik bir havuz oluşturmak amacıyla Pap-pen ile çevrelenen kesitlere endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için H₂O₂ solüsyonu (ab64264, Abcam) damlatılarak 10 dk bekletildi. Ardından PBS' de yıkanan kesitlere, özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere protein blok solüsyonu (ab64264, Abcam) 10 dk süre ile uygulandı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere ayrı ayrı MMP-2 (ab2462, Abcam, 1:200 dilüsyon oranı) (Yonghua B. ve ark., 2018), TGF-β (ab190503, Abcam, 1:200) (Seok J. Ve ark., 2018) ve α-sma (ab7817, Abcam, 1/50 dilüsyon oranı) (Wang P. Ve ark., 2017) primer

antikorları damlatıldı ve +4 °C' de 1 gece/overnight bekletildi. PBS ile yıkanan doku kesitleri biyotinli goat antipolyvalent solüsyonu (ab64264, Abcam) ile 10 dakika inkübe edildikten sonra tekrar PBS ile yıkandı ve streptavidin peroksidaz solüsyonu (ab64264, Abcam) kesitler üzerine eklendi. 10 dakikalık inkübasyonun ardından PBS'ten geçirilen kesitlerde MMP-2, TGF- β ve α -sma ekspresyonunun olduğu bölgeler diaminobenzidin (DAB) adı verilen kromojen ile kahverengi renkte gözlemlendi. Mayer hematoksilen (ab128990, Abcam) ile zıt boyama yapılan dokular dehidrasyon işleminin ardından (artan alkol serilerinden geçirilerek) toluen içerisine alındı ve Entellan (Merck) ile lamel yardımıyla kapatıldı.



7. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Nitel bağımsız verilerin analizinde Ki-kare test, Ki-kare test koşulları sağlanmadığında Fischer test kullanıldı. Analizlerde SPSS 22.0 programı kullanılmıştır. İki yönlü hipotezlerin testinde $p < 0.05$ istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edildi.



8.BULGULAR

Sham grubuna ait 2 tavşan cerrahi sırasında anestezi nedenli öldü ve çalışmadan çıkarıldı. Geriye kalan 30 tavşan sağlıklı görünmüş ve normal şekilde beslenmiştir. Tüm tavşanlar orbita içindeki değişiklikler için günlük takip edilmiştir. Cerrahi sahada çoğunlukla konjonktival hiperemi saptanmıştır. Bunun yanı sıra, tedavi uygulanan gözlerde herhangi bir önemsenecek oküler, perioküler ya da orbital değişiklik saptanmamıştır. Hiçbir tavşanda sistemik toksisite bulgusu saptanmamıştır. Hiçbir tavşanda operasyon nedenli preoperatif ve postoperatif bir komplikasyon gelişimi görülmemiştir.

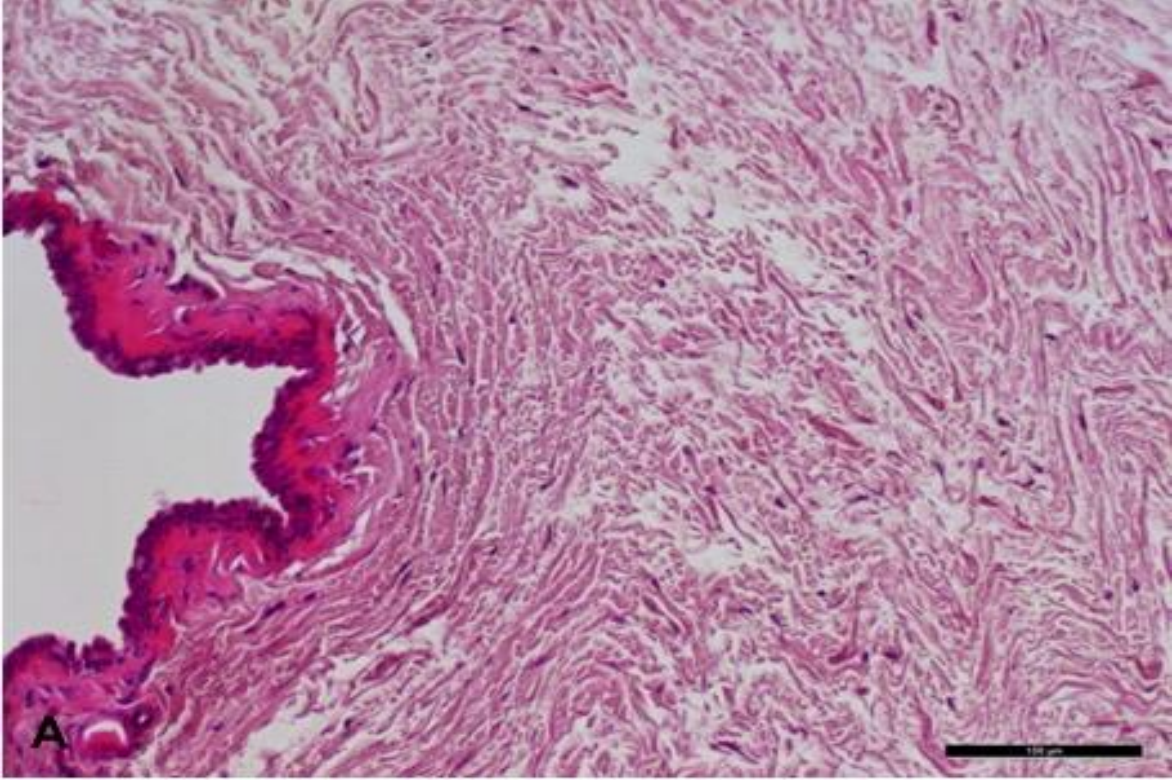
8.1.HİSTOPATOLOJİK İNCELEME BULGULARI

Konjonktiva, superior rektus kası ve sklera tabakası çıkarılmış tavşanların H&E ile boyanmış kesitleri incelendiğinde; kontrol grubunda genel olarak sağlıklı bir morfoloji gözlemlenmekle birlikte bazı örneklerde hafif miktarda inflamasyon da tespit edilmiştir (Şekil 11). Vaskülarizasyonda artış, şiddetli inflamasyon ya da fibrozis görülmemiştir. Sham grubunda ise konjonktival epitelde dökülmeler (Şekil 12A), subkonjonktival tabakada ödem (Şekil 12B), artan vaskülarizasyon ve şiddetli inflamasyon tespit edilmiştir (Şekil 13-14). İnflamasyonu oluşturan hücrelerin daha çok lenfositlerden ve nötrofillerden oluştuğu görülmüştür (Şekil 13B). Yine bu grupta bazı örneklerde sütür materyalinin etrafında lökositik infiltrasyon (Şekil 14), yabancı cisim inflamasyonu/yabancı cisim dev hücre inflamasyonu (Şekil 15) ve skleral deformasyon görülmüştür. 1 µM nintedanib grubuna bakıldığında ise sham grubuna kıyasla vaskülarizasyon ve inflamasyon derecesinin azaldığı ancak halen devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 16). 5 µM nintedanib grubu incelendiğinde ise vaskülarizasyon, inflamasyon ve ödemin sham grubuna göre oldukça azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 17). Konjonktival epitel de süreklilik göstermektedir. 10 µM nintedanib grubuna bakıldığında ise vaskülarizasyon, inflamasyon ve genel morfoloji açısından diğer tedavi gruplarına göre daha iyi sonuç verdiği; sham grubuna göre ise oldukça büyük bir iyileşme gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 18). Triamsinolon asetonid grubu incelendiğinde ise sham grubuna göre inflamasyon ve vaskülarizasyonun azalmakla birlikte ödemin devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 19).

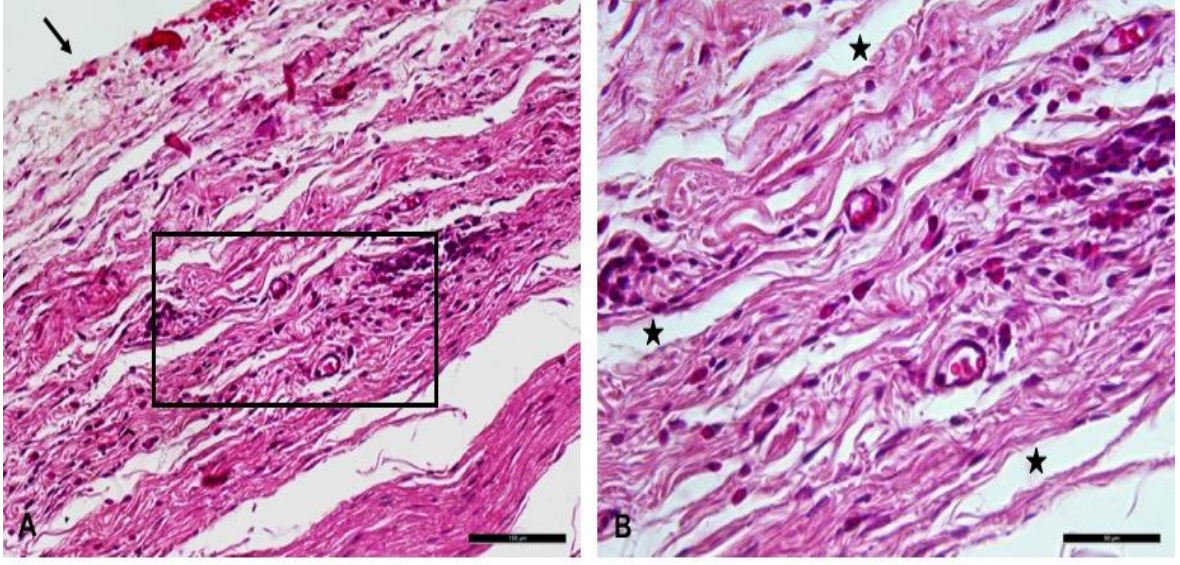
Sham grubunda konjonktival inflamasyon derecesi kontrol grubundan, 1 mikromol nintedanib grubundan, 5 mikromol nintedanib grubundan, 10 mikromol nintedanib grubundan, triamsinolon asetonid grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Kontrol grubu, 1 mikromol nintedanib grubu, 5 mikromol nintedanib grubu, 10 mikromol

nintedanib grubu, triamsinolon asetonid grupları arasında konjonktival inflamasyon derecesi anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. (Tablo 6) (Şekil 20)

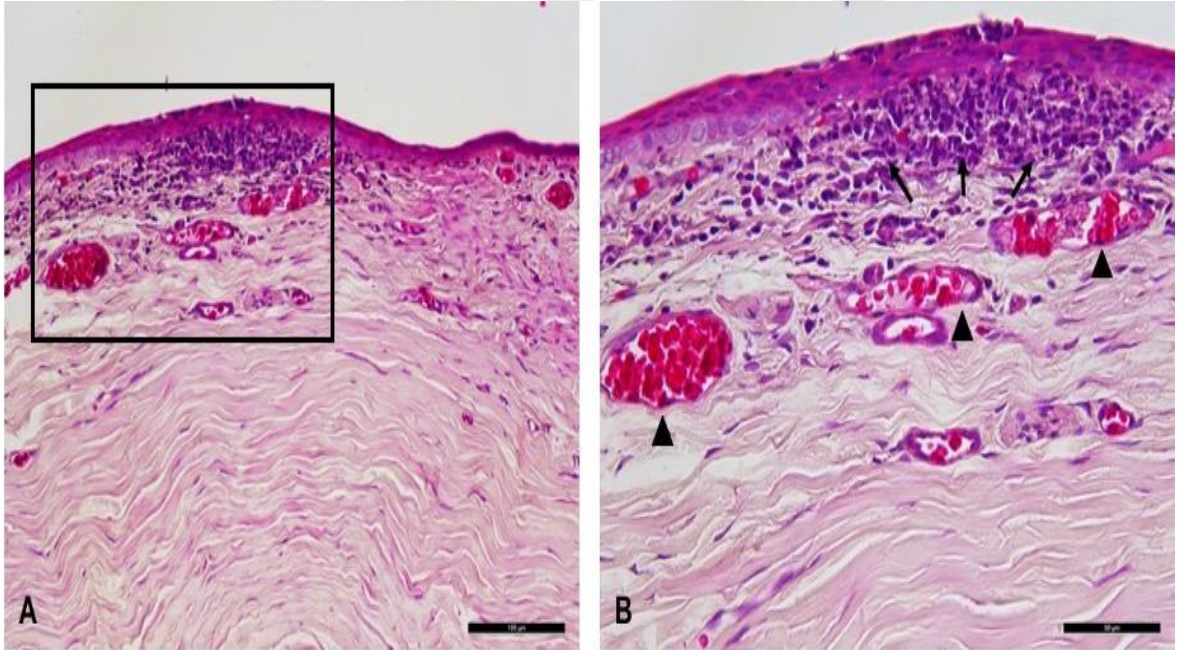
Sham grubunda konjonktival vaskülarite derecesi kontrol grubundan, 10 mikromol nintedanib grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubunda konjonktival vaskülarite derecesi 1 mikromol nintedanib grubundan, 5 mikromol nintedanib grubundan, triamsinolon asetonid grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. Kontrol grubu, 1 mikromol nintedanib grubu, 5 mikromol nintedanib grubu, 10 mikromol nintedanib grubu, triamsinolon asetonid grupları arasında konjonktival vaskülarite derecesi anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. (Tablo 6) (Şekil 21)



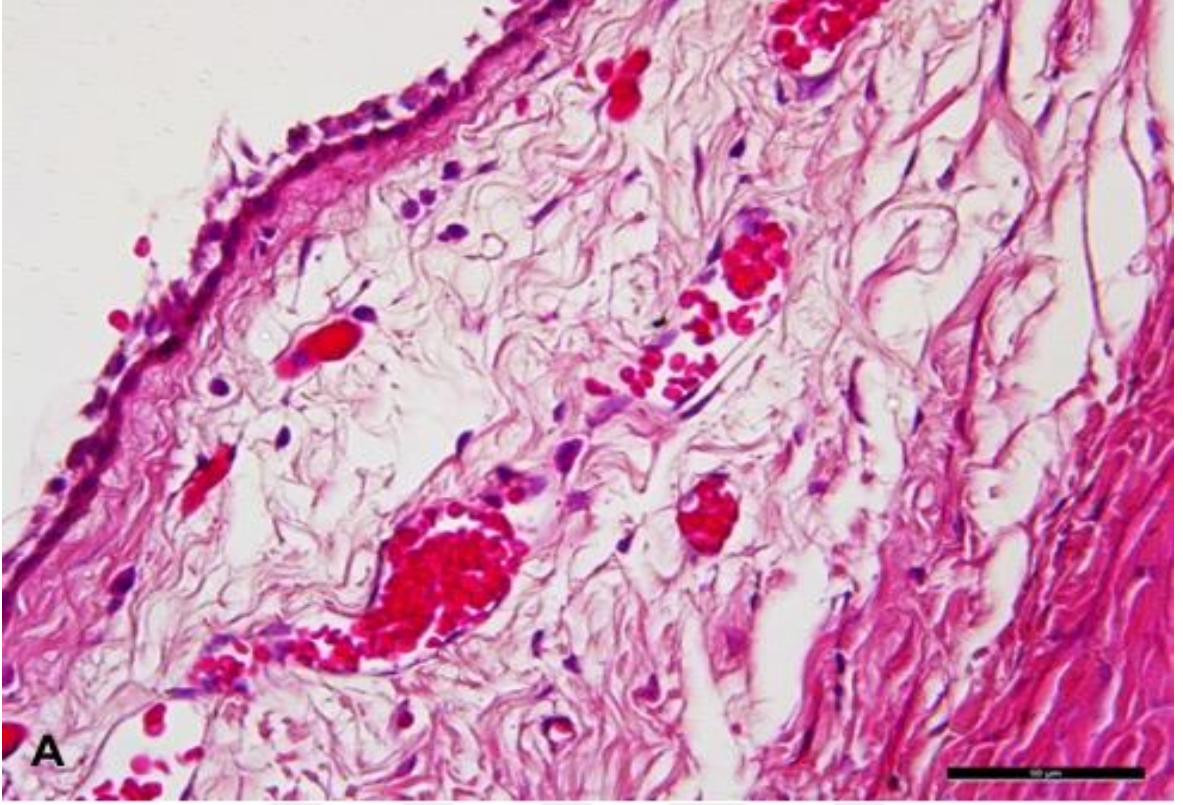
Şekil 11: Kontrol grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Konjonktival epitelde devamlılık ve subkonjonktival dokuda sağlıklı morfoloji gözlemlenmektedir. H&E, 200X magnifikasyon.



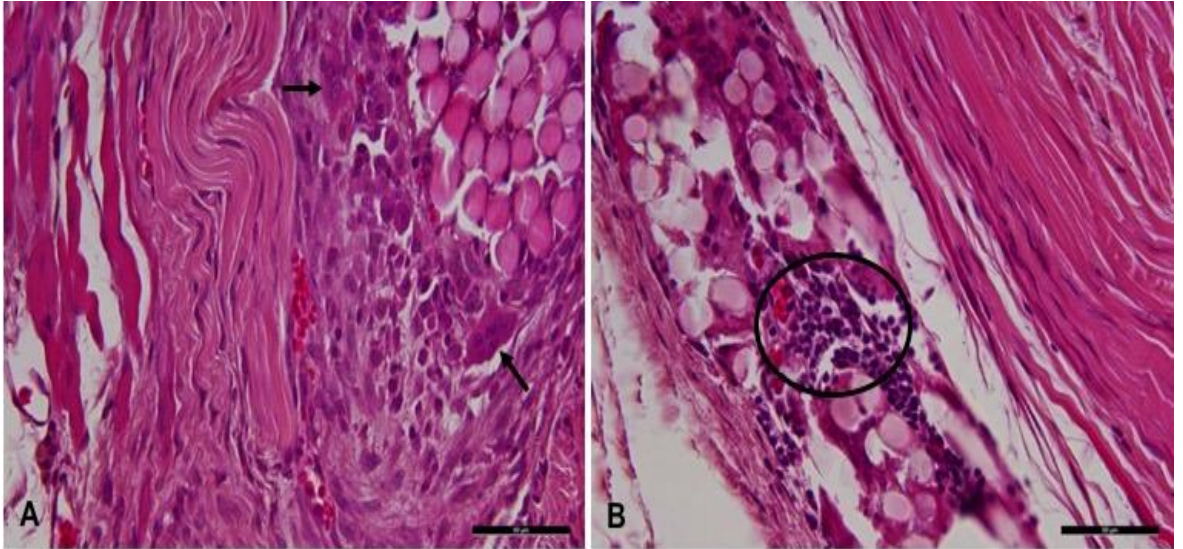
Şekil 12: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Siyah ok, konjonktival epitelde dökülmeleri; yıldız, subkonjonktival dokuda ödemi göstermektedir. H&E, A-200X ve B-400X magnifikasyon.



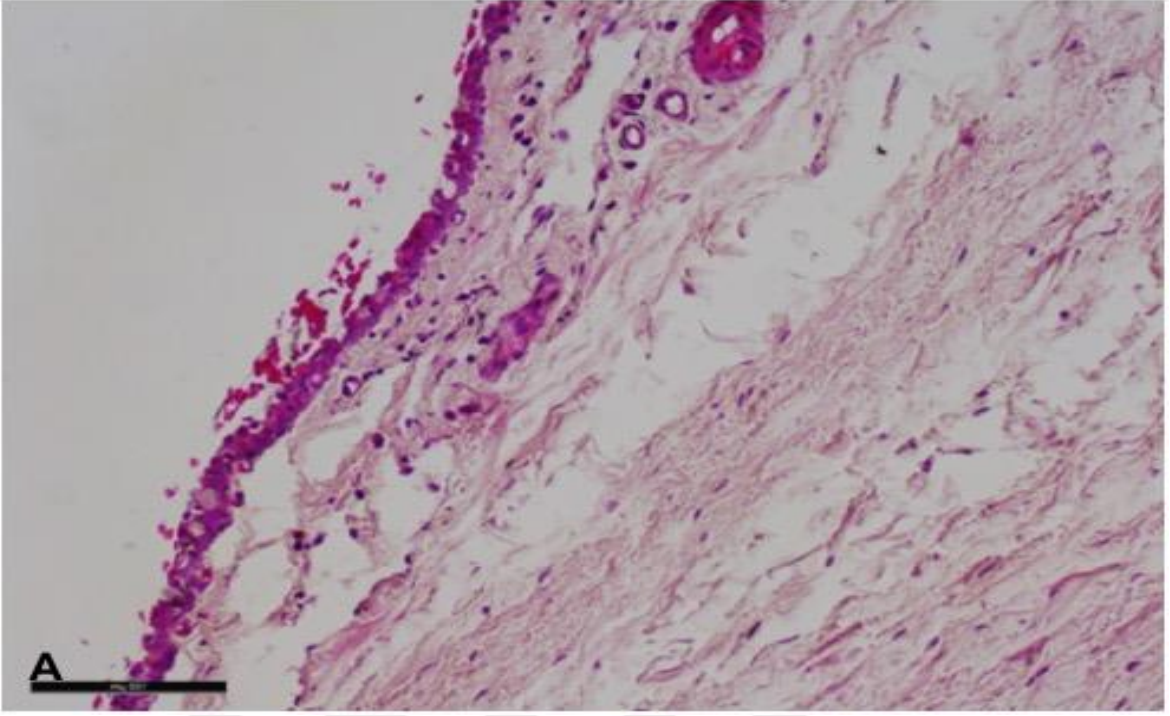
Şekil 13: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Siyah ok, şiddetli lökositik infiltrat; ok başı, artan vaskülarizasyonu göstermektedir. H&E, A-200X ve B-400X magnifikasyon.



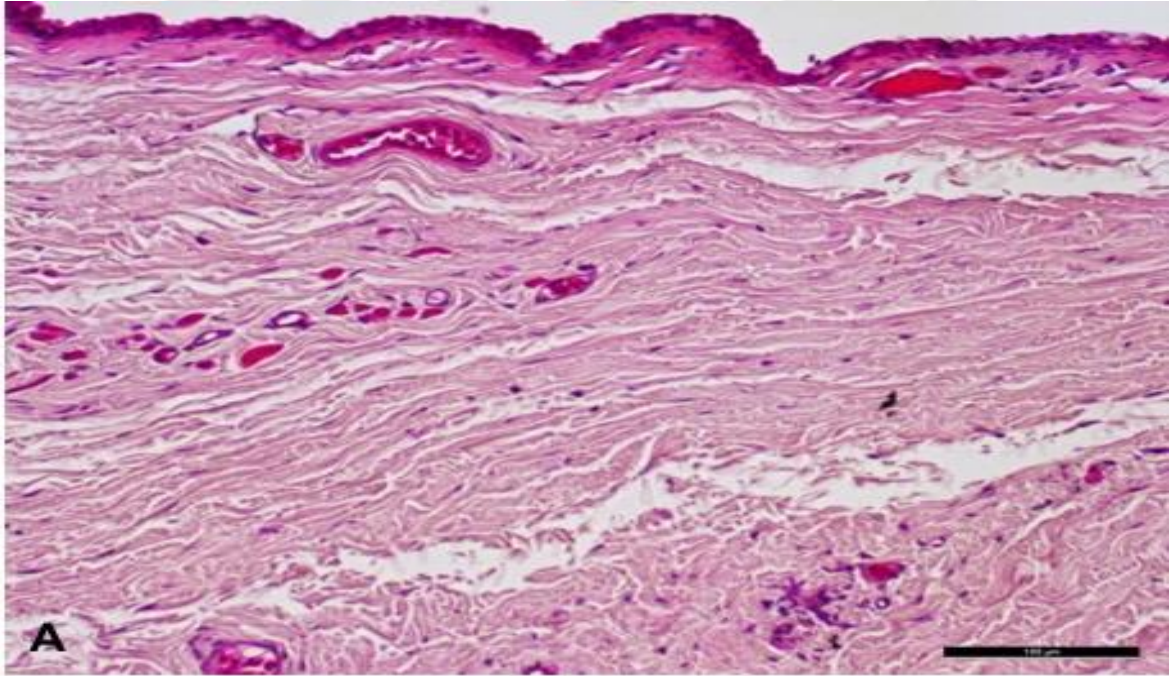
Şekil 14: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Artan vaskülarizasyon ve ödem dikkat çekmektedir. H&E, 400X magnifikasyon.



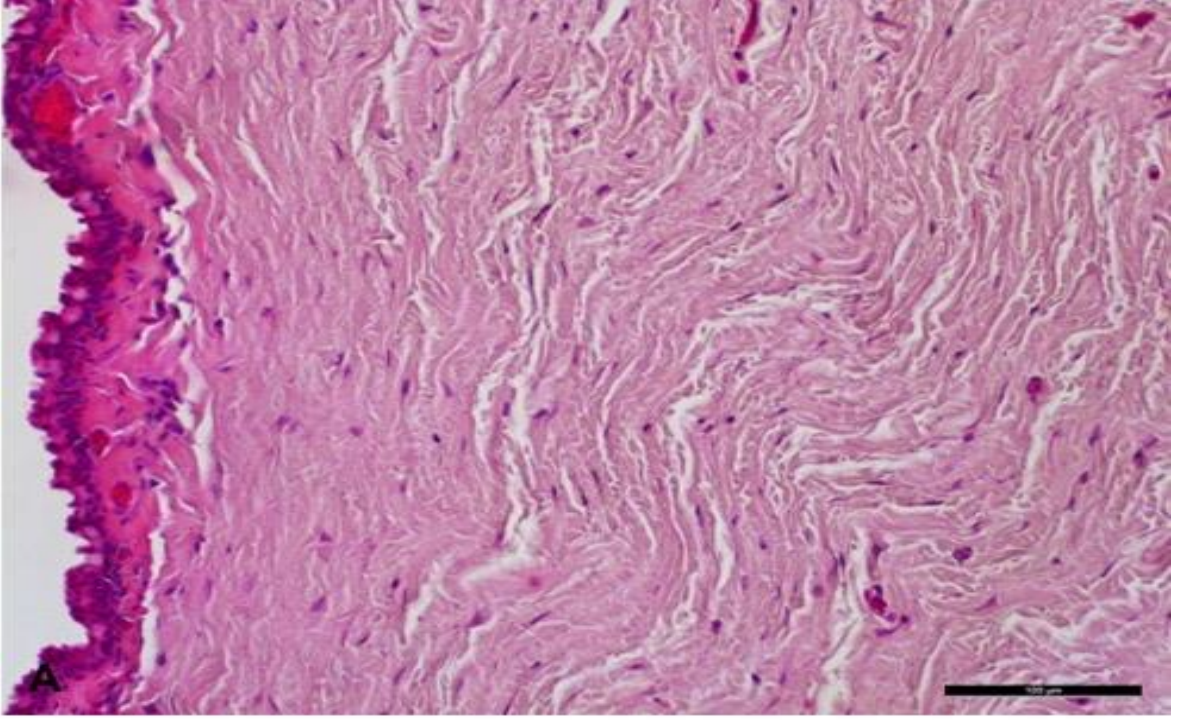
Şekil 15: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. Sütür materyalinin etrafında yabancı cisim inflamasyonu (siyah ok) ve lökositik infiltrasyon (siyah halka) dikkat çekmektedir. H&E, 400X magnifikasyon.



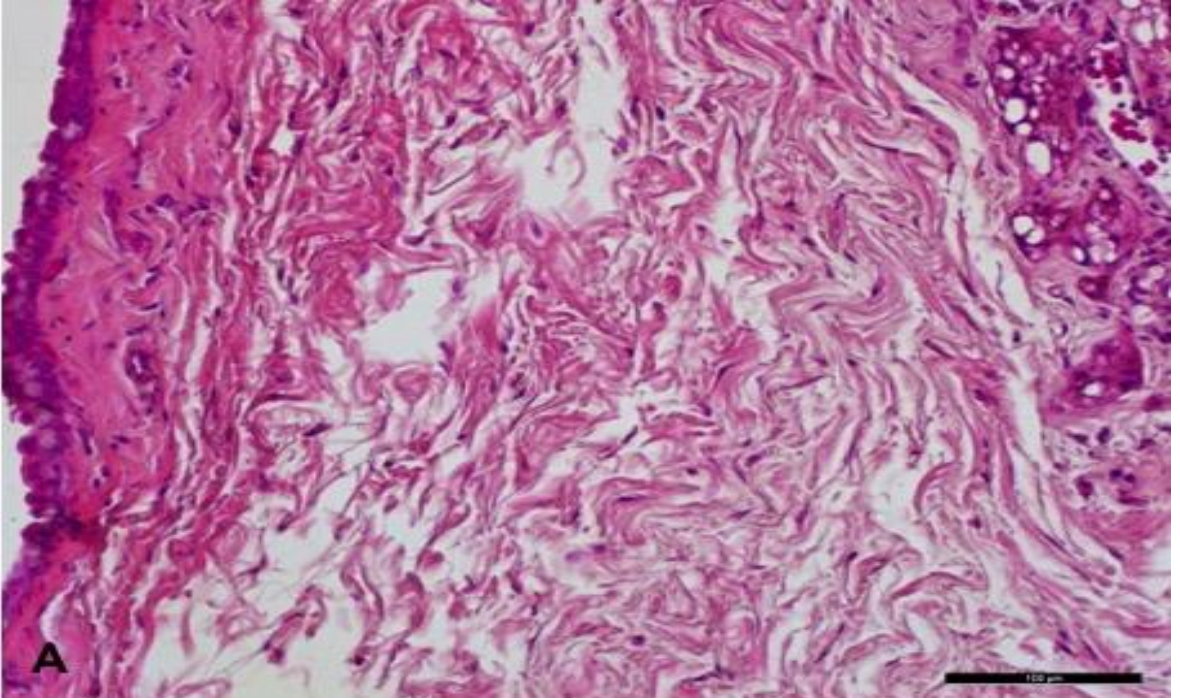
Şekil 16: 1 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. H&E, 200X magnifikasyon.



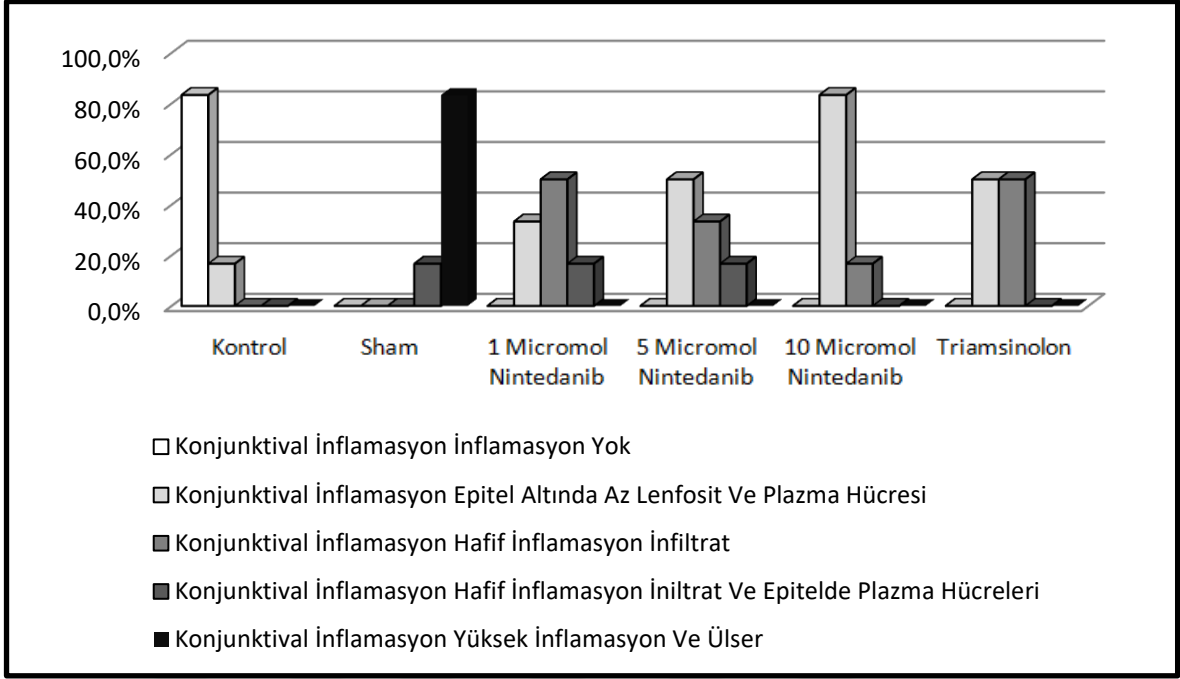
Şekil 17: 5 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. H&E, 200X magnifikasyon.



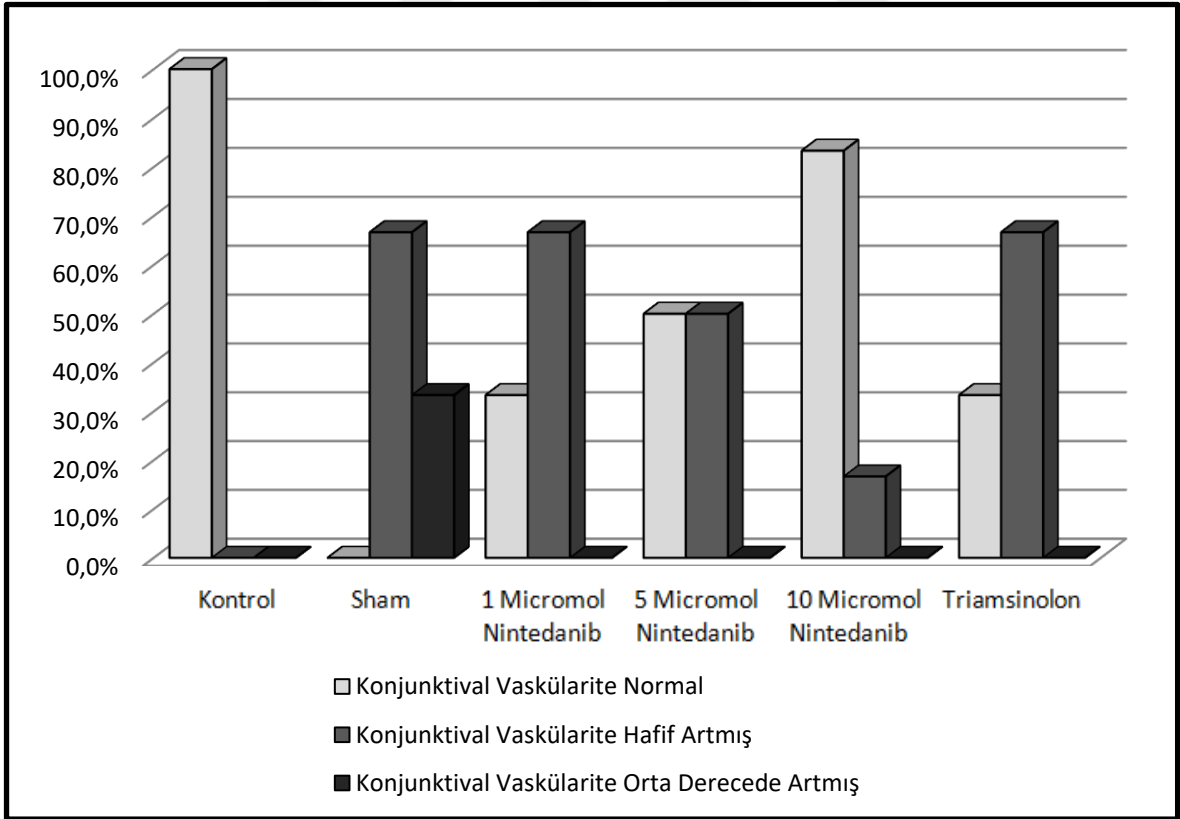
Şekil 18: 10 µM nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. H&E, 200X magnifikasyon.



Şekil 19: Triamsinolon asetonid grubuna ait subkonjonktival dokuyu gösteren fotomikrograf. H&E, 200X magnifikasyon.



Şekil 20: Gruplar arasında konjunktival inflamasyon derecesi dağılımı



Şekil 21: Gruplar arasında konjunktival vaskülarizasyon derecesi dağılımı

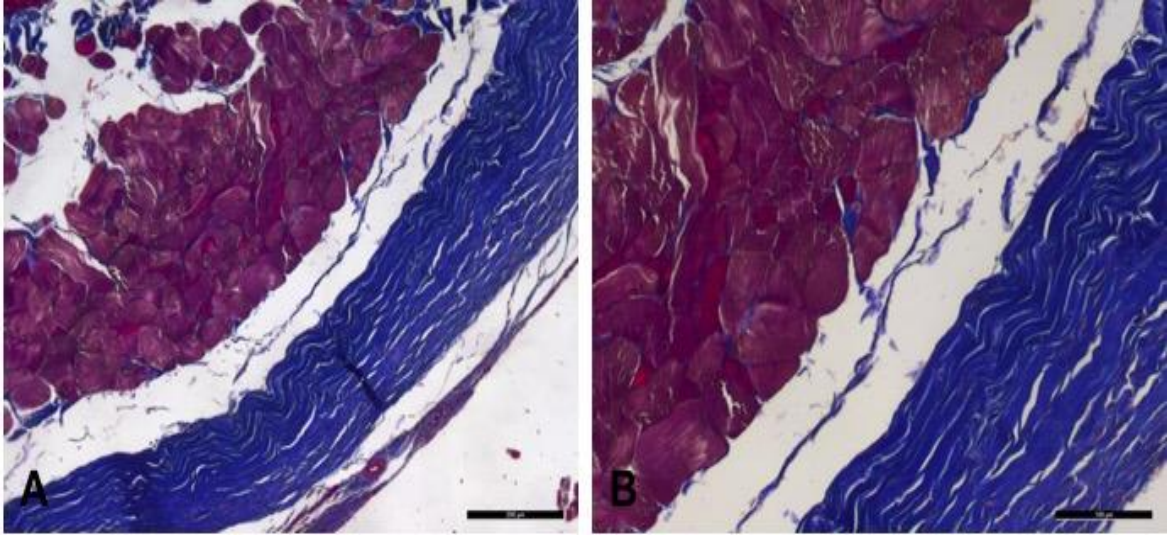
Kontrol grubuna ait örnekler incelendiğinde, normal sağlıklı morfolojiye sahip konjonktival epitel, subkonjonktival doku, kas ve sklera tabakaları gözlemlenmiştir (Şekil 22). Ancak sham grubu incelendiğinde superior rektus kasında şiddetli fibrozis ile birlikte (Şekil 23C-D) yer yer muskuloskleral (Şekil 24A-B) ve muskulokonjonktival adezyonlar (Şekil 23A) tespit edilmiştir. Hem kas içerisinde hem de perimüsküler çevrede fibrozis, mavi renkte boyanan kollajen birikimi ile gösterilmiştir. Artan kollajen sentezi nedeniyle bu grupta oldukça yoğun boyanma gerçekleşmiştir. 1 µM nintedanib grubuna bakıldığında, fibrotik alanlar perimüsküler bölgede yoğunlaşmıştır ve sham grubuna göre oldukça azalmıştır (Şekil 25B); ancak bazı bölgelerde muskulokonjonktival adezyonlar tespit edilmiştir (Şekil 25A). 5 µM nintedanib grubu incelendiğinde, kastaki fibrozisin oldukça azaldığı, kas-sklera komşuluğundaki perimüsküler bölgede çok az miktarda kollajen birikimi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 26). 10 µM nintedanib grubu incelendiğinde ise 5 µM nintedanib grubuyla benzer olarak; sham grubuna göre fibrozis ve adezyonun oldukça azaldığı ve kontrole yakın morfoloji sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 27). Triamsinolon tedavi grubunda ise sham grubuna göre kas fibrozisinin ve adezyonun azalmakla birlikte nintedanib tedavileri kadar etkin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 28). Genel olarak görülen histopatolojik bulgular, sham grubu dışındaki gruplarda yapılan istatistiksel analiz ile desteklenmemiştir.

Sham grubunda perimüsküler fibrozis derecesi kontrol grubundan, 1 mikromol nintedanib grubundan, 5 mikromol nintedanib grubundan, 10 mikromol nintedanib grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubunda perimüsküler fibrozis derecesi triamsinolon asetonid grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. Kontrol grubu, 1 mikromol nintedanib grubu, 5 mikromol nintedanib grubu, 10 mikromol nintedanib grubu, triamsinolon asetonid grupları arasında perimüsküler fibrozis derecesi anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. (Tablo 7) (Şekil 29)

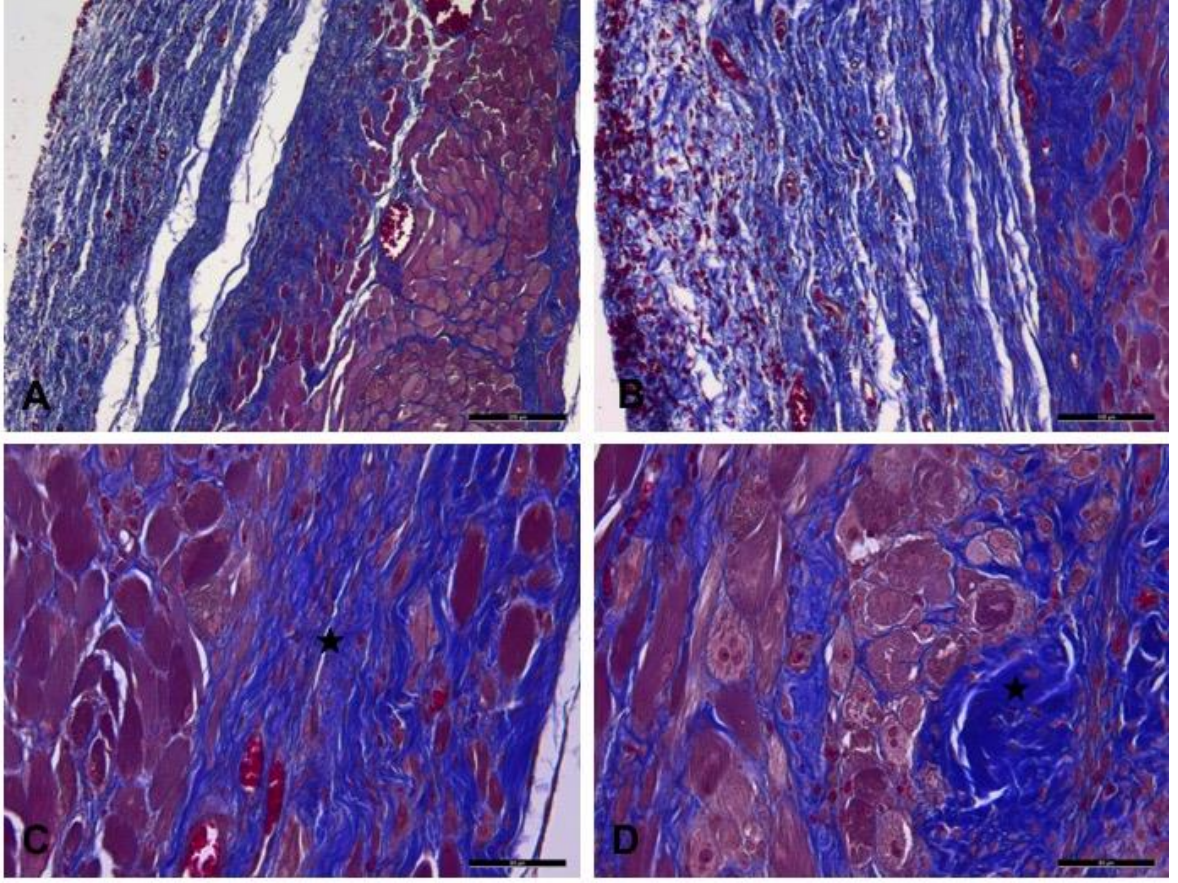
Sham grubunda skleral inflamasyon oranı kontrol grubundan, 1 mikromol nintedanib grubundan, 5 mikromol nintedanib grubundan, 10 mikromol nintedanib grubundan, triamsinolon asetonid grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Kontrol grubu, 1 mikromol nintedanib grubu, 5 mikromol nintedanib grubu, 10 mikromol nintedanib grubu, triamsinolon asetonid grupları arasında skleral inflamasyon oranı anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. (Tablo 6) (Şekil 30)

Sham grubunda rektus kas fibrozis oranı kontrol grubundan, 10 mikromol nintedanib grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. 1 mikromol nintedanib grubunda rektus kas fibrozis oranı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubunda rektus kas fibrozis oranı 1 mikromol nintedanib grubundan, 5 mikromol nintedanib grubundan, triamsinolon asetonid grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. 1 mikromol nintedanib grubunda rektus kas fibrozis oranı 5 mikromol nintedanib grubundan, 10 mikromol nintedanib grubundan, triamsinolon asetonid grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. 1 mikromol nintedanib grubu, 5 mikromol nintedanib grubu, 10 mikromol nintedanib grubu, triamsinolon asetonid grupları arasında rektus kas fibrozis oranı anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. (Tablo 7) (Şekil 31)

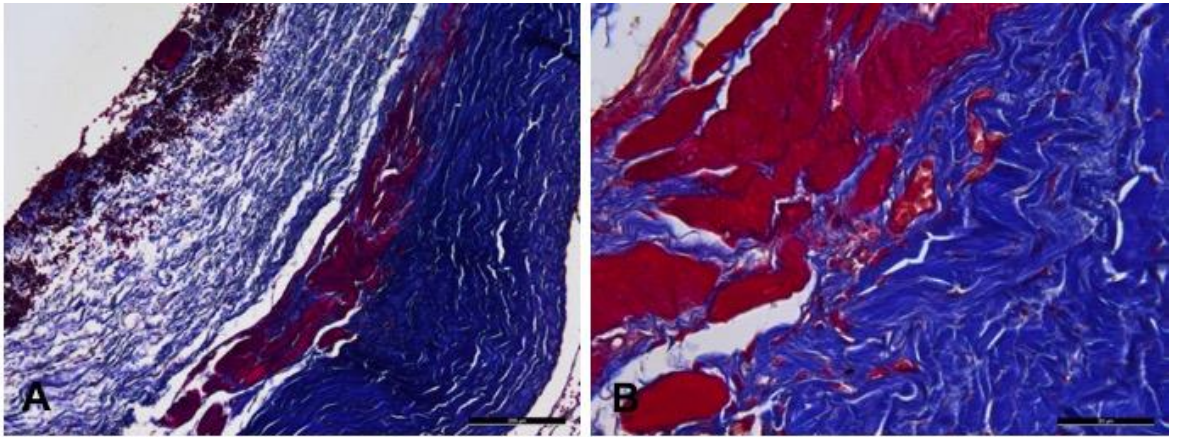
Sham grubunda adezyon derecesi kontrol grubundan anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha yüksekti. Sham grubunda adezyon derecesi 1 mikromol nintedanib grubundan, 5 mikromol nintedanib grubundan, 10 mikromol nintedanib grubundan, triamsinolon asetonid grubundan anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. 1 mikromol nintedanib grubu, 5 mikromol nintedanib grubu, 10 mikromol nintedanib grubu, triamsinolon asetonid grupları arasında adezyon derecesi anlamlı ($p > 0.05$) olarak farklı değildi. (Tablo 7) (Şekil 32)



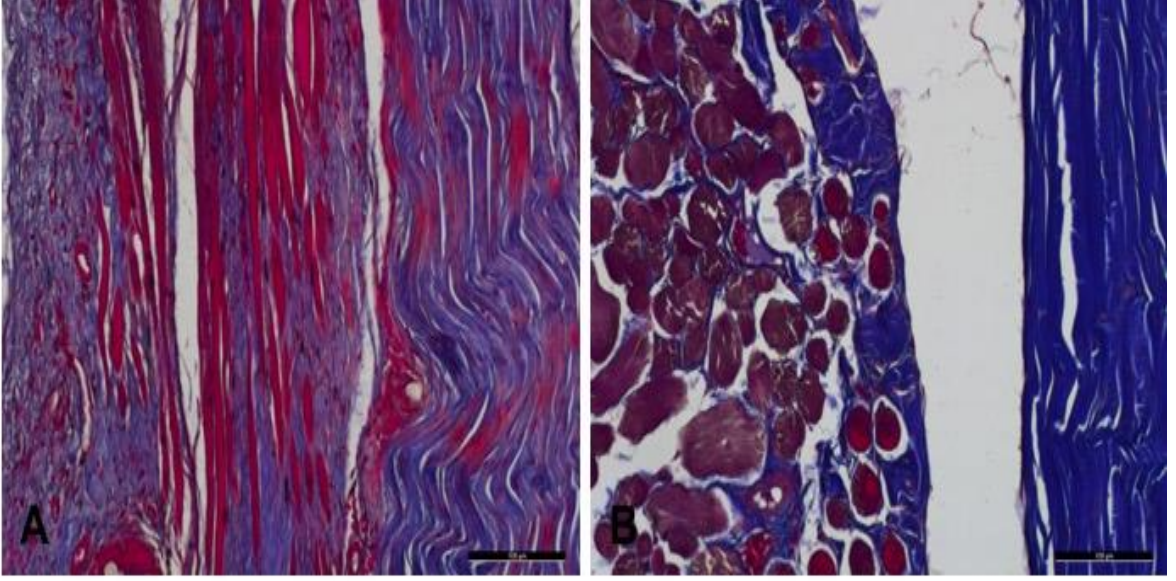
Şekil 22: Kontrol grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-100X, B-200X magnifikasyon.



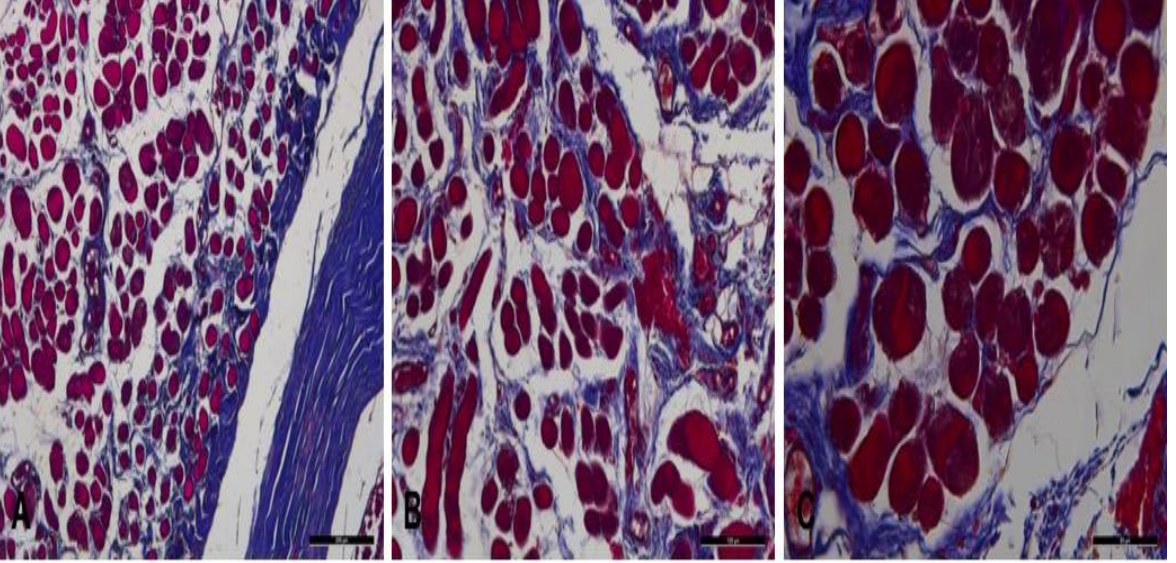
Şekil 23: Sham grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Yıldız, şiddetli kollajen birikimine işaret etmektedir. Masson trikrom, A-100X, B-200X, C ve D-400X magnifikasyon.



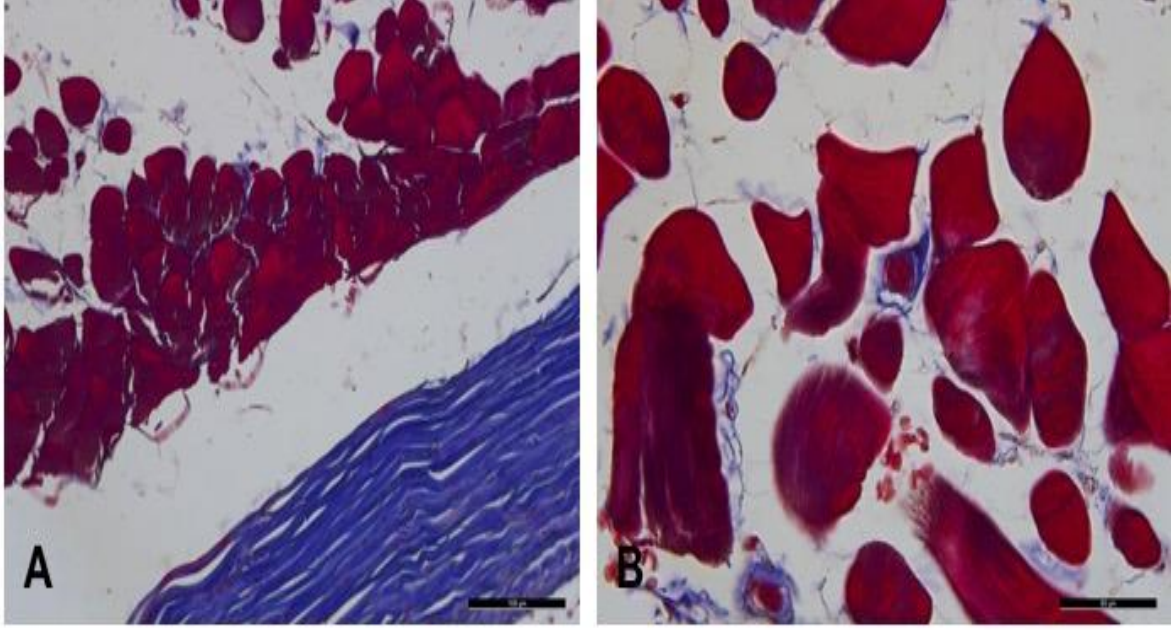
Şekil 24: Sham grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-100X, B-400X magnifikasyon.



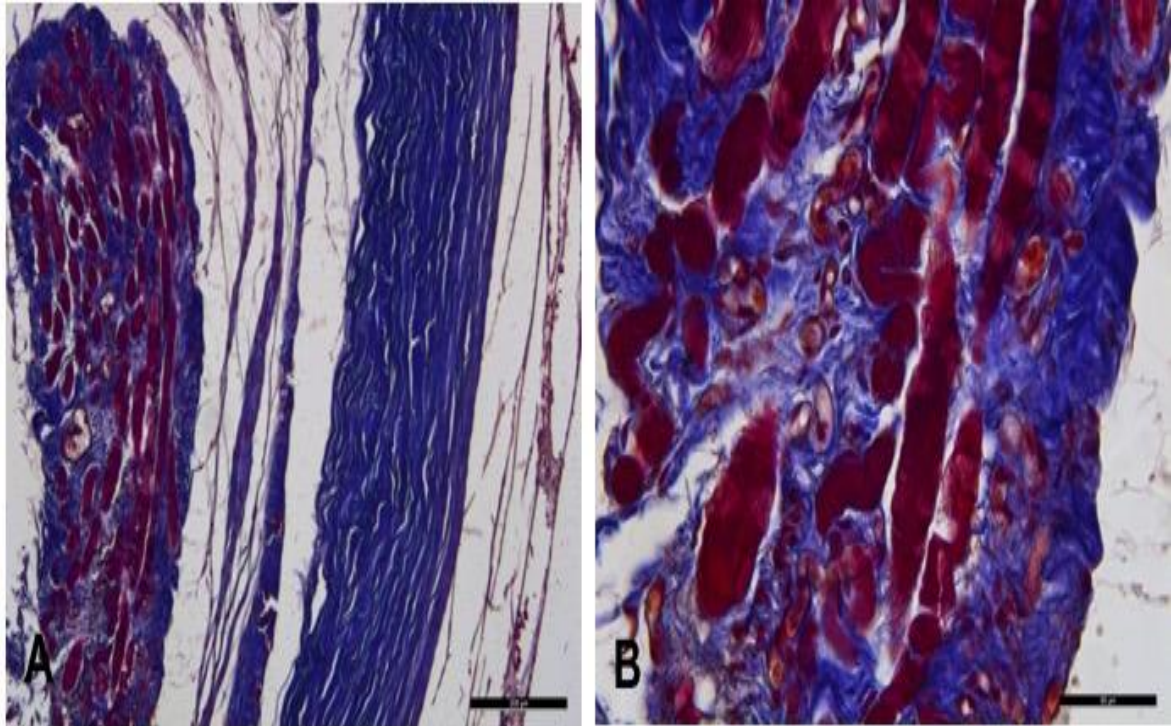
Şekil 25: 1 μ M nintedanib grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, 200X magnifikasyon.



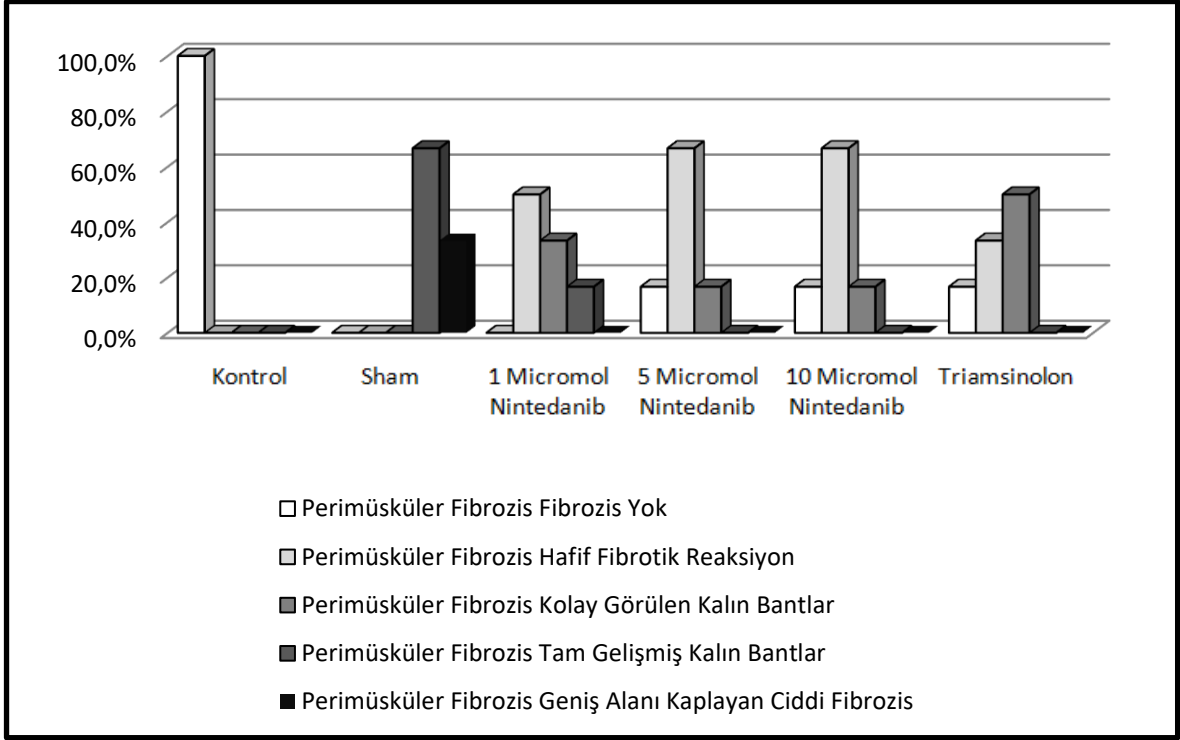
Şekil 26: 5 μ M nintedanib grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-100X, B-200X, C-400X magnifikasyon.



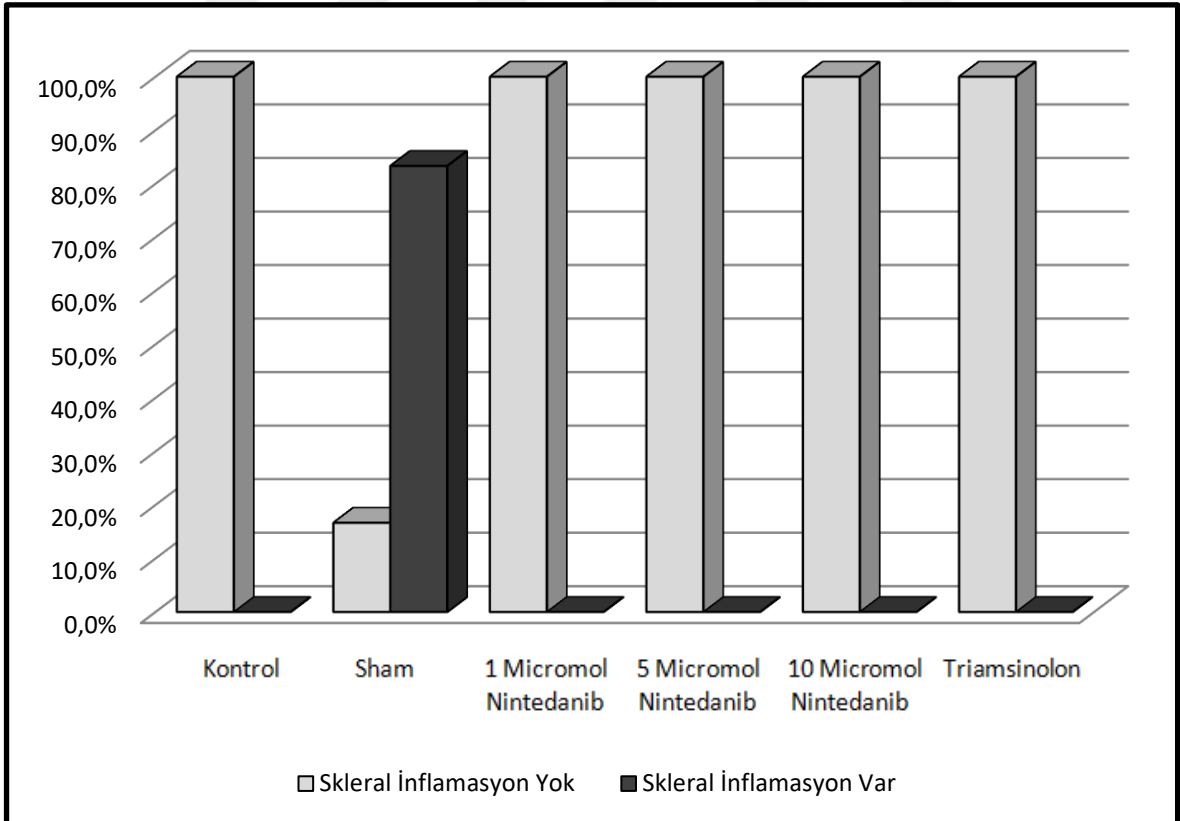
Şekil 27: 10 μ M nintedanib grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-200X, B-400X magnifikasyon.



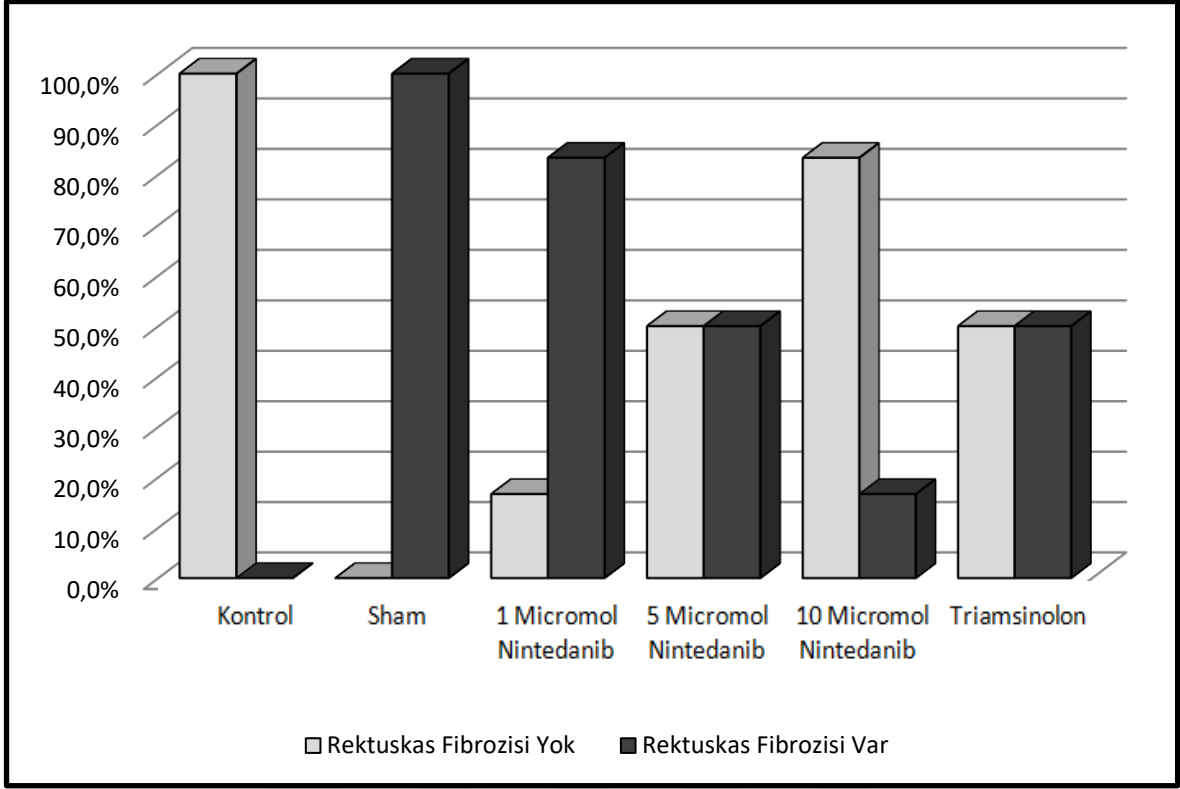
Şekil 28: Triamsinolon asetonid grubuna ait SRK ve perimüsküler dokuyu gösteren fotomikrograf. Masson trikrom, A-100X, B-400X magnifikasyon.



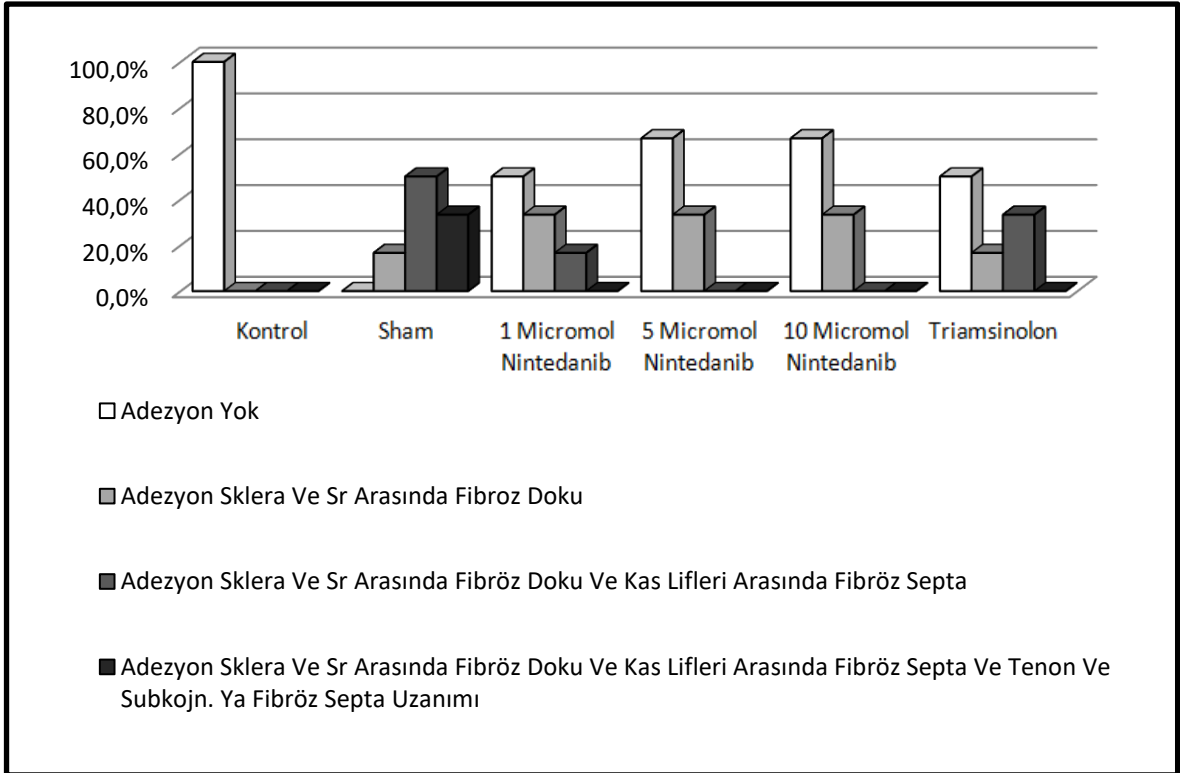
Şekil 29: Gruplar arasında perimüsküler fibrozis derecesi dağılımı



Şekil 30: Gruplar arasında skleral inflamasyon derecesi dağılımı



Şekil 31: Gruplar arasında rektus kas fibrozisi derecesi dağılımı



Şekil 32: Gruplar arasında adezyon derecesi dağılımı

Tablo 6: Gruplara göre konjonktival inflamasyonun, skleral inflamasyonun ve konjonktival vaskülaritenin dağılımı

	Kontrol ¹		Sham ²		1 Mikromol Nintedanib ³		5 Mikromol Nintedanib ⁴		10 Mikromol Nintedanib ⁵		Triamsinolon Asetonid ⁶		P
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Konjonktival İnflamasyon													
-İnflamasyon yok	5	83,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
-Epitel altında az lenfosit ve plazma hücresi	1	16,7%	0	0,0%	2	33,3%	3	50,0%	5	83,3%	3	50,0%	
-Hafif inflamasyon infiltrat	0	0,0%	0	0,0%	3	50,0%	2	33,3%	1	16,7%	3	50,0%	p<0.05 X ²
-Hafif inflamasyon infiltrat ve epitelde plazma hücreleri	0	0,0%	1	16,7%	1	16,7%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%	
-Yüksek inflamasyon ve ülser	0	0,0%	5	83,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Skleral İnflamasyon													
-Yok	6	100,0%	1	16,7%	6	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	p<0.05 X ²
-Var	0	0,0%	5	83,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Konjonktival Vaskülarite													
-Normal	6	100,0%	0	0,0%	2	33,3%	3	50,0%	5	83,3%	2	33,3%	
-Hafif artmış	0	0,0%	4	66,7%	4	66,7%	3	50,0%	1	16,7%	4	66,7%	p<0.05 X ²
-Orta derecede artmış	0	0,0%	2	33,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	

X² Ki-kare test (Fischer test)

Tablo 7: Gruplara göre perimüsküler fibrozisinin, rektus kas fibrozisinin ve adezyonun dağılımı

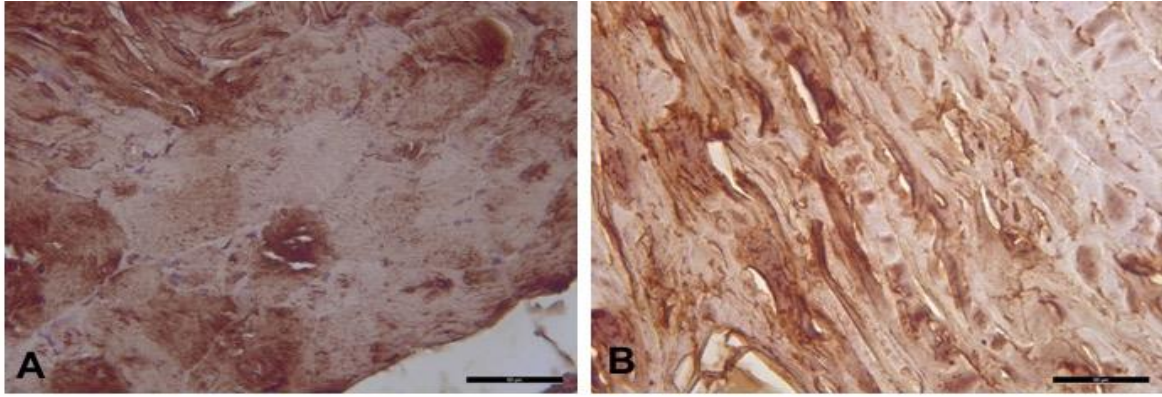
	Kontrol ¹		Sham ²		1 Mikromol Nintedanib ³		5 Mikromol Nintedanib ⁴		10 Mikromol Nintedanib ⁵		Triamsinolon Asetonid ⁶		P
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Perimüsküler Fibrozis													
-Fibrozis yok	6	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	1	16,7%	1	16,7%	<i>p</i> <0.05 X ²
-Hafif fibrotik reaksiyon	0	0,0%	0	0,0%	3	50,0%	4	66,7%	4	66,7%	2	33,3%	
-Kolay görülen kalın bantlar	0	0,0%	0	0,0%	2	33,3%	1	16,7%	1	16,7%	3	50,0%	
-Tam gelişmiş kalın bantlar	0	0,0%	4	66,7%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
-Geniş alanı kaplayan ciddi fibrozis	0	0,0%	2	33,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Rektus Kas Fibrozisi													
-Yok	6	100,0%	0	0,0%	1	16,7%	3	50,0%	5	83,3%	3	50,0%	<i>p</i> <0.05 X ²
-Var	0	0,0%	6	100,0%	5	83,3%	3	50,0%	1	16,7%	3	50,0%	
Adezyon													
-Yok	6	100,0%	0	0,0%	3	50,0%	4	66,7%	4	66,7%	3	50,0%	<i>p</i> <0.05 X ²
-Sklera ve SRK arasında fibroz doku	0	0,0%	1	16,7%	2	33,3%	2	33,3%	2	33,3%	1	16,7%	
-Sklera ve SRK arasında fibröz doku ve kas lifleri arasında fibröz septa	0	0,0%	3	50,0%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%	2	33,3%	
-Sklera ve SRK arasında fibröz doku ve kas lifleri arasında fibröz septa ve tenon ve subkonjonktival ya fibröz septa uzanımı	0	0,0%	2	33,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	

^{X2} Ki-kare test (Fischer test)

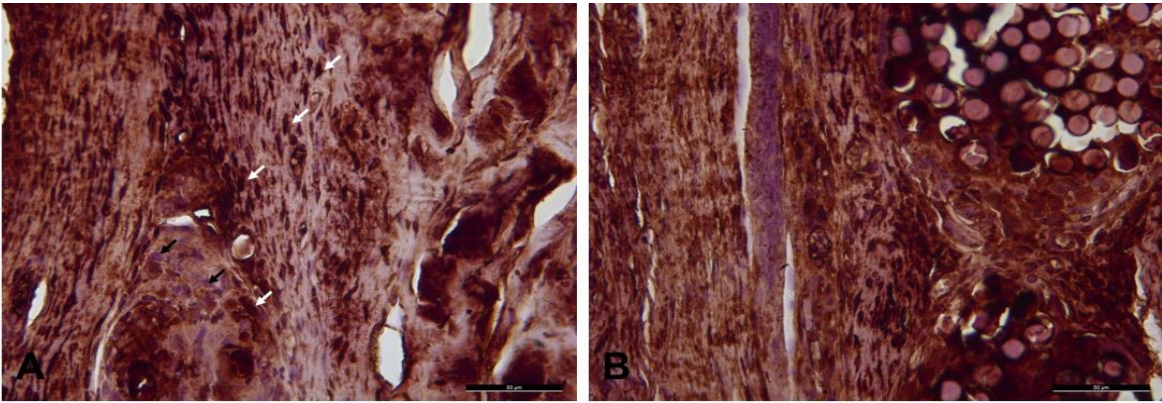
8.2.İMMÜNOHİSTOKİMYA İNCELEME BULGULARI

8.2.1.α-SMA immünohistokimyası

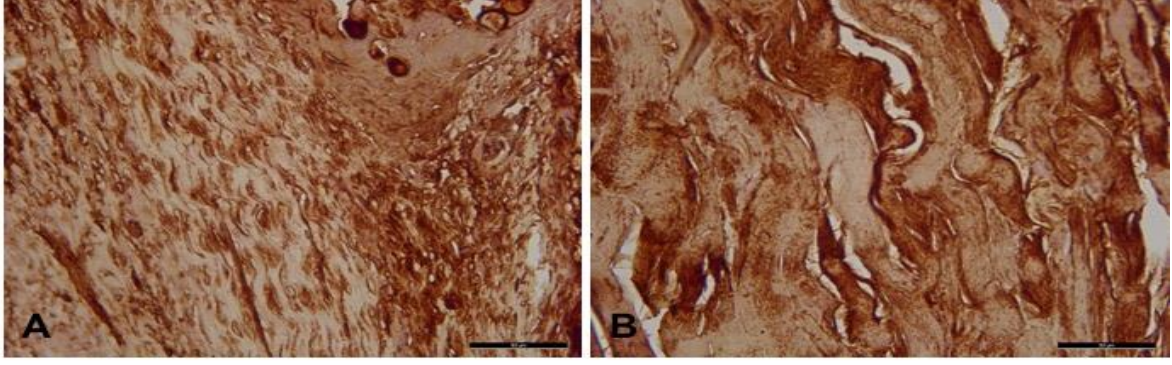
Tüm gruplara ait örneklerde subkonjonktival doku ve superior rektus kasında α-sma immünreaktivitesi incelenmiştir. Sham grubunda kontrole göre oldukça artmış bir α-sma ekspresyonu tespit edilmiştir (Şekil 34). Tedavi gruplarının hepsinde sham grubuna göre bu miyofibroblast belirtecinin ekspresyonunda azalma görülmüştür, ancak en belirgin azalma 5 ve 10 µM nintedanib gruplarında gerçekleşmiştir (Şekil 35-36). 1 µM nintedanib, triamsinolon asetonide göre α-sma ekspresyonunu azaltsa da 5 ve 10 µM nintedanib kadar etkin olmamıştır (Şekil 37-38).



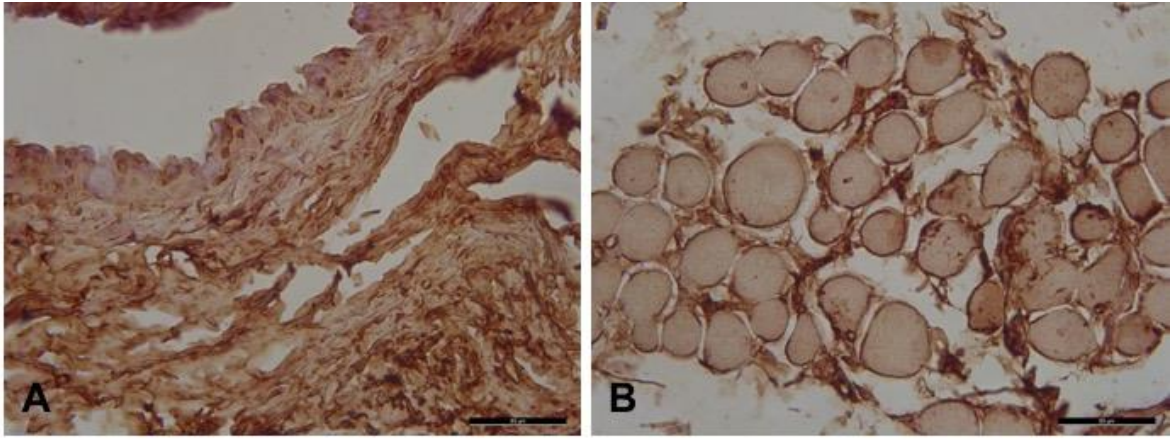
Şekil 33: Kontrol grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de α-sma immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



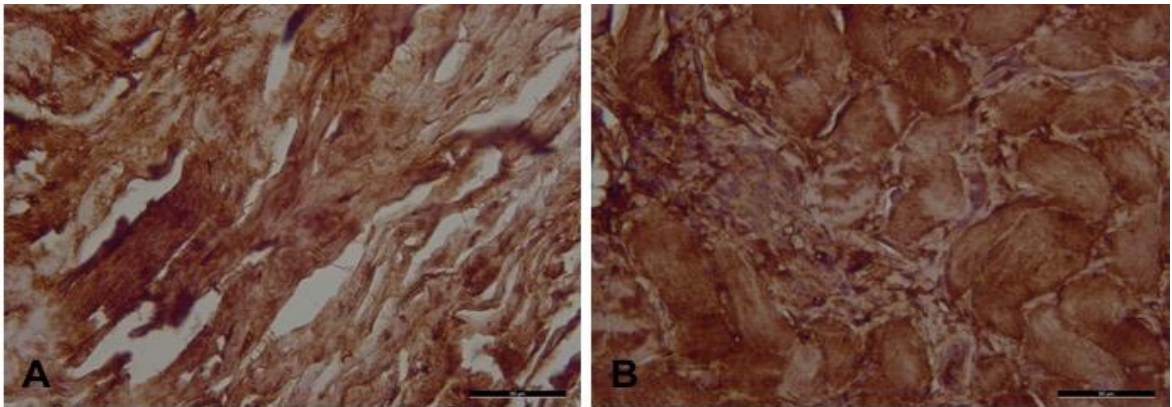
Şekil 34: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de α-sma immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. Siyah ok, α-sma negatif (-) hücreleri; beyaz ok, α-sma pozitif (+) hücreleri göstermektedir. 400X magnifikasyon.



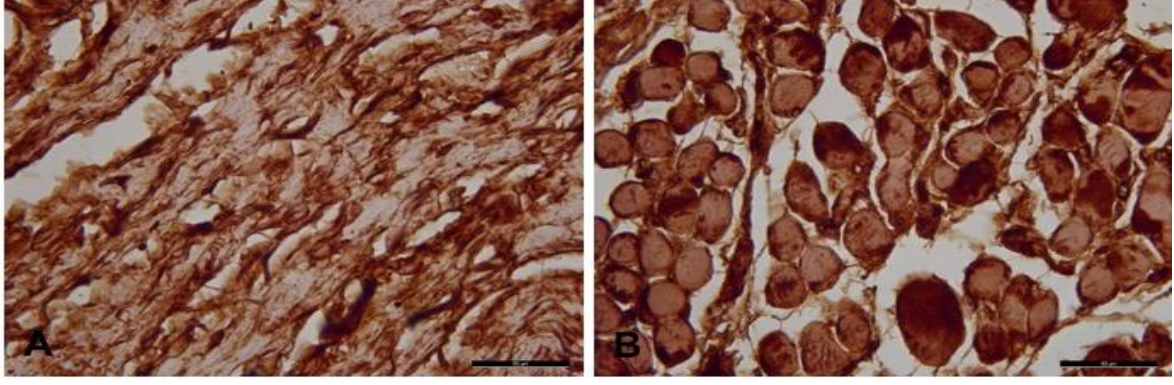
Şekil 35: 1 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de α -sma immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



Şekil 36: 5 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de α -sma immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



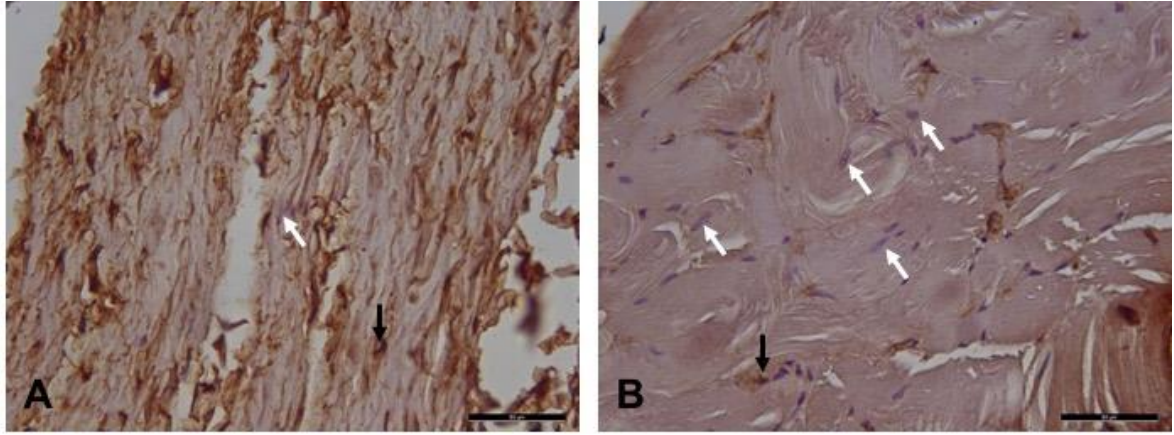
Şekil 37: 10 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de α -sma immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



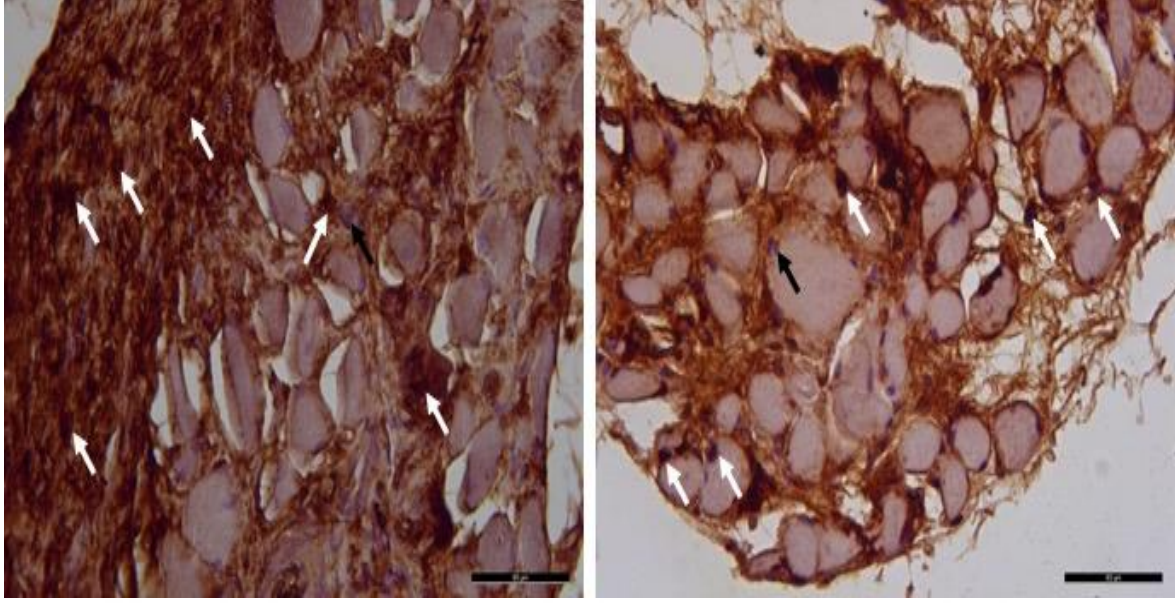
Şekil 38: Triamsinolon asetonid grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de α -sma immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.

8.2.2.TGF- β immünohistokimyası

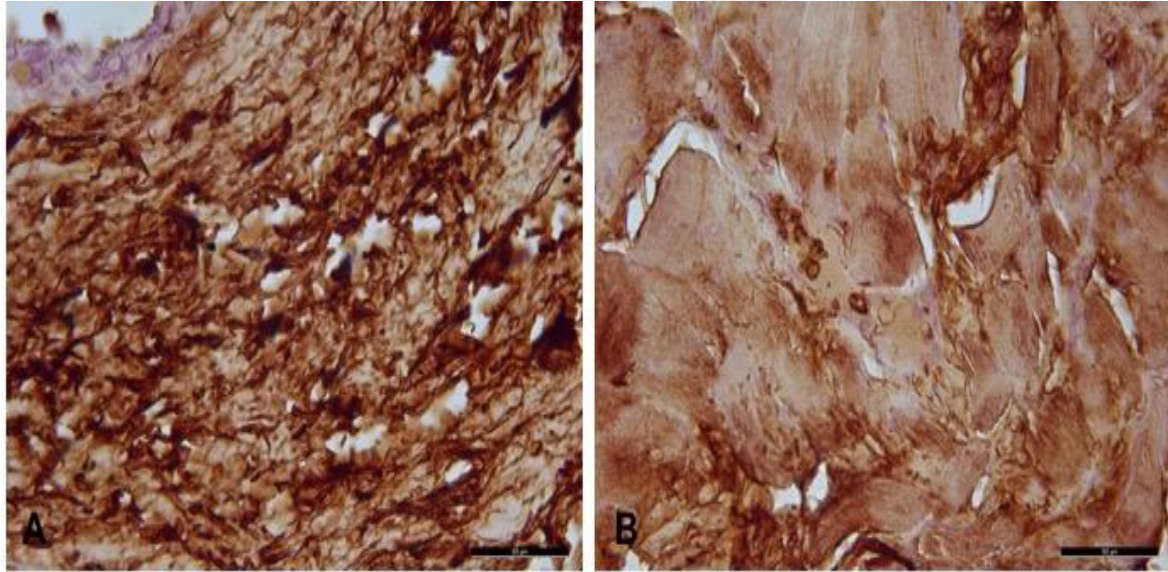
α -sma 'ya benzer olarak, TGF- β ekspresyonu sham grubunda kontrole göre oldukça artış göstermiştir (Şekil 40). Bu artış 1, 5 ve 10 μ M nintedanib gruplarında kademeli şekilde azalmıştır (Şekil 41-43); en iyi sonuç 10 μ M nintedanib grubunda tespit edilmiştir (Şekil 43). Triamsinolon asetonid, sham grubuna göre TGF- β immünreaktivitesini azaltsa da nintedanib kadar etkili olamamıştır (Şekil 44).



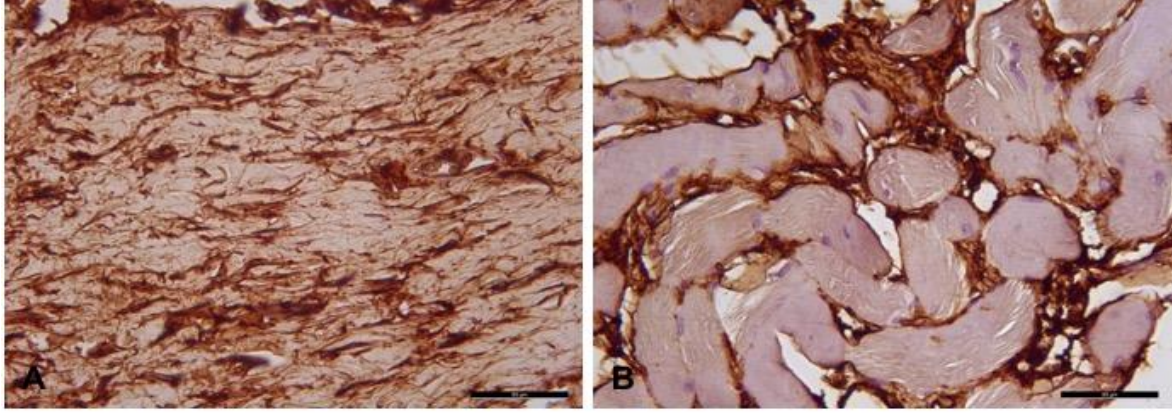
Şekil 39: Kontrol grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de TGF- β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. Siyah ok, α -sma pozitif (+) hücreleri; beyaz ok, α -sma negatif (-) hücreleri göstermektedir 400X magnifikasyon.



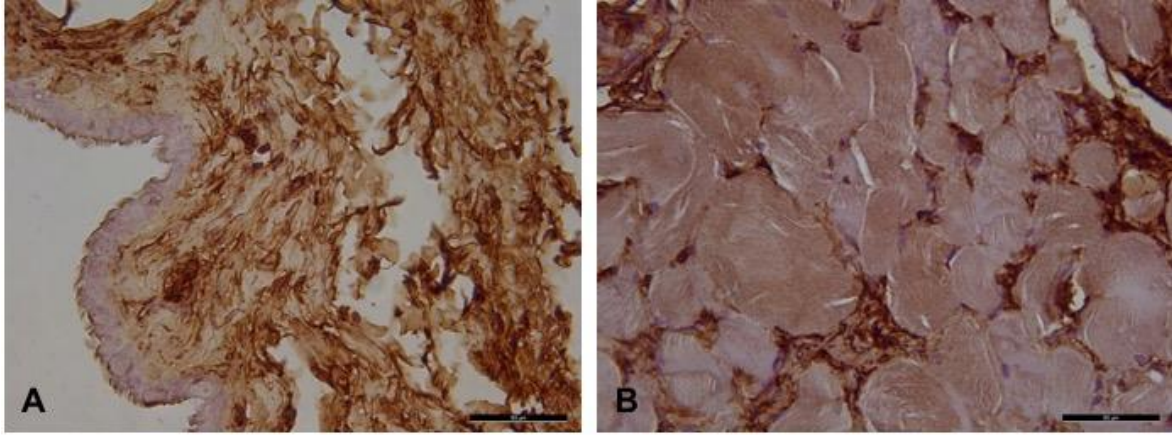
Şekil 40: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de TGF- β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. Siyah ok, α -sma negatif (-) hücreleri; beyaz ok, α -sma pozitif (+) hücreleri göstermektedir. 400X magnifikasyon.



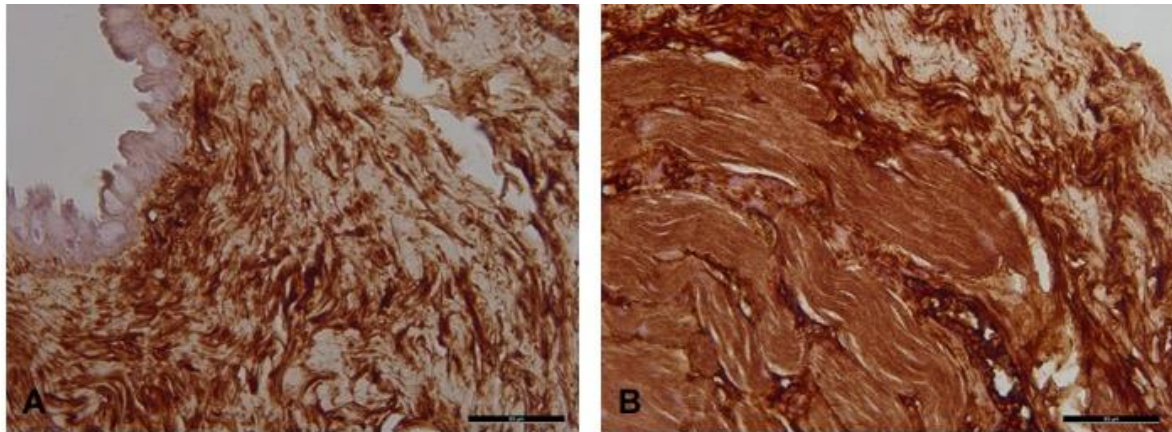
Şekil 41: 1 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de TGF- β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



Şekil 42: 5 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de TGF- β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



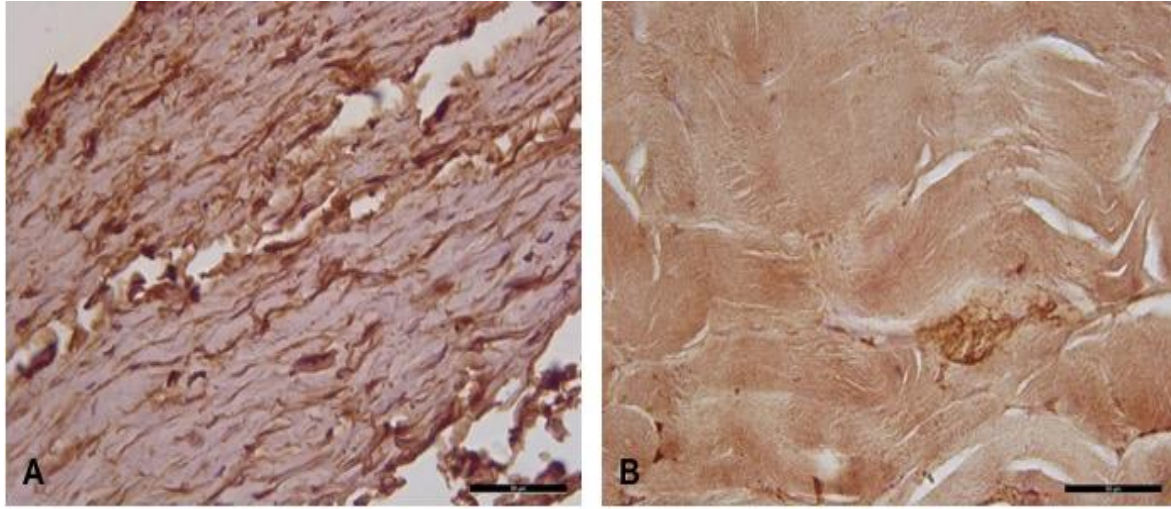
Şekil 43: 10 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de TGF- β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



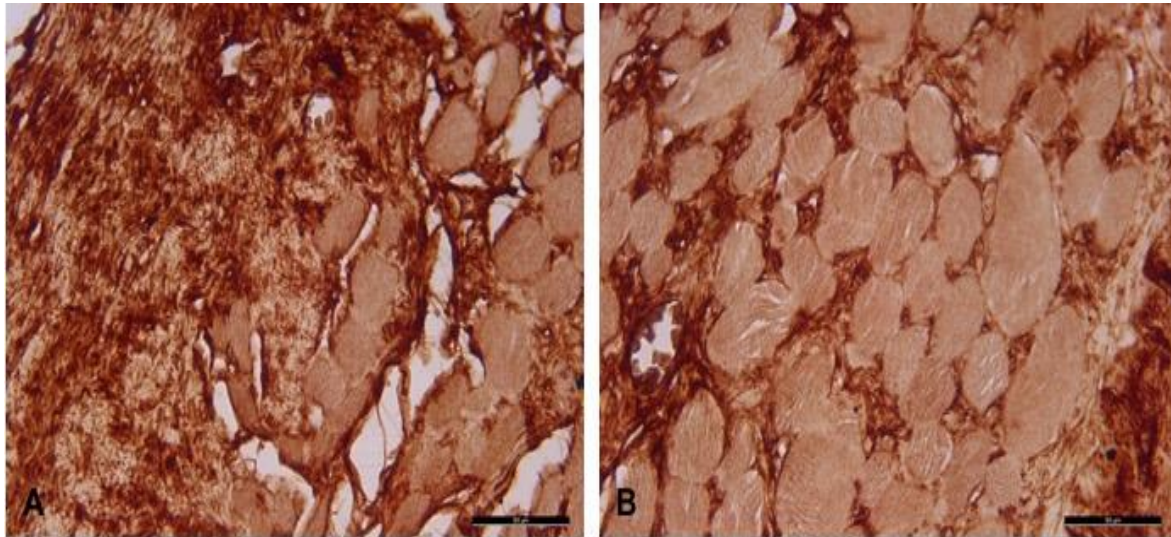
Şekil 44: Triamsinolon asetonid grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de TGF- β immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.

8.2.3.MMP-2 immünohistokimyası

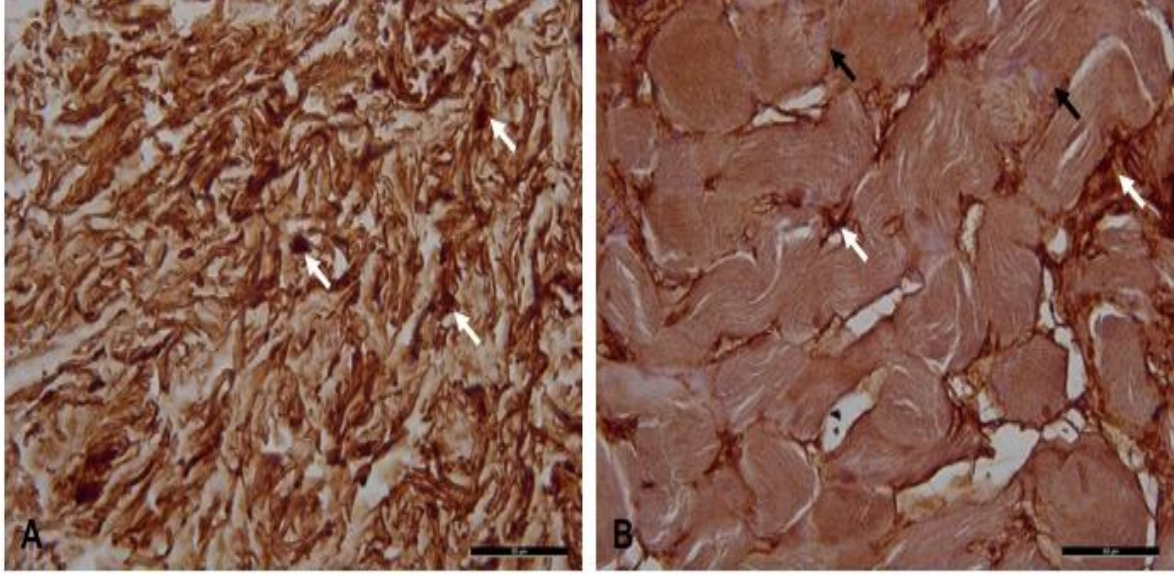
Bu matriks metalloproteinazın immünohistokimya bulguları TGF- β ile benzerlik göstermektedir. Şöyle ki; sham grubunda artmış olan MMP-2 ekspresyonu (Figür 30) tüm tedavi gruplarında azalmıştır (Figür 31-34) ancak tedavi grupları birbirleri ile kıyaslandıklarında aralarında immünohistokimyasal olarak önemli bir farklılık tespit edilememiştir.



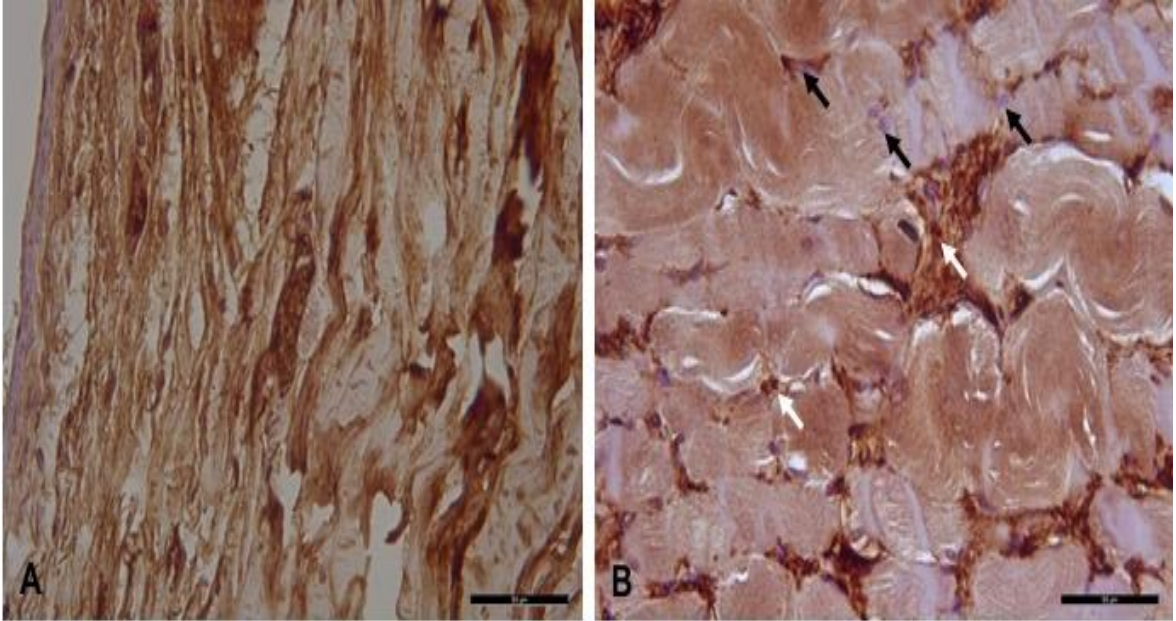
Şekil 45: Kontrol grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



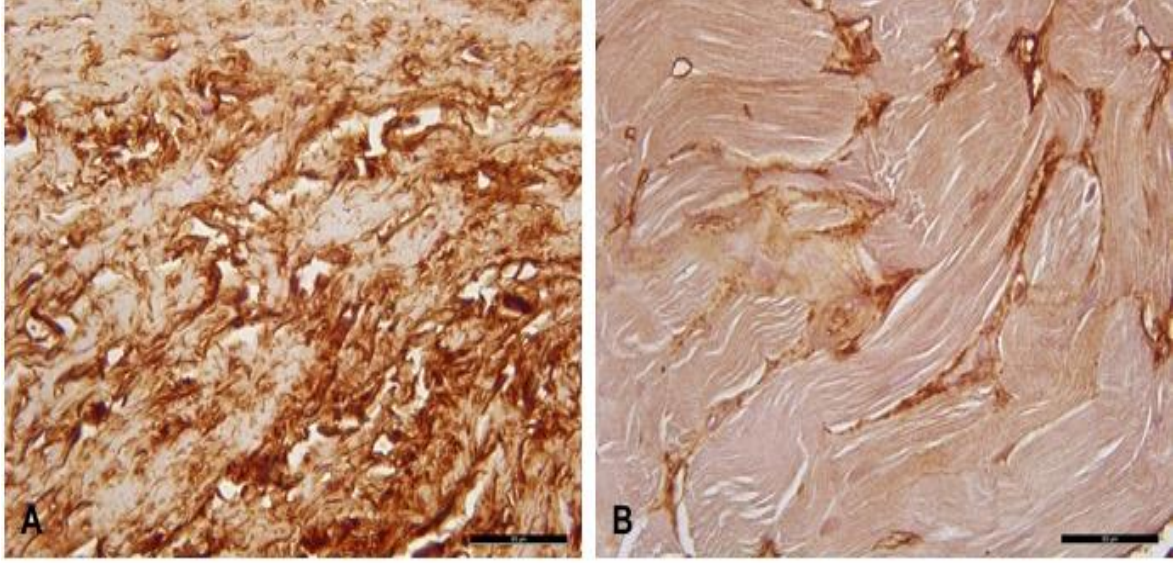
Şekil 46: Sham grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



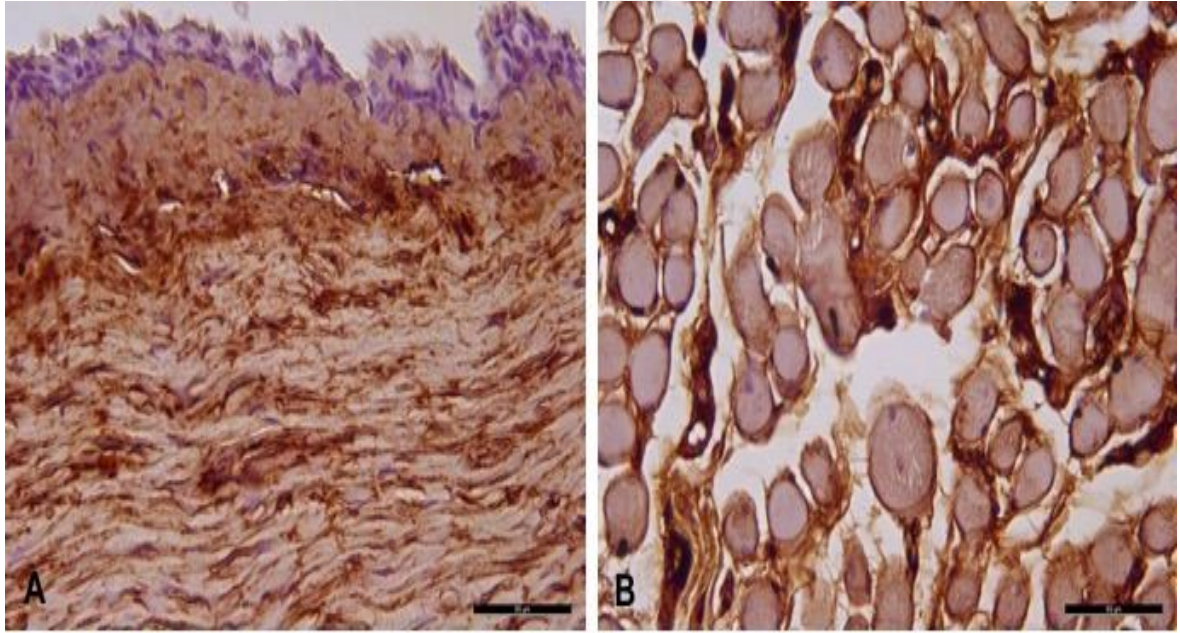
Şekil 47: 1 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



Şekil 48: 5 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.

















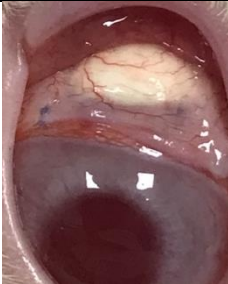

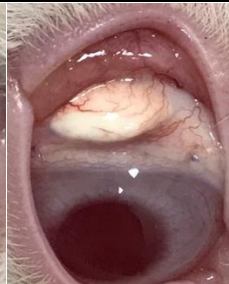



Şekil 49: 10 μ M nintedanib grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.



Şekil 50: Triamsinolon asetonid grubuna ait subkonjonktival dokuda (A) ve SRK (B) 'de MMP-2 immünreaktivitesini gösteren fotomikrograf. 400X magnifikasyon.

Şekil 51: Postoperatif 3. günde, 1. haftada, 2. haftada ve 4. haftada yara yerlerinin makroskopik görünümü

	3. GÜN	1. HAFTA	2. HAFTA	4. HAFTA
SHAM				
1 µM NİNTEDANİB				
5 µM NİNTEDANİB				
10 µM NİNTEDANİB				
TRİAMSİNOLON ASETONİD				

9.TARTIŞMA

Ekstraoküler kas cerrahisi sonrası yara iyileşmesi, normal fonksiyonun kazanılması ve zedelenen dokularda yapısal bütünlüğün sağlanması için büyük önem taşımaktadır. Yara iyileşmesindeki ana hedef, yara dokusu gelişimi olmadan normal doku yapısının en iyi şekilde restore edilmesidir, ancak inflamasyon ve fibrozis gelişimi nedeniyle mümkün olmamaktadır.

Şaşılık cerrahisi sonrası yara iyileşmesi ile ilgili hayvan çalışmaları yapılmıştır. Rhesus maymunlarında ekstraoküler kas cerrahisi sonrasında gelişen histopatolojik değişikliklerin değerlendirildiği çalışmada tendonun yeniden yapıştığı yerin her zaman aslında cerrahi sırasında suture edildiği yer olmadığı dökümente edilmiştir. Tavşanlarda yapılan çalışmada ise postoperatif 1. haftada tendon insersiyosunun posteriora hareketi, 5. haftada ise 2 mm anteriora hareketi saptanmıştır (5, 52).

Çalışmamızda cerrahi sonuçları düzeltebilmek ve rekürren cerrahiye kolaylaştırmak için yara iyileşmesini geciktirici ve dokular arasında adezyona engel olacağını düşündüğümüz 2 ayrı ajanın dokuda yara iyileşmesi üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Tavşan gözünde yaptığımız deneysel çalışmada üst rektus kasına cerrahi uygulandıktan sonra nintedanibin üç farklı dozu, triamsinolon asetonid ve serum fizyolojik kullanılan beş çalışma grubu ve işlem uygulanmayan diğer gözlerden oluşan bir kontrol grubu doku adezyonu, inflamasyon ve fibrozis yönünden karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda tavşanlardaki en kalın ekstraoküler kas olması ve kolay müdahale edilebilir olması nedeniyle üst rektus kasında cerrahi uygulamayı tercih ettik (53,54).

Şaşılık cerrahisinde önemli bir sorun yaratan postoperatif fibrozis oluşumu ve buna bağlı gelişen adezyonları önleyebilmek amaçlı daha önce çok sayıda ajan kullanılmıştır. Bu ajanlar yara iyileşmesinin değişik evrelerine etkilidir.

Glokom filtrasyon cerrahisinde fibrozisi önlemek için en sık kullanılan ajanlardan olan mitomisin-C şaşılık cerrahisinde de bu amaçla kullanılmıştır. Oh ve arkadaşları tarafından yapılan ekstraoküler kas cerrahisinde postoperatif yara iyileşmesi ve doku yapışıklığı üzerine mitomisin-C' nin etkisinin araştırıldığı 24 gözü kapsayan bir tavşan çalışmasında, 0,5 mg/ml dozunda 1 dk ve 5 dk süreyle mitomisin-C uygulanan her iki çalışma grubunda da kollajen lif proliferasyonunda azalmanın, dengeli tuz solüsyonu kullanılan kontrol grubuna göre daha iyi olduğu görülmüştür (9). Yine aynı şekilde b-FGF ekspresyonunun azalması her iki grupta kontrol grubuna göre üstün bulunmuştur. Ancak 1 dk ile 5 dk süreli mitomisin-C uygulanması arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlarla mitomisin-C' nin topikal kullanımı ekstraoküler kas cerrahisinde yapışıklıkları azaltabilir yorumu yapılmıştır.

Mahindrakar ve arkadaşları tarafından travma, retina dekolmanı cerrahisi, reoperasyona bağlı olarak gelişmiş 16 restriktif şaşılık hastasında 0,2 mg/ml mitomisin-C intraoperatif olarak kullanılmıştır. Sonuçta ameliyatta mitomisin-C kullanılmasının güvenli olduğu ve postoperatif yapışıklıkları azaltabileceği ileri sürülmüştür (55).

Özdem ve arkadaşlarının deneysel şaşılık cerrahisi modelinde politetrafloroetilen film, mitomisin-C ve streptokinazın etkilerini araştırmışlar ve her 3 ajanın da postoperatif fibrozisi azaltmadığını ifade etmişlerdir (56). Kantitatif pasif zorlu düksiyon testlerine göre 3 ajanın da mekanik kısıtlılığı azaltmadığını belirtmişlerdir.

Nonantijenik ve noninflamatuvar özellikte olan ve dokular arasında bir film tabaka oluşturan sodyum hyaluronat şaşılık cerrahisinde hem klinikte hem de deneysel olarak kullanılmıştır. Clorfeine ve arkadaşları dokular arasındaki yapışıklıkları önleyebilmek amacıyla 14 konsektif şaşılık hastasında sodyum hyaluronat kullanmışlar ve postoperatif yapışıklıkları azalttığını belirtmişlerdir (57). Searl ve arkadaşları tarafından 7 tavşanın 14 gözünde sodyum hyaluronat kullanılarak mekanik ve histopatolojik incelemeler sonucunda %1' lik sodyum hyaluronatın postoperatif yapışıklıkları azaltabileceği sonucuna varılmıştır (58).

Özkan ve arkadaşları bir deneysel tavşan çalışmasında şaşılık cerrahisinde dokular arasında oluşan yapışıklıkları önleyebilmek için seprafilm membran kullanmışlardır. Seprafilm, sodyum hyaluronat ve karboksimetilselülozdan oluşan eriyebilen bir membrandır. Geçici bir bariyer işlevi görerek dokuları ayırır. Sonuçta kas, konjonktiva ve sklera dokuları arasında oluşan yapışıklıkların seprafilm membran ile azaldığını bildirmişlerdir (16).

Gedik ve arkadaşları deneysel çalışmalarında 3 ayrı çalışma grubunda antiadeziv polimer jel olan ADCON-L, konvansiyonel ve polimer kaplı lipozom kullanarak, şaşılık cerrahisinde fibrozis üzerine etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Sonuçta ADCON-L' nin postoperatif fibrozisi azalttığını, konvansiyonel ve polimer kaplı lipozom uygulamalarının ise adezyonları önlemede etkili olmadığını ifade etmişlerdir (59). Choi ve arkadaşları tavşan gözünde ayarlanabilir sütür cerrahisinde ADCON-L' in etkinliğini değerlendirdikleri bir çalışmada ADCON-L'in, dengeli tuz solüsyonu kullanılan kontrol grubuna göre üstünlüğü olduğunu göstermişlerdir (15).

Postoperatif yapışıklıkları önlemek amacıyla kullanılan diğer bir ajan antrasiklin ailesinin üyesi kemoterapötik daunorubisin olmuştur. Dadeya ve arkadaşları 24 hastayı kapsayan çalışmalarında intraoperatif % 0,02 dozunda daunorubisin kullanmışlardır. Çalışmada % 0,02' lik daunorubicin 3 dakika süreyle sklera yüzeyine uygulanmış, peşinden uygulama sahası yıkanmıştır. Kontrol grubunda ise cerrahi saha serum fizyolojikle yıkanmıştır. Çalışma sonucunda yapışıklıkların önlenmesinde daunorubisin kontrol grubuna

göre üstün bulunmuş ve intraoperatif % 0,02 daunorubisinin 3 dakika süreyle kullanımı önerilmiştir (60).

Jung ve arkadaşlarının 16 tavşanda gerçekleştirdikleri deneysel şaşılık cerrahisi modelinde anti-TGF- β ajan olan pirfenidonun postoperatif inflamasyon ve fibrozis üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada pirfenidon lipozomal formu (0.5 mg/ml) 0.4 ml dozunda superior rektus kasına komşu subkonjonktival alana enjekte edilmiştir. Etkinliği serum fizyolojik ile yüklü lipozomların enjekte edildiği grupla karşılaştırılmıştır. Operasyondan 3 gün sonra akut inflamasyon değerlendirmek amacıyla 8 tavşanın 16 gözünde anti-CD11b antikoru ile immünoflöresans bakılmış, pirfenidon grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma tesbit etmişlerdir. 4. haftada 8 tavşanın 16 gözünde masson trikrom boyama ile geç dönem fibrozis değerlendirilmiş, azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar eşliğinde pirfenidonun intraoperatif enjeksiyonunun şaşılık cerrahisi sonrası gelişen inflamasyonu ve fibrozisi azaltmak amaçlı kullanılabilecek adjuvan ajan olabileceği sonucuna varılmıştır (61).

Doku yapışıklığını azaltmaya yönelik çalışmalar içinde bariyer matriks ajanların kullanımı da yer almaktadır.

Shokida, insanlarda ince bir silikon tabakayı kas ve sklera arasına yerleştirerek ameliyat sonrasında bu dokuların yapışmasını önlemeye çalışmış, bu sayede ayarlamayı 11 güne kadar geciktirmiştir. Son ayarlamadan sonra silikon tabakayı çıkarmıştır (62).

Hwang ve Chang tarafından yapılan bir deneysel tavşan çalışmasında eriyebilen adezyon bariyeri olan Interceed ve poliglaktin 910 vikril bariyerin ayarlanabilir sütür cerrahisinde, ayarlama süresi ve doku yapışıklıkları üzerine etkinliği araştırılmıştır. Interceed grubunda bulunan beş gözün dördünde 1. haftada ayarlama yapılabilmektedir. Bu grupta 2. haftada ancak bir gözde ayarlama mümkün olmuş, 3. haftada ise hiçbir gözde ayarlama yapılamamıştır. Poliglaktin 910 bariyer ağ kullanılan beş gözün üç tanesinde 1. haftada ayarlama yapılabilmektedir, 2. ve 3. haftada ise hiçbir gözde ayarlama yapılamamıştır (63). Yazarlar bir diğer çalışmalarında aynı modelde 5-fluorourasil (5-FU) ve Interceed' in etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, 5-FU, 5-FU + Interceed ve 5-FU + Interceed + Viscoat kullanılan üç grup oluşturularak kas gerginliği ve ayarlama süresi değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, 5-FU + Interceed + Viscoat' ın birlikte kullanılmasıyla ayarlamamanın postoperatif 1. haftada yapılabileceği bildirilmiştir (14).

Lee ve arkadaşları deneysel çalışmalarında PTFE/PLGA (Polytetrafluoroethylene/ Polylactide-co-glycolide) kullanarak sütür ayarlamasını 3 ve 5. haftada gerçekleştirdiklerini ifade etmişlerdir. PTFE kullanılan grupta 3. haftada 8 gözün 5 tanesinde, 5. hafta sonunda ise

10 gözün 5 tanesinde ayarlama yapılabilmektedir. PTFE/PLGA kullanıldığında ise, hem 3, hem de 5. haftada 10 gözün 8' inde ayarlama mümkün olmuştur (12).

Kim ve arkadaşları deneysel çalışmalarında poliüretan film tabaka kullanarak, bu bariyer tabakanın ayarlamayı geciktirme ve dokular arası yapışıklığı önleme üzerine etkisini araştırmışlardır. Oluşturulan 2 çalışma grubundan birisinde sadece poliüretan film tabaka, ikinci grupta poliüretan film tabaka ile deksametazon kullanılmıştır. Bu çalışmada 4. haftada poliüretan film tabaka ile deksametazon kullanılan tavşanların tamamında, sadece poliüretan film tabaka kullanılan tavşanların % 90' ında ayarlama mümkün olmuştur. Yine her 2 grupta, gözlerin % 90' ında ayarlama postoperatif 6 haftaya kadar geciktirilebilmiştir (10).

Çağlar ve arkadaşlarının 36 tavşan gözünde suramin, genistein ve kollajen matriks duragenin ayarlanabilir sütürlü şaşılık cerrahisi sonrasında inflamasyonu, fibrozisi önlemedeki ve ayarlamayı geciktirmedeki etkinliğini belirlemek amaçlı gerçekleştirdikleri çalışmada her 3 ajanın da adezyonu azaltarak ayarlamayı kolaylaştırdığını, suramin ve genisteinin büyüme faktör ekspresyonunu süprese ettiğini, ancak ayarlayabilme için en uzun süreyi duragenin sağladığını belirtmişlerdir (64).

Günümüzde kullanılan bu ajanlar dan hiçbiri klinikte rutin kullanıma girmemiştir. İdeal antiadeziv, antifibrotik madde arayışı devam etmektedir.

Çalışmamızda antifibrotik ve antiproliferatif özelliklere sahip ajan olarak kullandığımız nintedanib oftalmoloji alanında in vivo deneysel çalışmalarda ve klinik çalışmalarda daha önce bu amaçla kullanılmamıştır.

Nintedanib, idiyopatik pulmoner fibrosis tedavisinde oral yolla kullanılan antifibrotik bir ilaçtır (20). Güçlü antianjiyojenik ve antineoplastik etkinliğe sahiptir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (65), böbrek kanseri (66), kolorektal kanser (67), overyan kanser ve prostat kanseri(68) gibi birçok kanserin tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Nintedanibin bu kadar geniş uygulanma alanına sahip olması hedef aldığı reseptörlerin kritik hücrel fonksiyonlarda rol oynadığı düşünüldüğünde şaşırtıcı olmamalıdır. Platelet ilişkili büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) α ve β , vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü (VEGFR) 1-3, fibroblast büyüme faktör reseptörü (FGFR) 1-3' ün de dahil olduğu tirozin kinaz reseptörlerinin intraselüler inhibitörüdür. Nintedanib, bu reseptörlerin adenosin trifosfat (ATP) bağlayan kısmına kompetitif olarak bağlanır ve intraselüler sinyalizasyonu dönüşümlü olarak bloke eder. Sonuçta, endotel hücrelerde apoptozisi ve tümör vaskülarizasyonunda azalmayı indükler, tümör hücresi çoğalmasını ve göçünü inhibe eder. Ayrıca nintedanib, Flt-3

(Fms-benzeri tirozin-protein kinaz), Lck (lenfosit-spesifik tirozin-protein kinaz), Lyn (tirozin-protein kinaz lyn) ve Src (proto-onkogen tirozin-protein kinaz src) kinazları da inhibe eder.

Nintedanib, idiyopatik pulmoner fibrozis (IPF) patolojisinde temel rol oynayan hücreler olan akciğer fibroblastları/miyofibroblastlarının proliferasyon, migrasyon ve farklılaşmasında kritik işlevi olan FGFR ve PDGFR sinyalizasyon kaskatlarının aktivasyonunu inhibe eder. Nintedanib ile VEGFR inhibisyonunun ve nintedanibin antianjiyojenik aktivitesinin IPF patolojisi üzerinde potansiyel etkisi tam olarak anlaşılmamıştır. Nintedanib, IPF hastalarından alınan insan akciğer fibroblastlarının çoğalmasını, yer değiştirmesini ve fibroblasttan miyofibroblasta dönüşümünü inhibe eder (21). Akciğer fibrozisi hayvan modellerinde antifibrotik ve antiinflamatuvar etkinliği gösterilmiştir (22). Akciğer fibroblastlarının proliferasyonu, migrasyonu, farklılaşması ve ekstraselüler matriks proteinlerinin sekresyonu gibi fibrozis gelişimindeki ana olaylarda etkin olduğu gösterilmiştir (22). Thomopoulos ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada nintedanibin hedef aldığı PDGFR ve FGFR' nin intraoküler fibrozis patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (69).

Sıçan ve farelerde yapılan tek doz toksisite çalışmaları, nintedanibin akut toksisite potansiyelinin düşük olduğunu göstermiştir. Sıçanlardaki tekrar doz toksikoloji çalışmalarında advers etkiler (örneğin, epifizyal plakların kalınlaşması, kesici dişlerin lezyonu) çoğunlukla nintedanibin etki mekanizmasıyla (yani, VEGFR-2 inhibisyonu) ilişkili bulunmuştur. Bu değişiklikler, diğer VEGFR-2 inhibitörlerinden de bilinmektedir ve sınıf etkileri olarak sınıflandırılabilir. Kemirgen olmayanlarda yapılan toksisite çalışmalarında, gıda tüketiminde azalma ve vücut ağırlığında azalmanın eşlik ettiği diyare ve kusma gözlenmiştir. Sıçan, köpek ve Cynomolgus maymunlarında karaciğer enzimlerinde yükselmeye dair hiçbir kanıt bulunmamıştır. Diyare gibi ciddi advers etkilere bağlı olmayan hafif karaciğer enzim artışları sadece Rhesus maymunlarında gözlenmiştir. Sıçanlarda, günde iki kez 150 mg olan maksimum önerilen insan dozu (MRHD) ile elde edilen insan maruziyetinin altındaki düzeylerde, embriyofötal letalite ve teratojenik etkiler gözlenmiştir. Ayrıca, terapötik dozun altındaki maruziyet düzeylerinde aksiyal iskelet gelişimi ve büyük arterlerin gelişimi üzerine de etkiler kaydedilmiştir (70). Tavşanlarda, maksimum önerilen insan dozundan yaklaşık 3 kat yüksek maruziyette embriyofötal letalite ve teratojenik etkiler gözlenmiştir. Ancak, embriyofötal aksiyal iskelet gelişimi ve kalp üzerindeki şüpheli etkiler, günde iki kez 150 mg şeklinde önerilen maksimum insan dozu ile elde edilenin altındaki bir maruziyette gözlenmiştir.

Sıçanlarda yapılan bir prenatal ve postnatal gelişim çalışmasında, önerilen maksimum insan dozunun altında bir maruziyette prenatal ve postnatal gelişim üzerinde etkiler gözlenmiştir.

Sıçanlara uygulanan, implantasyona kadar süren bir erkek fertilitesi ve erken embriyonik gelişim çalışması, erkek üreme yolu ve erkek fertilitesi üzerinde etkiler göstermemiştir. Sıçanlarda, radyoaktif işaretli nintedanib ve/veya metabolitlerinin küçük miktarları süte salgılanmıştır (uygulanan dozun \leq %0.5' i). Fare ve sıçanlarda yürütülen 2 yıllık karsinojenite çalışmalarında, nintedanibin karsinojenik potansiyeli ile ilgili bir kanıt ortaya çıkmamıştır. Genotoksisite çalışmaları, nintedanib için hiçbir mutajenik potansiyel göstermemiştir. Tek doz nintedanibin %1' inden daha azı böbrekler aracılığı ile atılır. Nintedanib, esas olarak safra/feçes yoluyla elimine edilir (>%90) (70).

İdiyopatik pulmoner fibrozisli hastalarda nintedanibin güvenilirliğini ve etkinliğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen INPULSIS çalışmalarında en sık bildirilen gastrointestinal advers reaksiyon diyaredir (70). Diyare, OFEV (nintedanib) grubundaki hastaların % 62.4' ünde bildirilmesine karşı, plasebo grubunda hastaların % 18.4' ünde bildirilmiştir. Hastaların çoğunda diyare olayları hafif-orta şiddettedir ve tedavinin ilk 3 ayında ortaya çıkmıştır. Diyare, hastaların % 10.7' sinde doz azaltmasına ve % 4.4' ünde nintedanib tedavisinin kesilmesine yol açmıştır. Mide bulantısı ve kusma, sıklıkla bildirilen gastrointestinal advers reaksiyonlardır. Mide bulantısı ve kusma şikayeti olan hastaların çoğunda olay, hafif-orta şiddettedir. Mide bulantısı, hastaların % 2.0' sinde nintedanib tedavisinin kesilmesine yol açmıştır. Kusma, hastaların % 0.8' inde nintedanib tedavisinin kesilmesine yol açmıştır. Nintedanib uygulaması, karaciğer enzimlerinde (ALT, AST, alkalen fosfataz (ALP), gammaglutamiltransferaz (GGT)) yükselme ile ilişkili bulunmuştur. Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörünün (VEGFR) inhibisyonu, kanama riskinde artış ile ilgili olabilir. OFEV ile yürütülen INPULSIS çalışmalarında, OFEV kolunda kanama advers olayları yaşayan hastaların sıklığı (% 10.3), plasebo kolundaki hastalardan (% 7.8) hafif oranda daha yüksek olmuştur. Ciddi olmayan epistaksis en sık görülen kanama olayıdır. 2 tedavi grubunda da, ciddi kanama olayları düşük ve benzer sıklıklarda (plasebo: % 1.4; OFEV % 1.3) ortaya çıkmıştır. Arteriyel tromboembolik olaylar sık olmayan şekilde bildirilmiştir. Plasebo kullanan hastalarda % 0.7 ve nintedanib kullanan hastalarda % 2.5 şeklindedir. İskemik kalp hastalığına işaret eden advers olaylar, nintedanib ve plasebo grupları arasında dengeli olmakla birlikte, miyokard infarktüsü, nintedanib grubundaki hastalarda (% 1.6), plaseboya göre (% 0.5), daha yüksek bir yüzde ile görülmüştür. INPULSIS çalışmalarında, nintedanib ile tedavi edilen hastalarda venöz tromboembolizm riskinde artma gözlenmemiştir. Nintedanibin etki mekanizması nedeniyle hastalar, tromboembolik olaylar açısından daha yüksek risk altında olabilir. INPULSIS çalışmalarında nintedanib ile tedavi edilen hastalarda

gastrointestinal perforasyon riskinde bir artma gözlenmemiştir. OFEV uygulaması, kan basıncını artırabilir (70).

İlaçla ilgili bilinen tüm bu komplikasyonlar nedeniyle güvenilirliği ile ilgili gelişen şüpheler kullanımını kısıtlayabilecektir. Ancak, ilacın sistemik dozu düşünüldüğünde subkonjonktival yolla uygulanan dozların düşük olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Biz çalışmamız sırasında herhangi bir sistemik yan etkinin yanı sıra göz ile ilişkili korneal erozyon, skleral incelme ya da ilaç ilişkili enfeksiyon şeklinde sayılabilecek herhangi bir yan etki saptamadık.

İlacın oftalmolojik formunun bulunmaması nedeniyle optimal uygulama yolunu belirlemek amacıyla hayvan çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Biz çalışmamızda nintedanibi topikal damla şeklinde uygulamak yerine subkonjonktival enjeksiyon şeklinde uygulamayı tercih ettik. Böylelikle ilacın hedeflenen alana direkt olarak ulaşmasının sağlanmasını hedefledik. Ek olarak, ilacın uzun etkili formu hazırlanarak tekrarlanan uygulananımdan kaçınılabılır ve böylelikle hasta uyumu artırılabilir. Subkonjonktival enjeksiyon suda çözünür ilaçların geçişi için hız kısıtlayıcı basamak olan konjonktival epitel bariyerin geçilmesini sağlar. Böylelikle transkloral yolun kornea-konjonktiva bariyerini bypas etmesi sağlanmış olur. Subkonjonktival uygulamada konjonktivadaki kan ve lenfatik dolaşım nedeniyle ilaç hızla elimine olabilmektedir (71). Ancak ilacın lipozom, nanopartikül, mikroemülsiyon ve nanoemülsiyon gibi kolloidal herhangi bir formunun hazırlanması ile hedef bölgede sürekli ve kontrollü salınımı sağlanarak ilacın etkinliği daha az sıklıkta uygulanarak elde edilebilir (72).

İnflamasyonun başlangıcı ve kontrolü, birçok basamaktan oluşan kompleks bir olaydır. Dokuya ani bir şekilde nötrofil göçü gelişir, ardından konnektif dokuyu makrofajlar istila eder ve burada hasar görmüş kas dokusunu çevrelerler. Diğer yandan inflamatuvar reaksiyonun bir komponenti de vazodilatasyon gelişimi ve doku ödemeine yol açan artmış vasküler geçirgenliktir. Bu inflamatuvar olaylar sonrasında miyofibroblastlar ve subkonjonktival fibroblastlar aktifleşip bölünür. Aktifleşmiş fibroblastlar adezyon ve fibrozisle ilişkilidir.

Cerrahi sonrasındaki ilk 3 hafta boyunca fibroblastlar yara yerine göç eder, proliferer olur ve kollajen tip 1 ve tip 3 sentezlemeye başlarlar. Ancak fibroblastların göçü ilk 2-3 gün içinde başlamaktadır. Proliferatif faz sonrasındaki aylarda proliferasyon azalır. Kollajen sentezi ve yeniden şekillenme artar. Böylelikle cerrahi yerinde yaranın gücü giderek artar. Biz de çalışmamızda inflamasyon ve fibrozis için en aktif süre ilk 1 haftalık periyod olduğu için nintedanibi operasyon bitiminde, postoperatif 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerde uygulamayı tercih ettik. Çalışmamız, kollajen matürasyonunun 12-18 ay devam ettiği düşünüldüğünde, 4 haftadan oluşan kısa takip dönemi nedeniyle kısıtlı bir çalışmadır (73).

Çalışmamızda konjonktival inflamasyon ve vaskülaritenin, skleral inflamasyonun, perimüsküler fibrozisin, rektus kas fibrozisinin ve adezyonun cerrahi sonrası arttığı istatistiksel olarak ispatlanmıştır.

Hasar, yara iyileşmesi için bir stimulustur ve başarılı iyileşme yara dokusunun apozisyonunu gerektirir. Fizyolojik olarak tenon kapsülünde inaktif olarak bulunan insan tenon fibroblastları (İTF), skar oluşumunun ana komponentidir. Subkonjonktival ve perimüsküler fibrozis, insan tenon fibroblastlarının (İTF) aktiviteleri aracılığıyla gerçekleşir. Cerrahi sonrası 24 saat içinde aktifleşmiş insan tenon fibroblastları proliferere olur ve yara yerine doğru göç eder. Adezyon oluşumunda ana olay, İTF'lerin miyofibroblastlara transdiferensiasyonudur. İTF'ler birçok fibrojenik faktör ile stimülasyon sonrasında miyofibroblastlara farklılaşır. Aktif İTF'ler, tip 1, 3, 5 ve 6 kollajenleri gibi ekstraselüler matriks proteinlerini üretebilir. Ek olarak, İTF'lerin kontraktil özelliklere sahip miyofibroblastlara dönüşümü ile ekstraselüler matrikste büzülme meydana gelir, bu durum skar oluşumuna katkıda bulunur. İTF aktivasyonunun başlıca stimulusu, TGF β 'dir. TGF- β , yara iyileşmesinin her aşamasında etkindir ve fibroplazinin en potent stimulanıdır. Trombositler, nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlardan salınır. Fibroblast proliferasyonunu ve farklılaşmasını indükleyerek granülasyon dokusu oluşumu ve kollajen sentezini sağlar. Bu nedenle anti-TGF- β ajanları yara iyileşmesini düzenlemek, inflamasyonu ve fibrozisi kontrol etmek için potansiyel tedavi yöntemi sağlamaktadır. Bir yandan da TGF- β 'nin aşırı inflamasyonun genel baskılayıcısı olduğu bilinmektedir. Bu şekilde inflamatuvar hastalıkların kronik fazı sırasında fibrozis indüksiyonunda başrolde olduğu bilinmektedir (73).

Nintedanib antifibrotik etkinliğini fibroblastların TGF- β ile indüklenmiş miyofibroblast dönüşümünü engelleyerek göstermektedir. 2019 yılında yayınlanan bir çalışmada nintedanibin şaşılık ve glokom cerrahisi uygulanacak hastalardan alınan insan tenon kapsülü fibroblastlarında doza bağımlı bir şekilde (0.1, 0.5, 1 μ M) TGF- β ile indüklenen proliferasyon ve migrasyonu inhibe ettiği, fibroblastların miyofibroblastlara TGF- β ile indüklenen dönüşümünü inhibe ettiği in vitro olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada nintedanibin klasik Smad 2/3 sinyal kaskadının yanı sıra klasik olmayan p38MAPK ve ERK1/2 yollarını da hedef aldığı bildirilmiştir (23).

Lehtonen ve arkadaşlarının yaptığı in vitro çalışmada nintedanibin hem sağlıklı akciğerden hem de idiyopatik pulmoner fibrozis tanılı akciğerden elde edilmiş fibroblastların proliferasyonunu doza bağımlı şekilde azalttığı; 0,5 mikromolar nintedanibin α -sma ekspresyonunu azalttığı; 0,5 mikromolar nintedanibin miyofibroblastların intraselüler aktin,

fibronektin gibi ultrayapısal özelliklerini transmisyon elektron mikroskopuyla inceleyerek azalttığı gösterilmiştir (75).

Lehmann ve arkadaşlarının nintedanib ve anti-TGF- β ajan olan pirfenidonun insan ve fare akciğer alveolar epitel hücre fonksiyonunu nasıl etkilediğini aydınlatmak amaçlı yaptıkları çalışmada bleomisin ile indüklenmiş hücrelerde nintedanibin 0.1, 1 ve 10 mikromolar dozları çalışılmış, 1 mikromolar dozundaki nintedanibin fibrotik genlerin ekspresyonunu en etkin olarak azalttığı gösterilmiştir (76).

Rangarajan ve arkadaşlarının nintedanibin antifibrotik etkisinin mekanizmasını belirlemek amaçlı sağlam akciğer ve idiyopatik pulmoner fibrozis (IPF) tanılı akciğerden elde edilmiş fibroblastlar üzerinde yaptığı çalışmada nintedanibin 3 dozu 3 farklı zaman dilimi çalışılmıştır. IPF tanılı akciğer fibroblastlarında nintedanibin ekstraselüler matris proteinleri olan fibronektin ve kollajen 1 α 1' in ekspresyonunu doz ve zaman bağımlı şekilde azalttığını, 2 mikromolar dozun 0,5 ve 1 mikromolar dozdan daha etkili olduğunu ve 72. saatte 24 ve 48. saate göre daha etkin olduğunu göstermiştir. Çalışmanın sonucunda nintedanibin TGF- β reseptör sinyali inhibisyonu, TGF- β sinyalinden bağımsız olarak fibronektin ve kollajen 1 α 1 mRNA ekspresyonu inhibisyonu, nonkanonik yolak ile fibroblastlarda otofaji indüksiyonu ve fibroblastların TGF- β ile tetiklenen miyofibroblast dönüşümünü inhibe ettiği belirtilmiştir (77).

Çalışmamızda sham grubunda yara yerinde TGF- β düzeyindeki artışı gösterdik. 1, 5 ve 10 mikromolar nintedanib dozları uygulanan gözlerde ise bu TGF- β düzeyindeki artışın kademeli olarak daha düşük olduğu ve en düşük TGF- β düzeyinin ise 10 mikromolar nintedanib uygulanan göz grubunda olduğunu histopatolojik incelemede gösterdik. Ayrıca triamsinolon asetonidin ise yara yerinde oluşan TGF- β düzeyindeki artışı azaltsa da nintedanib kadar etkili olmadığını gösterdik.

Katrin ve arkadaşlarının nintedanibin antifibrotik etkisinin mekanizmasını belirlemek amaçlı sağlam akciğer ve idiyopatik pulmoner fibrozis (IPF) tanılı akciğerden elde edilmiş fibroblastlar üzerinde yaptığı çalışmada her iki grupta da 1 mikromolar nintedanibin TGF- β ile indüklenmiş kollajen sekresyonunu ciddi düzeyde önlediği gösterilmiştir (78).

Literatürde mevcut olan in vitro çalışmalarda nintedanib geniş konsantrasyon aralığında kullanılmıştır (10 mikromolar dozuna kadar). Biz de çalışmamızda çeşitli çalışmalarda en çok kullanılmış ve Lehmann ve arkadaşlarının (76) yaptığı çalışmada kullanılan 1 mikromolar dozunu ve doz bağımlı etkiyi görebilmek için daha yüksek dozlar olan 5 ve 10 mikromolar dozlarını kullanmayı tercih ettik.

Huang ve arkadaşlarının dermal fibroblastlar üzerine yaptığı çalışmada nintedanibin hem sağlam hem de sistemik skleroz tanılı kişilerden elde edilmiş dermal fibroblastlarda doz bağımlı şekilde PDGF ve TGF- β ilişkili proliferasyonu, migrasyonu, miyofibroblast farklılaşmasını ve kollajen salınımını azalttığı gösterilmiştir (79). Nintedanib sitokin ile tetiklenen fibroblast aktivasyonunu inhibe etmesinin yanı sıra sistemik skleroza ait fibroblastların endojen aktivasyonunu da inhibe etmiştir. Bleomisin ile tetiklenmiş cilt fibrozisini doz bağımlı şekilde önlemesine ek olarak bleomisin ile indüklenmiş var olan fibroziste de regresyonu indüklediği gösterilmiştir. Farede geliştirilmiş graft versus host hastalığı (GVHH) modelinde nintedanib kullanılmış, GVHH' ye sekonder gelişen deneysel skleroderma tablosunu hafiflettiğini göstermişlerdir.

Suesskind ve arkadaşlarının akciğer transplantasyonu sonrası gelişen ve patogenezinde büyüme faktörlerinin önemli rol oynadığı kronik akciğer allogreft disfonksiyonunu önlemek ve tedavi etmek amaçlı gerçekleştirdikleri çalışmada postoperatif 60. günde bakılan immünohistolojik analiz sonucunda büyüme faktörleri ve reseptörleri ekspresyonunda azalma görülmüştür (özellikle PDGF ve PDGF- α reseptörü, VEGF ve VEGF reseptörü-2). Ancak nintedanible tedavi edilmiş allogreftlerde edilmemiş olanlarla kıyaslandığında fibrotik değişikliklerde azalma saptanmıştır (80).

Ton Lin ve Lan Gong' un yaptığı çalışmada nintedanibin in vitro olarak lenfatik endotel hücre ile tetiklenen lenfanjiyogenezi ve in vivo olarak inflamatuvar korneal lenfanjiyogenezi inhibe ettiğini araştırmak hedeflenmiştir. VEGF-C, PDGF-BB ve bFGF uygulanması ile lenf endotel hücrelerinde proliferasyonda, migrasyonda ve tüp formasyonunda artış ve bu artışta nintedanib 0.1 mikromolar dozunda uygulanması sonrası azalma saptandı. Nintedanibin topikal ve sistemik uygulanması fare korneasında sütür ile tetiklenen hemanjiyogenezi ve lenfanjiyogenezi inhibe ettiği gösterildi. Bu çalışmanın in vitro basamağında nintedanibin çözücüsü olarak kullanılan DMSO (Dimetilsülfoksit) kontrol grubuna uygulanmış, lenf endotel hücrelerinde proliferasyona, migrasyona ve tüp formasyonuna etki etmediği gösterilmiştir (81).

Dimetilsülfoksit, kimyasal solvent olarak kullanılan yüksek polariteli organik sıvıdır. Biyolojik membranlara penetre olabilmesi nedeni ile farmasötiklerin topikal uygulanmasında aracı olarak kullanılabilir (82). DMSO' nun hücredeki özgün etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte kuvvetli hidroksil radikal tutucu ve antioksidan özelliği vardır ve bu özelliğinin bu maddenin etkinliğinde rol oynadığı kabul edilmektedir. DMSO' nun hidroksil radikali tutucusu olması nedeniyle hücre kültürlerinde radyasyon zararlarından koruyucu olarak kullanılabilirliği ifade edilmektedir. DMSO inflamasyon inhibisyonu ve

analjezi gibi farmakolojik aktiviteler göstermektedir. Bazı çalışmalarda yumuşak doku zedelenmesi, lokal doku kaybı, cilt ülserleri ve yanıklarının tedavisinde kullanılabileceği dokümente edilmiştir (83). Tavşan gözünde korneal alkali yanık oluşturularak, topikal %20 DMSO' nun etkinliğinin araştırıldığı bir deneysel çalışmada 3. günde korneal opasifikasyon ve korneal ülserasyon DMSO grubunda kontrol grubundan anlamlı düzeyde az bulunmuştur. Ancak bu etki çalışmanın ilerleyen günlerinde korunamamıştır (84). Çalışmamızda DMSO toz formundaki nintedanibin çözücüsü olarak kullanılmıştır ve etkinliğinin 3 doz formunda denenilen nintedanib grupları içerisinde etkisiz olduğuna karar verilmiştir. Xianchi Lin ve arkadaşlarının insan tenon fibroblastları üzerinde gerçekleştirdiği in vitro çalışmada dmso grubu oluşturulmadan nintedanibin etkinliği araştırılmış ve TGF- β ilişkili proliferasyonu, migrasyonu, miyofibroblast farklılaşmasını ve kollajen salınımını azalttığı gösterilmiştir (23).

Çalışmamızda 1, 5 ve 10 mikromolar nintedanibin subkonjonktival olarak uygulanması sonucunda yapılan histopatolojik inceleme nintedanibin antiinflamatuvar etkinliğini istatistiksel olarak ispatlamıştır (Tablo 6). Nintedanibin 3 dozu arasındaki antiinflamatuvar etki derecesi histopatolojik incelemelerde farklı görünmekle birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Aralarında skleral inflamasyon ve konjonktival inflamasyon açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Konjonktival vaskülarite değerlendirildiğinde ise 10 mikromolar nintedanibin en etkin doz olduğu istatistiksel olarak ispatlanmıştır. 1 ve 5 mikromolar nintedanibin konjonktival vaskülarite üzerine etkisinde sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkları saptanmamıştır.

Nintedanibin in vitro çalışmalarda gösterilmiş antifibrotik etkinliği bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak kanıtlanmıştır. Perimüsküler fibrozisini azaltmış, ancak 3 doz arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Rektus kas fibrozisini azaltmada ise en etkin dozun 10 mikromolar nintedanib olduğu istatistiksel olarak kanıtlanmıştır. 1 ve 5 mikromolar nintedanibin rektus kas fibrozisi üzerindeki etkinliği istatistiksel olarak sham ve triamsinolon asetonid grubundan farksızdır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 1 mikromolar nintedanib grubunda rektus kas fibrozisi istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır. Bu durumda 1 mikromolar nintedanibin rektus kas fibrozisini azaltmada yetersiz kaldığını söyleyebiliriz. Adezyonu azaltma açısından değerlendirildiğinde nintedanib istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkin görülmemiştir. Ancak histopatolojik incelemeler değerlendirildiğinde sham grubunda adezyon gelişmeyen göz yok iken nintedanibin 1, 5, 10 mikromol gruplarında sırasıyla %50, %66.7 ve %66.7 oranında adezyon gelişmemiştir. Buna dayanarak nintedanibin adezyonu azalttığı düşünülebilir. Bu açıdan istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edememiş olmamız denek sayılarının yeterli olmamasından kaynaklanabilir. Bu bakımdan benzer bir

çalışmanın daha fazla denekle yapılmasının istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar ortaya koyabileceğini düşünmekteyiz.

Tendon matriksinin ana bileşeni olan kollajen tip1, normal şartlarda proteolitik yıkıma dirençlidir. Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin üyesi olan kollajenazlar, sağlam fibriller kollajeni parçalayabilen az sayıdaki enzimlerden biridir. Kollajenaz aktivitesine sahip MMP' ler arasında MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13 ve MMP-14 sayılabilir. Kollajen üçlü heliks yapısında tek bir noktadan parçalanma başlar. $\frac{3}{4}$ ve $\frac{1}{4}$ lük fragmanlar oluşur ve bunlar daha sonra içinde jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9) da olduğu birtakım proteinazlar tarafından parçalanmaya devam edilir. Matriks metalloproteinazları; fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotelial hücreler ve konnektif doku hücrelerinden proenzim olarak salınır. Yara iyileşmesi embriyogenezisi, normal dokunun yeniden şekillenmesi, yara iyileşmesi ve anjiyogenezis gibi patolojik, fizyolojik ve biyolojik olaylarda önemli rol oynamaktadır. MMP aktivitesindeki net artış, yara iyileşmesi sürecindeki yeniden şekillenme evresinin bir parçasını temsil edebilecek matriks degradasyonunu göstermektedir. Ekstraselüler matriks bileşenlerinin sentezi ve yıkımı arasındaki denge, doku bütünlüğünün devam ettirilmesi için vazgeçilmezdir. Ekstraselüler matriks yıkımı, metalloproteinazların doku inhibitörlerinin (TIMP) ve matriks metalloproteinazlarının seviyeleri arasındaki hassas denge tarafından regüle edilir. MMP' lerin aktive edilmesi, yıkım aktivitelerin regülasyonunda önemli bir basamaktır. Wong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada glokom filtrasyon cerrahisinde MMP inhibisyonunun subkonjonktival skar oluşumunu önlediği bulunmuştur (84). Shima ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise glokom filtrasyon cerrahisinde postoperatif yara iyileşmesinde MMP' lerin, özellikle MMP-2' nin, önemli bir rol oynadığı ve tedavide hedef alınabileceği öne sürülmüştür (86).

Cerrahi geçirmiş ekstraoküler kas tendonunun skar dokusundan bakılan hücre kültürü çalışmasında western blot yöntemi ile MMP-2 düzeyinin arttığını gösterilmiştir (74). Çalışmamızda cerrahi sonrası sham grubunda MMP-2 düzeyinde artış saptanmıştır. Nintedanib gruplarında ise MMP-2 düzeyinde sham grubuna kıyasla azalma görülmüştür. Nintedanibin 1, 5, 10 mikromolar grupları arasında fark saptanmamış olması 1 mikromolar dozda da bu etkiyi elde edebileceğimizi göstermiştir. Bu sonuçlar nintedanibin antifibrotik ve antiinflamatuvar etkinliğinde MMP-2 düzeyindeki azalmanın da etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Miyofibroblastlar, fibroblastlarda az miktarda görülen α -smooth muscle actin (α -sma)' yi yüksek düzeyde eksprese etmesi ile karakterizedir. Çalışmamızda nintedanibin 5 ve 10 mikromolar dozlarında α -sma ekspresyonunda belirgin azalma görülmüş; 1 mikromolar

dozun etkinliği daha az saptanmıştır. 1 µM nintedanib, triamsinolon asetonide göre α-sma ekspresyonunu daha fazla azaltmıştır. α-SMA ekspresyonundaki azalmanın nintedanibin geç dönemde fibrozisi azalttığının önemli bir kanıtı olarak değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

Kortikosteroidler antiinflamatuvar, antialerjik, immünsüpresif ve hemen her organ üzerindeki etkileri nedeniyle sık kullanılan ilaç grubudur. Steroidler anjiyogenez, proliferasyon ve göçü engelleyerek inflamatuvar fazı ve buna bağlı olarak yara iyileşmesini geciktirir (87). Triamsinolon asetonid de antiinflamatuvar ve immnspresr özelliği nedeniyle geniş terapötik aralığa sahiptir. Oftalmolojideki ana endikasyonu, akut ve kronik anterior ya da posterior üveitlerin tedavisi olsa da şalazyon ve göz kapağı hemanjiomlarında lezyon içi uygulanması söz konusudur (87, 88). Kortizonun 4 ya da 5 katı kadar potent bir steroiddir. Triamsinolon asetonidin yarılanma ömrü, kristal formda olmayan çözünebilen steroidlerden daha uzundur. Triamsinolon asetonidin fibroblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (89). Bu şekilde yara iyileşmesini değiştirir. Aynı zamanda traksiyonel retina dekolmanı gelişimini azaltmak için intravitreal uygulanması da söz konusudur (90).

Giangiacomo ve arkadaşlarının triamsinolon asetonidin subkonjonktival alandaki histopatolojisini incelemek amaçlı yaptıkları çalışmada trabekülektomi operasyonundan 1 hafta önce subkonjonktival triamsinolon asetonid uygulanmış, subkonjonktival fibroblastların nekrotik olduğu, kollajen liflerinin morfolojisinin değiştiği ve makrofaj infiltrasyonunun olduğu görülmüş. Triamsinolon asetonidin suda az çözünür olması lokal olarak uzun süreli steroid konsantrasyonu elde edilmesini sağlarken sistemik yan etki olasılığını da azaltır. 4 mg doz, adrenal süpresyon dozunun yalnızca onda biri kadardır. 4 mg dozda triamsinolon asetonidin etkisi uygulandığı alana sınırlandırılabilir (91).

Gruzeo ve arkadaşlarının filtrasyon cerrahisinde subkonjonktival triamsinolon asetonid intraoperatif uygulanmasının antifibrotik etkinliğini değerlendirmek amaçlı yaptığı çalışmada etkisi mitomisin-C ile karşılaştırılmıştır. 4 mg tek doz olarak uygulanan subkonjonktival triamsinolon asetonidin blebin ömrünü uzattığını, ölçülen ortalama göziçi basınçlarının her iki grupta da düşük olduğunu, triamsinolon asetonidin cerrahi sonrası özellikle erken dönemde yara iyileşmesini geciktirdiğini ve mitomisin-C kadar uzun etkili olmadığını belirtmiştir (18).

Oh Oh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada şaşılık cerrahisi sonrası adezyonları azaltmadaki etkinliğini değerlendirmek üzere sodyum hyaluronat ve triamsinolon asetonid kullanılmıştır ve etkileri karşılaştırılmıştır. 4 hafta süren çalışmanın sonucunda sodyum hyaluronat ile dokuların sarılması dokunun korunmasını sağlamış, postoperatif adezyonları azaltmıştır.

Triamsinolon asetonid ise tedavi uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında postoperatif adezyonda anlamlı fark saptanmamıştır (92).

Carvalho ve arkadaşlarının deneysel şaşılık cerrahisinde triamsinolon asetonidin inflamatuvar cevap üzerine etkisini araştırdığı çalışmada iki grup kullanılmıştır. İlk grupta tavşanlarda cerrahiye sekonder inflamatuvar ve fibrotik yanıtın istatistiksel anlamlı sonuç vermemesi nedeniyle 2. grupta inflamasyonu arttırmak amaçlı skleral yatağa koter uygulanmıştır. Bu çalışma triamsinolon asetonid uygulanan gözlerde granülom yanıtının kontrol grubuna göre dramatik azaldığını göstermiştir (19).

Çalışmamızda skleral yatağa her göze standart dozda koter uygulamayı tercih ettik. Böylelikle hem kanama kontrolü sağladık hem de inflamasyonu arttırarak ajanların etkinliği değerlendirme olasılığımızı arttırdığımızı düşünüyoruz.

Triamsinolon asetonidin cerrahi sonrası tek seferlik uygulanması postoperatif dönemde tedavi uyumunu arttırması nedeniyle önemli bir seçenektir. Subkonjonktival alanda beyaz bir kitle oluşturması ve ortadan kaybolmasınının 6-8 hafta sürmesi nedenli kozmetik problem yaratabilir (91).

Çalışmamızda triamsinolon asetonidin cerrahiye sekonder gelişen skleral inflamasyonu ve konjonktival inflamasyonu istatistiksel olarak azalttığımızı ispatladık. Triamsinolon asetonid grubunda diğer gruplarla kıyaslandığında konjonktival vaskülarite, perimüsküler fibrozis, rektus kas fibrozisi ve adezyon üzerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü. Bizim çalışmamızda triamsinolon asetonid postoperatif adezyonu ve fibrozisi azaltmada yeterli etkinlikte bulunmamıştır. Ancak antiinflamatuvar etkinliğinin antifibrotik etkinliğinden istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu söylenebilir. Bu durumda steroidlerin rutin tedavi protokolünde yer aldığını bildiğimize göre nintedanibin de tedaviye eklenmesinin etki mekanizmalarında farklılıklar olması nedeniyle adjuvan etki yaratabileceği düşünülebilir. Adjuvan etkinin gösterilmesi amacıyla bir tedavi grubunda nintedanibin ve triamsinolon asetonidin birlikte kullanıldığı farklı bir çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

10.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, nintedanib fibroblast aktivasyonunu önleyerek yara iyileşmesini geciktirebilir. Nintedanibin antifibrotik etkinliğinin diğer bir gruba uygulanan triamsinolon asetonide göre histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. Nintedanibin 1 ve 5 mikromolar dozlarına kıyasla 10 mikromolar dozu daha güçlü antiinflamatuvar ve antifibrotik etki göstermektedir. Şaşılık cerrahisinde postoperatif fibrozisi ve inflamasyonu azaltma açısından en başarılı grubun 10 mikromolar nintedanib kullanılan grup olduğu görülmüştür. Triamsinolon asetonid, asıl etkisini antiinflamatuvar olarak göstermiştir, antifibrotik etkinliği zayıftır. Bugün için şaşılık cerrahisi sonrası kullanılan steroidlerin çok sayıda yan etkileri olduğu bilinmesi nedeniyle nintedanibin daha güvenli ve daha etkili bir alternatif ajan olabileceği düşünülmektedir. Ancak sadece bu çalışmanın sonuçlarına bakılarak nintedanibin şuan için klinikte rutin kullanımı mümkün değildir. Nintedanibin daha önce subkonjonktival fibrozis ve şaşılık cerrahisinde antiadeziv ajan olarak kullanıldığı deneysel herhangi bir çalışma bulunmaması nedeniyle çalışmamız bu konuda yapılacak çalışmalara öncülük edecektir. Nintedanibin şaşılık cerrahisi sonrası gelişen adezyonları azaltmadaki etkisini göstermek amacıyla öncelikle daha geniş sayıda denekle yapılan hayvan deneylerine ve takiben insanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

11.ÖZET

Tavşanlarda Deneysel Ekstraoküler Kas Cerrahisi Sonrası Tirozin Kinaz İnhibitörü Nintedanib Kullanımının Postoperatif İnflamasyon, Fibrozis ve Adezyon Gelişimi Üzerine Etkisinin Histopatolojik Ve İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması

Amaç:Çalışmamızda deneysel şaşılık cerrahisi modeli oluşturulacak tavşanlarda multipl tirozin kinaz inhibitörü nintedanib ve uzun etki süresine sahip steroid ajan olan triamsinolon asetonidin(TA) postoperatif adezyonu, inflamasyonu ve fibrozisi önlemedeki etkinliğini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem:32 adet Yeni Zelanda tavşanının sağ gözleri çalışmaya dahil edildi. Üst rektus kasına cerrahi uygulandı. Çalışma grubu olarak serum fizyolojik(SF), TA ve 1, 5, 10 mikromolar dozlarında nintedanib kullanılan ve her biri 6 göz içeren 5 grup oluşturuldu. 28. günde gözler enükle edilikten sonra hematoksilen-eozin ve masson trikrom ile histopatolojik inceleme yapıldı. İmmünohistokimyasal incelemede transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β), matriks metalloproteinaz 2(MMP-2) ve α smooth muscle actin(α -SMA) ekspresyonu değerlendirildi.

Bulgular:SF grubunda konjonktival ve skleral inflamasyon derecesi nintedanib gruplarından, TA grubundan anlamlı olarak daha yüksekti($p<0.05$). SF grubunda perimüsküler fibrozis derecesi nintedanib gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti($p<0.05$). SF grubunda perimüsküler fibrozis derecesi TA grubundan anlamlı olarak farklı değildi($p>0.05$). SF grubunda konjonktival vaskülarite ve rektus kas fibrozis oranı 10 mikromol nintedanib grubundan anlamlı olarak daha yüksekti($p<0.05$). SF grubunda adezyon derecesi nintedanib gruplarından, TA grubundan anlamlı olarak farklı değildi($p>0.05$). TGF- β , MMP-2 ve α -SMA ekspresyonu SF grubunda nintedanib gruplarından daha yüksekti.

Sonuç:Nintedanib şaşılık cerrahisi sonrası gelişen inflamasyonu ve fibrozisi azaltmada etkin görülmüştür. Nintedanibin antifibrotik etkinliğinin triamsinolon asetonide göre histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. TA, asıl etkisini antiinflamatuvar olarak göstermiştir, antifibrotik etkinliği daha zayıftır. Bugün için şaşılık cerrahisi sonrası kullanılan steroidlerin çok sayıda ciddi yan etkileri olduğu bilinmesi nedeniyle nintedanibin daha güvenli ve daha etkili bir alternatif ajan olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ekstraoküler kas cerrahisi, fibrozis, inflamasyon, nintedanib, triamsinolon asetonid.

12.İNGİLİZCE ÖZET

Efficacy of a multiple tyrosine kinase inhibitor Nintedanib in Preventing Postoperative Inflammation, Fibrosis and Adhesion after Experimental Strabismus Surgery

Purpose: To investigate the efficacy of multiple tyrosine kinase inhibitor agent, nintedanib, on the prevention of postoperative inflammation, fibrosis and adhesion following strabismus surgery in rabbits in comparison with triamcinolone acetonide.

Methods: Right eyes of 32 New Zealand white rabbits underwent reinsertion of the superior rectus muscle. They were randomized to receive one of the following treatments: 0.9 % normal saline, triamcinolone asetonide, or one of the three doses of nintedanib subconjunctivally. On the 28th day, six eyes from each group were enucleated and histologically and immunohistochemically analyzed to assess the postoperative inflammatory changes, fibrosis and adhesion. Transforming growth factor- β (TGF- β), matrix metalloproteinase (MMP-2) and α -smooth muscle actin (α -SMA) expressions in each group were evaluated.

Results: Conjunctival inflammation and scleral inflammation in triamsinolone acetonide and nintedanib groups were significantly reduced compared to saline group ($p<0.05$). Conjunctival vascularity and rectus muscle fibrosis were significantly reduced in 10 micromolar nintedanib group ($p<0.05$). Nintedanib groups were statistically the most effective groups in the reduction of perimuscular fibrosis ($p<0.05$). There was no significant between-group difference in the degree of adhesion at 4 weeks after surgery ($p>0.05$). The expressions of TGF- β , MMP-2 ve α -SMA were reduced in nintedanib groups compared to saline group.

Conclusions: Nintedanib appears to attenuate postoperative inflammation and fibrosis after strabismus surgery. The intraoperative use of triamcinolone asetonide has a better antiinflammatory effect than its antiadhesive effect. Antifibrotic effect of nintedanib is stronger than triamcinolone acetonide which is evaluated histopathologically and immunohistochemically. Nintedanib may be a safer and stronger alternative agent in strabismus surgery when compared to steroids.

Keywords: Extraocular muscle surgery, fibrosis, inflammation, nintedanib, triamcinolone acetonide.

13.KAYNAKÇA

- 1) Sanaç AŞ. Şaşılık ve Tedavisi, Ankara, Pelin Ofset, 2001.
- 2) Mora JS, Sprunger DT, Helveston EM, Evan AP. Intraoperative sponge 5-fluorouracil to reduce postoperative scarring in strabismus surgery. JAAPOS 1997; 1:92-97.
- 3) Sheha H, Casas V, Hayashida Y. The use of amniotic membrane in reducing adhesions after strabismus surgery. JAAPOS 2009;13: 99-101.
- 4) Shokida MF. Use of a silicone sheet for delayed adjustable strabismus surgery. Ophthalmic Surgery 1993; 24:486-8.
- 5) Dunlap EA. Surgery of muscle adhesions and effects of multiple operations. Br J Ophthalmol 1974; 58:307-12.
- 6) Cengiz Y, Altintas O, Manav Ay G, Caglar Y. Comparison of the effectiveness of mitomycin-C and Viscoat on delayed adjustable strabismus surgery in rabbits. Eur J Ophthalmol 2005; 15:530-5.
- 7) Searl SS, Metz HS, Lindahl KJ. The use of sodium hyaluronate as a biologic sleeve in strabismus surgery. Ann Ophthalmol 1987; 19:259-62.
- 8) Dadeya S, Kamlesh, Fatima S. Preliminary results of intraoperative daunorubicin in strabismus surgery. J Pediatr Ophthalmol Strabismus 2002; 39:340-4.
- 9) Oh SY, Park DW, Chang BL. The effect of mitomycin-C on the healing process in rabbit extraocular muscle surgery. Ophthalmic Surg Lasers 1999; 30:305-9.
- 10) Kim JH, Jeong SY, Jung MH, Hwang JM. Use of polyurethane with sustained release dexamethasone in delayed adjustable strabismus surgery. Br J Ophthalmol 2004; 88:1450-4.
- 11) Nguyen KD, Lee DA. Effect of steroids and nonsteroidal antiinflammatory agents on human ocular fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33:2693- 2701.
- 12) Lee MJ, Jin SE, Kim CK, Choung HK, Jeoung JW, Kim HJ, Choe G, Hwang JM. Slow-releasing tranilast in polytetrafluoroethylene/poly lactide-co-glycolide laminate delays adjustment after strabismus surgery in rabbit model. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48:699-704.
- 13) Lee DA, Lee TC, Cortez AE. Effects of mithramycin, mitomycin, daunorubicin and bleomycin on human subconjunctival fibroblast attachment and proliferation. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990; 31:2136-2144.
- 14) Hwang JM, Chang BL. Combined effect of Interceed and 5-fluorouracil on delayed adjustable strabismus surgery. Br J Ophthalmol 1999; 83:788-791.

- 15) Choi MY, Auh S, Choi DG, Chang BL. Effect of ADCON-L on adjustable strabismus surgery in rabbits. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:80-84.
- 16) Özkan SB, Kır E, Culhacı N, Dayanır V. The Effect of Seprafilm on Adhesions in Strabismus Surgery- An Experimental Study. *JAAPOS* 2004; 8:46-9.
- 17) Hwang JM, Chang BL. Combined effect of polytetrafluoroethylene and 5-fluorouracil on delayed adjustable strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2000; 37:163-7.
- 18) Gruezo Krishlex G., Paolo Antonio S. Silva, Patricia M. Khu, Rafael M. Valenzuela, Yasmine C. Ronquillo. Efficacy of intraoperative subconjunctival triamcinolone acetate as antifibrotic agent in filtration surgery. *Philipp J Ophthalmol* 2007; 32(2): 60-65.
- 19) Luis Eduardo Morato Reboucas de Carvalho, Milton Ruiz Alves, Maria Antonieta Longo Galvao da Silva, Marcelo Francis Gaal Vadas. Experimental surgery using triamcinolone. *Arq Bras Oftalmol.* 2007;70(2):209-15.
- 20) Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014;370:2071-2082.
- 21) Lutz Wollin, Eva Wex, Alexander Pautsch, Gisela Schnapp, Katrin E. Hostettler, Susanne Stowasser, Martin Kolb. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 45: 1434-1445.
- 22) Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and antiinflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 349:209-20.
- 23) Xianchai Lin, Jiamin Wen, Rongjiao Liu, Wuyou Gao, Bo Qu, Minbin Yu. Nintedanib inhibits TGF- β -induced myofibroblast transdifferentiation in human Tenon's fibroblasts. *Molecular Vision* 2018; 24:789-800.
- 24) Aydın P., Akova Y., Temel Göz Hastalıkları, Bölüm 17, 427- 439.
- 25) Fırat T. Göz ve Hastalıkları, 2. Cilt , Saypa Ofset , Ankara ,1990 , 701- 753.
- 26) Parks, M. M: *Clinical Ophthalmology*, Duane, T.D. (ed), Harper and Row Publishers, Philadelphia, Cambridge, New York, 1986, Vol. 1, Chap. 1, 1- 12.
- 27) Hasırıpı H., Recep Ö. F., *Pratik Göz Anatomisi. Işık Göz Kliniği Yayınları* Ankara, 2001: 85- 86.
- 28) Wilson II, FM.: *Pediatric Ophthalmology and Strabismus, Basic and Clinical Science Course* 1990 -1991, American Academy Of Ophthalmology , San Francisco ,1990 ; Sec. 6, 199 – 213.

- 29) Noorden, GK.: Binocular Vision and Ocular Motility, Fourth Edition, The C.V. Mosby Co., St. Louis, Baltimore, Philadelphia, 1990; 51- 285.
- 30) Ali Sefik Sanaç. Şaşılık ve Tedavisi. 2. Baskı Ankara 2002; 75-121,235-267.
- 31) Mohney BG. Common forms of childhood strabismus in an incidence cohort. Am J Ophthalmol 2007; 144:465-467.
- 32) Graham PA. Epidemiology of strabismus. Br J Ophthalmol. 1974; 58:224-231
- 33) Multi-ethnic Pediatric Eye Disease Study. Prevalence of amblyopia and strabismus in African American and Hispanic children ages 6 to 72 months. Ophthalmology. 2008; 115:1229-1236.
- 34) Pathai S, Cumberland PM, Rahi JS. Prevalence of and early-life influences on childhood strabismus: findings from the Millennium Cohort Study. Arch Pediatr Adolesc Med. 2010; 164(3):250-257.
- 35) Chia A, Dirani M, Chan YH, Gazzard G, Au Eong KG, Selvaraj P, Ling Y, Quah BL, Young TL, Mitchell P, Varma R, Wong TY, Saw SM. Prevalence of amblyopia and strabismus in young Singaporean Chinese children. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51:3411-3417.
- 36) Robai D, Rose KA, Kifley A, Cosstick M, Ip JM, Mitchell P. Factors associated with childhood strabismus: findings from a population-based study. Ophthalmology. 2006; 113:1146-1153.
- 37) Meyer E, Ludatscher RM, Zonis S. Primary and secondary overacting inferior oblique muscles: an ultrastructural study. Br J Ophthalmol. 1984 Jun;68(6):416- 20.
- 38) Gregson R, MacEwen C. Manual of Strabismus surgery. 1st ed. Butterworth-Heinemann; 2004. p.19-35.
- 39) Hunt TK. Basic principles of wound healing. J Trauma 1990;30 :122-128.
- 40) Williams PL, Warwick R, Dayson M, Bannister LH. Gray's Anatomy, 1989, 37. Baskı, 70-84.
- 41) Cross KJ, Mustoe TA. Growth factors in wound healing. Surg Clin N Am 2003; 83:531-545.
- 42) Cohen IK, Diegelmann RF, Yager DR, et al. Wound care and wound healing. In: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC eds. Principles of surgery 7th ed. New York, MC Graw Hill, 1999:263-295.
- 43) Moulin V. Growth factors in skin wound healing. Eur J Cell Biol 1995; 68:1-7.
- 44) Köveker GB. Growth factors in clinical practice. JCP 2000; 54:590-593.

- 45) Carrico TJ, Mehrhof AI, Cohen IK. Biology of wound healing. *Surg Clin North Am* 1984; 64:721-733.
- 46) O’Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:63-78.
- 47) Melby JC. Systemic corticosteroid therapy: pharmacology and endocrinologic considerations. *Ann Int Med* 1974; 81:505-12.
- 48) Nguyen KD, Lee DA. Effect of steroids and nonsteroidal antiinflammatory agents on human ocular fibroblast. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(9):2693-701.
- 49) Eaglstein WH, Mertz PM. New method for assessing epidermal wound healing: the effects of triamcinolone acetonide and polyethylene film occlusion. *J Invest Dermatol* 1978; 71:382- 4.
- 50) Antoszyk AN, Gottlieb JL, Machermer R, Hatchell DL. The effects of intravitreal triamcinolone acetonide on experimental preretinal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1993; 231(1):34-40.
- 51) Luis Eduardo Morato Reboucas de Carvalho, Milton Ruiz Alves, Maria Antonieta Longo Galvao da Silva, Marcelo Francis Gaal Vadas. Experimental surgery using triamcinolone. *Arq Bras Oftalmol.* 2007; 70(2):209-15
- 52) Irene H. Ludwig. Scar Remodeling After Strabismus Surgery. *Tr. Am. Opth. Soc.* Vol. XCVII, 1999.
- 53) Yang SM, Kim SH, Cho YA. The difference in muscle slippage according to scleral suture techniques in rectus muscle resection of rabbit eyes. *Eye* 2008;22:564-8.
- 54) Ryu WY, Bae JB. Changes in sagging extraocular muscle following surgical recession of the superior rectus in rabbit eyes. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2013;50:162-8.
- 55) Mahindrakar A, Tandon R, Menon V, Sharma P, Khokhar S. Effectiveness of mitomycin C in reducing reformation of adhesions following surgery for restrictive strabismus. *Journal of Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 2001; 38:131-135.
- 56) Özerdem U, Sanaç AŞ. Deneysel şaşılık cerrahisi modelinde politetrafloroetilen film, mitomisin C ve streptokinaz uygulamalarının mekanik ve histopatolojik etkileri. *Uzmanlık Tezi*, 1997, Ankara.
- 57) Clorfeine GS, Parker WT. Use of healon in eye muscle surgery with adjustable sutures. *Ann Ophthalmol* 1987; 19:215-217.
- 58) Searl SS, Metz HS, Lindahl KJ. The use of sodium hyaluronate as a biologic sleeve in strabismus surgery. *Ann Ophthalmol* 1987; 19:259-62.

- 59) Gedik Ş, Sanaç AŞ. Deneysel şaşılık cerrahisi modelinde ADCON-L, konvansiyonel ve polimer kaplı lipozom uygulamalarının mekanik ve histopatolojik etkileri. Uzmanlık Tezi, 2001, Ankara.
- 60) Dadeya S, Kamlesh, Fatima S. Preliminary results of intraoperative daunorubicin in strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2002; 39:340-4.
- 61) Kyoung In Jung, Jun-Sub Choi, Hyun Kyung Kim, Sun Young Shin. Effects of an Anti-transforming Growth Factor- β Agent (Pirfenidone) on Strabismus Surgery in Rabbits. *Current Eye Research*, 37(9), 770–776, 2012.
- 62) Shokida MF. Use of a silicone sheet for delayed adjustable strabismus surgery. *Ophthalmic Surg* 1993;24:486-8.
- 63) Hwang JM, Chang BL. Use of physical barriers for delayed adjustable strabismus surgery: the effect of Interceed and polyglactin 910 mesh. *Br J Ophthalmol* 1996; 30:759-762.
- 64) Caglar Oktem, Sibel Oto, Serap Toru, Coskun Bakar, Handan Ozdemir, Yonca Aydin Akova. Suramin, Genistein and Collagen Matrix (DuraGen) for Delayed Adjustment after Strabismus Surgery: Which One is Best?. *Current Eye Research*, Early Online, 1–8, 2015.
- 65) Okamoto I, Miyazaki M, Takeda M, et al. Tolerability of nintedanib (BIBF 1120) in combination with docetaxel: a phase 1 study in japanese patients with previously treated non–small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(2):346–352.
- 66) Eisen T, Shparyk Y, Jones R, et al. Phase II efficacy and safety study of nintedanib versus sunitinib in previously untreated renal cell carcinoma (RCC) patients. *J Clin Oncol*. 2013;31(15):4506.
- 67) Capdevila J, Carrato A, Tabernero J, Grande E. What could Nintedanib (BIBF 1120), a triple inhibitor of VEGFR, PDGFR, and FGFR, add to the current treatment options for patients with metastatic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;92(2):83–106.
- 68) Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, et al. BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res*. 2008; 68:4774–4782.
- 69) Thomopoulos S, Das R, Sakiyama-Elbert S, Silva MJ, Charlton N, Gelberman RH. bFGF and PDGF-BB for tendon repair: controlled release and biologic activity by tendon fibroblasts in vitro. *Ann Biomed Eng* 2010; 38:225-34. [PMID: 19937274].

- 70) Luca Richeldi, Roland M. du Bois, Ganesh Raghu, Arata Azuma, Kevin K. Brown, Ulrich Costabel, Vincent Cottin, Kevin R. Flaherty, David M. Hansell, Yoshikazu Inoue, Dong Soon Kim, Martin Kolb, et al., for the INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 2014; 370:2071-2082.
- 71) Weijtens O, Feron EJ, Schoemaker RC et al. High concentration of dexamethasone in aqueous and vitreous after subconjunctival injection. *Am J Ophthalmol.* 1999;128(2):192–7.
- 72) Ripal Gaudana, Hari Krishna Ananthula, Ashwin Parenky and Ashim K. Mitra. Ocular Drug Delivery. *The AAPS Journal*, Vol. 12, No. 3, September 2010.
- 73) Teller P, White TK. The physiology of wound healing: injury through maturation. *Surg Clin North Am* 2009;89:599–610.
- 74) Won Yeol Ryu, Hye Mi Jung, Mee Sook Roh, Yoon Hyung Kwon, Woo Jin Jeung, Woo Chan Park, Sae Heun Rho, Hee Bae Ahn. The effect of a temperature-sensitive poloxamer-alginate-CaCl₂ mixture after strabismus surgery in a rabbit model. *JAAPOS* 2013;17:484-489).
- 75) Siri T. Lehtonen, Anniina Veijola, Henna Karvonen, Elisa Lappi-Blanco, Raija Sormunen, Saara Korpela, Ulrika Zagai , Magnus C. Sköld and Riitta Kaarteenaho. Pirfenidone and nintedanib modulate properties of fibroblasts and myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* (2016) 17:14.
- 76) Mareike Lehmann, Lara Buhl, Hani N. Alsafadi, Stephan Klee , Sarah Hermann , Kathrin Mutze, Chiharu Ota ,Michael Lindner , Jürgen Behr , Anne Hilgendorff , Darcy E. Wagner and Melanie Königshoff . Differential effects of Nintedanib and Pirfenidone on lung alveolar epithelial cell function in ex vivo murine and human lung tissue cultures of pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* (2018) 19:175.
- 77) Sunad Rangarajan, Ashish Kurundkar, Deepali Kurundkar, Karen Bernard, Yan Y. Sanders, Qiang Ding, Veena B. Antony, Jianhua Zhang, Jaroslaw Zmijewski, and Victor J. Thannickal. Novel Mechanisms for the Antifibrotic Action of Nintedanib. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016 Vol 54, Iss 1, pp 51–59.
- 78) Katrin E Hostettler , Jun Zhong , Eleni Papakonstantinou , George Karakiulakis, Michael Tamm, Petra Seidel, Qingzhu Sun, Jyotshna Mandal, Didier Lardinois,

Christopher Lambers and Michael Roth. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* 2014, 15:157.

- 79) Jingang Huang, Christian Beyer, Katrin Palumbo-Zerr, Yun Zhang, Andreas Ramming, Alfiya Distler, Kolja Gelse, Oliver Distler, Georg Schett, Lutz Wollin, Jörg HWDistler. Nintedanib inhibits fibroblast activation and ameliorates fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2015; 0:1–8.
- 80) Marietta von Suesskind-Schwendi, Elke Boxhammer, Stephan W. Hirt, Stephan Schreml, Christof Schmid, Lutz Wollin, and Karla Lehle. The activity of nintedanib in an animal model of allogenic left lung transplantation resembling aspects of allograft rejection. *Taylor and Francis. Experimental Lung Research*. 2017 16:45.
- 81) Tong Lin, Lan Gong. Inhibition of lymphangiogenesis in vitro and in vivo by the multikinase inhibitor nintedanib. *Drug Design, Development and Therapy* 2017:11 1147–1158.
- 82) Santos NC, Figuera-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide; pharmacological, cellular and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1035-1041.
- 83) Muir M. DMSO: many uses, much controversy. *Altern Complement Ther* 1996;2: 230-235.
- 84) Skrypuch OW, Tokarewicz AC, Willis NR. Effect of dimethyl sulfoxide on a model of corneal alkali injury. *Can J Ophthalmol* 1987; 22:17-20.
- 85) Wong TT, Mead AL, Khaw PT. Matrix metalloproteinase inhibition modulates postoperative scarring after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:1097-1103.
- 86) Shima I, Katsuda S, Ueda Y, Takahashi N, Sasaki H. Expression of matrix metalloproteinases in wound healing after glaucoma filtration surgery in rabbits. *Ophthalmic Res* 2007; 39:315-324.
- 87) Kushner BJ. Intralesional corticosteroid injection for infantile adnexal hemangioma. *Am J Ophthalmol* 1982; 93:496-506.
- 88) Pizzarello LD, Jakobiec FA, Hofeldt AJ, et al. Intralesional corticosteroid therapy of chalazia. *Am J Ophthalmol* 1978; 85:818-21.

- 89) Ruhmann AG, Berliner DI: Influence of steroids on fibroblasts: II. The fibroblast as an assay system for topical antiinflammatory potency of corticosteroids. *J Invest Dermatol* 1967;49:123-130.
- 90) Mark S. Blumenkranz, Alice Claflin, Anthony S. Hajek. Selection of Therapeutic Agents for Intraocular Proliferative Disease. *Arch Ophthalmol* Vol 102, April 1984.
- 91) Giangiacomo J., Dueker David K., Adelstein Edward H. Histopatoloji of Triamcinolone in the Subconjunctiva. *Ophthalmology*. February 1987. Volume 94. Number 2.
- 92) Oh Oh Se, Jaeheung Lee. Reduction of Postoperative Adhesions in Strabismus Surgery. *Korean J. Ophthalmol*. Vol. 6:76-82, 1992.

