

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**FARKLI PREZERVAN MADDELER İÇEREN
ANTİGLOKOMATÖZ GÖZ DAMLALARI İLE PREZERVAN
MADDE İÇERMEYEN ANTİGLOKOMATÖZ DAMLANIN
OKÜLER YÜZEY VE TRABEKÜLER AĞ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Burcu GÖRGÜLÜ

**TEZ DANIŞMANI:
Prof. Dr. Özcan OCAKOĞLU**

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2015

ÖNSÖZ

Hekimlik hayatıma adım atmış olduğum İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimim süresince klinik-cerrahi bilgi ve deneyimleriyle yetişmeme katkı sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Güzin İskeleli'ye ve çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nezir Suyugül'e, Sayın Prof. Dr. Yılmaz Özyazgan'a, Sayın Prof. Dr. Nevbahar Tamçelik'e, Sayın Prof. Dr. Velittin Oğuz'a, Prof. Dr. Gülipek Tigrel'e, Sayın Prof. Dr. Solmaz Akar'a, Sayın Prof. Dr. Emel Başar'a, Sayın Prof. Dr. Osman Şevki Arslan'a, Sayın Prof. Dr. Özcan Ocakoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Cengiz Aras'a, Prof. Dr. Mehmet Akif Özdamar'a, Sayın Prof. Dr. Rengin Yıldırım'a, Sayın Prof. Dr. Sema Arvas'a, Sayın Prof. Dr. Hüseyin Yetik'e, Sayın Doç. Dr. Erdoğan Cicik'e, Sayın Doç. Dr. Ahmet Murat Sarıcı'ya sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tezimin oluşturulmasında ve asistanlık eğitimim boyunca değerli emeğini, tecrübelerini ve güvenini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur duyduğum tez danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Özcan Ocakoğlu'na,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İsmail Seçkin, Sayın Biyolog Sibel Demirci Delipınar, Sayın Biyolog Tuğba EkizYılmaz'a ve Sayın Biyolog Belisa Kaleci'ye,

Bilgi birikimleri ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli uzmanlarımız Sayın Op. Dr. Ceyhun Arıcı, Sayın Op. Dr. Didar Uçar ve Sayın Op. Dr. Cezmi Doğan'a, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım ve klinik hemşirelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim ve öğrenim hayatımda yanımda hissettiğim, bana her türlü desteği veren anneme, babama ve ağabeyime sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Saygılarımla
Dr. Burcu Görgülü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Tablolar	iv
Şekiller	v
Resimler	vi
Kısaltmalar	vii
1. Giriş	01
2. Genel Bilgiler	02
2.1. Glokomda Tıbbi Tedavi	03
2.2. Prezervan Maddeler	07
2.3. Konjonktiva Anatomi ve Histolojisi	10
2.4. Konjonktivanın İlaçlara Yanıt Mekanizmaları	11
2.5. Kornea Anatomisi ve Histolojisi	11
2.6. Trabeküler Dış Akım Yollarının Yapısı	13
3. Gereç ve Yöntem	15
4. Bulgular	19
5. Tartışma ve Sonuç	46
6. Özet	56
7. Abstract	57
8. Kaynaklar	58

TABLULAR

Tablo 1: Antiglokomatöz ajanların BAK konsantrasyonları.....	9
Tablo 2: Gruplar (Etken madde, prezervan tipi ve uygulama sıklığı).....	16
Tablo 3: Konjonktiva goblet hücre yoğunluğu.....	32
Tablo 4: CD45 immün boyama yöntemiyle kornea epitel ve CALT'da immün pozitif hücre yoğunluğu (H SCORE, ortalama±standart sapma).....	35
Tablo 5: Kaspaz-3 immün boyama yöntemiyle kornea epitel ve CALT'da immün pozitif hücre yoğunluğu (H SCORE, ortalama±standart sapma).....	40

ŞEKİLLER

Şekil 1: Prostaglandin analoglarının kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2: Kornea epitelindeki dökülmenin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	19
Şekil 3: Kornea epitel incelmesinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	20
Şekil 4: Kornea epitelinde oluşan dikensi yapıların istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	21
Şekil 5: Kornea epitel hücreleri arasında oluşan intersellüler aralıkların istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	22
Şekil 6: Kornea epitelinde görülen koyu nüveli hücrelerin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	23
Şekil 7: Korneada görülen ondülasyonun istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	24
Şekil 8: Substantia propria kornea’da oluşan ödemin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	25
Şekil 9: Kornea endotelinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	26
Şekil 10: Konjonktivadaki goblet hücre sayımının istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	33
Şekil 11: Kornea epitelindeki CD45 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	36
Şekil 12: CALT’taki CD45 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	38
Şekil 13: Kornea epitelindeki Kaspaz-3 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	41
Şekil 14: CALT’taki Kaspaz-3 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.....	43

RESİMLER

Resim 1: Grup A'dan hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin ve endotelinin histolojik yapısını gösteren resim.....	27
Resim 2: Grup B'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin ve endotelinin histolojik yapısını gösteren resim.....	28
Resim 3: Grup C'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin ve endotelinin histolojik yapısını gösteren resim.....	29
Resim 4: Grup D'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin ve endotelinin histolojik yapısını gösteren resim.....	30
Resim 5: Grup E'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin ve endotelinin histolojik yapısını gösteren resim.....	31
Resim 6: Deney gruplarından hazırlanan PAS+Hemalum preparatlarında goblet hücre sayılarındaki değişiklikleri gösteren resim.....	34
Resim 7: Deney gruplarından hazırlanan preparatlarda, kornea epitelindeki CD45 immünreaktivitesini gösteren resim.....	37
Resim 8: Deney gruplarından hazırlanan preparatlarda, CALT'taki CD45 immünreaktivitesini gösteren resim.....	39
Resim 9: Deney gruplarından hazırlanan preparatlarda, kornea epitelindeki kaspaz-3 immünreaktivitesini gösteren resim.....	42
Resim 10: Deney gruplarından hazırlanan preparatlarda, CALT'taki kaspaz-3 immünreaktivitesini gösteren resim.....	44

KISALTMALAR

BAK: Benzalkolyum klorid

PQ: Polikvad

PG: Prostaglandin

GİB: Göz içi basıncı

CALT: Konjonktiva ilişkili lenfoid doku

PGF2 α : Prostaglandin F2 α

H&E: Hematoksilen eozin

FDA: Food and Drug Administration

1.GİRİŞ

Glokom, önlenabilir görme kaybı nedenleri arasında ilk sıralardaki yerini korumaktadır. Günümüzde glokom tedavisi için farklı seçenekler gündemde olsa da topikal antiglokomatöz ilaçlar birinci basamak tedavi olarak önemini sürdürmektedir. Ancak, uzun süreli topikal antiglokomatöz ilaç kullanımı sonucu görülebilen oküler toksik reaksiyonlar ilaç intoleransına neden olabilmektedir. Glokomun tıbbi tedavisinde en büyük sorunlardan biri olan ve hasta uyumunu olumsuz etkileyen göze ait şikâyetlerin, ilacın etken maddesinden veya öncelikli olarak içerdiği koruyucu (prezervan) maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir ¹⁻³.

Uzun süreli topikal antiglokomatöz ilaç kullanımı sonrası, oküler yüzeyde toksik ve immünopatolojik değişiklikler tanımlanmıştır ⁴⁻⁶. Pilocarpin ve beta bloker etken maddeli antiglokomatöz ilaçların oküler reaksiyonlara yol açabildiği bilinmekle beraber özellikle içerikte yer alan prezervan maddelerin (özellikle benzalkonyum klorid BAK) kornea epiteli, konjonktiva ve gözyaşı fonksiyon testleri hatta trabekülüm ve endotel hücreleri üzerine toksik etkileri olduğu gösterilmiştir ⁷⁻⁹. Uzun süreli prezervan madde içeren topikal damla kullanan hastalarda subkonjonktival fibrozis riski artmakta ve glokom cerrahisi uygulanan gözlerde bleb ömrü kısalmaktadır ¹⁰.

Çalışmamızda antiglokomatöz göz damlaları içeriğinde yer alan prezervan maddelerden en sık kullanılan benzalkonyum klorid'in (BAK) yanısıra, yan etkilerinin daha düşük olduğu düşünülen yeni prezervanları (Polikuad ve Purite) içeren antiglokomatöz damlalarının ve prezervan içermeyen tafluprost etken maddeli antiglokomatöz damlanın oküler yüzey (konjonktiva ve kornea dokusu) ve trabeküler dış akım yolları üzerine olan sitotoksik etkileri tavşan gözlerinde histolojik olarak araştırıldı.

Çalışma gruplarını oluşturan tavşan gözleri 5'erli 5 gruba ayrılarak hazırlanan histolojik preparatlar hematoksilin eozin (H&E) ile boyanarak kornea dokusu ve trabeküler dış akım yolları; Periyodik Asit & Shiff + Hemalum boyası ile boyanarak konjonktiva goblet hücreleri üzerine prezervan maddelerin toksik etkisi ışık mikroskopisi yöntemi ile incelendi. Kornea epiteli ve konjonktiva ilişkili lenfoid doku (CALT) içerisinde apoptoz bulguları kaspaz-3 immün boyama tekniği ile, inflamasyon bulguları CD45 immün boyama tekniği ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar %0.9 izotonik solüsyon damlatılan kontrol grubunu oluşturan gözler ile karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

Glokom kelimesi Yunanca 'bulutlu' anlamına gelen 'Glaukos' dan türemiştir. Glokom; ilerleyici, geri dönüşümü olmayan, optik disk ve retina sinir lifi tabakasında yapısal değişikliklere ve görme alanında fonksiyonel kayıplara yol açan, multifaktöryel etyolojiye sahip bir hastalık grubudur. Tedavi edilmediği takdirde kalıcı körlükle sonuçlanan kronik bir optik nöropatidir ¹¹⁻¹³.

Glokom dünya genelinde önlenabilir körlüğün en sık ikinci, geri dönüşsüz körlüğün ise en sık nedenidir ^{14,15}. Primer açık açılı glokom vakaları tüm glokomlu olguların %74'ünü oluşturmaktadır ¹⁴. Bilateral körlük oranı primer açık açılı glokomda %25 iken primer açı kapanması glokomunda %10'dur ¹⁶.

Retina gangliyon hücrelerinin kaybı glokom patogenezinin temelini oluşturur. Retina sinir lifi tabakası ve optik sinir başı hasarının neden olduğu arkuat sinir lifi dağılımına uyan görme alanı defektleri izlenir. Sekonder değişiklikler ise peripapiller retina sinir lifi tabakasında hemorajiler, lamina kribrozanın deformasyonu ve doku kaybıdır ¹⁶. Glokomatöz optik sinir hasarının doğrudan yüksek göz içi basıncı (GİB) ile ilişkili olduğuna dair en ufak bir şüphe yoktur. Ancak glokomatöz hasarın her zaman yüksek GİB değerlerinde ortaya çıkmaması ve GİB'nin düşürülmesine rağmen glokomatöz optik nöropatinin devam etmesi GİB dışında bazı diğer faktörlerin etyopatogeneizde rol oynadığını düşündürmektedir. GİB'a bağlı olmayan başlıca faktörler; optik sinir başının perfüzyon bozukluğu, vasküler direnç ve sistemik hipotansiyondur. Glokomlu gözlerde genetik olarak programlanmış hücre ölümü olan apoptoz etyopatogeneizde sorumlu tutulan bir başka faktördür ¹⁷.

Glokomun sınıflandırılmasında en fazla kullanılan yöntem ön kamara açısının anatomik yapısı ve trabeküler ağ örgüsünün açı ile olan ilişkisidir. Buna göre glokomlar açık açılı glokom ve açı kapanması glokomu olarak ikiye ayrılır. Açık açılı glokomda aköz hümörün trabeküler ağ ve Schlemm kanalı üzerinden venöz sisteme akışında bir aksaklık söz konusudur. Kapalı açılı glokomda iridotrabeküler temas mevcuttur ve özellikle pupiller blok mekanizması sonucu fonksiyonel veya yapısal açı kapanması gelişir. Glokomları primer ve sekonder olarak da sınıflandırmak da mümkündür. Primer glokomlar, oküler ya da sistemik hastalıklarla ilişkili değildir. Genellikle iki taraflıdır ve genetik yatkınlık söz konusudur. Sekonder glokomlar ise göz içi basınç artışından sorumlu oküler ya da sistemik hastalıklar ile ilişkilidir. Genellikle tek taraflı ve edinseldir ¹⁸.

2.1. GLOKOMDA TIBBİ TEDAVİ

Göz içi basıncının düşürülmesi, tüm glokom tipleri için geçerli tek kanıta dayalı tedavi yaklaşımıdır ¹⁹. Glokom tedavisinde genellikle ilk basamak GİB'nı düşüren ilaçların kullanımınıdır (antiglokomatözler). Antiglokomatöz ilaçlar aköz humör yapımını azaltarak ya da aköz humörün dışı akımını artırarak GİB'nı düşürürler. Çoğu hastada tek başına ilaç tedavisi hastalığın kontrol altına alınmasını sağlayabilir ²⁰.

Glokom tedavisinde ilk uygulanması gereken tek molekül (monoterapi) ile GİB'nın düşürülmesidir. Ancak hastaların bir kısmında daha başlangıçta veya yaklaşık %60'ında 2. yılın sonunda tek ilaç ile yapılan tedavi yetersiz kalır ve çoklu tedavi ihtiyacı ortaya çıkar.

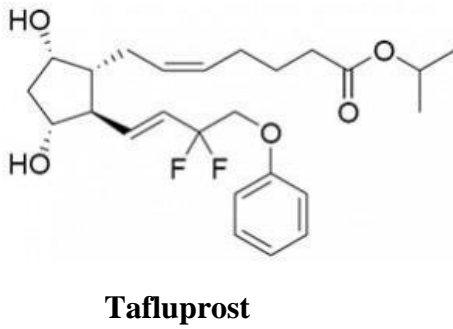
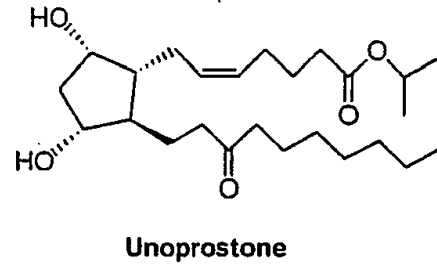
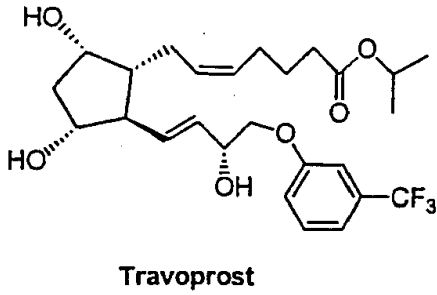
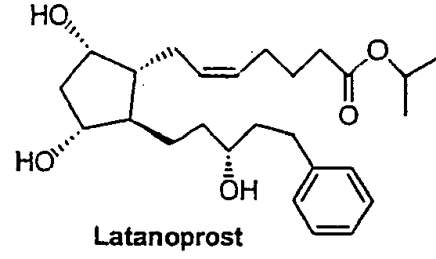
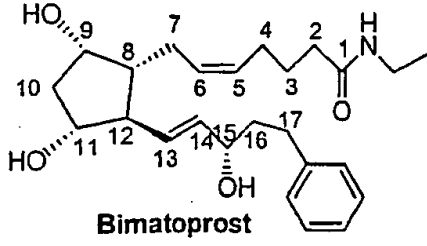
Glokomun tıbbi tedavisinde kullanılan antiglokomatöz ilaçları 5 grup içerisinde toplayabiliriz.

1. Prostaglandin analogları
2. Beta blokerler
3. Sempatomimetikler (alfa 2 agonistler)
4. Parasempatomimetikler
5. Karbonik anhidraz inhibitörleri

2.1.1. Prostaglandin (PG) Analogları

Prostaglandinler ilk defa 1935 yılında prostat dokusundan izole edilmiştir. Enzimatik yolla yağ asitlerinden köken alan lipid bileşenleridir. Göz travması sonrası farklı PG'ler iris ve siliyer cisimden salınırlar. Bunlardan bir tanesi intraoküler basıncı etkin olarak düşürdüğü bilinen PGF_{2α}'dır ²⁰. Hipotansif etkisini temel olarak uveoskleral dışı akımı, daha az önemde trabeküler dışı akımı artırarak gösterdiği bilinmektedir. Matriks metalloproteinazların regülasyonu ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin yeniden yapılanmasını sağlayarak dışı akım yollarının geçirgenliğinde ve direncinde değişiklikler oluşturur ²¹.

PG analogları GİB'ni düşürmede en etkili topikal ajanlardır. European Glaucoma Society (EGS) tarafından glokom tedavisinde birinci basamak olarak onaylanmıştır²². Klinik kullanımı olan 5 adet PG analogu mevcuttur Bildirilen yan etkileri konjonktival hiperemi, iris renginde koyulaşma, kirpiklerde uzama ve renk koyulaşmasıdır²³.



Şekil 1: Prostaglandin analoglarının kimyasal yapısı

Latanoprost (Xalatan® 0.005% , Pfizer, New York, NY) kornea esterazları tarafından hidrolize edilerek biyolojik olarak aktifleşen bir ester ön ilacıdır. Selektif prostoglandin F2 α (PGF2 α) prostanoid reseptör agonistidir²⁰. Yetişkin insanlarda aktif ilaç aköz humörde tespit edilen en yüksek konsantrasyonuna topikal uygulama sonrası 2. saatte ulaşır²⁴. GİB'ni düşürme etkisi 3-4 saat sonra başlar ve 24 saat sürer²⁵. Glokom ve oküler hipertansiyonun kısa ve uzun vadeli tedavisinde günde tek doz topikal latanoprost (0.005%) etkili ve güvenli bir ajandır.

Bimatoprost (Lumigan®0.03%, Allergan, Irvine, Calif.) sentetik bir prostamid analogudur. Prostamidler, PGF2 α reseptörlerine bağlanmazlar, serbest olarak bulunurlar. Korneal enzimler tarafından aktivasyon gerektirmeyen aktif bir ilaçtır²⁶. İlaç uygulanmasından 4 saat sonra GİB'ni düşürücü etkisi başlar. Maksimum etkiye 8-12 saat sonra ulaşılır. 24 saatlik periyotta sabit bir GİB kontrolü sağlar²⁷. Etkinlik açısından latanoprost ile benzerdir. Günde tek doz bimatoprost 0.03% glokom ve oküler hipertansiyon tedavisinde iyi tolere edilebilir ve etkili bir ajandır.

Travoprost (Travatan® Z 0.004%, Alcon, Fort Worth, Tex.) kornea esterazları tarafından hidrolize edilerek biyolojik olarak aktifleşen bir ester ön ilacıdır. Selektif PGF2 α prostanoid reseptör agonistidir²⁰. PGF2 α reseptörlerine latanoprosttan daha fazla afinite gösterir. Oküler hipertansiyon ve glokom hastalarında intraoküler basıncı düşürmede travoprostun etkinliği latanoprost ile benzerdir. Latanoprostta göre daha fazla konjonktival hiperemiye neden olur ancak bu etki tedavisiz düzelir²⁸.

Unoprostone isopropil (Rescula 0.15%, Novartis Ophthalmics, Basel, Switzerland) kornea esterazları tarafından hidrolize edilerek biyolojik olarak aktifleşen bir ester ön ilacıdır. PGF2 α pulmonar metabolitinin analogudur. PGF2 α reseptör afinitesi latanoprostta göre 100 kat daha azdır²⁰. Potasyum ve klor kanallarını aktive ederek trabeküler ağda gevşemeye ve konvansiyonel yoldan aköz hümör akımında artışa neden olduğu düşünülmektedir. Bazal göz içi basıncını 10%-25% oranında düşürerek 2-5 saat etki süresine sahiptir²⁹. Günümüzde diğer prostaglandin analoglarıyla karşılaştırılacak olursa daha az tercih edilir.

Tafluprost (Saflutan® 0.0015%, Merck & Co. NJ, U.S.A.) glokom ve oküler hipertansiyon tedavisinde kullanıma giren en yeni ve ilk prezervan içermeyen prostaglandin analogudur. Tafluprost oldukça potent ve selektif bir PGF2 α prostanoid reseptör agonistidir. GİB düşürücü etkinliği klinik çalışmalar ile gösterilmiştir³⁰⁻³³. Diğer prostaglandin analogları

gibi bir ön ilaçtır. Latanoprost göre daha potent göz içi basıncı düşürücü etkiye sahiptir ve melanogenezisi daha az uyarır³⁴. BAK içeren latanoprost tedavisine intolerans geliştiren hastalarda, prezervan içermeyen tafluprost tedavisine geçiş sonrası oküler yüzey hastalığı semptom ve bulgularına sahip olanların sayısında anlamlı derecede azalma olduğu görülmüştür³⁵.

2.1.2. Beta Blokerler

1978 yılında timolol maleate topikal glokom tedavisinde FDA onayını almıştır. Oküler beta blokerler siliyer cisimden aköz humör oluşumunu azaltarak etki ederler. Bu azalma 50% oranına ulaşabilir, ancak GİB düşüşü bu oranda yüksek değildir (%25-28). Aköz dışı akımı üzerinde etkili değildir. Monoterapi olarak ya da kombinasyon tedavilerinde GİB'ni düşürmek amacıyla kullanılırlar. Günde 2 kere kullanımı önerilmektedir²⁰.

Bronşial astım ve ciddi kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi pulmoner problemleri olan hastalarda kullanımı relatif kontrendikedir. Sinüs bradikardisi, dekompanse kalp yetmezliği, kardiyojenik şok, 2-3. derece atriyoventriküler blok hastalarında kullanımı kontrendikedir. Lokal yan etkileri kornea duyusunda azalma, uygulama sırasında yanma ve kaşınma, kuru göz semptomları, alerjik blefarokonjonktivit ve geçici görme bulanıklığıdır²⁰.

Beta blokerler selektif ve non-selektif olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Non-selektif ajanlar hem β_1 hem β_2 adrenerjik reseptör antagonistleridir. Bu grupta timolol maleat, karteolol ve levobunolol mevcuttur. Bunlardan karteolol intrinsik sempatomimetik beta blokördür. Aynı zamanda parsiyel agonistik etki gösteren bir ajan olduğu için daha az kardiyovasküler yan etki profiline sahiptir. Selektif beta blokerler ise tek reseptör alt tipine (β_1) etkilidirler. Bu grupta betaksolol mevcuttur²⁰.

2.1.3. Sempatometik İlaçlar (Adrenerjik)

Alfa-2 reseptörlerinin uyarılması hümör aköz yapımını azaltır. Non selektif agonist adrenerjik ajanlar (alfa ve beta adrenerjik reseptör agonistleri) epinefrin ve dipiverin; selektif ajanlar klonidin, aproklonidin ve brimonidindir.

Brimonidin aköz yapımını azaltarak ve uveoskleral akımı artırarak GİB'ni düşürücü etki gösterir. Günde iki kez % 0,2 konsantrasyonda kullanılır. Hayvan çalışmalarında brimonidinin nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir^{36,37}. İnsan çalışmalarında brimonidin tedavisi alan hastaların görme alanlarında iyileşme olduğu izlenmiştir^{38,39}.

2.1.4. Parasempatomimetik İlaçlar (Kolinerjikler)

Asetilkolin benzeri etki gösterirler. Asetinkolin, asetilkolin esteraz tarafından sentezlenir ve kolinerjik reseptörlere bağlanır. Glokom tedavisinde kullanılan en eski ilaçlardır. Siliyer kastaki muskarinik reseptörleri uyararak miyozis yaparlar. Siliyer kas kontraksiyonu ile uveoskleral dışa akım artar⁴⁰. Trabeküler ağın açılmasını sağlayarak konvansiyonel yoldan akımı da artırır⁴¹. Direkt etkili kolinerjikler pilokarpin ve karbakol, indirekt etkili olanlar fizostigmin, ekotiyofat, demakaryumdur. Pupiller bloğa bağlı akut açı kapanması glokomunda %1-2 pilokarpin miyotik etkisiyle açı üzerindeki iris dokusunu geriye çekerek atağın sonlanmasına katkıda bulunur. Günümüzde bu grup ilaçlar uzun süreli glokom tedavisinde yan etkilerinden dolayı tercih edilmezler.

2.1.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri (KAİ)

Göz dahil pek çok dokuda karbonik anhidraz enzimi bulunur. Ca-II izoenzimi aköz humör yapımı ve GİB kontrolünde etkilidir. Bu enzim gözde temel olarak siliyer cisim, kornea endotel hücreleri ve pigment epitelinden salgılanır. Tüm karbonik anhidraz inhibitörleri siliyer cismin nonpigmente siliyer epitel hücrelerindeki karbonik anhidrazı inhibe ederek aktif aköz humör sekresyonunu azaltır⁴². Bu grupta sistemik olarak kullanılan asetozolamid ve topikal olarak kullanılan dorzolamid ve brinzolamid mevcuttur. Topikal uygulama ile ortalama %18'lik bir basınç azalması temin edilir⁴³. Oral kullanılan KAİ'nin uzun süreli glokom tedavisinde kullanımını yan etkilerinden dolayı sınırlıdır.

2.2. PREZERVAN MADDELER

Prezervan maddeler oftalmik preparatların önemli bir komponentidir. Mikrobiyal üremeyi durdurur ve aktif ilacın bozulmasını engeller. Çoklu doz içeren şişeler açıldıktan sonra oftalmik preparatın sterilitesinin korunması için prezervan maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Prezervan maddeler olmadan çoklu doz içeren şişeler günde 2 kere kullanım ile 1-2 hafta içerisinde kontamine olmaktadır⁴⁴.

Benzalkonyum klorür (BAK): Oftalmik preparatlarda en sık kullanılan prezervan maddedir. Topikal solüsyonlardaki en sık kullanılan konsantrasyonu 0,01% olmakla birlikte 0,004% ile 0,02% arasında farklı uygulamaları da olabilmektedir. BAK kuaterner amonyum türevi oldukça etkili bir antimikrobiyal ajandır. Protein denatürasyonu yaparak ve sitoplazmik membranı parçalayarak etki gösterir. Oküler dokularda birikerek, doz bağımlı hücre ölümünü

indükleyebilir⁴⁴. Sitotoksik etkileri doz bağımlıdır ve daha yüksek konsantrasyonlarda ve daha uzun süreli kullanımda bu etki artmaktadır⁴⁵. En sık görülen yan etkileri konjonktival hiperemi, azalmış gözyaşı üretimi, yüzeysel punktat keratopati, epitelyal erozyonlar, kuruluk-yanma ve oküler iritasyon gibi subjektif yakınmalardır⁴⁶. Bu yan etkiler kuru göz ve inflamatuvar iritasyona neden olarak oküler rahatsızlık hissine yol açarlar.

BAK'in deterjan özellikleri gözyaşı film tabakasının lipid bölümünü zarara uğratarak aköz bileşeninde azalmaya ve gözyaşı film kırılma zamanında kısalmaya neden olur. Ayrıca BAK goblet hücre yoğunluğunda azalmaya neden olarak müsin üretiminde eksikliğe ve gözyaşı film tabakası düzensizliğine yol açar. Tüm bu etkiler glokom hastalarında zaten azalmış bazal gözyaşı sekresyonu üzerine eklenerek oküler yüzey hastalığı bulgularına neden olur.

BAK tipi deterjanlar memeli hücreler tarafından nötralize edilemezler ve irritant etki ile allerjik yanıt uyandırır. BAK konjonktivada primer olarak allerjik ve inflamatuvar yanıt uyandırırken aynı zamanda direk toksik etki ile konjonktiva yüzeysel tabakalarında soyulmayı artırır. Konjonktivada subepitelyal kollajen birikimini artırdığı, substansiya propria kornea'da inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olduğu ve proapoptotik etki oluşturduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir⁴⁷⁻⁵¹. BAK'in tek bir uygulama dozu sonrasında bile bir hafta süre ile konjonktiva dokusunda bulunduğu gösterilmiştir. BAK'in ortaya çıkardığı inflamatuvar hücre yanıtı uzun süreli kullanımlarda fibroblast artışına ve psödopemfigoid tipi subkonjonktival fibrozise yol açmaktadır. Uzun süreli BAK kullanımı filtran cerrahi (trabekülektomi) sonrası yara iyileşme sürecini etkileyerek bleb yetmezliğine neden olabilmektedir⁵².

BAK sadece gözyaşı üretimi ve stabilitesi üzerinde zararlı etkiler yapmakla kalmaz aynı zamanda kornea üzerine direk sitotoksik etkilerde bulunur. %0.001'den daha az konsantrasyonlarda dahi epitel disfonksiyonuna ve kornea epitelinde bariyer hasarına yol açtığı gösterilmiştir⁵².

Oküler yüzey üzerindeki etkileri iyi tanımlanmışken ön kamaradaki birikimi de toksik etkilere katkı sağlamaktadır. Kısa süreli BAK kullanımı dahi ön kamarada inflamatuvar reaksiyon oluşturmaktadır. Uzun süreli BAK uygulaması, glokom patogeneğinde rol alan matriks metalloproteinaz-9 seviyesinde artışa neden olarak glokom seyrinin daha kötüye gitmesine neden olabilir⁵².

Tablo 1: Antiglomatöz ajanların BAK konsantrasyonları

Alphagan® (Brimonidin)	%0.005 BAK
Azopt® (Brinzolamid)	%0.01 BAK
Betoptic S® (Betaxolol)	%0.01 BAK
Cosopt® (Dorzolamid-Timolol)	%0.0075 BAK
Lumigan® (Bimatoprost)	%0.05 BAK
Timoptic® (Timolol)	%0.01 BAK
Travatan® (Travoprost)	%0.015 BAK
Trusopt® (Dorzolamid)	%0.0075 BAK
Xalatan® (Latanoprost)	%0.02 BAK

Uzun süreli prezervan madde kullanımının oküler dokularda oluşturduğu toksik yükü azaltmak önemlidir. Bu nedenle günümüzde yan etkilerinin daha az olduğu bilinen prezervan maddeleri içeren antiglomatöz damlalar ile prezervan madde içermeyen tek kullanımlık preparatlara yönelim mevcuttur.

Purite: BAK'e alternatif bir stabilize oksikloro komplekstir (SOC). Bu prezervan madde fungusid, virusid ve bakterisid etki gösterir. Tam mekanizması açıklanmamış olsa da hücrelerdeki doymamış yağları ve glutasyonu okside ederek antimikrobiyal etki gösterdiği kabul edilmektedir⁴⁴. SOC göze damlatıldığı zaman doğal göz yaşı komponentleri olan sodyum, klor iyonları, oksijen ve suya dönüşür⁵³. Brimonidine tartrate (Alphagan P®) içeriğinde yer almaktadır. Oküler yüzeylerde BAK'den daha iyi tolere edilir.

Polikvad(PQ): Polimerik kuaterner amonyum yapısında bir katyonik antimikrobiyal ajandır. Oküler yüzey üzerinde kullanımı güvenli, BAK'e alternatif bir prezervan maddedir^{54,55}. Polikvad kontakt lens solüsyonları, suni göz yaşı preparatları ve antiglomatöz ajanlarda mevcuttur^{56,57}. Türkiye'de travoprost (Travatan®) ve travoprost – timolol maleat kombinasyonu (Doutrav®) içeriğinde bulunur.

SofZia: Borat, çinko ve sorbitol içeren oksitleyici bir bileşiktir. BAK gibi kuarterner ammonyum bileşimidir ancak deterjan etkisi göstermez. Memeli oküler epiteline daha az zararlıdır⁴⁵. Travoprost (Travatan Z®) içeriğinde mevcuttur.

2.3. KONJONKTİVA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Konjonktiva göz kapakları ve orbitanın yumuşak dokularını koruyan, gözün serbest hareketine izin veren, gözyaşının aköz ve müköz komponentinin salgılandığı, gözün bütünlüğünü sağlayan bir müköz membrandır. Konjonktiva korneoskleral limbustan, göz kapaklarının mukokütanöz bileşke noktasına kadar uzanır. Oküler yüzeyin savunmasını sağlayan immün dokunun ve antimikrobiyal ajanların kaynağıdır. Konjonktiva anomalileri oküler hareketlerin kısıtlanmasına, gözyaşı film tabakasının düzensizliğine ve enfeksiyonlara karşı savunma cevabının yetersizliğine neden olur⁵⁸.

Konjonktiva epiteli: Konjonktiva yüzeyi göz kapağı kenarından limbusa uzanan yer yer değişik kalınlıkta non-keratinize çok katlı epitel ile örtülüdür. Epitel hücreleri fornikslerde kolumnar, bulbar ve tarsal konjonktivada küboidal yapıdadır. Limbus bölgesi hariç tüm konjonktiva yüzeyinde, özellikle forniks, karünkül ve plika semilunariste daha yoğun olmak üzere epitel hücreleri arasında mukus salgılayan goblet hücreleri vardır. Konjonktiva epitelinin yüzeyinde bulunan mikrovilli ve mikropili adı verilen çıkıntı şeklindeki yapıların üzerini ince bir glikokaliks ve hidrofilik özellikteki müsün tabakası örtmektedir. Bu oluşumlar gözyaşı tabakasının konjonktiva üzerine tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Müsinin goblet hücrelerinin yanı sıra konjonktiva ve kornea epiteli tarafından da salgılandığı gösterilmiştir⁵⁹. Limbus bölgesinde konjonktiva epiteli korneanın non-keratinize skuamöz epiteline dönüşür.

Konjonktiva Stroması (Substansiya propria): Fibrovasküler bir bağ dokusudur. Tarsal konjonktivada ve limbusta ince ve sıkı yapıda, fornikslerde ise daha kalın ve gevşek yapıdadır. Yüzeysel substansiya propria lenfoid tabakayı içerir. Bu tabaka doğumdan sonra 8 ile 12. hafta arasında oluşmaya başlar. Konjonktiva ilişkili lenfoid doku (CALT) oküler yüzeyin immün yanıtının başlaması ve düzenlenmesinde önemlidir. Epitel tabakası içindeki lenfositler, lenfatikler ve bunlarla ilişkili kan damarları ile lenfosit ve plazma hücrelerinin follüküler kümeler içeren yaygın stromal bileşenlerini içermektedir¹⁷. Derin tabaka ise damarlar, lenfatikler ve sinirsel yapılar bulunur.

2.4. KONJONKTIVANIN İLAÇLARA YANIT MEKANİZMALARI

Konjonktiva topikal ilaçlar için pasif, yarı geçirgen doğal bir bariyerdir. Sürekli ilaç kullanımı konjonktiva için kronik bir strestir. Topikal ilaç tedavilerinin konjonktivayı olumsuz etkilemesine neden olan potansiyel faktörler arasında tedavinin türü, içerdiği prezervan maddenin türü, tedavi süresi, uygulama sıklığı, uygulanan etken maddenin fiziksel özellikler (konsantrasyonu, pH değeri, sıcaklık derecesi, toksisitesi) sayılabilir⁶⁰.

Konjonktiva maruz kaldığı kronik strese karşı çeşitli şekillerde yanıt verebilir. Bu yanıt klinik bulgu olmaksızın nonspesifik irritasyon, subklinik hüresel ultrastrüktürel değişiklikler, Tip 1 hipersensitivite reaksiyonu, Tip 4 hipersensitivite reaksiyonu (alerjik kontakt konjonktivit), foliküler, papiller veya toksik konjonktivit ve sikatrizan konjonktivit gelişimine kadar geniş bir yelpazede görebiliriz⁶⁰.

2.5. KORNEA ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Kornea dış çevre ile temas eden, göze ışığın girişini sağlayan saydam bir penceredir. Ön kornea yüzeyi gözyaşı tabakası ile kaplı iken arka yüzey aköz humör ile temas halindedir. Kornea ön yüzeyi konveks ve asferiktir. Merkezi 0.5 mm kalınlığında iken periferde doğru gittikçe kalınlık artar. Vücutta en fazla inervasyona sahip en hassas doku korneadır. Trigeminal sinirin oftalmik dalından köken alan siliyer sinirler tarafından inerve edilir. Kornea avasküler bir dokudur. Kornea iç yüzeyinde yer alan endotel hücreleri aköz humörden glukoz difüzyonu ile beslenir. Dış epitel ve diğer katlar ise gözkapakları açık iken havada ve gözyaşında erimiş oksijenin difüzyonu ile metabolik ihtiyaçlarını karşılarlar. Patolojik durumlarda kornea stromasına limbustan yeni damarların ilerlemesi sonucu kornea saydamlığı kaybolur⁵⁸.

Kornea 3 farklı hücre tabakası ve 2 ara yüzeyden oluşur: Korneada yer alan 3 tip hücre; epitel hücreleri, stromada yer alan keratositler (korneal fibroblastları) ve kornea endotel hücrelerdir. Bowman tabakası, ve Descemet membranı bu hücreler arasındaki ara yüzeylerdir⁶¹.

Kornea epiteli: Nonkeratinize çok katlı skuamöz epiteldir. Kornea epiteli 3 farklı epitelyal hücre içeren 5-6 tabakadan oluşur; yüzeyel, kanatsız ve kolumnar bazal hücreler. Bazal hücreler yuvarlak, oval nükleusa sahip alçak prizmatik hücrelerdir. Yüzey hücreleri yassı şekil kazanırlar, nükleusları yassı ve piknotik görünümündedir. Sadece bazal hücreler

çoğalma yeteneğine sahiptir. Hücreler arasında tight junction, hemidesmozom, desmozom ve gap junction bağlantıları bulunur.

Bowman tabakası: Aselüler membran benzeri bir tabakadır. Kollajen liflerin ve proteoglikanların rastgele düzenlemesi ile oluşmuştur. Tip I ve III kollajen içerir. Yaralanma sonrası kendini yenileyemez, fizyolojik rolü tam olarak bilinmemektedir.

Stroma (Substansia propria): Kornea kalınlığının %90'ını oluşturur. Toplam stroma volümünün %2-3'ü hücresel bileşenlerden geri kalanı ekstraselüler matriks komponenti kollajen ve proteoglikanlardan oluşur. Hücresel komponenti oluşturan keratositler fibroblast benzeri hücrelerdir. Kollajen liflerin düzenli dağılımı ve yavaş üretim-yıkım döngüsü saydamlığın korunması için gereklidir.

Descemet membranı: Kornea endotelinin bazal membranıdır. Kalınlığı doğumda 3 µm iken yetişkin bir insanda 8-10 µm'dur. Kollajen tip IV – VIII, fibronektin ve lamininden oluşur. Kornea stromasının arka yüzüne yapışır ve stroma şeklindeki herhangi bir değişikliği yansıtır. Fiziksel stres sonucu rüptürü stromaya aköz humör sızıntısına ve stromada ödeme neden olur.

Endotel: Descemet membranının arka yüzünde mozaik paternde tek katlı endotel hücre tabakası bulunur. Genç erişkinlerde hücre yoğunluğu 3500/mm² dir. Yaşla birlikte hücre yoğunluğu azalır. Sağlıklı bir korneada endotel hücrelerin %70-80'i hegzagonaldır. Hücreler arası bağlantılar aköz humöre karşı sızdıran bir bariyer oluştururlar. Hücre sayısında azalma sonucu kornea stromasına sıvı sızıntısı artarak kornea saydamlığı kaybolur ⁶¹.

2.6. TRABEKÜLER DIŞ AKIM YOLLARININ YAPISI

Primat gözde aköz hümör siliyer cisimden üretilir. İlk olarak arka kamaraya dökülen aköz, pupilla boşluğundan ön kamaraya buradan iris kökü ve kornea arasında oluşan ön kamara açısına ulaşır. Bu bölgede aköz hümörün gözü terk edebilmesi için iki dış akım yolu vardır. Birincisi trabeküler dış akım yolları olarak bilinen trabeküler ağ örgüsü, Schlemm kanalı, kollektör kanallar, intraskleral ve episkleral venöz pleksustur. Hümör aközün yaklaşık %80'i gözü bu yolla terk eder. İkinci indirekt dış akım yolu siliyer kasın boşlukları arasından koroidal, suprakoroidal boşluğa ve buradan skleranın vasküler kanallarına aközün hümörün ulaşmasını sağlar. Uveoskleral yol olarak bilinen bu dış akım yolu GİB'dan bağımsızdır ve bu yolla gözü terkeden sıvı miktarı total dış akımın %20'sinden daha azdır ⁶¹.

İnsan trabeküler ağ örgüsünün fonksiyonel olarak 2 farklı bölgesi vardır. Bunlar Schwalbe hattının hemen gerisindeki limbosa komşu olan ön trabeküler ağ örgüsü (filtran olmayan bölüm) ve Schlemm kanalını çevreleyen fonksiyonel (filtran) trabeküler ağ örgüsü bölümüdür. Schlemm kanalının etrafındaki fonksiyonel ağ örgüsü dıştan içe üç tabakadan oluşmuştur; kribriform, korneaoskleral ve uveal ağ örgüleri. Kribriform tabaka (diğer adıyla jukstakanaliküler doku, endotelyal ağ örgüsü) Schlemm kanalının iç duvarıyla en yakın komşuluğu gösterir. Elastik yapıda liflerin oluşturduğu bir yapıya sahiptir, fibroblast benzeri trabeküler hücreler ekstraselüler materyal olarak bilinen ancak elektron mikroskopi çalışmasında "boşluklar" olarak görülen yapının içerisine gömülüdür ⁶¹.

Trabeküler ağ örgüsü hücreleri yüksek ölçüde fagositik özelliğe sahiptir ve aköz hümörde dolanan partikülleri, hücrel debrisleri ve protein moleküllerini ortadan kaldırırlar. Böylece aköz hümörün temizlenmesini sağlar, intertrabeküler boşlukların tıkanmasını önlerler. Trabeküler hücreler trabeküler demetlerle sıkı bağlantılı değildir, bu nedenle Schlemm kanalı endoteline geçerek dolaşım sistemine de girebilirler ⁶¹.

Schlemm kanalı sklera sulkusu içine gömülmüş, yatay kesitlerinde 350-500 µm genişliğe sahip sirküler bir yapıdır. Kanalın her parçası aynı boyut ve şekle sahip değildir, pek çok septa ya da doku köprüleri ile parçalara ayrılmıştır. Schlemm kanalı tek sıra endotel tabakası ile örtülüdür. İç duvardaki hücreler ortalama 160 µm uzunluğunda iğsi hücrelerdir. Dış duvar hücreleri ise daha uzun ve geniştir. İç duvar hücreleri birbirine sıkı yapışıklıklarla bağlanmıştır. Schlemm kanalının endotelini döşeyen hücreler ise mezodermal yapıdan köken alırlar. Schlemm'in iç duvar endoteli hücrelerinin pek çoğunda farklı boyutta dev vakuoller

yer alır ve geçirgen mikrokanallar oluşturabilme kabiliyetindedirler. Böylece aköz hümör ve partiküllerin geçişine imkan verirler. Dış duvar endoteli ise bir bazal membran desteği yapar.

Schlemm kanalının dış duvarında limbal bölgedeki vasküler sistem ile bağlantılı 20-35 arası kollektör kanal vardır. Nazal bölgede temporalden daha fazla bulunurlar. Bu kanallar aköz hümörü episkleral vasküler yapıya ve venöz sisteme ulaştırır ⁶¹.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deney hayvanı olarak tavşan:

Tavşan oftalmolojik araştırmalarda boyutu ve büyük göz yapısı nedeniyle tercih edilen hayvandır. Tavşan ve insan gözü arasında bir takım fizyolojik ve anatomik farklılıklar bulunmaktadır. Gözyaşı döngüsü ve göz kırpmaya sıklığı tavşanlarda daha siktir ve insanlarda bulunmayan üçüncü göz kapağını bulundurur. Ancak kornea yapısı, aköz humör volümü, gözyaşı pH'ı ve miliosmolaritesi tavşan ve insan gözlerinde benzerdir ⁶².

Tavşan gözlerinde trabeküler dış akım sistemi insan gözünden farklı yapıya sahiptir. İrisin öne doğru aşırı bombeleşmiş olması ön kamara açısının görülmesini ileri derecede zorlaştırır. Trabeküler ağ örgüsü insana oranla daha sığıdır ve içeriğindeki delik (por) çapları daha küçüktür. Tavşanda insan yapısına benzer hakiki bir Schlemm kanalı olmamakla beraber korneoskleral septalarla bölümlenmiş, iyi ayırt edilebilen, trabeküler ağ örgüsüne yakın boşluklar mevcuttur. Trabeküler ven ya da kanal olarak isimlendirilen bu boşluklar sklera içerisindeki derin venlere açılarak aköz hümorü episklere ve konjonktiva venlerine taşırlar ⁶².

Çalışmamızda kullanılan 3,5-4,5 kg ağırlığında 25 adet erkek yetişkin New Zealand beyaz tavşan İstanbul Üniversitesi Deneysel Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı Üretim ve Saflaştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışma öncesi İ.Ü. Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı alındı. Çalışmaya başlamadan önce bütün tavşanlar büyüteç ve ışık kalemi yardımıyla konjonktiva ve kornea patolojileri açısından değerlendirildi. Çalışmaya alınan 25 tavşan randomize olarak 5'li 5 gruba ayrıldı (Tablo2). Her grup 5 tavşanın 10 gözünü içermekteydi.

Tablo 2: Gruplar (Etken madde, prezervan tipi ve uygulama sıklığı)

Gruplar	Prezervan tipi	Etken madde	Ticari isim	Uygulama dozu
A (Kontrol)	Yok	İzotonik %0.9 solüsyon	Serum fizyolojik	1*1
B	Yok	Tafluprost %0.0015	SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme	1*1
C	%0,15 Purite	Brimonidin %0,1	ALPHAGAN P® , Allergan	2*1
D	%0,001 Polikuad	Travoprost %0,004	TRAVATAN® PQ, Alcon	1*1
E	%0,02 BAK	Latanoprost %0,005	XALATAN®, Pfizer	1*1

Tedavi gruplarında kullanılan antiglokomatöz damlalar rutin tedavi dozunda, günlük doz saati kaydedilerek, her iki göze uygulandı. Damla damlatıldıktan sonra alt ve üst göz kapakları manuel olarak 10 saniye süreyle kapatıldı. Damla uygulamasına tüm gruplarda 28 gün süreyle kesintisiz devam edildi. Çalışma süresi içerisinde 1. 2. ve 3. haftada gözler yeniden değerlendirildi. Enfekte görümlü ya da başka bir sebepten hasara uğramış göze rastlanılmadı.

Sedasyon ve sakrifizasyon:

Planlanan çalışma süresini tamamlayan tavşanlara intramusküler 35 mg/kg ketamine ve 5 mg/kg xylazine enjeksiyonu ile sedasyon sağlandıktan sonra üst bulbar konjonktivadan biyopsi materyali alındı. Daha sonra hayvanlar 1 mEq/ml'lik potasyum klorür solüsyonundan 2 mEq intrakardiyak enjekte edilerek sakrifiye edildi. Konjonktiva çepeçevre açılarak rektus kasları serbestleştirildi ve glob bütün olarak enükle edildi. Ön segment yapıları (kornea, bulber konjonktivadan bir kısım, ön kamara, iris ve lens) korundu, vitreus ve retinayı içeren arka glob bölümü diseke edilerek uzaklaştırıldı.

Doku örneklerinin hazırlanışı ve çalışma tekniği:

Alınan doku örnekleri %4'lük tamponlanmış nötral formaldehit (Atabay Kimya) ile fikse edildikten sonra, sırasıyla %70, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinden (Merck) geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulandı. Dokular şeffaflaştırılmak üzere 3 kez toluenden (Riedel-de Haën) geçirildikten sonra yumuşak parafin (46-48 °C) ve sert parafinde (56-58 °C) 45'er dk. bekletildi sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin blok haline getirilen doku örneklerinden mikrotom (Leica SM 2000) aracılığıyla 4-5 µm kalınlığında alınan kesitler, pozitif şarjlı lamlar (Thermo Scientific) üzerine yapıştırıldı. Hazırlanan preparatlara ışık mikroskopik incelemeler için Hematoksilen & Eozin (H&E); goblet hücre sayımı için Periyodik Asit & Shiff + Hemalum boyaları uygulandı. Preparatların incelenmesinde İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda mevcut Olympus BX 61 marka ışık mikroskobu kullanıldı.

Rutin doku takibi prosedüründen sonra doku örneklerine işaretlenmiş monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılarak Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama uygulandı. Elde edilen parafin bloklardan alınan doku kesitleri pozitif şarjlı lamlar (Thermo Scientific) üzerine yapıştırıldı. Hazırlanan preparatlara inflamasyon mevcudiyetini göstermek amacıyla CD45 (Biorbyt) ve apoptoz varlığını araştırmak için Kaspaz-3 (Biorbyt) primer antikorları uygulandı.

Hematoksilen & Eozin ile boyanan preparatlarda ışık mikroskobunun x40 büyütmesi kullanılarak her bir doku örneğinde rastgele seçilen beş bölgede H-SCORE yöntemi ile yarı-kantitatif değerlendirme yapıldı. Kornea doku örneklerinde araştırmaya konu edilen kriterler; epitel dökülmesi, epitel incilmesi, epitelde dikensi yapılar, intersellüler aralık, epitelde koyu nüveli hücrelerin varlığı, stroma içi kollajen liflerde ondülasyon, stromada ödem varlığı ve kornea endotelindeki hücre kaybı idi. 4 farklı araştırmacı tarafından eşzamanlı olarak yukarıdaki kriterlere ayrı ayrı 0-3 arasında skorlar verildi ve bu değerlendirmeye göre istatistiksel analiz yapıldı. H&E boyalı preparatlarda trabeküler dış akım yollarındaki değişiklikler ışık mikroskobu ile incelendi.

Periyodik Asit & Shiff + Hemalum boyalı preparatlarda konjonktiva epitelinde belirlenen ortalama 316,553 µm uzunluğundaki alanda goblet hücreleri sayıldı ve her grup için ortalama değerler hesaplanarak kantitatif değerlendirme yapıldı.

CD45 ve kaspaz-3 immün boyama yöntemiyle elde edilen preparatların ışık mikroskopisi x40 büyütmede incelenmesiyle kırmızı reaksiyon veren hücreler immün pozitif olarak kabul edildi. Her preparat için 5 farklı alanda pozitif boyanan hücreler 4 araştırmacı tarafından eş zamanlı olarak sayıldı ve her bir alan için 0-100 arasında değerler verildi. 4 araştırmacının her bir alan için buldukları değerlerin ortalaması alınarak yarı kantitatif değerlendirme (H-SCORE yöntemi) yapıldı.

İmmünohistokimya Prosedürü

Kesitler parafinlerinin giderilmesi için 1 saat toluende bekletildi. Dokular hidrasyon amacıyla sırasıyla %100-%96-%90-%70'lik inen alkol serilerinden geçirildikten sonra distile suya alındı. Antijenin açığa çıkarılması amacıyla mikrodalga fırının orta ayarında 3x5 dk. sitrat tamponu ile antijen geri-kazandırma işlemi yapıldı. Kesitler oda ısısına soğutuldu. Distile su ile 5 dk yıkanan kesitler fosfat tamponu ile 3x5 dk yıkandı ve boyama haznesine dizildikten sonra üzerlerine hidrojen peroksit damlatıldı ve 10 dk. beklendi. Fosfat tamponu ile yıkanan kesitler 5 dk. UV blokta (İnvitrogen) bekletildi (istenmeyen zemin boyanmasının önlenmesi için). UV bloktan sonra yıkama yapılmadan 1:100 oranında sulandırılan primer antikor damlatıldı ve kesitler oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Kesitler 4 kere fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra fazla sıvı kurulandı ve sekonder antikor (İnvitrogen) damlatılarak 15 dk. beklendi. Kesitler 4 kere fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra fazla sıvı kurulandı ve streptavidin-peroksidazda (İnvitrogen) 10 dk. bekletildi. Kesitler 4 kere fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra fazla sıvı kurulandı ve kromojen (İnvitrogen) damlatılarak mikroskop altında renkli reaksiyon verene kadar takip edildi. Reaksiyon veren kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Nükleus boyası olarak Mayer's Hematoksilen kullanıldı (10 sn).

İstatistiksel analiz:

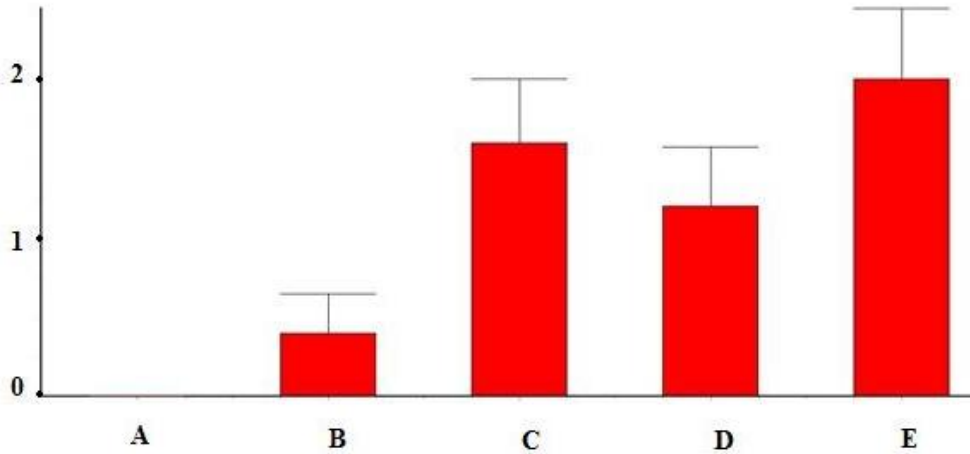
Tüm gruptaki hayvanların kornea epitelindeki değişikliklerin, konjonktivadaki goblet hücre sayılarının, CD45 ve kaspaz-3 immünreaktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde gruplar arasındaki karşılaştırmalar için One Way ANOVA testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak belirtildi. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz GraphPad programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopisi ile elde edilen bulgular

4.1.1. Kornea epitel dökülmesi:

%0.9 serum fizyolojik uygulanan grubun (kontrol) Hematoksilen & Eozin boyamalarının ışık mikroskobu ile incelenmesinde; kornea epiteli düzgün izlendi, epitel hücresi kaybı gözlenmedi. En fazla epitel dökülmesi %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 grubunda (BAK-latanoprost) tespit edildi. Daha sonra sırasıyla %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 grubu (purite-brimonidin) ve %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 grubu (polikvad-travoprost) gelmekteydi. En az hücre dökülmesi prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 grubunda (prezervansız tafluprost) gözlendi (Şekil 2). Gruplar arası istatistiksel analizde kontrol grubu ile prezervan içermeyen tafluprost grubu arası anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0.05$), kontrol grubu ile purite-brimonidin grubu ve BAK-latanoprost grubu arasında anlamlı farklılık bulundu. (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$).

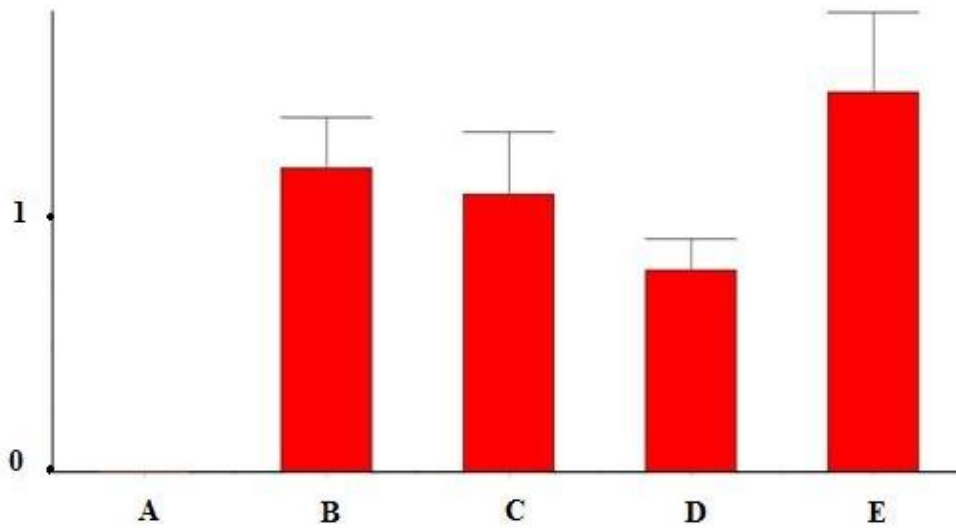


Şekil 2 : Kornea epitelindeki dökülmenin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.2. Kornea epitel incelmesi:

Kontrol grubunun Hematoksilen & Eozin boyamalarının ışık mikroskobu ile incelenmesinde; kornea epitel hücre kalınlığında değişikliğe rastlanılmadı. En fazla epitel incelmesi BAK-latanoprost grubunda gözlemlendi. Prezervan içermeyen tafluprost grubunda epitelin ondülasyon gösterdiği bazı bölgelerde epitel kalınlığı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı ve kornea epitelinin yassı hücrelerinin yok olduğu incelenmiş alanlar gözlemlendi. Polikuad-travoprost grubunda ise en az epitel incelmesi izlendi (Şekil 3). Gruplar arası istatistiksel analizde kontrol grubu ile prezervan içermeyen tafluprost, purite-brimonidin grubu ve BAK-latanoprost grubu arasında anlamlı farklılık bulundu (sırasıyla $p<0.01$ $p<0.01$ ve $p<0.001$). Kontrol grubu ile polikuad-travoprost grubu arası anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($p>0.05$).

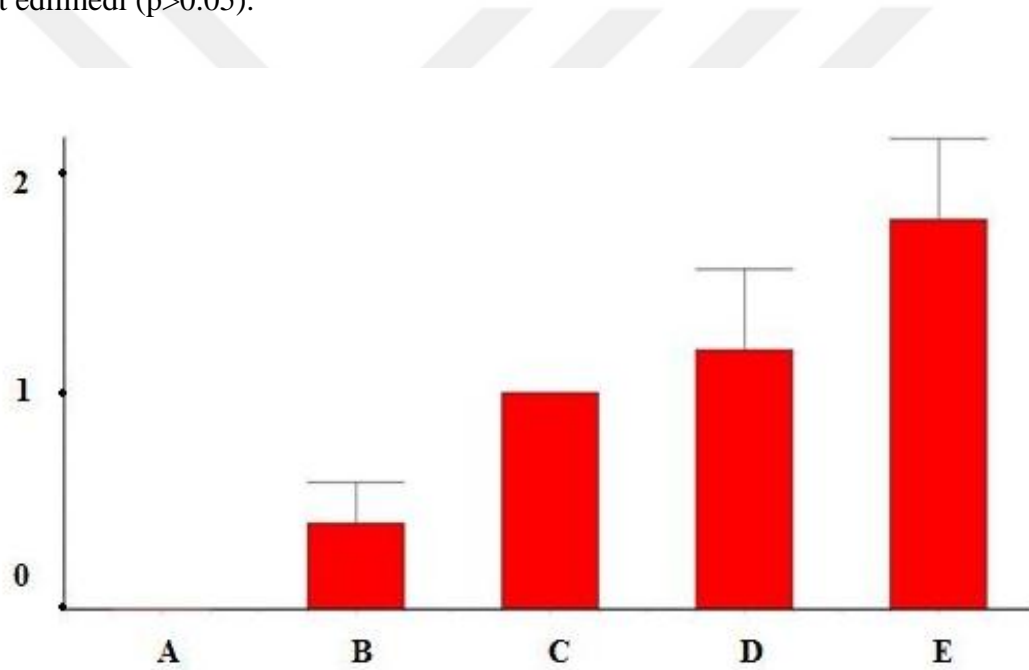


Şekil 3 : Kornea epitel incelmesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikuad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.3. Kornea epitelinde dikensi yapılar:

Kontrol grubunun Hematoksilen & Eozin boyamalarının ışık mikroskobu ile incelenmesinde; kornea ön yüzü epiteli düzgün izlendi, dikensi yapılar gözlenmedi. En fazla dikensi yapı oluşumu sırasıyla BAK-latanoprost grubu, polikuad-travoprost grubu, purite-brimonidin grubunda gözlendi. En az dikensi yapı prezervan içermeyen tafluprost grubunda izlendi (Şekil 4). Gruplar arası istatistiksel analizde kontrol grubu ile polikuad-travoprost grubu ve BAK-latanoprost grubu arasında anlamlı farklılık bulundu. (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$). Kontrol grubu ile prezervan içermeyen tafluprost grubu arası anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Prezervan içermeyen tafluprost sadece BAK-latanoprost grubu ile anlamlı farklı idi. ($p<0.01$). Diğer prezervan madde içeren gruplar ile aralarında anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$).

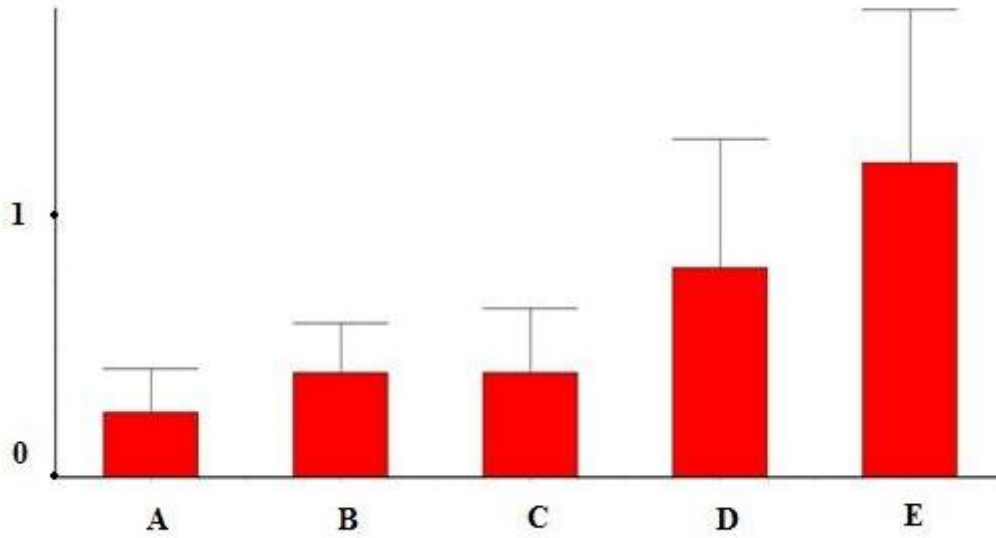


Şekil 4 : Kornea epitelinde oluşan dikensi yapıların istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikuad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.4. Kornea epitelinde interselüler aralık:

Gruplar arasında interselüler aralıklarda genişleme en fazla BAK-latanoprost grubunda gözlenmiş olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 5).

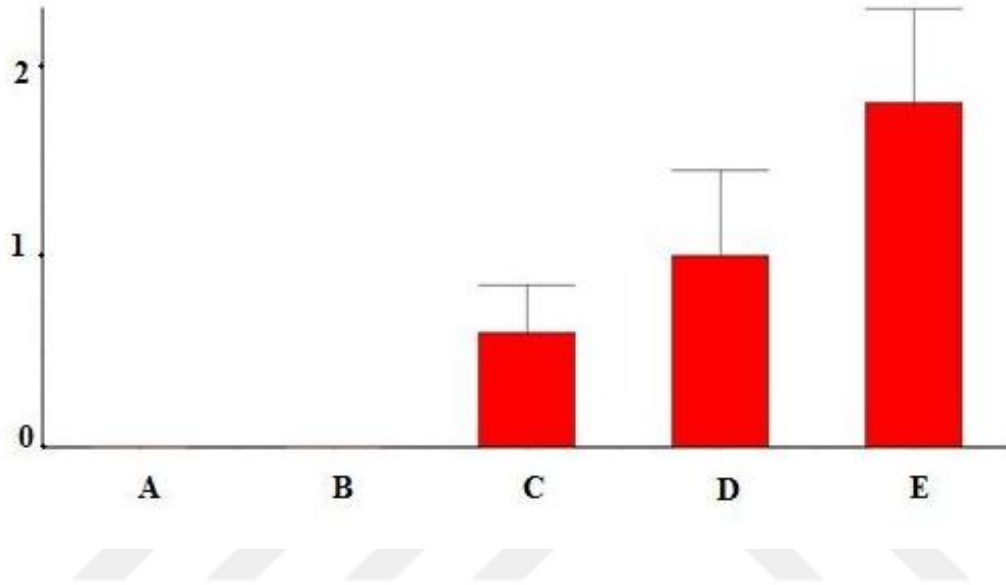


Şekil 5:Kornea epitel hücreleri arasında oluşan interselüler aralıkların istatistiksel olarak değerlendirilmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama ,**Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.5. Kornea epitelinde koyu nüveli hücreler:

Kornea epitelinde koyu nüveli hücelere en fazla BAK-latanoprost grubunda rastlandı (Şekil 6). Kontrol grubu ve prezervan içermeyen tafluprost grubu ile BAK-latanoprost arası anlamlı farklılık mevcuttu (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.01$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.

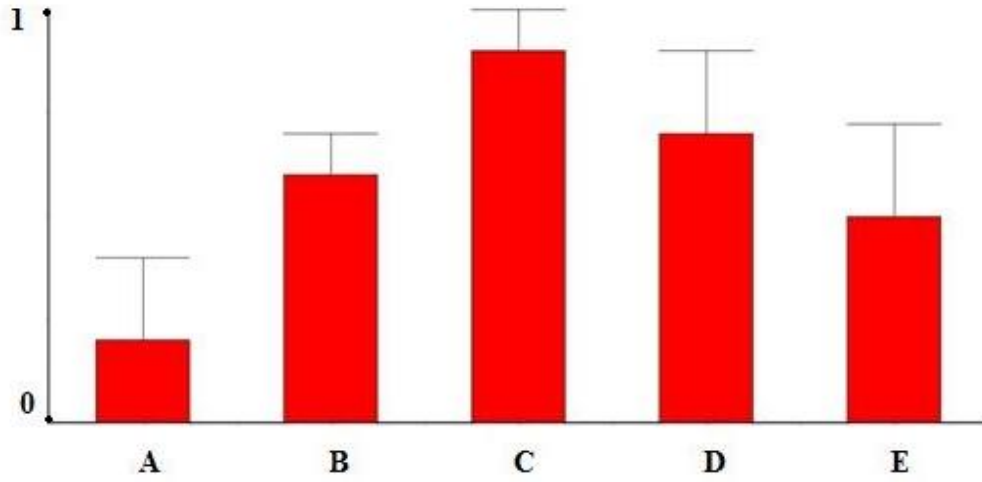


Şekil 6: Kornea epitelinde görülen koyu nüveli hücrelerin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikuad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.6. Korneada görülen ondülasyon:

Gruplar arasında en fazla ondülasyona purite-brimonidin grubunda rastlanılmış olmasına rağmen her grupta farklı düzeyde ondülasyon görüldü (Şekil 7). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$).

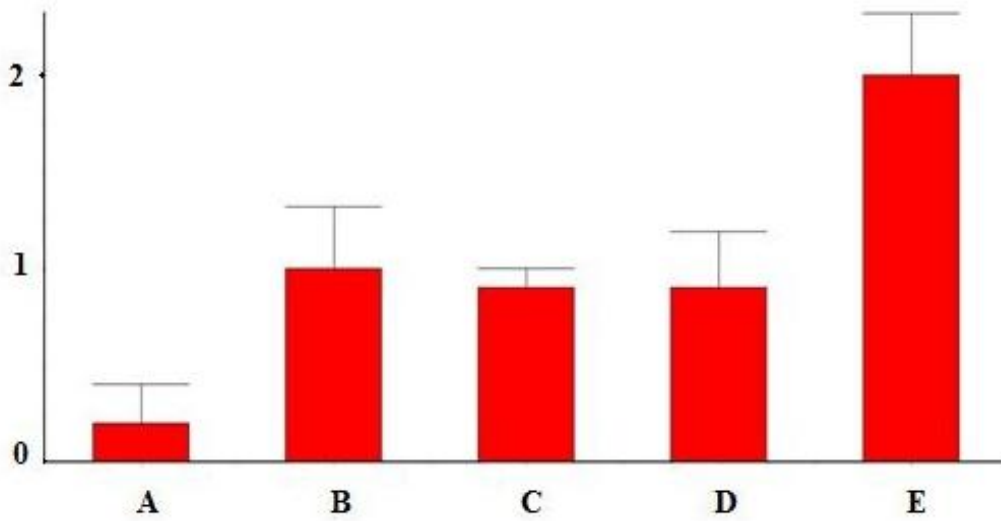


Şekil 7: Korneada görülen ondülasyonun istatistiksel olarak değerlendirilmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama .**Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.7. Substantia propria kornea'da oluşan ödem:

Gruplar arasında en fazla substantia propria ödemi BAK-latanoprost grubunda gözlemlendi (Şekil 8). BAK-latanoprost grubu ile kontrol grubu, purite-brimonidin grubu ve polikvad-travoprost grubu arası anlamlı farklılık mevcuttu (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.05$, $p<0.05$). Kontrol grubu ile BAK-latanoprost dışında diğer çalışma grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

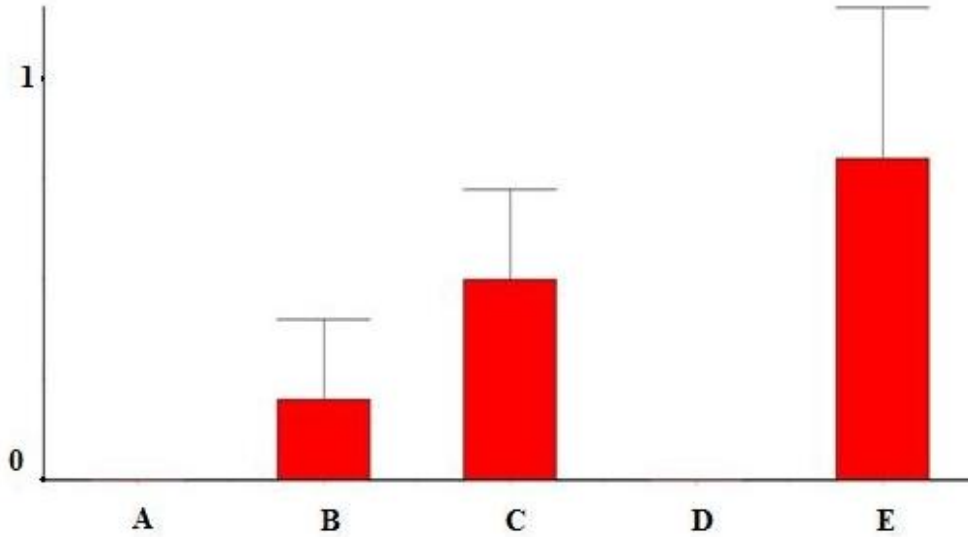


Şekil 8: Substantia propria kornea'da oluşan ödemin istatistiksel olarak değerlendirilmesini gösteren grafik

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama ,**Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.8. Kornea endotel değişiklikleri

Kornea endotelinde en fazla değişiklik BAK-latanoprost grubunda gözlenmekle birlikte gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 9).



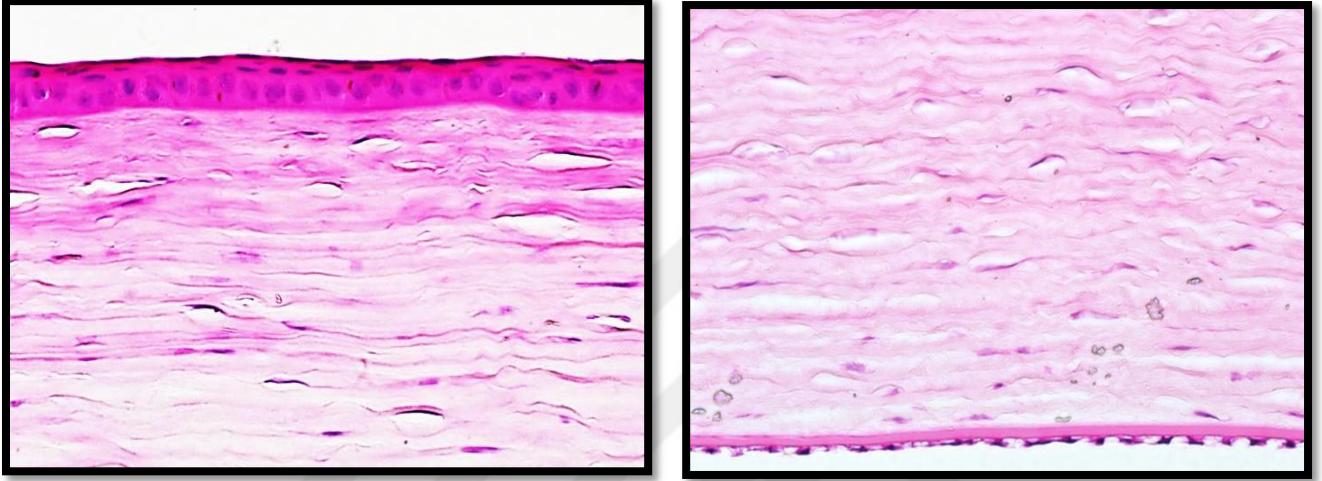
Şekil 9: Kornea endotelinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.9. Kornea dokusunun H&E boyanmasının gruplarda genel değerlendirmesi

Kontrol grubu:

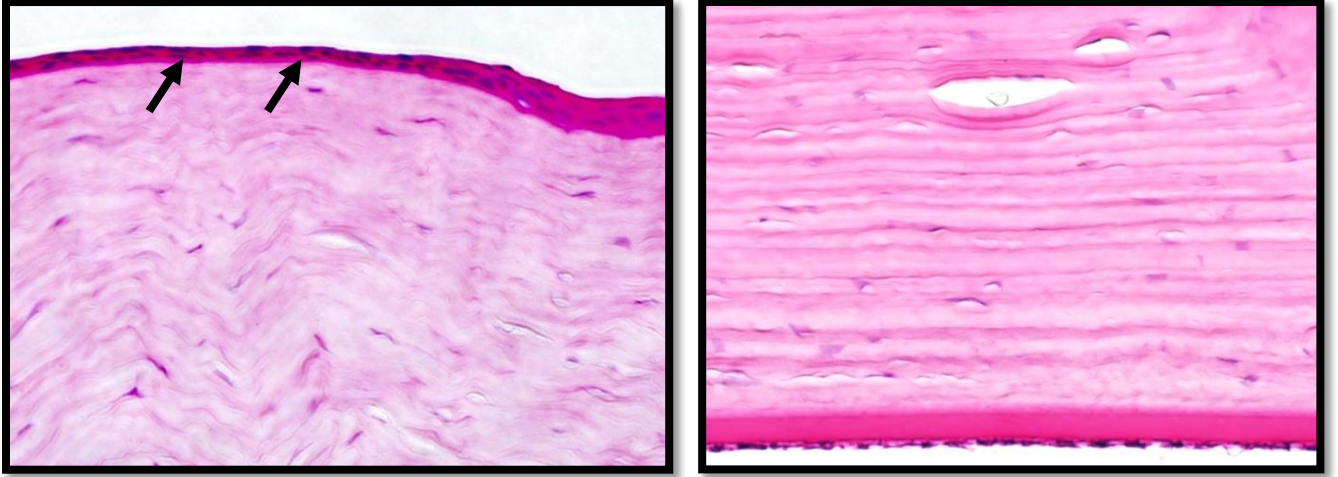
İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama yapılan grupta kornea epitel yapısı normaldi, Substantia propria kornea'da ödematöz alanlar görülmedi. Korne endotelinde değişiklik saptanmadı (Resim 1).



Resim 1: Grup A'dan hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim. x40 **Grup A :** Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama ,

Prezervan içermeyen tafluprost grubu:

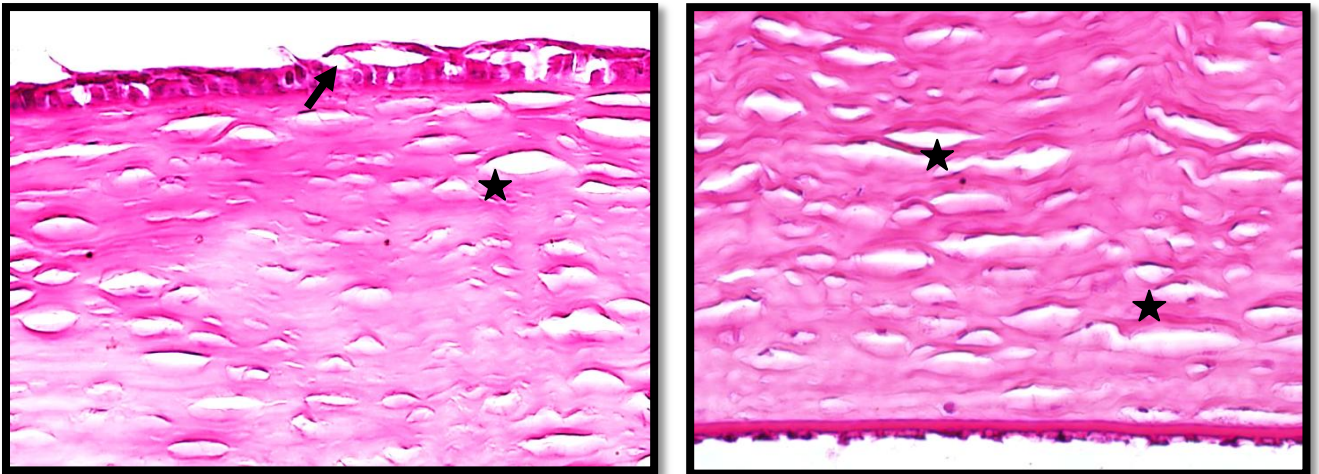
Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyonun (Saflutan®) uygulandığı grupta kornea epiteli, stroması ve endotelindeki değişiklikler istatistiksel olarak kontrol grubuna yakın izlendi. Kornea epitelinde hafif ondülasyon görülen bölgelerde yassı hücrelerin yok olduğu incelmış alanlar görüldü ve bu bölgelerde epitel kalınlığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı. Bazal hücrelerin substantia propria kornea'ya doğru uzandığı sahalar görüldü. Substantia propria kornea'da ödem yok denecek kadar azdı. Kornea endotelinde herhangi bir anormallik gözlenmedi (Resim 2).



Resim 2: Grup B'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim. x40 Epitel incilmesi (↗ ile gösterilen) **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama

Purite-brimonidin grubu:

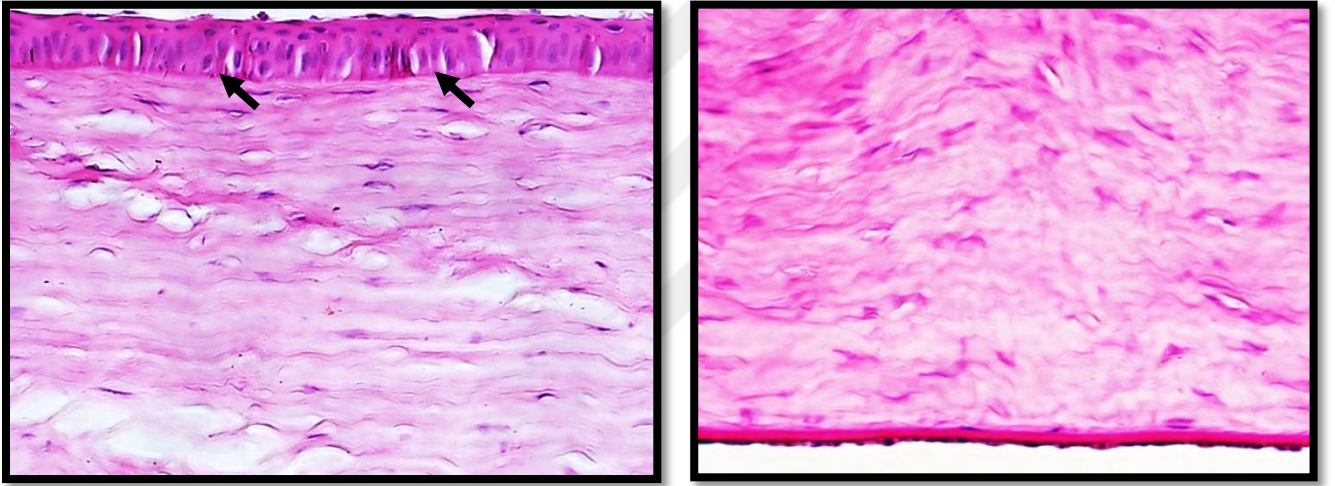
%0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyonun uygulandığı grupta kornea epitelinde incelme ve dökülme sahaları gözlemlendi. Bazal hücrelerin uzayarak substantia propria kornea'ya doğru çıkıntı yapmış olduğu görüldü. Substantia propria kornea'da ödem alanları görüldü. Kornea endotelinde herhangi bir anormallik gözlenmedi (Resim 3).



Resim 3: Grup C'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim. x40 Epitelde dökülme (↗ ile gösterilen) Stroma ödemi (★ ile gösterilen) **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama

Polikvad-travoprost grubu:

%0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyonun uygulandığı grupta kornea epitelinde konjonktivaya yakın bölgelerde ondülasyon görüldü. Epitel hücrelerinin bazılarında intrasellüler genişlemeler dikkat çekti. Korneada epitelinin üst yüzeyinde dikensi çıkıntılar kontrol grubuna göre daha belirgindi. Stromada belirgin ödem izlenmedi. Konjonktivaya yakın bölgelerde hücreler arası ayrılmalar görüldü. Kornea endotelinde herhangi bir anormallik gözlenmedi (Resim 4).



Resim 4: Grup D'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim. x40 Epitelde interselüler aralıkta artış (↗ ile gösterilen)

Grup D: %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama

BAK-latanoprost grubu:

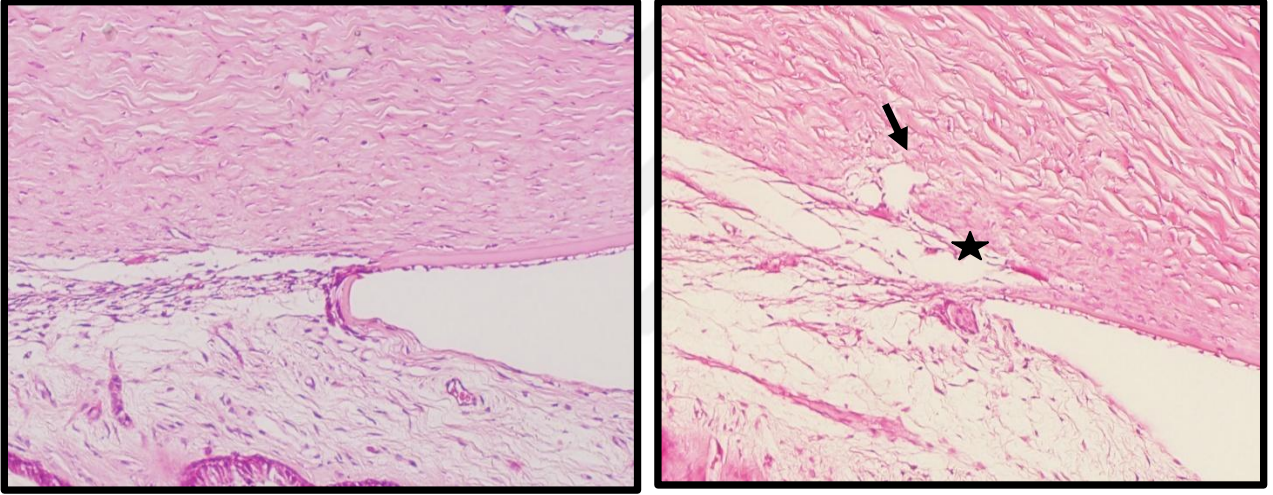
%0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyonun uygulandığı grupta kornea epitelindeki incelme, dökülme, epitelde yüzeyinde oluşan dikensi yapılar kontrol ve prezervan içermeyen tafluprost grubuna göre artmıştı. Kornea epitelinin yassı hücre katlarının azaldığı çok sayıda alan gözlemlendi. Kornea epitelinde ondülasyon ve epitel hücreleri arasında interselüler genişlemeler gözlemlendi. Ondülasyon gösteren sahalarda kollajen lif düzeni bozulmuştu. Substantia propria kornea'daki ödem, diğer gruplara göre belirgindi. Kornea endotelinde bazı gözlerde endotel bazal membran ayrışması gözlemlendi (Resim 5).



Resim 5: Grup E'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim x40. Epitelde dökülme (↗ ile gösterilen) Stroma ödemi (★ ile gösterilen) Endotelde ayrışma (↘ ile gösterilen) **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.1.10. Trabeküler dış akım yolunun incelenmesi:

Gruplardan elde edilen kesitlere H&E boyama yöntemi kullanılarak preparatlar ışık mikroskopisi x40 büyütmesinde incelendi. BAK-latanoprost grubunda trabeküler ağda demetler arası genişlik artışı, Schlemm kanalı benzeri boşluklar ve distal dış akım kanallarında genişlemeler olduğu görüldü. Purite-brimonidin grubunda BAK-latanoprost grubundaki değişiklikler kadar belirgin olmasa da benzer bulgular tespit edildi. Polikuad-travoprost ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarında trabeküler dış akım yolu üzerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Resim 6)



Resim 6: Grup B ve Grup E'den hazırlanan H&E preparatlarında trabeküler dış akım yollarının histolojik yapısını gösteren resim x40. Dış akım yollarında genişleme (↗ ile gösterilen) Demetler arası genişlik artışı (★ ile gösterilen) **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

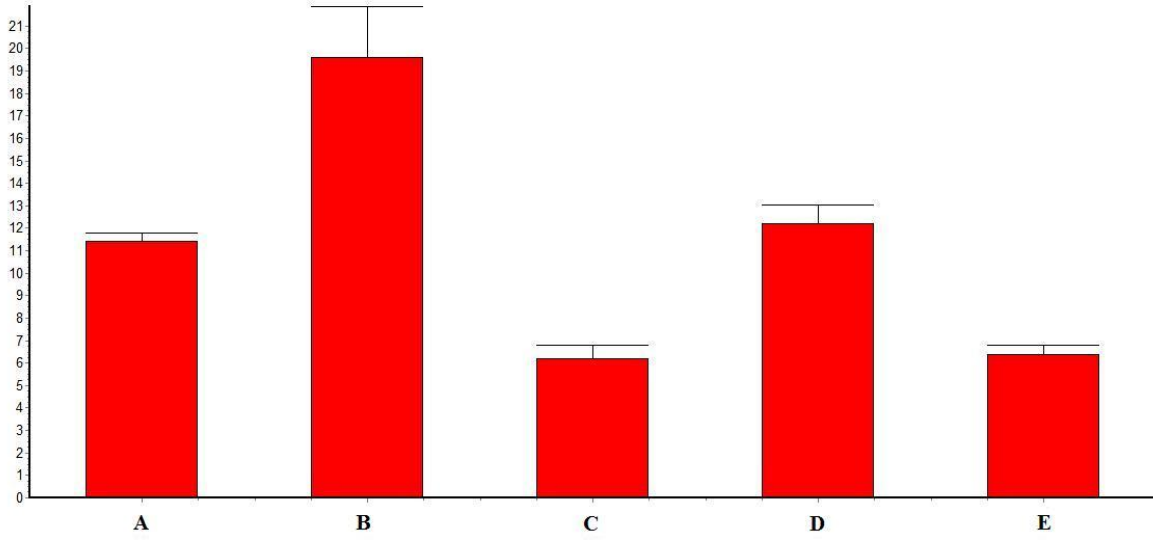
4.2. Konjonktiva Goblet Hücre Değerlendirmesi

Periyodik Asit & Schiff + Hemalum boyalı preparatlarda goblet hücreleri ışık mikroskobunun x40 büyütmesi kullanılarak ortalama 316,553 μm uzunluğundaki bir alanda sayıldı (Resim 7). Her grup için ortalama değerler (hücre/alan) hesaplanarak kantitatif değerlendirme yapıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Konjonktiva goblet hücre yoğunluğu (hücre/alan)

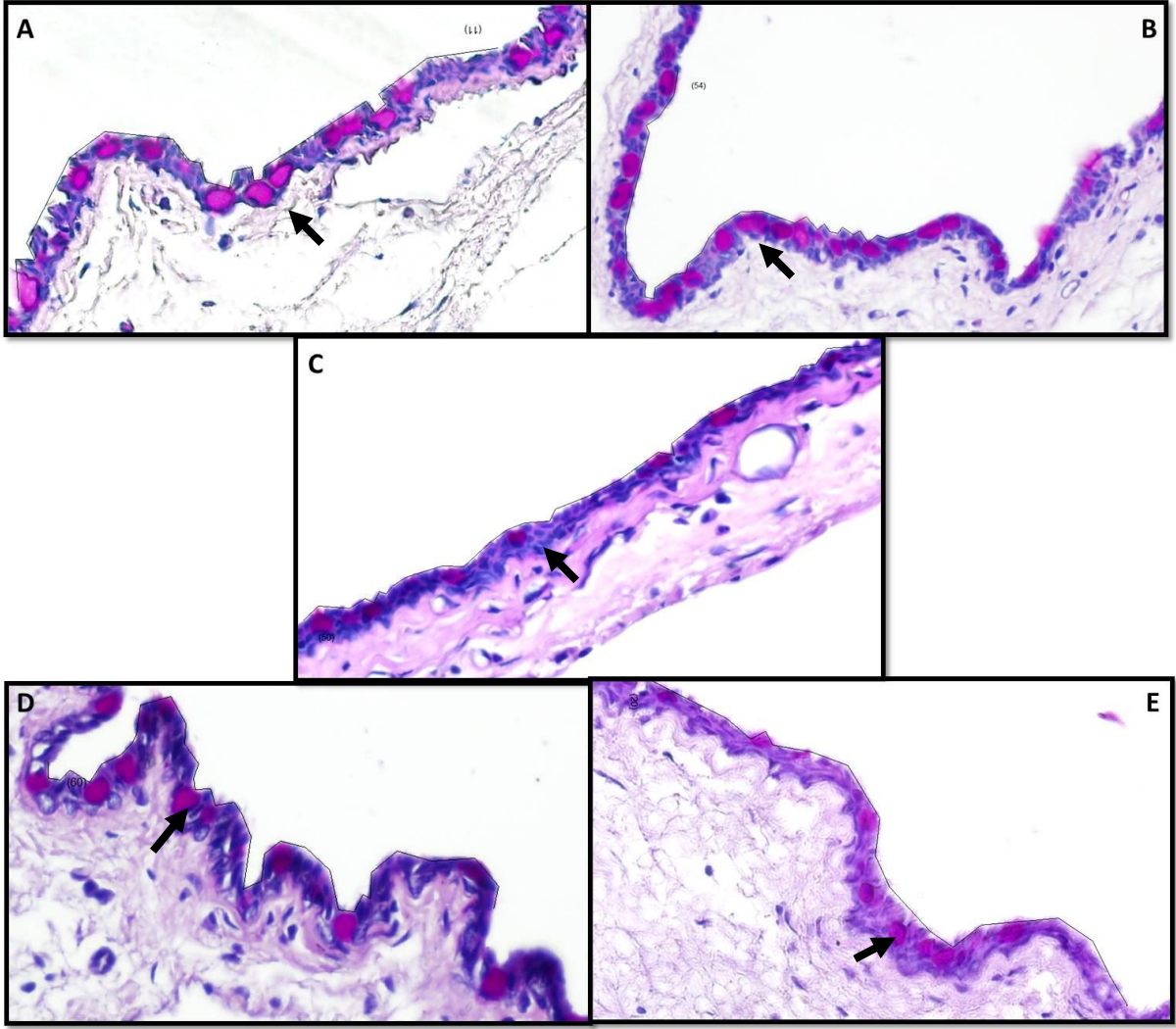
Gruplar	Goblet hücre sayısı (hücre/alan)	Ortalama alan uzunluğu (μm)
A (Kontrol)	11,4 \pm 0.89	316.62 \pm 0.33
B (Prezervan içermeyen tafluprost)	19,6 \pm 5.07	316.22 \pm 3.22
C (Purite-Brimonidin)	6,2 \pm 1.3	315.86 \pm 1.11
D (Polikuad-travoprost)	12,2 \pm 1.92	316.54 \pm 0.24
E (BAK-latanoprost)	6,4 \pm 0.89	316.30 \pm 1.27

Elde edilen bulgulara göre BAK-latanoprost grubunda konjonktivadaki goblet hücrelerinin sayısında kontrol ($p<0.05$), prezervan içermeyen tafluprost ($p<0.001$) ve polikuad-travoprost ($p<0.05$) gruplarına göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi. BAK-latanoprost grubu ile purite-brimonidin grubu arasında goblet hücre sayısı farklı bulunmadı ($p>0.05$). Prezervan içermeyen tafluprost grubunda konjonktivadaki goblet hücrelerinin sayısı bütün gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı ($p<0.05$) (Şekil 10).



Şekil 10: Konjonktivadaki goblet hücre sayısının istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama



Resim 7: Deney gruplarından hazırlanan PAS+Hemalum preparatlarında goblet hücre sayılarındaki değişiklikleri gösteren resim. x40 Goblet hücreleri (↗ ile gösterilen)

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikuad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

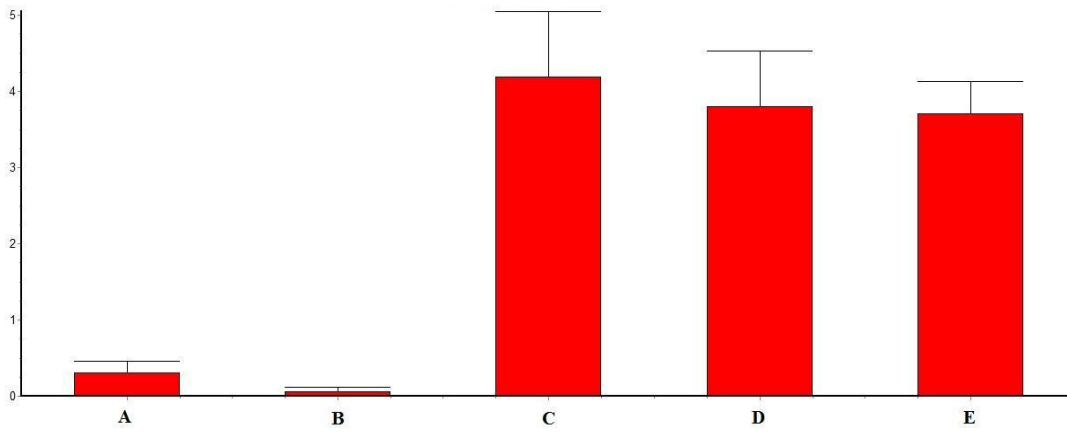
4.3.1. İnflamasyon değerlendirilmesi (CD45 İmmünreaktivitesi):

Çalışma gruplarından CD45 immün boyama tekniği kullanılarak elde edilen preparatlar Olympus BX 61 marka ışık mikroskopunda incelendi. x40 büyütmede her bir doku örneğinde rastgele seçilen beş bölgede H-SCORE yöntemi ile yarı-kantitatif değerlendirme yapıldı. İncelenen doku kesitlerinde kırmızı reaksiyon veren hücreler immün pozitif olarak kabul edildi (Resim 8,9). Örneklere immünreaktivitelerine göre dört farklı kişi tarafından 0-100 arasında skorlar verildi ve bu değerlendirmeye göre istatistiksel olarak analiz yapıldı (Tablo 4). Değerlendirme, kornea epiteli ve CALT olmak üzere iki kısımda gerçekleştirildi.

Tablo 4: CD45 immün boyama yöntemiyle kornea epiteli ve CALT’da immün pozitif hücre yoğunluğu (H SCORE, ortalama±standart sapma)

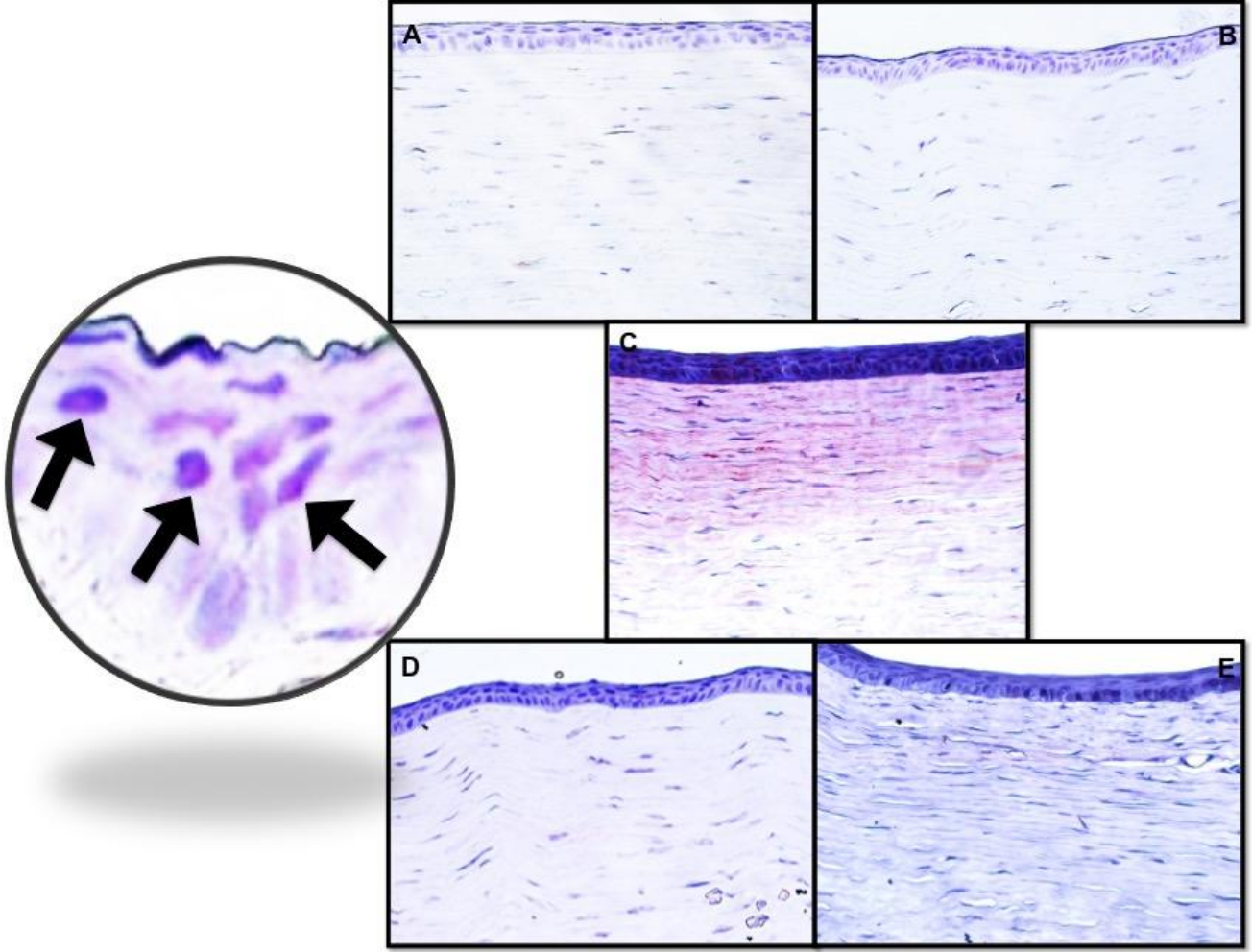
Gruplar	Ortalama H SCORE değerleri	
	Kornea epiteli	CALT
A (Kontrol)	0.31±0.31	2.745 ±0.82
B (Prezervan içermeyen tafluprost)	0.06±0.13	10.75±4.23
C (Purite-brimonidin)	4.18±1.92	40.85±6.34
D (Polikuad-travoprost)	3.8±1.62	20.88±7.25
E (BAK-latanoprost)	3.7±0.94	34.12±6.13

Kornea epitelinde kontrol ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarında belirgin inflamatuvar değişiklik izlenmedi. Prezervan madde içeren gruplarda (purite-brimonidin, polikvad-travoprost, BAK-latanoprost grupları) gözlenen inflamatuvar değişiklikler kontrol ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarına oranla anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Şekil 11).



Şekil 11: Kornea epitelindeki CD45 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.

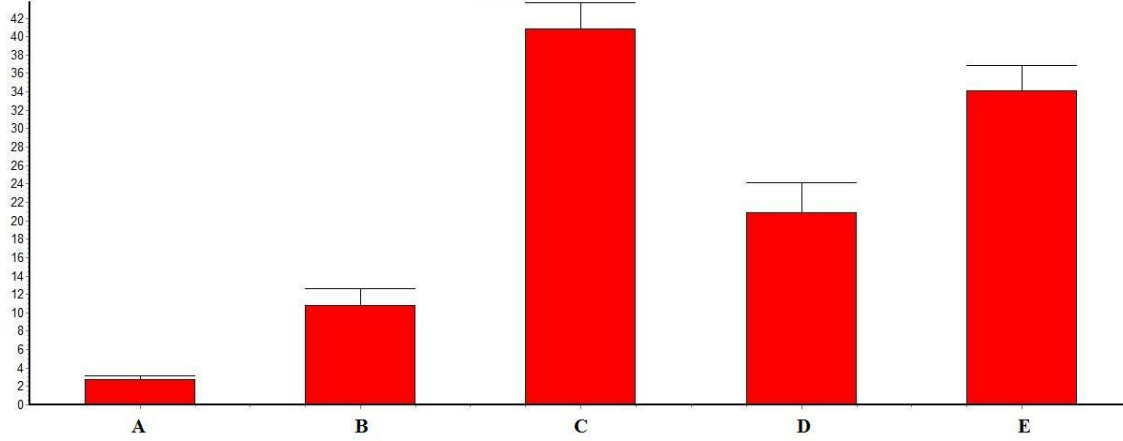
Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama ,**Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama



Resim 8: Deney gruplarından hazırlanan preparatlarda, kornea epitelindeki CD45 immünreaktivitesini gösteren resim. X40 İmmün pozitif hücreler (↗ ile gösterilen)

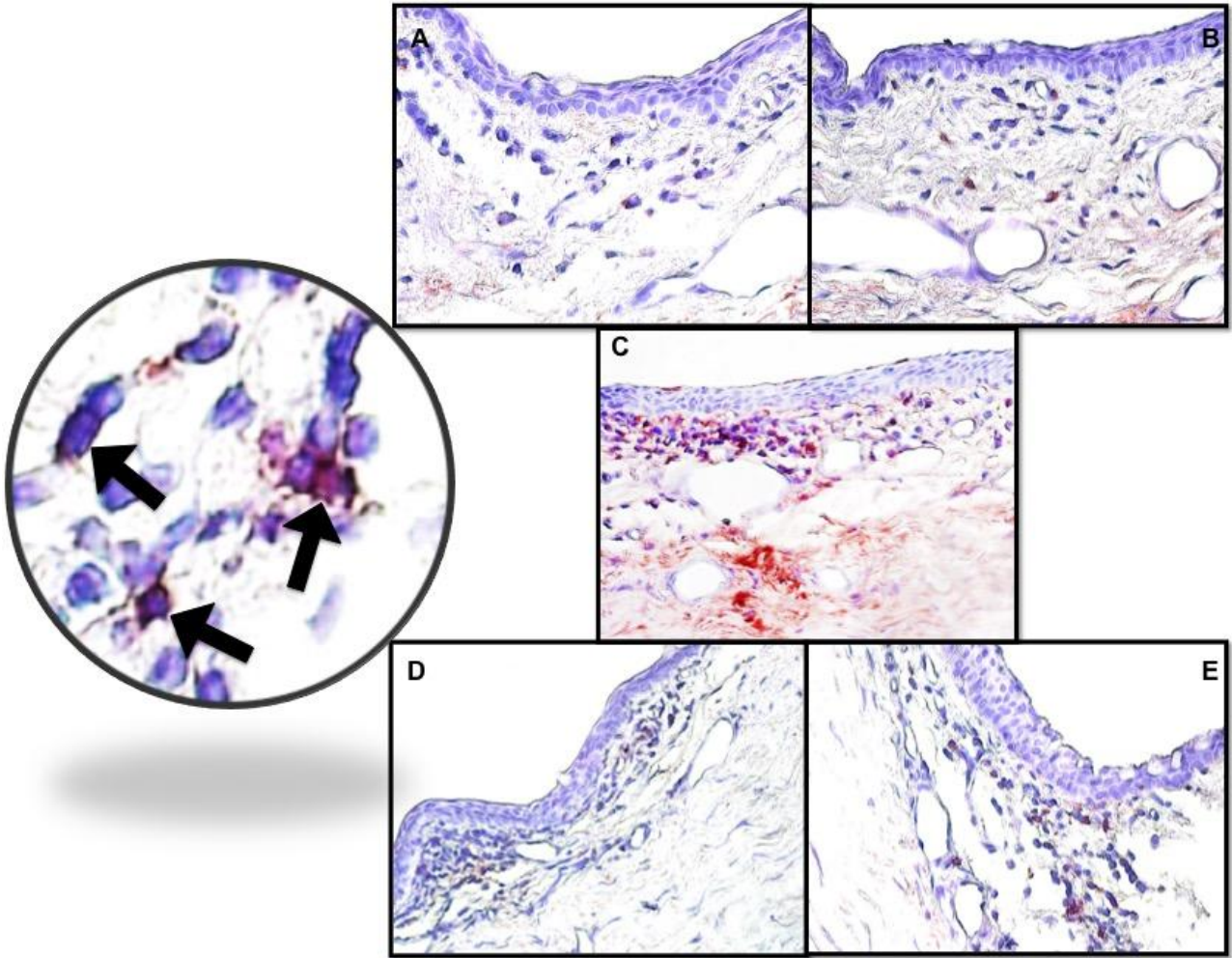
Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama ,**Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

CALT (konjonktiva-ilişkili lenfoid doku)'da kontrol ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarında belirgin inflamatuvar değişiklikler izlenmedi. Prezervan madde içeren gruplarda (purite-brimonidin, polikuad-travoprost, BAK-latanoprost grupları) gözlenen inflamatuvar değişiklikler kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 12).



Şekil 12: CALT'teki CD45 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikuad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama



Resim 9: Deney gruplarından hazırlanan preparatlarda, CALT'teki CD45 immünreaktivitesini gösteren resim. X40 İmmün pozitif hücreler (↗ ile gösterilen)

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

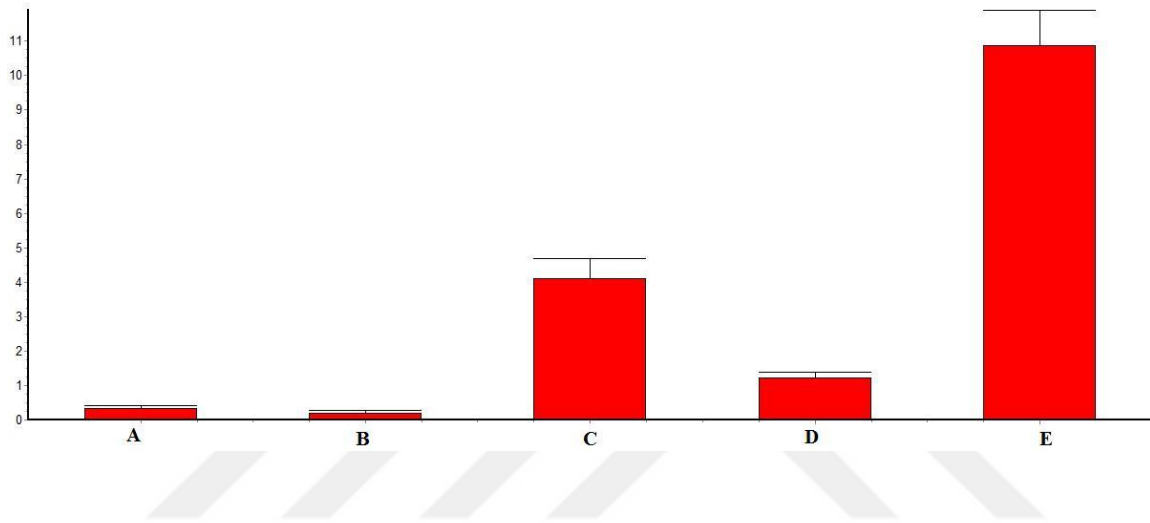
4.3.2. Apoptotik hücre değerlendirilmesi (Kaspaz-3 İmmünreaktivitesi):

Çalışma gruplarından kaspaz-3 immün boyama tekniği kullanılarak elde edilen preparatlar Olympus BX 61 marka ışık mikroskopunda incelendi. x40 büyütmede her bir doku örneğinde rastgele seçilen beş bölgede H-SCORE yöntemi ile yarı-kantitatif değerlendirme yapıldı. İncelenen doku kesitlerinde kırmızı reaksiyon veren hücreler immün pozitif olarak kabul edildi (Resim 10,11). Örneklere immünreaktivitelere göre dört farklı kişi tarafından 0-100 arasında skorlar verildi ve bu değerlendirmeye göre istatistiksel olarak analiz yapıldı (Tablo 5). Değerlendirme, kornea epiteli ve CALT (konjonktiva-ilişkili lenfoid doku) olmak üzere iki kısımda gerçekleştirildi.

Tablo 5: Kaspaz-3 immün boyama yöntemiyle kornea epiteli ve CALT’da immün pozitif hücre yoğunluğu (H SCORE, ortalama±standart sapma)

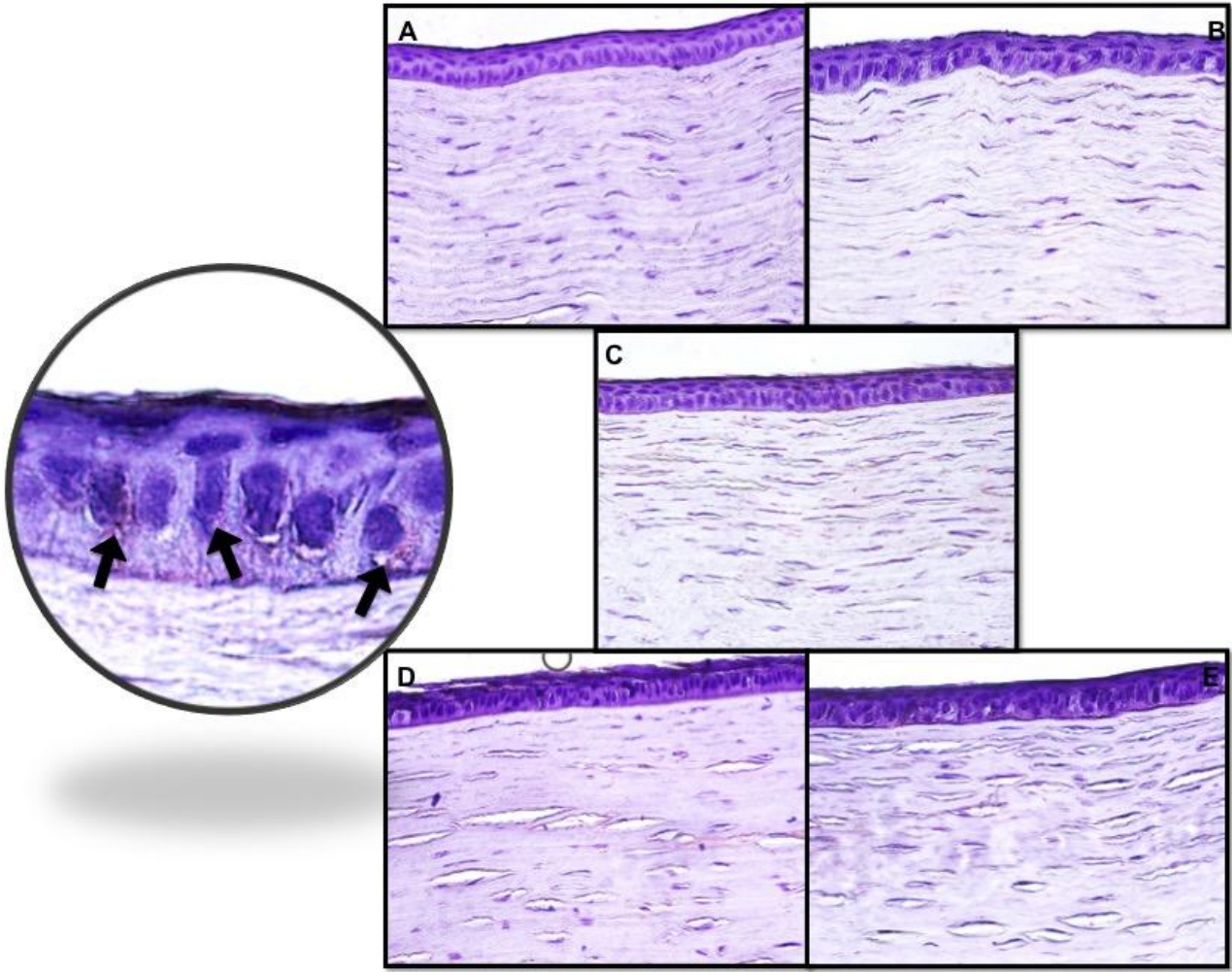
Gruplar	Ortalama H SCORE değerleri	
	Kornea epiteli	CALT
A (Kontrol)	0.34±0.19	1.02±0.57
B (Prezervan içermeyen tafluprost)	0.2±0.18	2.15±0.82
C (Purite-brimonidin)	4.11±1.27	8.16±2.31
D (Polikvad-travoprost)	1.21±0.41	6.88±5.46
E (BAK-latanoprost)	10.86±2.31	27.29±11.45

Kornea epitelinde apoptotik hücre sayısı incelendiğinde; kontrol, prezervan içermeyen tafluprost ve polikvad-travoprost gruplarında anlamlı apoptotik reaksiyon izlenmedi. Purite-brimonidin ve BAK-latanoprost gruplarında apoptotik hücre sayısı diğer gruplara göre anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.001$) (Şekil 13).



Şekil 13: Kornea epitelindeki Kaspaz-3 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesini gösteren grafik.

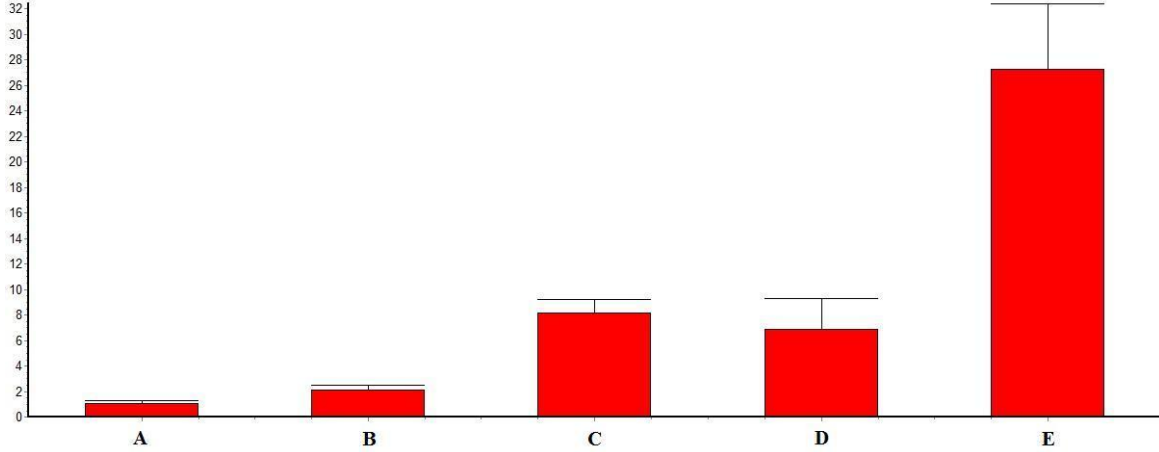
Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama



Resim 10: Deney gruplarından hazırlanan preparatlarda, kornea epitelindeki kaspaz-3 immünreaktivitesini gösteren resim. X40 İmmün pozitif hücreler (↗ ile gösterilen)

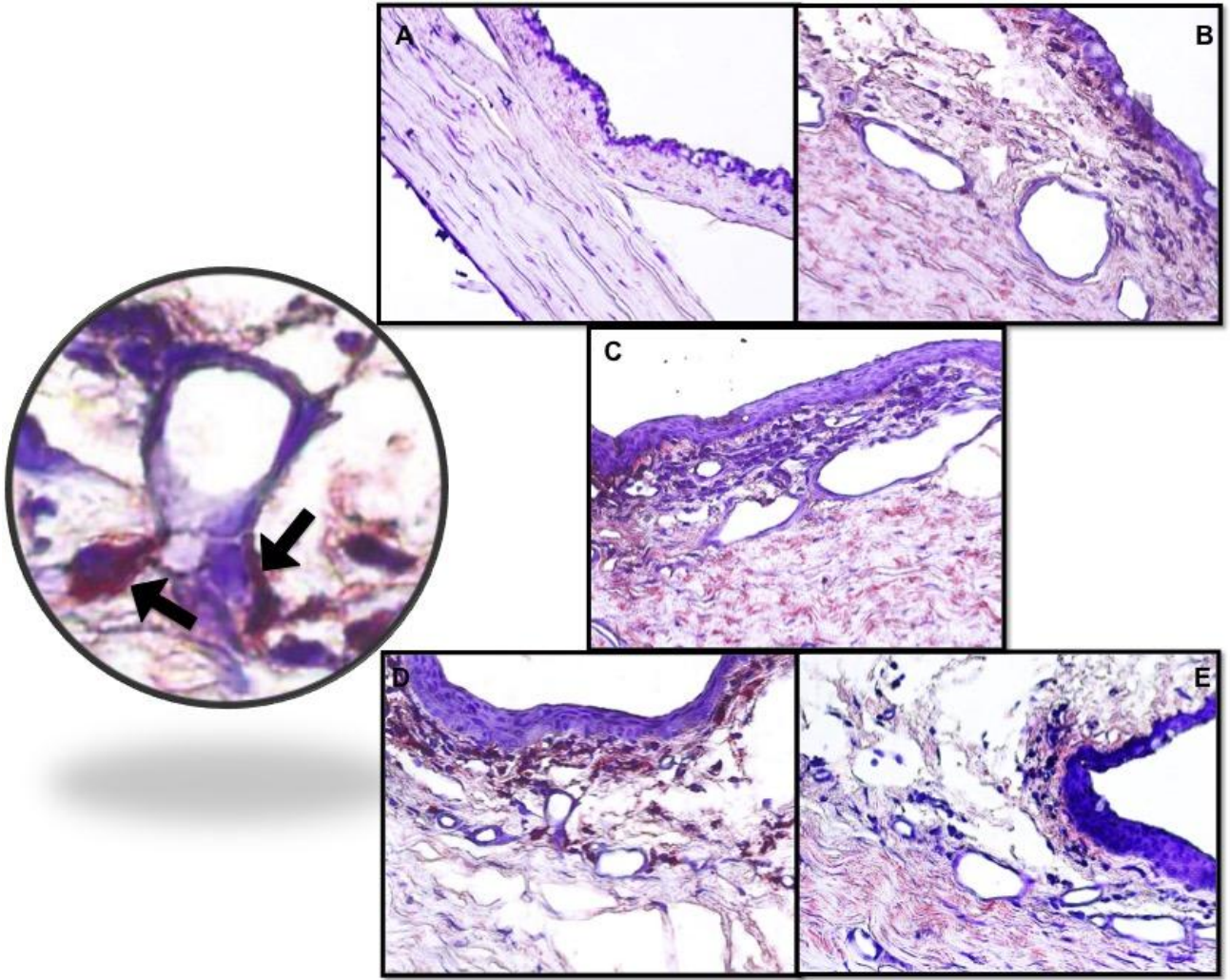
Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

Kaspaz-3 immün boyama yöntemi kullanılarak konjonktiva ilişkili lenfoid dokuda (CALT) apoptotik hücre sayısı incelendiğinde; BAK-latanoprost grubunda apoptotik hücrelerin diğer tüm çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0.001$) (Şekil 14).



Şekil 14: CALT'taki Kaspaz-3 immünreaktivitesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesini gösteren grafik.

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama



Resim 11: Deneysel gruplarından hazırlanan preparatlarda, CALT'teki kaspaz-3 immünreaktivitesini gösteren resim. X40 İmmün pozitif hücreler (↗ ile gösterilen)

Grup A : Kontrol grubu, İzotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **Grup B:** Prezervan içermeyen tafluprost %0.0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **Grup C:** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **Grup D:** %0,001 polikuad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **Grup E:** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama

4.3.3. CD45 ve Kaspaz-3 immün boyama sonuçlarının genel değerlendirmesi:

CD45 immün boyama ile inflamatuvar hücre analizi kornea epiteli ve CALT üzerinde yapıldı. Prezervan (BAK, Polikvad ve Purite) içeren antiglokomatöz ajanların tümü her iki dokuda inflamatuvar değişikliklere yol açarken prezervan içermeyen tafluprostun böyle bir etkisi gözlenmedi.

Kaspaz-3 immün boyama ile apoptotik hücre analizinde kornea epiteli üzerinde BAK-latanoprost ve Purite-brimonidin grubunun, CALT üzerinde ise BAK-latanoprost grubunun apoptotik etki gösterdiği tespit edildi.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Artmış GİB glokomun gelişiminde en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir ve GİB'nin düşürülmesi günümüzdeki en önemli tedavi yaklaşımıdır⁶³. Medikal ya da cerrahi yaklaşımla basıncın düşürülmesi, oküler hipertansif ve her evre glokomu olan hastalarda optik sinir hasarının ve görme alanı defektlerinin ortaya çıkmasını ve ilerlemesini azaltmaktadır⁶⁴⁻⁶⁷.

Glokom tedavisinde genellikle ilk yaklaşım GİB'ni düşüren topikal ilaçların (antiglokomatöz ajanlar) kullanımınıdır. Günümüzde glokomun tıbbi tedavisinde farklı gruplarda antiglokomatöz ilaçlar mevcut olmakla beraber prostaglandin (PG) analogları tedavi seçiminde genellikle ilk tercih edilen gruptur. PG analogları düşük sistemik ve kabul edilebilir lokal yan etkiye sahip oldukça güçlü, günde tek doz uygulama ile yeterli basınç düşüşü sağlayabilen ilaçlardır. Eğer PG tedavisine yeterli yanıt alınmaz ise diğer ajanların (beta blokerler, karbonik anhidraz inhibitörleri, alfa-2 agonistler) tedaviye eklenmesi düşünülebilir. Çoğu olguda tek ilaçla yapılan tıbbi tedavi GİB üzerinde etkin bir düşüş sağlamakla beraber hastaların yaklaşık %60'ında 2. yılın sonunda ikinci ilaç gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Bazen GİB'nin etkin kontrolü için üç hatta daha fazla molekül içeren antiglokomatöz tedaviye gereksinim olabilir. İlaç (şişe) sayısının fazlaşması kullanım güçlüğüne ve yan etki sıklığının artışına neden olan en önemli faktördür. Unutulmamalıdır ki bu hastalar belli bir yaşın üzerinde ve diğer sistemik problemleri nedeniyle farklı ilaçları almak zorunda olan kimselerdir. Tıbbi tedavinin hangi amaçlarla yapılırsa yapılsın başarılı olabilmesi için hasta uyumunun sağlanması, yan etkilerin minimize edilmesi ve tedavinin sürekliliğinin sağlanması gerekmektedir.

Deneysel klinik çalışmalar uzun süreli topikal damla kullanımının konjunktiva ve kornea dokusunda hasara yol açarak oküler rahatsızlığa neden olduğunu göstermektedir. Bu etkiler oküler yüzey değişikliklerini tetikleyerek gözyaşı film tabakasında düzensizliğe ve konjunktivada inflamasyona yol açabilir. Bu süreç sonrası gelişecek olan subkonjunktival fibrozis gelecekte yapılması muhtemel glokom cerrahilerinde bleb ömrünü kısaltarak cerrahi başarı oranını azaltmaktadır⁶⁸.

Geniş kapsamlı toplum araştırmalarında uzun süreli topikal antiglokomatöz ilaç kullanan hastalarda kuru göz belirtileri ve oküler yüzey hastalığı bulgularının glokomu olmayan popülasyona göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir⁶⁹⁻⁷¹. Oküler yüzey belirtileri hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkilemekte ve tedaviye uyumunu azaltmaktadır.

Glokom ilaçlarına bağlı oküler yüzey hastalığı belirti ve bulgularına etken maddenin kendisinin mi yoksa şişe içeriğinde yer alan prezervan maddenin mi yol açtığı konusu halen tartışmalıdır. Oküler yan etkilerin büyük bölümünün aktif bileşenden çok prezervan maddeye bağlı olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Jaenen ve ark. 9658 glokom hastasının dahil edildiği bir araştırmada, prezervan içeren preparatları kullanan hastalarda oküler yüzey hastalığı semptom ve bulgularının prezervan içermeyen ilaç kullanan hastalara göre daha sık olduğunu tespit etmiştir ⁷². Bir başka çalışmada prezervanlı ve prezervansız %0,5 timolol maleat kullanan hastalarda prezervan içeren preparatların gözyaşı film stabilitesinde bozulma ve gözyaşı kırılma zamanında azalmaya bağlı olarak oküler yüzey semptomlarına neden olduğu gösterilmiştir ⁷³.

Oftalmik preparatların çoklu doz içeren formlarında şişe içeriği açıldıktan sonra en fazla 1 hafta içinde çeşitli mikrobiyal etkenlerle ortamdan kontamine olma tehlikesi mevcuttur. Bu nedenle çoklu kullanım gerektiren topikal damla türü ilaçların içeriğinde prezervan maddeler yer alır. Oftalmik preparatlarda en sık kullanılan prezervan madde benzalkolyum klorid (BAK)'dir. BAK kuaterner amonyum türevi oldukça etkili bir antimikrobiyal ajandır. Günümüzde antiglokomatöz ajanlar da dahil olmak üzere mevcut göz damlalarının %70'inin şişe içeriğinde prezervan madde olarak BAK mevcuttur ⁷⁴. Topikal solüsyonlardaki en sık kullanılan konsantrasyonu 0,01% olmakla birlikte 0,004% ile 0,02% arasında farklı uygulamaları da olabilmektedir. Bu maddenin antimikrobiyal özelliği deterjan etkisinden kaynaklanır. Bu etki ile çeşitli mikrobik ajanların hücre duvarları yıkılarak bakterisid, virüs id ve fungus id etkiler gösterir. Aynı zamanda kornea epitelinin sıkı bağlantıları gevşeterek hümeör aköz içerisine daha iyi etken madde penetrasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Örneğin topikal siklosporin A, asiklovir ve farklı antibiyotik içeren ilaçların korneadan geçişlerinin BAK içeren taşıyıcılarla arttığı tespit edilmiştir ⁷⁵⁻⁷⁷.

BAK konjonktivada alerjik ve inflamatuvar yanıt uyandırır. Konjonktivada subepitelyal kollajen birikimini arttırdığı, kornea stromasında inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olduğu ve proapoptotik etki oluşturduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir ⁴⁷⁻⁵¹. BAK'in tek bir uygulama dozu sonrasında bile 1 hafta süre ile konjonktiva dokusunda bulunduğu gösterilmiştir ⁷⁸. BAK'in gözyaşındaki inflamatuvar faktörleri arttırdığı, kornea epitel ve endotel hücrelerine toksik etkilerinin olduğu ve hatta trabeküler ağ hücrelerinde apoptozu indüklediği in vivo ve in vitro çalışmalar ile doğrulanmıştır. Toksik etkilerin mekanizması tam olarak açıklanamamış olsa da proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, apoptoz, oksidatif

stres, gözyaşı tabakasının ve hücre membranlarının lipid bileşenleri ile etkileşim gibi mekanizmalara bağlı olabileceği düşünülmektedir ^{73,77,78}.

BAK'in toksik etkilerinden kurtulmak için alternatif prezervan maddeler geliştirilmiştir. Purite, Polikuad ve SofZia yan etkileri BAK'e oranla daha az olan prezervan maddelerdir. BAK dışı prezervan içeren antiglokomatöz damlaların GİB'ni düşürücü etkisi BAK'li damlalara göre daha az olmamakla birlikte BAK içeren preparatların antimikrobiyal güvenliğinin daha fazla olduğu bilinmektedir ⁸¹.

BAK alternatifi olan prezervanlardan Purite bir stabilize oksikloro komplekstir (SOC). Geniş bir antioksidan rezerve sahiptir ve ışığa maruz kaldığında doğal gözyaşı komponentlerine dönüşür ⁸². Antimikrobiyal aktivite spektrumunu çok geniştir ayrıca memeli hücrelerinde toksisitesi düşük seviyededir ⁵³. Purite içeren glokom ilaçlarının yarattığı kornea hasarı ve konjonktivadaki inflamatuvar hücre infiltrasyonu BAK içeren ajanlara göre daha düşük düzeyde bulunmuştur ^{44,83}. Purite içeren %0.15 brimonidin'in (Alphagan P®) GİB düşürücü etkisi BAK içeren %0.2 brimonidin'e (Alphagan®) eşdeğer olmakla beraber hasta uyumunun daha yüksek olduğu ve daha iyi tolere edildiği gösterilmiştir ^{84,85}.

Polyquaternium-1 (PQ, Polyquad®) kontakt lens solüsyonları ve suni gözyaşı preparatları bileşiminde bulunmaktadır. Koruyucu etki sağlamak için BAK'den (%0.005-%0.02) daha düşük konsantrasyonda (%0.001) kullanmak yeterlidir. Labbe ve ark. fare modelinde in vivo konfokal mikroskopi ve impresyon sitolojisi ile yüksek dozlarda PQ'ın oküler yüzeye BAK'tan daha az toksik etkili olduğunu göstermiştir ⁵⁶. Lopez ve ark. PQ içeren suni gözyaşı solüsyonunun BAK içerene göre daha az epitel hasarına neden olduğunu bildirmiştir ⁸⁶. İnsan konjonktival epitel hücreleri ile yapılan in vitro bir çalışmada PQ ve PQ içeren travoprostun; değişik konsantrasyonlarda BAK ile BAK içeren travoprost ve latanoprost göre daha az sitotoksik etkisi olduğu gözlenmiştir ⁸⁷.

PQ ve BAK içeren farklı PG analoglarının toksik etkilerinin karşılaştırıldığı tavşan modelinde, kontrol grubu ve PQ içeren solüsyonun uygulandığı gruplarda oküler yüzeyde toksisite bulguları izlenmemiştir. BAK içeren gruplarda ise diffüz konjonktival hiperemi ve kemozis, epitelyal hücrelerde hasar, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, goblet hücre sayısında azalma ve belirgin total oküler yüzey toksisite bulguları izlenmiştir ⁵⁵.

Tafluprost GİB üzerinde oldukça güçlü etki gösteren, daha az yan etki profiline sahip (iris renginde değişiklik yapıcı etkisi diğer PG analoglarına oranla daha düşük) yeni bir PG

analoğudur. Tafluprost ilk prezervan içermeyen PG türevidir. Prezervan içeren PG analoglarının kullanımı sonrası oküler yüzey hastalığı belirtileri gösteren hastalar için iyi bir seçenek olarak görülmektedir. Bu hastalarda tafluprosta geçiş ile impresyon sitoloji bulgularında düzelme, flöresein kırılma zamanında uzama ve oküler yüzey hastalığı semptomlarında (kaşıntı, sulanma, yanma, yabancı cisim hissi) azalma izlenmektedir ⁸⁸.

Damla formunda hazırlanan çeşitli etken maddeleri içeren preparatların şişe içeriğinde yer alan BAK'in, etken maddenin kornea penetrasyonunu kolaylaştırarak ön kamaraya geçişini arttırdığı bildirilmiştir ⁷⁵⁻⁷⁷. Ancak prezervan içermeyen tafluprost ile BAK içeren tafluprostun ön kamaraya geçişi arasında fark olmadığı da gösterilmiştir ⁸⁹.

Liang ve ark. prezervan içermeyen tafluprost, latanoprost-BAK ve %0.02 BAK solüsyonunun tavşan gözleri üzerindeki toksisitesini araştırmış, klinik muayene ve konfokal mikroskopik inceleme ile kontrol grubuna kıyasla en yüksek oküler yüzey toksisitesini latanoprost-BAK grubunda saptamıştır. Tafluprost grubu bulguları kontrol grubuna yakın bulunmuştur. İnflamatuvar reaksiyonun araştırıldığı immünoreaktif boyama yöntemiyle CD45+ ve TNFR1+ hücre sayısı latanoprost-BAK ve BAK grubunda kontrol ve tafluprost grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ⁹⁰.

Çalışmamızda çoklu kullanım gerektiren glokom ilaçları içeriğinde yer alan prezervan maddelerin oküler yüzeye olası toksisite bulgularının araştırılması yanısıra yeni kullanıma giren ve prezervan içermeyen PG türevi olan tafluprostun böyle bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla en sık kullanılan prezervan madde olan BAK içeren latanoprost (Xalatan®), oküler yüzeye daha düşük toksik etki gösterdiği kabul edilen purite içeren brimonidin (Alphagan-P®), polikvad içeren travoprost (Travatan®) ve prezervan içermeyen tafluprost (Saflutan®) tavşan gözlerine 28 gün süreyle tedavi dozunda uygulandı. Uygulama sonrası enükle edilen gözlerden histolojik inceleme için alınan örneklerle Hematoksilen & Eozin ve Periyodik Asit & Shiff + Hemalum boyaları uygulanarak kornea, konjonktiva ve goblet hücre sayısı değişiklikleri ışık mikroskopisi ile incelendi. Uygulanan terapötik ajanlara bağlı kornea dokusu ve CALT (konjonktiva ilişkili lenfoid doku) içerisinde olası inflamatuvar ve apoptotik değişiklikler immünohistokimyasal boyama yöntemiyle araştırıldı. Bu amaçla hazırlanan histolojik kesitlerde CD45 ve kaspaz-3 immünreaktanları kullanıldı. Elde edilen sonuçlar %0.9 izotonik solüsyon uygulanan kontrol grubu ile ve kendi aralarında karşılaştırıldı.

Çalışmamızda ışık mikroskopik incelemede BAK-latanoprost grubunda kornea epitelinde dökülme, incelme, yassı hücre katlarında azalma ve epitel üzerinde dikensi yapılar izlendi. Prezervan içermeyen tafluprost, purite-brimonidin ve polikvad-travoprost gruplarında ise kornea epitelinin ışık mikroskopik incelemesi genelde kontrol grubuna benzer bulundu. Ancak tafluprost uygulanan gözlerde ondülasyon gösteren bazı bölgelerde kornea epitelinde anlamlı incelme tespit edildi. Bu bulgu literatürde daha önceden tespit edilen diğer bulguların dışında çalışmamızda ilk olarak gözlenmiş olup açıklanması daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır. Purite-brimonidin grubunda epitel dökülmesi ve incelmesi kontrol grubuna kıyasla daha fazla, BAK-latanoprost grubundan daha düşük seviyedeydi.

Daha önceki çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da BAK'in kornea epiteli üzerindeki toksik etkisinin prezervan içermeyen, purite ve polikvad içeren ajanlara göre anlamlı olarak daha fazla olduğu sonucuna varıldı.

BAK-latanoprost grubunda kornea stromasında ödem, kontrol, purite-brimonidin ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarına göre anlamlı derecede artmış olarak izlendi. Ancak kornea endoteline ait herhangi bir değişikliğe rastlanmadı. Zhang ve ark. BAK'in kornea endotel hücreleri arasındaki ara bağlantılarda hasara neden olarak endotel bariyer fonksiyonunda azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada konfokal mikroskopik incelemede kornea endotel hücre morfolojisinde bozulma olduğu izlenmiştir⁹¹. Çalışmamızda gözlediğimiz ve literatür bulgularında rastlayamadığımız BAK-latanoprost grubunda kornea stromasında izlenen ödemin BAK'in endotel fonksiyonu üzerinde yaratmış olduğu toksik etkiye bağlı olabileceği düşünüldü. Bu konuda kornea endotel değişikliklerini elektron mikroskopisi veya konfokal mikroskopi ile değerlendirecek daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Goblet hücreleri gözyaşı filmindeki toksik bileşenlere en hassas hücre tiplerinden biridir⁹². Esas olarak yüzey ıslanabilirliğinden sorumlu olan müsini salgırlar. Müsin tabakası gözyaşı filminin aköz tabakasının oküler yüzeye tutunmasını sağlar. Goblet hücre kaybı müsün sekresyonunda azalmaya, gözyaşı film tabakasında düzensizliğe, konjonktiva ve kornea epitel hücrelerinin beslenmesinde yetersizliğe neden olur⁹³. Bu değişiklikler yabancı cisim hissine ve oküler yüzey hastalığına yol açabilir. Goblet hücre yoğunluğu oküler yüzey hastalığının ciddiyetini yansıtan bir parametredir⁹⁴.

Çalışmamızda 28 günlük uygulama sonrası BAK-latanoprost ve purite-brimonidin gruplarında goblet hücre yoğunluğunda anlamlı bir azalma tespit ettik. Kahook ve ark. BAK-latanoprost, Sofzia-travoprost ve prezervan içermeyen suni gözyaşı damlalarının tavşan gözlerine 30 gün boyunca günde bir kez damlatılması sonucu BAK-latanoprost grubunda gözlenen goblet hücre sayısındaki azalmayı diğer iki gruba göre anlamlı bulmuşlardır⁹⁵. Bir başka çalışmada tavşan gözlerine farklı konsantrasyonlarda BAK uygulanması sonrası yapılan histolojik incelemede kontrol grubuna göre goblet hücre yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. BAK konsantrasyonu arttıkça bu etkilerin daha belirginleştiği gözlenmiştir⁹⁶. Bu sonuçlar BAK'in toksik etkilerinin doza bağımlı olduğunu göstermektedir. BAK ihtiva eden antiglokomatöz ajanların glokom gibi kronik bir hastalıkta uzun süreli kullanılması durumunda konjonktivadaki goblet hücre sayısında azalmaya ve buna bağlı oküler yüzey semptomlarına neden olacağı aşikardır.

Çalışmamızda prezervan içermeyen tafluprost grubunda Periyodik Asit & Shiff + Hemalum ile boyanan preparatlarda goblet hücre sayısında anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. Literatür taramalarında rastlayamadığımız bu bulgu açıklanmaya gereksinim göstermektedir. Kahook ve ark. BAK-travoprost'un sadece BAK'e kıyasla insan konjonktiva epitel hücrelerinde daha az toksik etki oluşturduğunu ve travoprostun goblet hücreleri üzerine koruyucu etkisi olabileceğini ileri sürmüştür⁹⁵. Bir başka çalışmada prostaglandinlerin antioksidatif özelliklerinden bahsedilmektedir⁹⁷. Çalışmamızda prezervan içermeyen prostaglandin analogu olan tafluprostun diğer prostaglandinlerde gözlenen koruyucu etkiye benzer bir mekanizma ile goblet hücreleri üzerinde antioksidan ve sitoprotektif etki gösterebileceği düşünülmüştür.

Doku örneklerinde inflamasyon ve apoptoz bulgularının araştırılması için immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla çeşitli immünoreaktan maddeler uygulanarak bu reaktanlara yanıt veren immün pozitif hücreler ışık mikroskopisinde tespit edilmektedir. Bu sayede alınan doku örneği içerisinde çeşitli etkenlere karşı gelişen inflamasyon ya da hücre kaybı değerlendirilmesi yapılabilmektedir.

Çalışmamızda BAK-latanoprost, purite-brimonidin polikuad-travoprost ve prezervan içermeyen tafluprost uyguladığımız tavşan gözlerinden elde edilen histolojik kesitlere CD45 ve kaspaz-3 immünoreaktan maddeleri uygulayarak hazırladığımız preparatları ışık mikroskopisi ile değerlendirdik. Değerlendirme kornea dokusu ve CALT folliküleri üzerinde yapıldı. İnflamasyon mevcudiyetinin araştırılması için CD45, apoptoz tespiti için kaspaz-3

antikorları kullanıldı. Gruplarda tespit edilen immün pozitif hücre sayıları %0.9 izotonik solüsyon uygulanan kontrol grubu gözler ile karşılaştırıldı.

Çalışmamızda CD45 antikorunu kullanılarak yapılan immünohistokimyasal incelemelerde BAK-latanoprost, purite-brimonidin, polikuad-travoprost gruplarında her iki dokuda anlamlı sayıda pozitif boyanan inflamatuvar hücre varlığı tespit edildi. Prezervan içermeyen tafluprost grubunda görülen bulgular ile kontrol grubu arasında ise fark tespit edilmedi.

BAK içeren ve içermeyen antiglokomatöz prostaglandin analoglarının CALT üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, CALT'teki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun primer olarak BAK konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ⁹⁸.

PQ ve BAK içeren sabit kombinasyon preparatlarının karşılaştırıldığı tavşan çalışmasında, yeni geliştirilen travoprost/timolol PQ solüsyonunun travoprost/ timolol BAK ve latanoprost/timolol BAK solüsyonlarından belirgin olarak daha düşük oküler toksisite skoruna sahip olduğu bildirilmiştir. Kontrol grubu ve travoprost/timolol PQ uygulanan grupta CD45+ hücre sayımı ile CALT folliküllerinde belirgin inflamatuvar reaksiyon izlenmemiştir ⁵⁴.

Baudouin ve ark. BAK içeren antiglokomatöz ajanların sürekli kullanımının klinik olarak anlamlı inflamasyon bulgusu olmadığı halde konjonktivada inflamasyon belirteçlerinin artışına neden olduğunu göstermişlerdir ⁹⁹.

Sherwood ve ark.daha önce topikal ilaç kullanmaksızın glokom cerrahisi geçiren veya glokom cerrahisi öncesi en az 1 yıl süre ile topikal antiglokomatöz ilaç kullanan hastalarda konjonktiva ve Tenon kapsülü biyopsilerini değerlendirmiştir. Uzun süreli topikal ilaç kullanımı olan grupta makrofaj, lenfosit, mast hücresi ve fibroblast sayısında anlamlı derecede artış tespit edilmiştir ¹⁰.

Uzun süreli birden fazla topikal antiglokomatöz kullanan hastaların konjonktiva ve trabeküler ağ biyopsilerinde inflamatuvar hücre ve fibroblast infiltrasyonu olduğu görülmüştür. BAK içeren damlaların kronik kullanımının, konjonktiva ve trabekül dokusunda inflamatuvar değişikliklere neden olduğu, bu değişikliklerin gelecekte yapılması muhtemel glokom cerrahisi sonuçlarını etkileyeceği düşünülmektedir ⁵⁰.

Yukardaki çalışmalarda belirtildiği gibi, kornea epiteli ve özellikle konjonktivada yer alan CALT folliküler yapılarında BAK'in uzun süreli kullanımının inflamatuvar değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Bununla beraber bu konuda Purite, Polikuad gibi yeni

prezervanlar ve prezervan içermeyen tafluprost ile ilgili yeterli bilgi yoktur. Çalışmamızda sadece BAK'in değil diğer prezervan ajanların da BAK'e oranla daha düşük düzeyde olmakla beraber kontrol grubuna göre anlamlı inflamatuvar değişiklikler oluşturduğunu tespit ettik. Bu bulgular Purite ve Polikuad gibi yeni prezervan ajanların sanıldığı kadar masum olmayabilecekleri ve uzun süreli kullanımlarının BAK kadar olmasa bile oküler yüzey değişikliklerine yol açabileceğini düşündürmektedir. Prezervan içermeyen tafluprost grubunda ise bu tür inflamatuvar değişikliklere rastlanılmamıştır.

Glokomda oluşan hücre kaybının iki mekanizması mevcuttur. Bunlardan biri planlanmış hücre ölümü manasına gelen apoptoz diğeri nekrozdur. Ancak glokom seyri sürecinde görülen apoptoz doğal seyrine oranla daha hızlı gelişen patolojik bir mekanizmadır. Apoptoz sadece glokom gibi kronik bir hastalığın seyrinde değil bazı toksik maddelerin etkisiyle de ortaya çıkabilir. Uzun süreli antiglokomatöz tedavi uygulanması ve içerdiği prezervan maddelerin apoptotik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda kaspaz-3 antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal incelemelerde kornea epitelinde BAK-latanoprost, ve purite-brimonidin uygulanan gruplarda pozitif boyanan apoptotik hücreler kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artmış bulundu. Polikuad-travoprost ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarında ise epitelde apoptotik değişiklik gösteren anlamlı sayıda hücre tespit edilmedi. CALT folliküleri içerisinde ise sadece BAK-latanoprost grubunda apoptotik hücre sayısı anlamlı olarak artmış bulundu. Bu değişiklikler BAK'ın yanı sıra purite içeren damlaların da apoptotik değişikliklere zemin hazırlayabileceğini düşündürmektedir.

İnsan konjonktiva hücre kültürünün farklı konsantrasyonlarda BAK'e maruziyeti sonrası hücre sayısı, hücre canlılığı ve apoptotik aktivitenin (Apo 2.7 ile) incelendiği bir çalışmada, BAK'e bağlı oküler doku hasarının doz bağımlı olduğu görülmüştür. Bu bulgular düşük konsantrasyonda BAK içeren oftalmik preparatların tercih edilmesi gerektiğini düşündürmektedir¹⁰⁰.

Glokom hastalarında uzun süreli antiglokomatöz ilaç kullanılmasına ve prezervan maddelere bağlı oküler yan etkiler sadece kornea ve konjonktiva gibi yüzeysel dokularda değil trabekül endotel hücreleri gibi daha derin yapılarda da izlenebilmektedir. Literatürde prezervan maddelerin trabeküler ağ örgüsü üzerine etkilerini inceleyen az sayıda çalışma vardır. Oküler yüzeye tekrarlayan dozlarda uygulanan BAK trabeküler ağ gibi derin dokularda birikim gösterebilir. Hamard ve ark.'nın trabeküler hücre kültürü üzerine yaptıkları çalışmada BAK içeren preparatların apoptotik aktivitede artışa neden olduğu, antiglokomatöz

ajan olmaksızın sadece BAK uygulaması ile trabeküler hücrelerin %95'inin apoptoza uğradığı gösterilmiştir ¹⁰¹.

BAK'ün trabeküler ağ dokusunda birikerek kronik inflamasyon, inflamatuvar sitokin salınımı, immün hücre infiltrasyonu ve trabeküler ağ hücre apoptozisi ile trabeküler disfonksiyon ya da dejenerasyonuna neden olabileceği düşünülmektedir. Bu veriler doğrultusunda topikal antiglokomatöz tedavinin prezervan madde etkisi ile uzun dönem trabeküler dejenerasyona ve dışa akım direncine neden olabileceği sonucuna varılmıştır ⁹.

Chang ve ark.insan trabeküler ağ hücrelerine farklı konsantrasyon ve zamanlarda BAK ve prezervan içermeyen tafluprost uygulayarak apoptozis ve hücre canlılığını değerlendirmiştir. BAK'ün hücre canlılığında doz-zaman bağımlı bir azalmaya neden olduğu, ancak tafluprostun hücre canlılığı üzerine farklı konsantrasyon ve zamanlarda anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür. BAK ve BAK-tafluprostun etkisi karşılaştırıldığında hücre canlılığının tafluprost uygulanan grupta belirgin derecede artmış olduğu görülmüştür. Bu sonuç tafluprostun sitoprotektif etkisine bağlanmıştır ¹⁰².

Her ne kadar çalışmamızda elektron mikroskopisi uygulayamadığımız için trabeküler sistem üzerinde bir ayrıntılı değerlendirme yapma imkanımız olmasa da gruplardan elde edilen histolojik preparatların incelenmesinde, BAK-latanoprost ve purite-brimonidin gruplarında trabeküler demetlerde düzensizleşme, demet aralıklarında değişiklikler ve distal dış akım yollarında düzensizleşme ve yer yer genişlemeler gözlemlendi. Polikuad-travoprost ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarında ise kontrol grubu ile kıyaslanacak olursa trabeküler dış akım yollarında anlamlı değişikliklere rastlanmadı. Bu bulgular genel bir sonuç çıkarmamıza yetecek seviyede olmamakla birlikte BAK ve purite tipi ajanların trabeküler dış akım yolları üzerinde de uzun süreli kullanımda oküler yüzey değişiklikleri yanısıra ilave toksik etkilere yol açabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda BAK-latanoprost, purite-brimonidin ve polikuad-travoprost ile prezervan içermeyen tafluprostun tavşan gözlerinde kornea dokusu, konjonktiva goblet hücreleri, trabeküler dış akım yolları ve CALT follikülleri üzerine olası sitotoksik, inflamatuvar ve apoptotik etkileri araştırıldı. Prezervan maddelerden BAK, purite ve polikuadın histolojik kesitlerde ve immünohistokimyasal incelemelerde oküler yüzey hastalığı belirtilerine neden olabileceği sonucuna varıldı. Bu gruplar içerisinde en ciddi toksik etkiler öncelikle BAK-latanoprost grubunda gözlemlendi. Polikuad-travoprost grubu purite-brimonidin

grubuna oranla daha az toksisite bulgusuna sahipti. Prezervan içermeyen tafluprost grubunda kontrol grubu ile benzer nitelikte bulgulara rastlandı. Bu grupta konjonktiva goblet hücrelerinde sayıca artış tespit edildi, bu bulgu tafluprostun sitoprotektif etkili olabileceğini düşündürdü. Elde etmiş olduğumuz bulgular ışığında uzun süreli tedavi gerektiren glokom hastalarında prezervan maddelerin neden olabileceği yan etkiler dikkate alınarak mümkünse prezervan içermeyen preparatların tercih edilmesi gerektiği söylenebilir.



6. ÖZET

AMAÇ: BAK içeren latanoprost, poliquad içeren travoprost, purite içeren brimonidin ve prezervan içermeyen tafluprostun tavşan gözlerinde oküler yüzey ve trabeküler dış akım yolu üzerindeki sitotoksik etkilerinin histolojik olarak incelenmesi.

GEREÇ VE YÖNTEM: 25 adet erkek yetişkin New Zealand beyaz tavşan 5 gruba ayrıldı. Gruplara izotonik %0.9 solüsyon (Serum fizyolojik), prezervan içermeyen tafluprost %0.0015, %0,15 purite içeren brimonidin %0,1, %0,001 poliquad içeren travoprost %0,004 ve %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 tedavi dozunda 28 gün süre ile uygulandı. Hematoksilen eozin (H&E) boyası ile kornea dokusu ve trabeküler dış akım yolları; Periyodik Asit & Shiff + Hemalum boyası ile konjonktiva goblet hücreleri ışık mikroskopisi ile incelendi. CD45 ve kaspaz-3 antikoru ile kornea epitel ve CALT dokusundaki inflamasyon ve apoptoz bulguları immünohistokimyasal olarak araştırıldı. İstatistiksel analizde One Way ANOVA testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak belirtildi. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

SONUÇ: BAK-latanoprost grubunda kornea epitel değişiklikleri ve stroma ödemi daha belirgin gözlemlendi. Bu grupta goblet hücre sayısı kontrol, poliquad-travoprost ve prezervan içermeyen tafluprost grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulundu. BAK-latanoprost grubu ve purite-brimonidin grubunda trabeküler dış akım yolları üzerinde değişiklikler gözlemlendi, diğer gruplardaki bulgular kontrol grubundan farklı bulunmadı. Prezervan içermeyen tafluprost grubunda goblet hücre sayısında beklenmedik artış olduğu görüldü. Prezervan madde içeren BAK-latanoprost, Purite-brimonidin ve Poliquad-travoprost gruplarında hem kornea epitel hem de CALT'ta CD45 inflamatuvar hücre sayısının diğer gruplara artmış olduğu görüldü. BAK-latanoprost grubunda hem kornea epitel hem de CALT'ta kaspaz-3+ apoptotik hücre sayısı artmıştı. Purite-brimonidin grubunda ise kornea epitelinde apoptotik aktivite artışı izlendi.

YORUM: Elde etmiş olduğumuz bulgular ışığında uzun süreli tedavi gerektiren glaukom hastalarında prezervan maddelerin neden olabileceği oküler yan etkiler dikkate alınarak mümkünse prezervan içermeyen preparatların tercih edilmesi gerektiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Prezervan, BAK, Purite, Poliquad, tafluprost, oküler yüzey, kornea epitel, CALT, CD45, Kaspaz-3, goblet.

7. ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate ocular surface and trabecular outflow pathway changes after using latanoprost preserved with BAK, travoprost preserved with Poliquad, brimonidine preserved with Purite and preservative-free tafluprost.

MATERIAL AND METHOD: 25 male, adult New Zealand albino rabbits were randomized into groups of 5 to receive daily instillation of %0.9 isotonic solution, preservative-free tafluprost %0.0015, brimonidin %0,1 preserved with %0,15 Purite, travoprost %0,004 preserved with %0,001 Poliquad and latanoprost %0,005 preserved with %0,02 BAK over a 28-day period. Eucleation was performed at the end of the study followed by histologic analysis using hematoxylin eosin staining to evaluate corneal and trabecular outflow pathway changes; periodic acid schiff staining to identify goblet cells by light microscopy. Inflammatory and apoptotic changes in corneal epithelium and CALT were analysed using light microscopy, immunohistology in cryosections for detecting CD45+ and caspase-3+ cells. Results were expressed as means±standart error. The groups for analysis were compared using One Way ANOVA. The significance value is accepted $p < 0.05$.

RESULT: Corneal epithelial changes and corneal stromal edema were higher in latanoprost-BAK group. The number of goblet cells in the BAK-latanoprost group was significantly lower than control, preservative-free tafluprost and Poliquad-travoprost group. The changes of trabecular outflow pathway were significant in BAK-latanoprost and Purite-brimonidine groups. Interestingly goblet cells significantly increased in preservative-free tafluprost group. The number of CD45+ inflammatory cells in both corneal epithelium and CALT were significantly higher in BAK-latanoprost, Purite-brimonidine and Poliquad-travoprost group than other groups. In BAK-latanoprost group caspase-3 + apoptotic activity was significantly higher both in corneal epithelium and CALT than the control group. Also Purite-brimonidine induced apoptotic activity in corneal epithelium.

CONCLUSION: These results show that long-term medication with preservative containing antiglaucoma eye drops can cause ocular surface side effets. On the basis of all these results it would be advisable to use preservative-free solutions whenever possible, especially in patients with the greatest exposure to high doses or prolonged treatments, in those suffering from preexisting or concomitant ocular surface diseases.

Key Words: Preservative, BAK, Purite, Poliquad, tafluprost, ocular surface, corneal epithelium, CALT, CD45, caspase-3, goblet.

8. KAYNAKLAR

1. Broadway DC, Grierson I, O'Brein C, Hitching RA. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. I. The conjunctival cell profile. *Arch Ophthalmol* 1994; 112:1437-1445.
2. Yalvaç IS, Gedikoğlu G, Akgün U, Nurözler A, Koç F, Kasım R, Duman S: Effects of antiglaucoma drugs on ocular surface. *Acta Ophthalmol Scand* 1995; 73:246-248.
3. Van Beek L, Mulder M, Haeringen NJ, Kijlstra A. Topical ophthalmic β blockers may cause release of histamine through cytotoxic effects on inflammatory cells. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:1004-1007.
4. Baudouin C. Side effects of antiglaucomatous drugs on the ocular surface. *Curr Opin Ophthalmol* 1996; 7:80-86.
5. Arıcı MK, Arıcı DS, Topalkara A, Güler C. Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Experiment Ophthalmol* 2000; 28:113-117.
6. Nuzzi R, Fizazzo C, Cerruti A. Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva and the lacrimal response. *Int Ophthalmol* 1998; 22:31-35.
7. Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldhild M, Becquet F. Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucomatous drugs. Human and animal studies. *Ophthalmology* 1999; 106:556-563.
8. Van Beek LM, Keizer RJW, Polak BC, Elzenaar PR, Haeringer NJ, Kijlstar A. Incidence of ocular side effects of topical β blockers in the Netherlands. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:856-859.
9. Baudouin C, Denoyer A, Desbenoit N, Hamm G, Grise A. In Vitro And In Vivo Experimental Studies On Trabecular Meshwork Degeneration Induced By Benzalkonium Chloride (An American Ophthalmological Society Thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2012 Dec; 110:40-63.
10. Sherwood MB, Grierson I, Millar L, Hitchings RA. Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology.* 1989;96:327-335.
11. DPhil RJ, Chidlow G, Wood JP, Crowston JG, Goldberg I. Review Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2012; 40: 341-349

12. Morgan JE. Genetics of Glaucoma. Textbook of Ophthalmology (eds) Easty DL and Sparrow JM, Vol. I, Oxford Med. Pub, 1998, pp.702-708.56
13. Shields MB. Textbook of Glaucoma 3 th ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1992, pp.84-125
14. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. Br J Ophthalmol 2006; 90:262-267
15. Resnikoff S, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. Bull World Health Organization 2004; 82:844-851
16. Shaarawy MK, Sherwood MB, Hitchings RA, Crowston JG, Glaucoma Volume 1: Medical Diagnosis and Therapy, Elsevier 2009.
17. Kanski JJ: Glokomlar: Klinik oftalmoloji, Dördüncü baskı. Çeviri Ed: Oraglı K:M: Great Britain Butterworth- Heinemann LTD. 1999, S: 183-209.
18. Stamper RL, Lieberman MF, Drake MV, Becker-Shaffer's Diagnosis and Therapy of the Glaucomas, 8th Edition.Saunders Elsevier 2009.
19. Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Crowston JG, Goldberg I, Definition of Glaucoma: Clinical and Experimental Concepts. Clin Experiment Ophthalmol. 2012 May-Jun; 40(4):341-9
20. Netland PA,Glaucoma medical therapy principles and management 2th edition, Oxford Uni.Press 2008.
21. Toris CB, Gabelt BT, Kaufman PL. Update on the mechanism of action of topical prostaglandins for intraocular pressure reduction. Surv Ophthalmol. 2008;53(Suppl1):S107–S120.
22. Alm A, Review Latanoprost in the treatment of glaucoma, Clin Ophthalmol. 2014; 8: 1967–1985.
23. Johnstone MA, Albert DM. Prostaglandin-induced hair growth. Surv Ophthalmol. 2002;(Suppl 1):S185–S202.
24. Sjöquist B, Stjernschantz J. Ocular and systemic pharmacokinetics of latanoprost in humans. Surv Ophthalmol. 2002;47(Suppl 1):S6–S12.
25. Camras CB, Alm A. Initial clinical studies with prostaglandins and their analogues. Surv Ophthalmol. 1997;41(Suppl 2):S61–S68.
26. Woodward DF, Kraus AH-P, Chen J. The pharmacology of bimatoprost. Surv Ophthalmol. 2001; 45 (suppl 4): 337-45.
27. Curran MP. Bimatoprost: a review of its use in open-angle glaucoma and ocular hypertension. Drugs Aging. 2009;26(12):1049-71.

28. Cheng JW, Xi GL, Wei RL, Cai JP, Li Y. Effects of travoprost in the treatment of open-angle glaucoma or ocular hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2009 Aug;70(4):335-50.
29. Fung DS, Whitson JT. An evidence-based review of unoprostone isopropyl ophthalmic solution 0.15% for glaucoma: place in therapy. *Clin Ophthalmol*. 2014 Mar 10;8:543-54.
30. Hamacher T, Airaksinen J, Saarela V, Liinamaa MJ, Richter V & Ropo A. Efficacy and safety levels of preserved and preservative-free tafluprost are equivalent in patients with glaucoma or ocular hypertension; results from a pharmacodynamics analysis. *Acta Ophthalmol Suppl (Oxf)*. 2008;242:14-9.
31. Sutton A, Gilvarry A, Ropo A. A comparative placebo-controlled study of prostanoid fluoroprostaglandin receptor agonist tafluprost and latanoprost in healthy males. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2007 Aug;23(4):359-65.
32. Sutton A, Gouws P, Ropo A. Tafluprost a new potent prostanoid receptor agonist: a dose-response study on pharmacodynamics and tolerability in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2008 Aug;46(8):400-6.
33. Uusitalo H, Kaarniranta K, Ropo A. Pharmacokinetics, efficacy and safety of preserved and preservative-free tafluprost in healthy volunteers. *Acta Ophthalmol Suppl (Oxf)*. 2008;242:7-13.
34. Takagi Y, Nakajima T, Shimazaki A, et al. Pharmacological characteristics of AFP-168 (tafluprost), a new prostanoid FP receptor agonist, as an ocular hypotensive drug. *Exp Eye Res*. 2004;78(4):767-76.
35. Uusitalo H, Chen E, Pfeiffer N, Brignole-Baudouin F, Kaarniranta K, Leino M, Puska P, Palmgren E, Hamacher T, Hofmann G, Petzold G, Richter U, Riedel T, Winter M, Ropo A. Switching from a preserved to a preservative-free prostaglandin preparation in topical glaucoma medication. *Acta Ophthalmol*. 2010 May;88(3):329-36.
36. Wheeler LA, Gil DW, WoldeMussie E. Role of alpha-2 adrenergic receptors in neuroprotection and glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 2001 May;45 Suppl 3:S290-4; discussion S295-6.
37. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Nov;42(12):2849-55.

38. Ruiz Lapuente C, Ruiz Lapuente A, Link B. Influence of topical brimonidine on visual field in glaucoma. *Eur J Ophthalmol*. 2001 Jul-Sep;11 Suppl 2:S67-71.
39. Tsai JC, Chang HW. Comparison of the effects of brimonidine 0.2% and timolol 0.5% on retinal nerve fiber layer thickness in ocular hypertensive patients: a prospective, unmasked study. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2005 Dec;21(6):475-82.
40. Bill A. Effects of atropine and pilocarpine on aqueous humour dynamics in cynomolgus monkeys (*Macaca irus*). *Exp Eye Res*. 1967 Apr;6(2):120-5.
41. Derich RC. Cholinergic agents. In: Morrison JC, Pollac IP (eds). *Glaucoma science and practice*. Thieme, New York 2003: 383-390.
42. Iester M. Brinzolamide ophthalmic suspension: a review of its pharmacology and use in the treatment of open angle glaucoma and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol*. 2008 Sep;2(3):517-23.
43. Lippa EA, Carlson L-E, Ehinger B, et al. Dose response and duration of action of dorzolamide, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Arch Ophthalmol* 1992;110:495-9.
44. Noecker R, Herrygers L, Anwaruddin R, Corneal and Conjunctival Changes Caused by Commonly Used Glaucoma Medications, *Cornea* 2004; 23:490–496
45. Kahook MY, Noecker RJ, Comparison of Corneal and Conjunctival Changes After Dosing of Travoprost Preserved With sofZia, Latanoprost With 0.02% Benzalkonium Chloride, and Preservative-free Artificial Tears, *Cornea* 2008; 27:339–343
46. Pisella PJ, Pouliquen P , Baudouin C. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br J Ophthalmol* 2002;86:418–423
47. Schwab IR, Lindberg JV, Gioia VM, Benson WH & Chao GM. Foreshortening of the inferior fornix associated with chronic glaucoma medications. *Ophthalmology* 1992; 99:197–202.
48. Broadway DC, Grierson I, Hitchings RA . Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva. *Br J Ophthalmol*. 1993 Sep;77(9):590-6.
49. Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitchings RA. Adverse effects of topical antiglaucomatous medications II: the outcome of filtration surgery. *Arch Ophthalmol*. 1994 Nov;112(11):1446-54.
50. Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, Bechetoille A. Ocular surface inflammatory changes induced by topical

- antiglaucomatous drugs: human and animal studies. *Ophthalmology*.1999 Mar;106(3):556-63.
51. Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, Creuzot- Garcher C, Rat P, Brignole F, Baudouin C. Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved Timolol: an ex vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 May;45(5):1360-8.
52. Lauren M Rosin, Nicholas P Bell. Preservative toxicity in glaucoma medication: clinical evaluation of benzalkonium chloride-free 0.5% timolol eye drops. *Clin Ophthalmol*. 2013; 7: 2131–2135.
53. Grant R. Ajello M, Vlass E. Salt water or high tech? A look at two new rinsing solutions for contact lenses. *Optician*. 1996;212:38–41.
54. Liang H, Baudouin FB, Pauly, Riancho L, Baudouin C. Polyquad-Preserved Travoprost/Timolol, Benzalkonium Chloride (BAK)-Preserved Travoprost/Timolol, and Latanoprost/Timolol in Fixed Combinations: a Rabbit Ocular Surface Study, *Adv Ther*, 2011; 28(4):311-325.
55. Liang H, Baudouin FB, Riancho L, Baudouin C, Reduced in vivo Ocular Surface Toxicity with Polyquad-Preserved Travoprost versus Benzalkonium-Preserved Travoprost or Latanoprost Ophthalmic Solutions, *Ophthalmic Res* 2012 ;48:89–101
56. Labbe A, Pauly A, Liang H, et al. Comparison of toxicological profiles of benzalkonium chloride and polyquaternium-1: an experimental study. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2006;22:267-278.
57. Lipener C. A randomized clinical comparison of OPTI-FREE EXPRESS and ReNu MultiPLUS multipurpose lens care solutions. *Adv Ther*. 2009;26:435-446.
58. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, *Cornea fundamentals, diagnosis and management volume one 3rd edition*, Mosby Elsevier 2011, pp: 25-31
59. Sansoy N, Aydın P, Akova Y. *Temel Göz Hastalıkları*, Güneş Kitapevi, Ankara. 2001; pp: 125-126.
60. Broadway D, Grierson I, Hitchings R. Adverse effect of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva. *Br J Ophthalmol* 1993; 77:590-596.
61. Ritch R, Shields MB, Krupin T. *The Glaucomas, Second Edition Volume one*. Mosby 1996, pp 89-100.
62. Lee VH, Robinson JR. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. *J Ocul Pharmacol* 1986; 2: 67–108

63. Lichter PR. Expectations from clinical trials. Results of the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1371–1372.
64. Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120:701–713.
65. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, et al, for the Early Manifest Glaucoma Trial Group. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1268 –1279.
66. Collaborative Normal Tension Glaucoma Study Group. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. *Am J Ophthalmol* 1998;126:487–497.
67. The AGIS Investigators. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS), VII: the relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am J Ophthalmol* 2000;130:429–440.
68. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010 Jul;29(4):312-34.
69. Schmier JK, Covert DW. Characteristics of respondents with glaucoma and dry eye in a national panel survey. *Clin Ophthalmol.* 2009;3:645-50.
70. Ghosh S, O'Hare F, Lamoureux E, Vajpayee RB, Crowston JG. Prevalence of signs and symptoms of ocular surface disease in individuals treated and not treated with glaucoma medication. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2012;40(7):675-81.
71. Baffa Ldo P, Ricardo JR, Dias AC, Módulo CM, Braz AM, Paula JS, et al. Tear film and ocular surface alterations in chronic users of antiglaucoma medications. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71(1):18-21
72. Jaenen, N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni,G, Figueiredo,A, Zeyen,T. Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *Eur.J.Ophthalmol.* 2007 May-Jun;17(3):341-9.
73. Manni G, Centofanti M, Oddone F, Parravano M, Bucci MG. Interleukin-1 Tear Concentration in Glaucomatous and Ocular Hypertensive Patients Treated With Preservative-Free Nonselective Beta-Blockers. *Am J Ophthalmol.* 2005 Jan;139(1):72-7.

74. Kaur IP, Lal S, Rana C, Kakkar S, Singh H. Ocular preservatives: associated risks and newer options. *Cutan Ocul Toxicol* 2009; 28:93-103.
75. Yenice I, Mocan MC, Palaska E, Bochot A, Bilensoy E, Vural I, Irkeç M, Hincal AA. Hyaluronic acid coated poly-epsilon-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Exp Eye Res.* 2008 Sep;87(3):162-7.
76. Majumdar S, Hippalgaonkar K, Repka MA. Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea. *Int J Pharm.* 2008 Feb 4;348(1-2):175-8.
77. Rathore MS, Majumdar DK. Effect of formulation factors on in vitro transcorneal permeation of gatifloxacin from aqueous drops. *AAPS PharmSciTech.* 2006 Jul 7;7(3):57.
78. Wilson FM. Adverse external ocular effects of topical ophthalmic medications. *Surv Ophthalmol* 1979;24:57– 88.
79. Ayaki M, Iwasawa A, Inoue Y. Toxicity of antiglaucoma drugs with and without benzalkonium chloride to cultured human corneal endothelial cells. *Clin Ophthalmol* 2010; 4: 1217-1222.
80. Hamerd P, Blondin C, Debbasch C, Warnet JM, Baudouin C, Brignole F. In vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241:1037-1043.
81. Wang YQ, Wang X, Liu P. Meta analysis about the efficacy and safety of anti-ocular hypertension eye drops without benzalkonium chloride. *Asian Pac J Trop Med.* 2013 Dec;6(12):1004-8.
82. Kim CY, Hong S, Seong GJ. Brimonidine 0.2% versus brimonidine Purite 0.15% in Asian ocular hypertension. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2007 Oct;23(5):481-6.
83. Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther* 2001;18:205–215.
84. Mundorf T, Wilcox KA, Ousler GW 3rd, Welch D, Abelson MB. Evaluation of the comfort of Alphagan P compared with Alphagan in irritated eyes. *Adv Ther.* 2003 Nov-Dec;20(6):329-36.
85. Katz LJ. Twelve-month evaluation of brimonidine-purite versus brimonidine in patients with glaucoma or ocular hypertension. *J Glaucoma.* 2002 Apr;11(2):119-26.
86. Lopez Bernal D, Ubels JL. Quantitative evaluation of the corneal epithelial barrier: effect of artificial tears and preservatives. *Curr Eye Res* 1991;10:645–656.

87. Brignole-Baudouin F, Riancho L, Liang H, Baudouin C. Comparative in vitro toxicology study of travoprost Polyquad-preserved, travoprost BAK-preserved, and latanoprost BAK-preserved ophthalmic solutions on human conjunctival epithelial cells. *Cur Eye Res* 2011;36:979–988.
88. Hommer A. A review of preserved and preservative-free prostaglandin analogues for the treatment of open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Today (Barc)*. 2010 Jun;46(6):409-16.
89. Pellinen P, Lokkila J. Corneal penetration into rabbit aqueous humor is comparable between preserved and preservative-free tafluprost. *Ophthalmic Res*. 2009;41(2):118-22.
90. Liang H, Baudouin C, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short- and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0.02% benzalkonium chloride. *Br J Ophthalmol*. 2008 Sep;92(9):1275-82
91. Zhang Z, Huang Y, Xie H, Pan J, Liu F, Li X, Chen W, Hu J, Liu Z. Benzalkonium chloride suppresses rabbit corneal endothelium intercellular gap junction communication. *PLoS One*. 2014 Oct 9;9(10):e109708.
92. Perez-Vilar J, Mabolro R. Gel-forming mucins. Notions from in vitro studies. *Histol Histopathol*. 2007;22:455–464.
93. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2004;78:379–388.
94. Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA. Goblet cell density in ocular surface disease. A better indicator than tear mucin. *Arch Ophthalmol*. 1983;101:1284–7.
95. Kahook MY, Noecker R. Quantitative Analysis of Conjunctival Goblet Cells After Chronic Application of Topical Drops. *Adv Ther*. 2008;25(8):743–751.
96. Kim RJ, Oh TH, Kim HS. Effects of benzalkonium chloride on the ocular surface of the rabbit. *Jpn J Ophthalmol* (2011) 55:283–293
97. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F: In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 4594–4599

98. Liang H, Baudouin C, Labbe A, Riancho L, Brignole-Baudouin F. Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue (CALT) Reactions to Antiglaucoma Prostaglandins with or without BAK-Preservative in Rabbit Acute Toxicity Study. *PLoS One* 2012;7(3):e33913.
99. Baudouin C, Garcher C, Haouat N, et al. Expression of inflammatory membrane markers by conjunctival cells in chronically treated patients with glaucoma. *Ophthalmology* 1994;101:454–460.
100. De Saint Jean M, Brignole P, Bringuier AF, et al. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Change conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:619–630.
101. Hamard P, Blondin C, Debbasch C, Warnet JM, Baudouin C, Brignole F. In vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241(12):1037-1043.
102. Chang C, Zhang AQ, Kagan DB, Liu H, Hutnik CM. Mechanisms of benzalkonium chloride toxicity in a human trabecular meshwork cell line and the protective role of preservative-free tafluprost. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2015 Mar;43(2):164-72.