

Polikvad'lı Travoprost, Benzalkonyum Klorid'li Latanoprost, Purite'li Brimonidin ve Prezervansız Tafluprost'un Oküler Yüzey Üzerine Etkileri: Tavşan Oküler Yüzey Çalışması

The Effects of Polyquad-Preserved Travoprost, Benzalkonium Chloride-Preserved Latanoprost, Purite-Preserved Brimonidine and Preservative-Free Tafluprost on Ocular Surface: A Rabbit Ocular Surface Study

Burcu GÖRGÜLÜ ŞAHİN,^a
Özcan OCAKOĞLU,^b
İsmail SEÇKİN,^c
Sibel DEMİRCİ DELİPİNAR,^c
Tuğba EKİZ YILMAZ,^c
Belisa KALECİ^c

^aGöz Hastalıkları Kliniği,
Van Bölge Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, Van
^bGöz Hastalıkları AD,
^cHistoloji ve Embriyoloji AD,
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 24.05.2016
Kabul Tarihi/Accepted: 27.03.2017

Yazışma Adresi/Correspondence:
Burcu GÖRGÜLÜ ŞAHİN
Van Bölge Eğitim ve
Araştırma Hastanesi,
Göz Hastalıkları Kliniği, Van,
TÜRKİYE/TURKEY
burcu.gorgulu@hotmail.com

Bu çalışma, Türk Oftalmoloji Derneği
49. Ulusal Kongresi (4-8 Kasım 2015,
İstanbul)'nde sözel olarak sunulmuştur.

ÖZET Amaç: Farklı prezervan maddeler içeren antiglokomatöz damlalar ile prezervansız damlanın tavşan oküler yüzeyi üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesidir. **Gereç ve Yöntemler:** Yirmi beş adet erkek erişkin Yeni Zelanda beyaz tavşan 5 gruba ayrıldı. Gruplara izotonik %0,9 solüsyon (serum fizyolojik), prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 (Safutan®), %0,15 Purite içeren brimonidin %0,1 (Alphagan P®), %0,001 Polikvad içeren travoprost %0,004 (Travatan®) ve %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 (Xalatan®) tedavi dozunda 28 gün süreyle uygulandı. Enükleasyon yapıldıktan sonra kornea dokusu ve konjonktiva goblet hücreleri ışık mikroskopisiyle incelendi. Kornea epiteli ve konjonktiva ilişkili lenfoid dokuda (CALT) inflamasyon ve apoptoz bulguları immünohistokimyasal olarak araştırıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak belirtildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için One-way ANOVA testi kullanıldı. p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz GraphPad programı kullanılarak yapıldı. **Bulgular:** Işık mikroskopisinde, BAK-latanoprost grubunda kornea epitel değişiklikleri ve stroma ödemi daha belirgindi. BAK-latanoprost grubundaki goblet hücre sayısı kontrol, Polikvad-travoprost ve prezervan içermeyen tafluprost grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulundu (p<0,05). Prezervan içermeyen tafluprost grubunda goblet hücre sayısının diğer gruplara göre yüksek olduğu görüldü (p<0,05). İmmünohistokimyasal incelemede, kornea epiteli ve CALT'da inflamatuvar hücre sayısı, prezervan içeren tüm gruplarda anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05). BAK-latanoprost ve Purite-brimonidin gruplarında apoptotik hücre sayısında artış izlendi (p<0,05). **Sonuç:** Bu bulgular, prezervan maddelerin kornea epitelinde toksisiteye, konjonktivada goblet hücre sayısında azalmaya, kornea ve CALT'da inflamatuvar reaksiyon artışına ve apoptotik değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Benzalkonyum bileşikler; glom; goblet hücreleri; polikvaternium 1; tafluprost

ABSTRACT Objective: Evaluation of cytotoxic effects of antiglaucomatous agents with different preservatives, and preservative-free agent on rabbit ocular surface. **Material and Methods:** Twenty-five adult male New Zealand albino rabbits were randomized into groups of 5. These groups received daily instillation of %0,9 isotonic solution (saline solution), preservative-free tafluprost %0,0015 (Safutan®), brimonidin %0,1 preserved with %0,15 Purite (Alphagan P®), travoprost %0,004 preserved with %0,001 Poliquad (Travatan®), and latanoprost %0,005 preserved with %0,02 BAC (Xalatan®) respectively, over a 28-day period. After enucleation, corneal epithelium and conjunctival goblet cells were examined by light microscopy. Inflammatory and apoptotic changes in corneal epithelium and conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) were analysed immunohistochemically. The results were reported as ± standard deviation from the mean. Group results were compared through One-way ANOVA. Significance level was p<0.05. Statistical analyses were carried out using GraphPad software. **Results:** Corneal epithelial changes and corneal stromal edema were detected to be more prominent in latanoprost-BAC group under light microscopy. The number of goblet cells in the BAC-latanoprost group was significantly lower than that in the control, preservative-free tafluprost and Poliquad-travoprost groups (p<0.05). The number of goblet cells were found to be significantly higher in preservative-free tafluprost group compared to other groups (p<0.05). Immunohistochemical examination revealed that the number of inflammatory cells in both corneal epithelium and CALT were significantly higher in all preservative containing groups (p<0.05). In BAC-latanoprost and Purite-brimonidine groups, a significant increase in apoptotic cell count was observed (p<0.05). **Conclusions:** The findings indicate that the preservatives can cause corneal epithelium toxicity, a decrease in the number of goblet cells in conjunctiva and an increase in inflammatory reactions and apoptotic changes in the cornea and CALT.

Keywords: Benzalkonium compounds; glaucoma; goblet cells; polyquaternium 1; tafluprost

Glokom, önlenabilir görme kaybı nedenleri arasında ilk sıralardaki yerini korumaktadır. Günümüzde glaukom tedavisinde 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.

Prezervan maddeler oftalmik preparatların önemli bir komponentidir. Mikrobiyal üremeyi durdurmakta ve aktif ilacın bozulmasını engellemektedir. Çoklu doz içeren şişeler açıldıktan sonra günde 2 kere kullanım ile 1-2 hafta içerisinde kontamine olabildiği için oftalmik preparatın sterilitesinin korunması için prezervan maddeler gerekmektedir.¹

Uzun süreli topikal antiglokomatöz ilaç kullanımı sonrası, oküler yüzeyde toksik ve immünopatolojik değişiklikler tanımlanmıştır.²⁻⁴ 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.⁵⁻⁷ Uzun süreli prezervan madde içeren topikal damla kullanan hastalarda, subkonjonktival fibroz riski artmakta ve glaukom cerrahisi uygulanan gözlerde bleb ömrü kısalmaktadır.⁸

Çalışmamızda; BAK içeren latanoprost, Polikvad içeren travoprost, Purite içeren brimonidin ve prezervan içermeyen tek kullanımlık tafluprost etken maddeli damlaların, tavşanlarda 28 günlük tedavi dozunda kullanılarak oküler yüzey (konjonktiva ve kornea dokusu) üzerine olan sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

DENEY HAYVANI OLARAK TAVŞAN

Tavşan, oftalmolojik araştırmalarda boyutu ve büyük göz yapısı nedeni ile tercih edilen hayvandır. Tavşan ve insan gözü arasında birtakım fizyolojik ve anatomik farklılıklar bulunmaktadır. Gözyaşı döngüsü ve göz kırpması sıklığı tavşanlarda daha siktir ve insanlarda bulunmayan üçüncü göz kapağını bulundurmaktadır. Ancak kornea yapısı, aköz humor volümü, gözyaşı pH'si ve miliozmolaritesi tavşan ve insan gözlerinde benzerdir.⁹

Çalışmamızda kullanılan 3,5-4,5 kg ağırlığında 25 adet erkek erişkin Yeni Zelanda beyaz tavşan, İstanbul Üniversitesi Deneysel Araştırma Enstitüsü Deneysel Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Ana Bilim Dalı Üretim ve Sıfırlama Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışma öncesi İ.Ü. Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı alındı. Deneyler "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensipleri doğrultusunda hayvan hakları korunarak yürütüldü. 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 (Tablo 1). Her grup 5 tavşanın 10 gözünü içermekte idi.

Gruplara izotonik %0,9 solüsyon (serum fizyolojik) günde 1 kere, prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 (Saflutan®, Merck Sharp & Dohme) günde 1 defa, %0,15 Purite içeren brimonidin %0,1 (Alphagan P®, Allergen) günde 2 kere, %0,001 Polikvad içeren travoprost %0,004 (Travatan®, PQ, Alcon) günde 1 kere ve %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 (Xalatan®, Pfizer, Belçika) günde 1 kere günlük doz

TABLO 1: 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®, Allergen | 2*1 |
| D | %0,001 Polikvad | Travoprost %0,004 | TRAVATAN® PQ, Alcon | 1*1 |
| E | %0,02 BAK | Latanoprost %0,005 | XALATAN®, Pfizer | 1*1 |

BAK: Benzalkonyum klorid.

saati kaydedilerek, her iki göze uygulandı. Sistemik emilim ile damla damlatılmayan gözde de ilaç etkisi görülebileceği için gruplarda bir tavşanın her iki gözü kullanıldı ve ayrı bir kontrol grubu oluşturuldu. Damla damlatıldıktan sonra, alt ve üst göz kapakları el ile 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 görünümü ya da başka bir sebepten hasara uğramış göze rastlanmadı.

SEDASYON VE SAKRİFİZASYON

Planlanan çalışma süresini tamamlayan tavşanlara intramusküler 35 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin enjeksiyonu ile sedasyon yapılarak üst bulbar konjonktivalarından biyopsi alındı. Daha sonra hayvanlar intrakardiyak potasyum klorür solüsyonu 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 ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANIŞI VE ÇALIŞMA TEKNİĞİ

Alınan doku örnekleri %4'lük tamponlanmış nötral formaldehit ile fikse edildikten sonra, alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulandı. Şeffaflaştırılmak üzere "toluen"den geçirilen dokular parafin bloklara gömüldü. Doku örneklerinden mikrotom (Leica SM 2000) aracılığıyla 4-5 µm kalınlığında hazırlanan preparatlara ışık mikroskopik incelemeler için hematoksilin & eozin (H&E); goblet hücre sayımı için periyodik asit & Schiff (PAS)+ hemalum boyaları uygulandı. Preparatların incelenmesinde İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda mevcut Olympus BX 61 (Tokyo, Japonya) marka ışık mikroskobu kullanıldı.

Rutin doku takibi prosedüründen sonra, doku örneklerine işaretlenmiş monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılarak immünohistokimyasal boyama uygulandı. Parafin bloklardan hazırlanan preparatlara inflamasyon mevcudiyetini göstermek amacıyla CD45 (Biorbyt) ve apoptoz varlığını araştırmak için kaspaz-3 (Biorbyt) primer antikorları uygulandı.

H&E ile boyanan preparatlarda ışık mikroskopunun 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, interselüler aralık, epitelde koyu nüveli hücrelerin varlığı, stroma içi kollajen liflerde ondülasyon, stromada ödem varlığı ve kornea endotelindeki hücre kaybı idi. Dört farklı araştırmacı tarafından eş zamanlı olarak yukarıdaki kriterlere ayrı ayrı 0-3 arasında skorlar verildi ve bu değerlendirmeye göre istatistiksel analiz yapıldı.

PAS+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 ile 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. Dört araştırmacının her bir alan için bulunduğu değerlerin ortalaması alınarak yarı-kantitatif değerlendirme (H-SCORE yöntemi) yapıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm gruplardaki hayvanların kornea epitelindeki değişikliklerinin, konjonktivadaki goblet hücre sayılarının, CD45 ve kaspaz-3 immünreaktivitesinin 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.

BULGULAR

İŞIK MİKROSKOPİSİ BULGULARI

I-Kornea Dokusunun Değerlendirmesi (H&E Boyanma)

Kontrol grubu

İzotonik %0,9 solüsyonun (serum fizyolojik), günde tek doz uygulama yapılan grupta kornea epi-

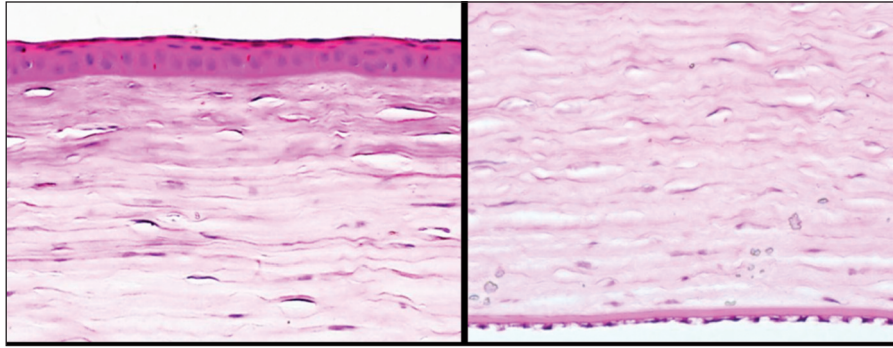
tel ve endotel yapısı normal idi. Kornea stromasında ödematöz alanlar görülmedi (Resim 1a).

Prezervan içermeyen tafluprost grubu

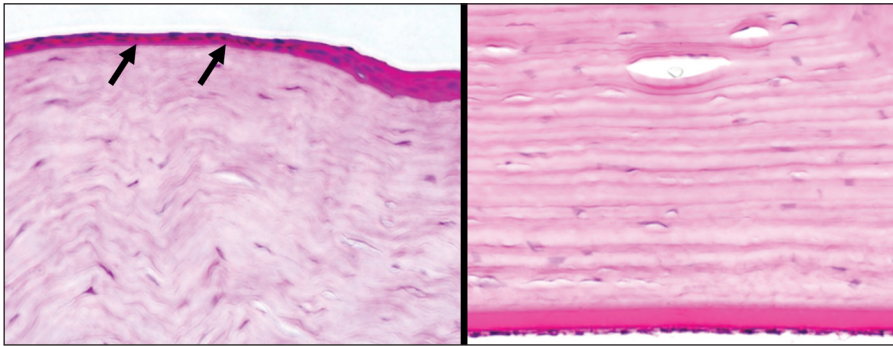
Prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 oftalmik solüsyonun (Saflutan®) uygulandığı grupta kornea epitel, stroması ve endotelindeki değişiklikler kontrol grubuna yakın izlendi. Kornea stromasında ödem yok denecek kadar az idi. Kornea endotelinde herhangi bir anormallik gözlenmedi (Resim 1b).

Purite-brimonidin grubu

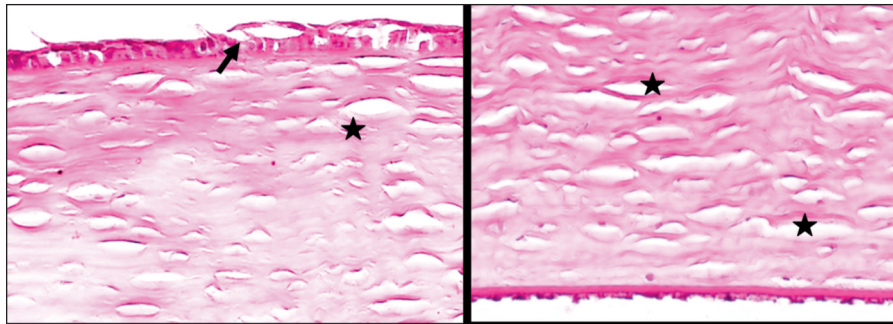
%0,15 Purite içeren brimonidin %0,1 (Alphagan P®) oftalmik solüsyonun uygulandığı grupta kornea epitelinde incelme ve dökülme sahaları gözlemlendi. Bazal hücrelerin uzayarak kornea stromasına doğru çıkıntı yapmış olduğu görüldü. Kornea stromasında ödematöz alanlar saptandı. Kornea endotelinde herhangi bir anormallik gözlenmedi (Resim 1c).



RESİM 1: a) Grup A'dan hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim (x40). **Grup A)** Kontrol grubu, izotonik %0,9 solüsyon (serum fizyolojik), günde tek doz uygulama.



RESİM 1: b) Grup B'den hazırlanan H&E preparatlarında kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim x40 epitel incelmesi (→ ile gösterilen), **Grup B)** Prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama.



RESİM 1: c) Kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim. Epitelde dökülme → ile stroma ödemi ★ ile gösterilen (x40 büyütme, H&E), **Grup C)** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama.

Polikuad-travoprost grubu

%0,001 Polikuad içeren travoprost %0,004 (Travatan®) oftalmik solüsyonun uygulandığı grupta, kornea epitelinde konjonktivaya yakın bölgelerde ondülasyon görüldü. Epitel hücrelerinde intraselüler genişlemeler dikkat çekti ve epitelin üst yüzeyinde dikensi çıkıntılar kontrol grubuna göre daha belirgin idi. Stromada belirgin ödem izlenmedi. Kornea endotelinde herhangi bir anormallik gözlenmedi (Resim 1d).

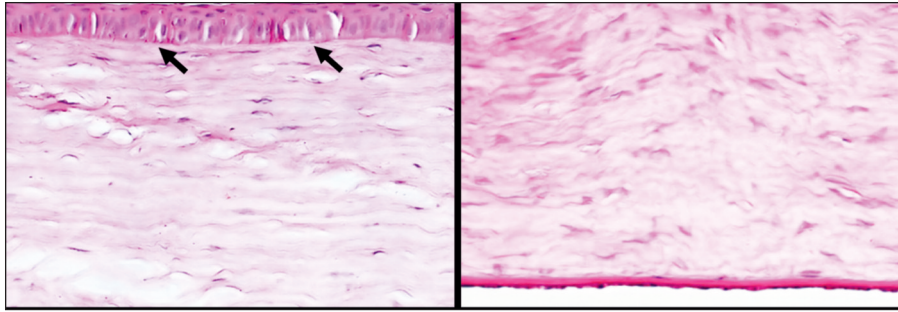
Benzalkonyum klorid-latanoprost grubu

%0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 (Xalatan®) oftalmik solüsyonun uygulandığı grupta; kornea epitelindeki incelme, dökülme, epitel yüzeyinde oluşan dikensi yapılar kontrol ve prezervan içermeyen tafluprost grubuna göre artmış idi. Kornea epitelinin yassı hücre katlarının azaldığı çok sayıda alan gözlemlendi. Kornea epitelinde ondülasyon ve interselüler genişlemeler gözlemlendi. Ondülasyon gösteren sahalarda kollajen lif düzeni

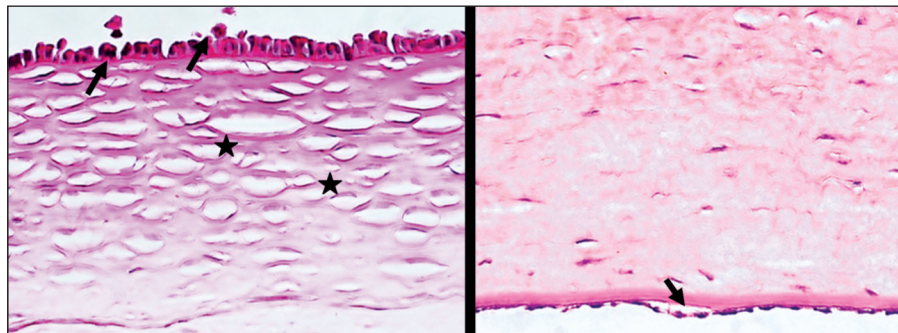
bozulmuş idi. Kornea stromasındaki ödem diğer gruplara göre belirgindi. Kornea endotelinde bazı gözlerde endotel bazal membran ayrışması gözlemlendi (Resim 1e).

II- Konjonktiva Goblet Hücre Değerlendirmesi

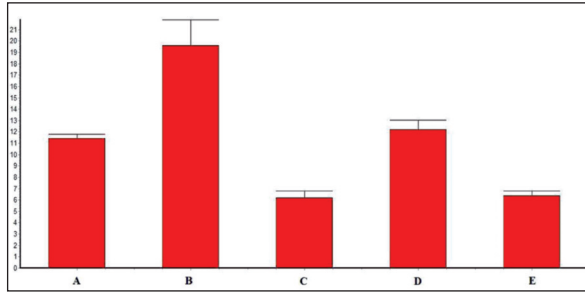
Her grup için goblet hücrelerinin ortalama değerleri (hücre/alan) hesaplanarak kantitatif değerlendirme yapıldı (Şekil 1). Elde edilen bulgulara göre, BAK-latanoprost grubunda konjonktivadaki goblet hücrelerinin sayısında kontrol, tafluprost ve Polikuad-travoprost gruplarına göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi. BAK-latanoprost grubu ile Purite-brimonidin grubu arasında goblet hücre sayısı farklı bulunmadı. Prezervan içermeyen tafluprost grubunda, konjonktivadaki goblet hücrelerinin sayısının bütün gruplara göre anlamlı derecede fazla olduğu görüldü (Tablo 2). Resim 2'de, deney gruplarından hazırlanan PAS+hemalum preparatlarında goblet hücreleri görülmektedir.



RESİM 1: d) Kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim. Epitelde interselüler aralıkta artış → ile gösterilen. (x40 büyütme, H&E), **Grup D)** %0,001 polikuad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama.



RESİM 1: e) Kornea epitelinin (sol) ve endotelinin (sağ) histolojik yapısını gösteren resim. Epitelde dökülme → ile stroma ödemi ★ ile endotelde ayrışma → ile gösterilen (x40 büyütme, H&E), **Grup E)** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama.



ŞEKİL 1: Konjonktivadaki goblet hücre sayısının istatistiksel olarak değerlendirilmesini gösteren grafik.

Grup A); Kontrol grubu, izotonik %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.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

I-İnflamasyon Değerlendirilmesi (CD45 İmmünreaktivitesi)

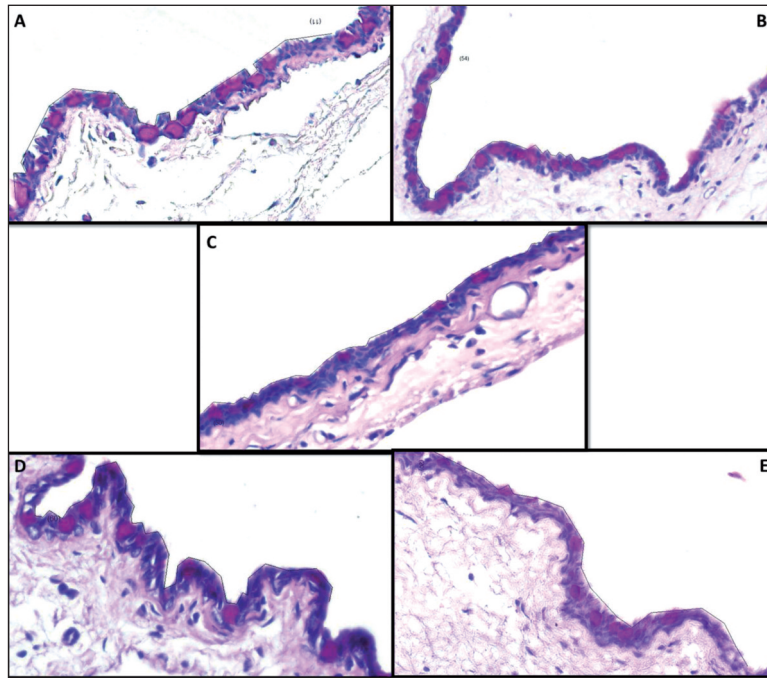
CD45 immün boyama yöntemi ile kornea epiteli ve konjonktiva ilişkili lenfoid doku [conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT)]'da inflamatuvar hücre yoğunluğu H-SCORE yöntemi ile yarı-kantitatif olarak saptandı.

Kornea epiteli ve CALT'de kontrol ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarında belirgin inflamatuvar değişiklik izlenmedi. Prezervan madde içeren gruplarda (Purite-brimonidin, Polikvad-travoprost, BAK-latanoprost grupları) gözlenen inflamatuvar hücre sayısı kontrol ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarına oranla anlamlı olarak yüksek idi (Tablo 3a, Tablo 3b). Resim 3a kornea epitelinde,

TABLO 2: Gruplar (etken madde, prezervan tipi ve uygulama sıklığı).

| Karşılaştırmalar | p değerleri |
|---|-------------|
| A (kontrol)- B (Prezervan içermeyen tafluprost) | 0,001 |
| A (kontrol)- C (Purite-Brimonidin) | 0,044 |
| A (kontrol)- D (Polikvad-travoprost) | 1,000 |
| A (kontrol)- E (BAK-latanoprost) | 0,048 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-C (Purite-Brimonidin) | 0,001 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-D(Polikvad-travoprost) | 0,002 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)- E (BAK-latanoprost) | 0,001 |
| C (Purite-Brimonidin)- D (Polikvad-travoprost) | 0,014 |
| C (Purite-Brimonidin)- E (BAK-latanoprost) | 1,000 |
| D (Polikvad-travoprost)- E (BAK-latanoprost) | 0,019 |

BAK: Benzalkonyum klorid.



RESİM 2: Goblet hücre sayılarındaki değişiklikleri gösteren resim. Goblet hücreleri → ile gösterilen. (x40 büyütme, PAS+Hemalum).

A) Kontrol grubu, izotonik %0,9 solüsyon (serum fizyolojik), günde tek doz uygulama **B)** Prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **C)** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **D)** %0,001 Polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **E)** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama.

TABLO 3a: CD45 immün boyama yöntemiyle kornea epitelinde immün pozitif hücre yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılması (bonferroni düzeltmesi).

| Karşılaştırmalar | p |
|---|-------|
| A (kontrol)- B (Prezervan içermeyen tafluprost) | 1,000 |
| A (kontrol)- C (Purite-Brimonidin) | 0,001 |
| A (kontrol)- D (Polikvad-travoprost) | 0,003 |
| A (kontrol)- E (BAK-latanoprost) | 0,003 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-C (Purite-Brimonidin) | 0,001 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-D(Polikvad-travoprost) | 0,002 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)- E (BAK-latanoprost) | 0,002 |
| C (Purite-Brimonidin)- D (Polikvad-travoprost) | 1,000 |
| C (Purite-Brimonidin)- E (BAK-latanoprost) | 1,000 |
| D (Polikvad-travoprost)-E (BAK-latanoprost) | 1,000 |

BAK: Benzalkonyum klorid.

TABLO 3b: CD45 immün boyama yöntemiyle kornea epitelinde immün pozitif hücre yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılması (bonferroni düzeltmesi).

| Karşılaştırmalar | p |
|---|-------|
| A (kontrol)- B (Prezervan içermeyen tafluprost) | 0,295 |
| A (kontrol)- C (Purite-Brimonidin) | 0,001 |
| A (kontrol)- D (Polikvad-travoprost) | 0,001 |
| A (kontrol)- E (BAK-latanoprost) | 0,001 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-C (Purite-Brimonidin) | 0,001 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-D(Polikvad-travoprost) | 0,085 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)- E (BAK-latanoprost) | 0,001 |
| C (Purite-Brimonidin)- D (Polikvad-travoprost) | 0,001 |
| C (Purite-Brimonidin)- E (BAK-latanoprost) | 0,737 |
| D (Polikvad-travoprost)-E (BAK-latanoprost) | 0,012 |

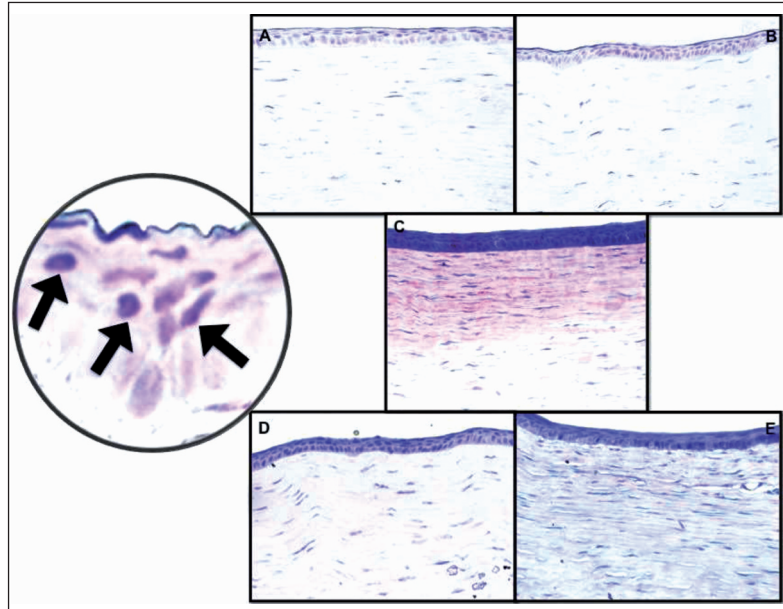
BAK: Benzalkonyum klorid.

Resim 3b CALT'de CD45 ile pozitif (kırmızı) boyanan immünreaktif inflamatuvar hücreleri görülmektedir.

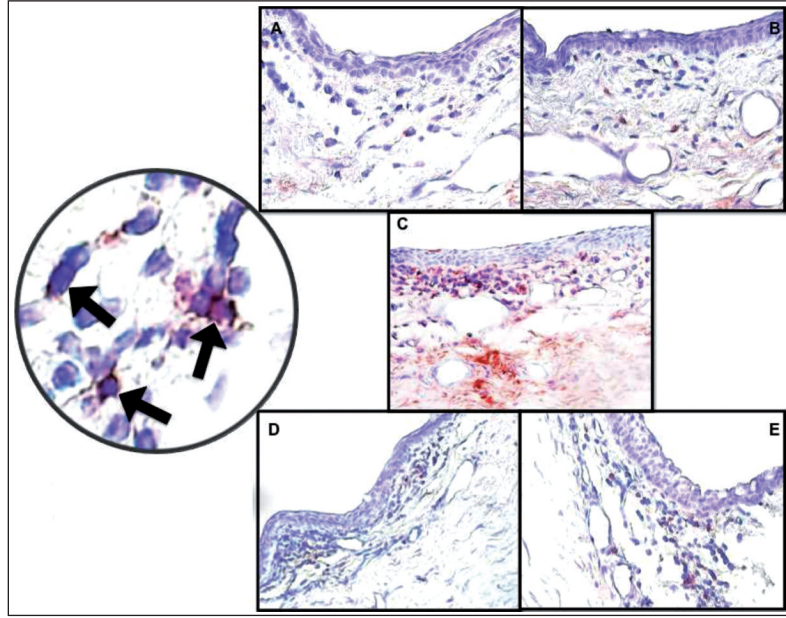
II-Apoptotik Hücre Değerlendirilmesi (Kaspaz-3 İmmünreaktivitesi)

Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile kornea epitel ve CALT'de apoptotik hücre yoğunluğu H-SCORE yöntemi ile saptandı.

Kornea epitelinde kontrol, prezervan içermeyen tafluprost ve Polikvad-travoprost gruplarında, kaspaz-3 ile pozitif reaksiyon veren anlamlı sayıda apoptotik hücre izlenmedi. Purite-brimonidin ve BAK-latanoprost grubunda, kornea epitelinde apoptotik hücrelerin diğer tüm çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. CALT'daki apoptotik hücre sayısının ise BAK-latanoprost grubunda kontrol ve Polikvad-

**RESİM 3: a)** Kornea epitelindeki CD45 immünreaktivitesini gösteren resim. İmmün pozitif hücreler → ile gösterilen. (x40 büyütme)

A) Kontrol grubu, izotonik %0.9 solüsyon (serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **B)** Prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **C)** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **D)** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **E)** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama.



RESİM 3: b) CALT'daki CD45 immünreaktivitesini gösteren resim. İmmün pozitif hücreler → ile gösterilen. (x40 büyütme)

A) Kontrol grubu, izotonik %0.9 solüsyon (serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, B) Prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, C) %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, D) %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, E) %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama.

TABLO 4a: CD45 immün boyama yöntemiyle kornea epitelinde immün pozitif hücre yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılması (bonferroni düzeltmesi).

| Karşılaştırmalar | p |
|---|-------|
| A (kontrol)- B (Prezervan içermeyen tafluprost) | 0,295 |
| A (kontrol)- C (Purite-Brimonidin) | 0,001 |
| A (kontrol)- D (Polikvad-travoprost) | 0,001 |
| A (kontrol)- E (BAK-latanoprost) | 0,001 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-C (Purite-Brimonidin) | 0,001 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-D(Polikvad-travoprost) | 0,085 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)- E (BAK-latanoprost) | 0,001 |
| C (Purite-Brimonidin)- D (Polikvad-travoprost) | 0,001 |
| C (Purite-Brimonidin)- E (BAK-latanoprost) | 0,737 |
| D (Polikvad-travoprost)-E (BAK-latanoprost) | 0,012 |

BAK: Benzalkonyum klorid.

TABLO 4b:Kaspaz-3 immün boyama yöntemiyle CALT'da immün pozitif hücre yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılması (bonferroni düzeltmesi)

| Karşılaştırmalar | p |
|---|-------|
| A (kontrol)- B (Prezervan içermeyen tafluprost) | 1,000 |
| A (kontrol)- C (Purite-Brimonidin) | 0,589 |
| A (kontrol)- D (Polikvad-travoprost) | 1,000 |
| A (kontrol)- E (BAK-latanoprost) | 0,001 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-C (Purite-Brimonidin) | 1,000 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)-D(Polikvad-travoprost) | 0,589 |
| B (prezervan içermeyen tafluprost)- E (BAK-latanoprost) | 1,000 |
| C (Purite-Brimonidin)- D (Polikvad-travoprost) | 1,000 |
| C (Purite-Brimonidin)- E (BAK-latanoprost) | 0,589 |
| D (Polikvad-travoprost)-E (BAK-latanoprost) | 0,001 |

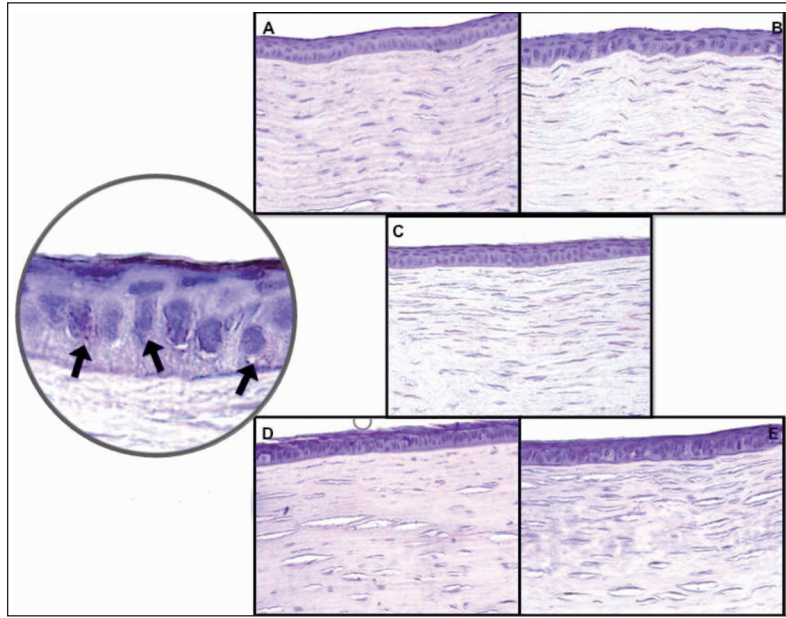
BAK: Benzalkonyum klorid.

travoprost gruplarına göre artmış olduğu izlendi (Tablo 4a, Tablo 4b). Resim 4a kornea epitelinde, Resim 4b CALT'da kaspaz-3 ile pozitif (kırmızı) boyanan immünreaktif apoptotik hücreleri görülmektedir.

TARTIŞMA

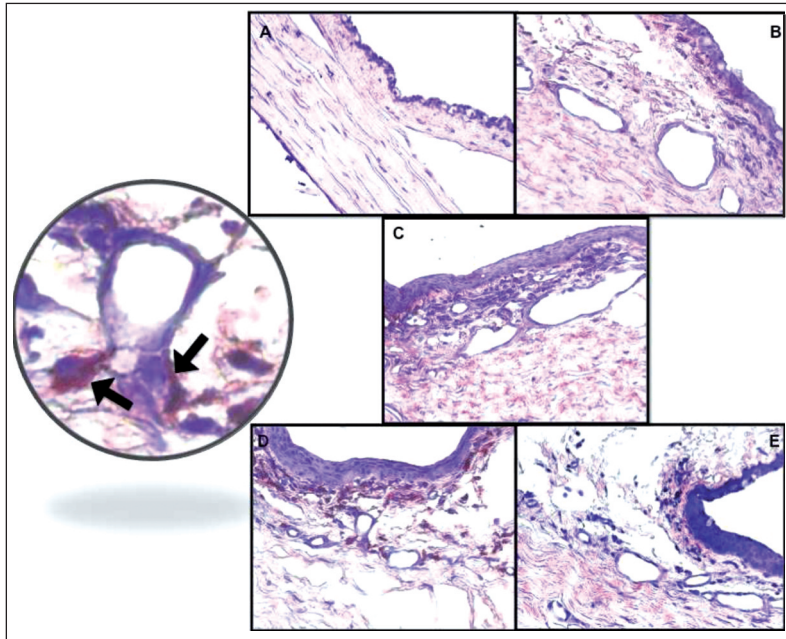
Glokom tedavisinde genellikle ilk yaklaşım göz içi basıncı (GİB)'ni düşüren topikal ilaçların (antiglo-

komatöz ajanlar) kullanımınıdır. Çoğu hastada 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 olabilmektedir. İlaç (şişe) sayısının fazlalaşması kullanım güçlüğüne ve yan etki sıklığının artmasına neden olan en önemli faktördür. Tıbbi tedavi hangi amaçlarla



RESİM 4: a) Kornea epitelindeki kaspaz-3 immünreaktivitesini gösteren resim. İmmün pozitif hücreler → ile gösterilen. (x40 büyütme)

A) Kontrol grubu, izotonik %0,9 solüsyon (serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **B)** Prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **C)** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **D)** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **E)** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama.



RESİM 4: b) CALT'daki kaspaz-3 immünreaktivitesini gösteren resim. İmmün pozitif hücreler → ile gösterilen. (x40 büyütme)

A) Kontrol grubu, izotonik %0,9 solüsyon (serum fizyolojik), günde tek doz uygulama, **B)** Prezervan içermeyen tafluprost %0,0015 oftalmik solüsyon (SAFLUTAN®, Merck Sharp & Dohme), günde tek doz uygulama, **C)** %0,15 purite içeren brimonidin %0,1 oftalmik solüsyon (ALPHAGAN PURITE® P, Allergan), günde iki doz uygulama, **D)** %0,001 polikvad içeren travoprost %0,004 oftalmik solüsyon (TRAVATAN® PQ, Alcon), günde tek doz uygulama, **E)** %0,02 BAK içeren latanoprost %0,005 oftalmik solüsyon (XALATAN®, Pfizer), günde tek doz uygulama.

yapılırsa yapılısın başarılı olabilmesi için hasta uyumunun sağlanması, yan etkilerin minimize edilmesi ve tedavinin sürekliliğinin sağlanması gerekmektedir.

Deneyisel klinik çalışmalar, uzun süreli topikal damla kullanımının konjonktiva ve kornea dokusunda hasara yol açarak oküler rahatsızlığa neden olduğunu göstermektedir. Bu etkiler, oküler yüzey

değişikliklerini tetikleyerek gözyaşı film tabakasında düzensizliğe ve konjonktivada inflamasyona yol açabilmektedir.

Oftalmik preparatların çoklu doz içeren formlarında şişe içeriği açıldıktan sonra en fazla bir hafta içinde çeşitli mikrobiyal etkenlerle ortamdaki kontamine olma tehlikesi mevcuttur. Bu nedenle, çoklu kullanım gerektiren topikal damla türü ilaçların içeriğinde prezervan maddeler yer almaktadır. Oftalmik preparatlarda en sık kullanılan prezervan madde BAK'dır. BAK, kuaterner amonyum türevi oldukça etkili bir antimikrobiyal ajandır. Günümüzde antiglokomatöz ajanlar da dâhil olmak üzere, mevcut göz damlalarının %70'inin şişe içeriğinde prezervan madde olarak BAK mevcuttur.¹⁰ Topikal solüsyonlardaki en sık kullanılan konsantrasyonu %0,01 olmakla birlikte, %0,004-0,02 arasında farklı uygulamaları da olabilmektedir. Bu maddenin antimikrobiyal özelliği deterjan etkisinden kaynaklanmaktadır. Bu etki ile çeşitli mikrobik ajanların hücre duvarları yıkılarak bakterisid, virüs ve fungusid etkiler göstermektedir. Aynı zamanda, kornea epitelinin sıkı bağlantılarını gevşeterek humör aköz içerisine daha iyi etken madde penetrasyonunu sağladığı düşünülmektedir.

Geniş kapsamlı toplum araştırmalarında, uzun süreli topikal antiglokomatöz ilaç kullanan hastalarda kuru göz belirtileri ve oküler yüzey hastalığı bulgularının glokomu olmayan populasyona göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.¹¹⁻¹³ Prezervan içeren ve prezervansız beta blokerlerin etkilerini karşılaştıran bir çalışmada 3 aylık tedavi sonrası prezervan içeren damlanın uygulandığı grupta fluorescein ile belirgin kornea ve konjonktiva boyanması, göz kapağı eritemi, konjonktival hiperemi ve foliküller hiperplazi izlenmiştir. Gözyaşı kırılma zamanı ve Schirmer testinde anlamlı değişiklik saptanmıştır.¹⁴

Oküler yüzey belirtileri, hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkilemekte ve tedaviye uyumunu azalmaktadır. Glokom ilaçlarına bağlı oküler yüzey hastalığı belirti ve bulgularının büyük bölümünün, aktif bileşenden çok prezervan maddeye bağlı olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır.^{15,16} Bu maddelerden en sık kullanılmakta olanın BAK'ın olası toksik etkilerinden kurtulmak için alternatifleri ge-

liştirilmiştir. Purite ve Polikuad (PQ) yan etkileri BAK'a oranla daha az olan prezervan etkili maddelerdir. PQ ve BAK içeren solüsyonların karşılaştırıldığı tavşan modelinde, BAK içeren gruplarda difüz konjonktival hiperemi ve kemozis, epitelial hücrelerde hasar, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, goblet hücre sayısında azalma ve belirgin total oküler yüzey toksisite bulguları izlenmiştir. PQ uygulanan gözlerde ise oküler yüzey toksisite bulguları saptanmamıştır.¹⁷

Çalışmamızda, günümüzde glokom tedavisinde en sık kullanılan antiglokomatöz damlaların preparat hâliyle (etken madde+prezervan+çözelti) göze uygulanarak oküler yüzeyde oluşturdukları etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır. Yirmi sekiz günlük tedavi dozunda uygulamayı takiben elde edilen doku kesitlerinin ışık mikroskobu ile incelenmesinde, BAK-latanoprost uygulanan gözlerde kornea epitelinde dökülme, incelme, yassı hücre katlarında azalma ve epitel üzerinde dikensi yapılarda artış ve kornea stromasında ödem saptandı. Purite-brimonidin grubunda epitel dökülmesi ve incelmesi kontrol grubuna kıyasla daha fazla, BAK-latanoprost grubundan daha düşük seviyede idi. Hiçbir grupta kornea endoteline ait herhangi bir değişikliğe rastlanmadı. BAK-latanoprost grubunda kornea stromasında ödem kontrol, prezervan içermeyen tafluprost ve Purite-brimonidin gruplarına göre artmış olarak izlendi. BAK-latanoprost grubunda literatür bulgularında rastlayamadığımız stroma ödeminde artışa BAK'ın endotele toksik etkisinin yol açabileceği düşünüldü. Bu bulguların izahında, kornea endotel değişikliklerinin elektron mikroskopisi veya konfokal mikroskopi ile değerlendirecek kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tafluprost, GİB üzerinde oldukça güçlü etki gösteren, daha az yan etki profiline sahip [iris renginde değişiklik yapıcı etkisi diğer prostaglandin (PG) analoglarına oranla daha düşük] yeni bir PG analogudur. Tafluprost ilk prezervan içermeyen PG türevidir. Prezervan içeren PG analoglarının kullanımını sonrası oküler yüzey hastalığı belirtileri gösteren hastalar için iyi bir seçenek olarak görülmektedir. Bu hastalarda prezervan içermeyen tafluprost geçiş ile impresyon sitoloji bulgularında

düzelme, fluoresein kırılma zamanında uzama ve oküler yüzey hastalığı semptomlarında (kaşıntı, sulanma, yanma, yabancı cisim hissi) azalma izlenmiştir.¹⁸ 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 tafluprost grubu bulgularını kontrol grubuna yakın bulmuşlardır.¹⁹ BAK içeren latanoprost kullanan glokom hastalarının, prezervan içermeyen tafluprosta geçişi ile oküler yüzey hastalığı bulguları ve kuru göz semptomlarında azalma olduğu izlenmiştir.²⁰ Benzer şekilde Walimbe ve ark., BAK içeren latanoprost kullanan hastalarda prezervan içermeyen latanoprosta geçiş sonrası gözyaşı kırılma zamanı, oküler yüzey hastalığı indeksi, korneal boyanma ve konjonktival hiperemi skorlarında iyileşme olduğunu gözlemlemişlerdir.²¹

Çalışmamızda, tafluprost uygulanan korneaların ışık mikroskopisi ile incelenmesinde genelde kontrol grubuna benzer değişiklikler gözlenmekle beraber, epitelin ondülasyon gösteren bazı bölgelerinde incelmeler saptandı. Bu bulguya, literatürde tafluprost uygulamasına bağlı oluşabilecek bilinen bulguların dışında çalışmamızda ilk olarak rastlanmış olup, açıklanması daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

Goblet hücreleri gözyaşı filmindeki toksik bileşenlere en hassas hücre tiplerinden biridir.²² Esas olarak yüzey ıslanabilirliğinden sorumlu olan müsin salgılamaktadır. Müsin tabakası gözyaşı filminin aköz tabakasının oküler yüzeye tutunmasını sağlamaktadır. Goblet hücre kaybı müsin sekresyonunda azalmaya, gözyaşı film tabakasında düzensizliğe, konjonktiva ve kornea epitel hücrelerinin beslenmesinde yetersizliğe neden olmaktadır.²³ Bu değişiklikler yabancı cisim hissine ve oküler yüzey hastalığına yol açabilmektedir. Goblet hücre yoğunluğu, oküler yüzey hastalığının ciddiyetini yansıtan bir parametredir.

BAK-latanoprost ve Purite-brimonidin çalışma gruplarımızda, 28 günlük uygulama sonrası goblet hücre yoğunluğunda anlamlı azalma gözlemlendi. 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 bulmuşlardır.²⁴ BAK konsantrasyonu arttıkça goblet hücre sayısında azalma daha da belirginleşmektedir.²⁵ BAK içeren antiglokomatöz ajanların glokom gibi kronik bir hastalıkta uzun süreli kullanılması durumunda konjonktivadaki goblet hücre sayısında azalmaya ve buna bağlı oküler yüzey semptomlarına neden olacağı aşikârdır.

Çalışmamızda, prezervan içermeyen tafluprost grubunda goblet hücre sayısının diğer gruplara göre fazla olduğu gözlenmiştir. Benzer bulgular başka, çalışmalarda da elde edilmiştir. Barabino ve ark.nın yaptığı bir fare çalışmasında, travoprost ve bimatoprostun 1 haftalık uygulama sonrası goblet hücre sayısında artışa neden olduğu görülmüştür.²⁶ Russ ve ark., timolol ve PG analoglarının etkilerini karşılaştırarak bütün PG gruplarında konjonktival goblet hücre sayısında artış olduğunu saptamışlardır.²⁷ Uzun süreli PG analogu kullanımının timolol preparatı kullanımına göre daha az kuru göz bulgularına neden olmasını bu etkiye bağlamışlardır. Hava kirliliğinin konjonktiva goblet hücre hiperplazisine neden olduğu gösterilmiştir. Bu artışın dış faktörlere karşı oluşan bir oküler yanıt olduğu düşünülmektedir.²⁸ PG analoglarının neden olduğu goblet hücre sayısındaki artış, oküler yüzeyin koruyucu etkisinin sonucu olabilmekte ya da ilaçların oluşturduğu olumsuz etkilerin bir yansıması olabilmektedir.

Guenuon ve ark., bazı PG analoglarının konjonktiva epitel hücreleri üzerine antioksidan etkilerinden bahsetmişlerdir. Bu etkinin muhtemelen PG analoglarının serbest oksijen radikalleri oluşumunu azaltıcı özelliğinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. PG analoglarının bu koruyucu etkiye benzer bir mekanizma ile de goblet hücreleri üzerinde antioksidan ve sitoprotektif etki gösterebileceği düşünülmüştür.²⁹

Uzun süreli topikal damla kullanımının bir diğer etkisi, oküler dokularda oluşabilecek inflamasyon ve apoptotik değişikliklerdir. BAK içeren ve içermeyen antiglokomatöz PG analoglarının

CALT üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, CALT'daki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun primer olarak BAK konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.³⁰ Bu süreç sonrası gelişecek olan subkonjonktival fibroz gelecekte yapılması muhtemel glokom cerrahilerinde bleb ömrünü kısaltarak cerrahi başarı oranını azaltmaktadır.³¹

Çalışmamızda, CD45 antikorunu kullanılarak yapılan immünohistokimyasal incelemelerde, prezervan içeren bütün gruplarda her iki dokuda anlamlı sayıda pozitif boyanan inflamatuvar hücre saptandı. Prezervan içermeyen tafluprost grubunda görülen bulgular ile kontrol grubu arasında ise fark yok idi. Liang ve ark., travoprost/timolol Polikvad kombine solüsyonunun travoprost/timolol BAK ve latanoprost/timolol BAK solüsyonlarından belirgin olarak daha düşük oküler toksisite skoruna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Travoprost/timolol Polikvad uygulanan grupta ise CD45+ hücre sayımı ile CALT foliküllerinde belirgin inflamatuvar reaksiyon izlenmemiştir.³² Kim ve ark.'nın fare çalışmasında, BAK içeren damlaların uygulandığı gruplarda artmış inflamasyon ve apoptoz, kornea hasarı ve düşük hücre canlılığı olduğu saptanmıştır. Ayrıca, PG uygulanan gruplarda hücre canlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgu, PG analoglarının BAK'ın oluşturduğu toksisiteye karşı koruyucu olduğunu düşündürmüştür.³³

Yukarıdaki çalışmalarda belirtildiği gibi, kornea epiteli ve özellikle konjonktivada yer alan CALT yapılarında BAK'ın uzun süreli kullanımının inflamatuvar değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Bununla beraber bu konuda Purite, Polikvad gibi yeni prezervanlar ve prezervan içermeyen tafluprost ile ilgili yeterli bilgi yoktur. Çalışmamızda sadece BAK'ın değil diğer prezervan ajanların da BAK'a oranla daha düşük düzeyde olmakla beraber, kontrol grubuna göre anlamlı inflamatuvar değişiklikler oluşturduğu saptandı. Bu bulgular Purite ve Polikvad 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 rastlanmamıştır.

Kaspaz-3 antikorunu kullanılarak yaptığımız immünohistokimyasal incelemelerde, BAK-latanoprost ve Purite-brimonidin uygulanan gruplarda kornea epitelinde pozitif boyanan apoptotik hücreler kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artmış idi. Polikvad-travoprost ve prezervan içermeyen tafluprost gruplarında ise epitelde apoptotik değişiklik gösteren anlamlı sayıda hücre saptanmadı. CALT folikülleri 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.

SONUÇ

Çalışmamızda BAK-latanoprost, Purite-brimonidin ve Polikvad-travoprost uygulamasının 28 günlük tedavi dozunda tavşan gözlerinde kornea dokusu, konjonktiva goblet hücreleri ve CALT folikülleri üzerine sitotoksik, inflamatuvar ve apoptotik etkilere neden olabileceği sonucuna varıldı. Bu gruplar içerisinde en ciddi toksik etkiler BAK-latanoprost grubunda idi. Polikvad-travoprost grubu, Purite-brimonidin grubuna oranla daha az toksisite bulgusuna sahip idi. Prezervan içermeyen tafluprost grubunda kontrol grubu ile benzer nitelikte bulgulara rastlandı. Bu grupta, konjonktiva goblet hücrelerinin sayıca fazla olduğu saptandı, bu bulgu tafluprostun goblet hücreleri üzerinde sitoprotektif etkili olabileceğini düşündürdü.

Elde etmiş olduğumuz bulgular ışığında, uzun süreli tedavi gerektiren glokom hastalarında prezervan maddelerin neden olabileceği yan etkileri dikkate alarak, mümkün ise prezervan içermeyen preparatların tercih edilmesi gerektiği söylenebilmektedir.

Teşekkür

Çalışmamıza destek veren İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.

Yazar Katkıları

Bu çalışma hazırlanırken tüm yazarlar eşit katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

1. Noecker RJ, Herrygers LA, Anwaruddin R. Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. *Cornea* 2004;23(5):490-6.
2. Baudouin C. Side effects of antiglaucomatous drugs on the ocular surface. *Curr Opin Ophthalmol* 1996;7(2):80-6.
3. Arici MK, Arici DS, Topalkara A, Güler C. Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Exp Ophthalmol* 2000;28(2):113-7.
4. Nuzzi R, Finazzo C, Cerruti A. Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva and the lacrimal (Brit. Engl) response. *Int Ophthalmol* 1998;22(1):31-5.
5. Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, et al. Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucomatous drugs: human and animal studies. *Ophthalmology* 1999;106(3):556-63.
6. van Beek LM, de Keizer RJ, Polak BC, Elzenaar PR, van Haeringer NJ, Kijlstra A. Incidence of ocular side effects of topical beta blockers in the Netherlands. *Br J Ophthalmol* 2000;84(8):856-9.
7. 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;110:40-63.
8. 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(3):327-35.
9. Lee VH, Robinson JR. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. *J Ocul Pharmacol* 1986;2(1):67-108.
10. Kaur IP, Lal S, Rana C, Kakkar S, Singh H. Ocular preservatives: associated risks and newer options. *Cutan Ocul Toxicol* 2009;28(3):93-103.
11. Schmier JK, Covert DW. Characteristics of respondents with glaucoma and dry eye in a national panel survey. *Clin Ophthalmol* 2009;3: 645-50.
12. 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 Exp Ophthalmol* 2012;40(7): 675-81.
13. 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.
14. Iester M, Telani S, Frezzotti P, Motolese I, Ficus M, Fogagnolo P, et al. Ocular surface changes in glaucomatous patients treated with and without preservatives beta-blockers. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014;30(6):476-81.
15. 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;17(3):341-9.
16. Manni G, Centofanti M, Oddone F, Parravano M, Bucci MG. Interleukin-1beta tear concentration in glaucomatous and ocular hypertensive patients treated with preservative-free nonselective beta-blockers. *Am J Ophthalmol* 2005;139(1):72-7.
17. Liang H, Brignole-Baudouin F, 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(2):89-101.
18. 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;46(6): 409-16.
19. 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;92(9):1275-82.
20. Uusitalo H, Egorov E, Kaamiranta K, Astakhov Y, Ropo A. Benefits of switching from latanoprost to preservative-free tafluprost eye drops: a meta-analysis of two Phase IIIb clinical trials. *Clin Ophthalmol* 2016;10:445-54.
21. Walimbe T, Chelkerkar V, Bhagat P, Joshi A, Raut A. Effect of benzalkonium chloride-free latanoprost ophthalmic solution on ocular surface in patients with glaucoma. *Clin Ophthalmol* 2016;10:821-7.
22. Perez-Vilar J, Mabolo R. Gel-forming mucins. Notions from in vitro studies. *Histol Histopathol* 2007;22(4):455-64.
23. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res* 2004;78(3):379-88.
24. Kahook MY, Noecker R. Quantitative analysis of conjunctival goblet cells after chronic application of topical drops. *Adv Ther* 2008;25(8): 743-51.
25. Kim RJ, Oh TH, Kim HS. Effects of benzalkonium chloride on the ocular surface of the rabbit. *Jpn J Ophthalmol* 2011;55(3):283-93.
26. Barabino S, Antonelli S, Cimbolini N, Mauro V, Bouzin M. The effect of preservatives and antiglaucoma treatments on the ocular surface of mice with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(10):6499-504.
27. Russ HH, Costa VP, Ferreira FM, Valgas SR, Correa Neto MA, Strobel Ev, et al. Conjunctival changes induced by prostaglandin analogues and timolol maleate: a histomorphometric study. *Arq Bras Oftalmol* 2007; 70(6):910-6.
28. Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Karajósé N, Macchione M, Matsuda M, Racca L, et al. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hyperplasia in human conjunctival epithelium. *Environ Health Perspect* 2007; 115(12):1753-6.
29. 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(12):4594-9.
30. Liang H, Baudouin C, Labbé 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.
31. 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;29(4):312-34.
32. Liang H, Brignole-Baudouin F, Pauly A, 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): 311-25.
33. Kim JH, Kim EJ, Kim YH, Kim YI, Lee SH, Jung JC, et al. In Vivo Effects of Preservative free and Preserved Prostaglandin Analogs: Mouse Ocular Surface Study. *Korean J Ophthalmol* 2015;29(4):270-9.