

Tavşan Gözlerinde Cerrahi Yara İyileşme Sürecinde Lokal TNF Alfa İnhibisyonunun Konjonktiva ve Tenon Fibroblast Aktivitesine Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi (Deneysel Ön Çalışma)

Didar Uçar (*), Özcan Ocakoğlu (**), Seyhun Solakoğlu (***)

ÖZET

Amaç: Konjonktiva altı fibrozis glokomun cerrahi başarısı üzerinde önemli rol oynar. Çalışmamızda bir TNF alfa inhibitörü infliximab'ın tavşan gözlerinde oluşturulan cerrahi yaranın iyileşme sürecinde konjonktiva ve tenon fibroblastik aktivitesine etkisini histolojik olarak inceledik.

Gereç-Yöntem: 11 albino tavşanın 21 gözünde standart protokol ile cerrahi yara modeli (forniks tabanlı konjonktiva açılması ve 2/3 kalınlıklı üçgen sklera flebi hazırlanması) oluşturuldu. 18 göze farklı dozlarda (2 mg/ml ve 5 mg/ml), farklı sürelerde (3 dk-5 dk) ve değişik uygulama yolu (topikal- subkonjonktival (sc)) kullanılarak infliximab tatbik edildi (gruplar A-B-C-D-E-F). 3 göze ilaç uygulanmadan sadece cerrahi girişim yapıldı (Kontrol grubu-Grup G). Cerrahi ve ilaç uygulaması yapılan bölgeden kesitler alınarak Bromodeoksiüridin (BrdU) ile boyandı. Işık mikroskopisi ile fibroblast sayısı ve fibroblast sayısı/tüm hücre sayısı (proliferatif indeks) tespit edildi. İstatistiksel analizde Mann Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ alındı.

Sonuç: Yüksek doz topikal/sc infliximab uygulaması yapılan Grup B, C, D ve F'de fibroblast sayısı ve fibroblast/tüm hücre sayısı oranı grup G'den daha düşük idi (antifibroblastik etki) ($p < 0,05$). Düşük doz topikal infliximab (grup A) ve sc infliximab (grup E) uygulamasının fibroblastik aktivite üzerinde etkisi gözlenmedi ($p > 0,05$).

Yorum: Tavşan gözlerinde oluşturulan cerrahi yaranın iyileşme sürecinde tenon ve konjonktivanın fibroblastik aktivitesi doz ve süreye bağlı olarak topikal infliximab uygulaması ile azalmaktadır. Bu etkiden glokom cerrahisi sonuçlarını olumsuz etkileyen konjonktiva altı fibrozis önlenmesinde yararlanılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: TNF alfa inhibitörü, fibroblast, yara iyileşmesi, glokom cerrahisi

(*) Şehit Kamil Devlet Hastanesi, Gaziantep

(**) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul

(***) İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul

Yazışma adresi: Prof. Dr. Özcan Ocakoğlu, Nişantaşı Valikonağı Cad. Yüce Apt. No.17 Kat 2 Da.9 Şişli-İstanbul E-posta: ocakoglu@superonline.com

Mecmuaya Geliş Tarihi: 12.12.2008

Düzeltilmeden Geliş Tarihi: 11.02.2009

Kabul Tarihi: 29.03.2009

SUMMARY

Histological Evaluation of Local TNF Alpha Inhibition on Conjunctiva and Tenon Fibroblastic Activity in Surgical Wound Healing of Rabbit eyes (exPerimental Prestudy)

Purpose: Subconjunctival fibrosis has an important role on results of glaucoma surgery. We investigated histologically the effect of infliximab (a TNF alpha inhibitor) on conjunctiva and tenon fibroblastic activity of rabbit eyes during wound healing period of the surgical wound.

Material-Methods: The surgical wound model was created with a standart protocol (for-nix- based conjunctival fleb and scleral fleb with 2/3 of scleral thickness) on twenty-one eyes of 11 albino rabbits. Infliximab was used different doses (2 mg/ml or 5 mg/ml), different times (3 seconds or 5 seconds) or alternative application routes (topical or subconjunctival(SC)) on eighteen eyes (groups A-B-C-D-E-F). Three eyes had only surgical approach without drug application (control eyes, group G). The pathological slices were taken on the surgical area and the examples were painted with Bromodeoxyuridine (BrdU). Fibroblasts counts and the ratio of fibroblasts counts/ cell counts (proliferative index) were measured with light microscopy. Statistical analysis was made with Mann Whitney U test. Statistically significance was accepted $p < 0,05$.

Results: In groups B,C,D and F (with high dose topical/SC infliximab); fibroblasts counts and proliferative index was lower than controls (group G) ($p < 0,05$). Low dose topical infliximab (group A) and SC infliximab group (group E) was no affect shown on the fibroblastic activity ($p > 0,05$).

Conclusion: Dose and time dependent topical infliximab application has an inhibitory effect of tenon and conjunctival fibroblastic activity during wound healing of rabbit eyes. We thought that this effect may prevent subconjunctival fibrosis has a negative effect on results of glaucoma surgery

Key Words: TNF alpha inhibitors, fibroblast, wound healing, glaucoma surgery

Glokomun cerrahi tedavi yöntemleri arasında filtrasyon cerrahisi, Schlemm kanalı cerrahileri ve dirençli glokom olgularında seton (valv) implant cerrahisi sayılabilir (1,2). Günümüzde cerrahi tedavi olarak halen en sık kullanılan yöntem 1967'de Cairns tarafından tarif edilen bir filtrasyon cerrahisi modeli olan "trabekülektomi"dir (3). Bu yöntemde ön kamara ile konjunktiva altı alan arasında bir açıklık (fistül) oluşturularak göz içi sıvısının konjunktiva altına yayılması ve optik sinir başı üzerindeki baskının azaltılması amaçlanır. Ancak daha önceden mevcut olmayan bu kanalın açılması ile organizmada pek çok hücrenin ve çeşitli hümorale faktörlerin rol aldığı yara iyileşme süreci uyarılmış olur. Bu sürecin ilerlemesi sonucunda gelişecek skar dokusu (subkonjunktival fibrozis) trabekülektomi cerrahisi sonrası görülen başarısızlığın en önemli nedenidir (4,5).

Glokom cerrahisinde filtran blebin kapanmasında ana neden konjunktiva altı boşlukta tenon dokusu fibroblastlarının proliferasyonu ile kollajen ve diğer ekstrasellüler materyalin sentezlenmesidir (5,6). Fibrozisin engellenebilmesi amacı ile günümüzde filtran glokom cerrahisi sırasında ve sonrasında çeşitli antifibrotik ajanlar kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan antimeta-

bolit ajanlar (MMC) 5 Florourasil (5 FU) ve Mitomisin c olmakla beraber (7,8) literatürde denenmiş pek çok ajan vardır. Bunlar arasında octreotid asetat (9), suramin (10), TGF beta (decorin) (11), gamma-interferon (12), matriks metalloproteinaz inhibisyonu (13), genistein (14) ve siklosporin C (15) sayılabilir. Bu ajanlar glokom cerrahisi sırasında oluşturulan sklerostomi açıklığını çevreleyen konjunktiva ve tenon kapsülü fibroblastlarının bölünmesini engelleyerek ve apoptotik hücre ölümünü sağlayarak yara iyileşmesini geciktirirler (7,8,16). Ancak çevredeki komşu hücrelere de zarar vermeleri ve oluşturdukları çok ciddi yan etkileri nedeniyle kullanımları sadece riskli glokom olguları ile sınırlı kalmaktadır (17).

Yara iyileşme sürecinde rol oynayan proinflamatuar doğal bir sitokin olan tümör nekroz faktör alfa (TNF alfa) aktive monosit ve makrofajlardan oluşmaktadır. Normal ve anormal immün cevap ile ilişkili inflammatuar reaksiyonlar üzerinde çeşitli etkileri vardır. Epitel hücre bariyerlerinin permeabilitesi etkiler, inflammatuar hücrelerin ortama toplanmasından ve matriks metalloproteinazlarının adezyonun düzenlenmesinden sorumludur. TNF alfa suda eriyebilir ve membranları geçebilir.

Etkisi p55 ve p75 membran reseptörlerine bağlanarak gösterir (18).

Yara iyileşmesinde öncü düzenleyici olduğu bilinen TNF alfa'nın inhibe edilmesi ile iyileşmenin geciktirilmesi mümkün olabilir (19). Günümüzde klinik kullanımda bulunan TNF alfa antagonistleri Etanercept (Enbrel-Wyeth 25 ml/flakon.), Infliximab (Remicade-Schering-Plough-100 mg/flakon) ve Adalimumab (Humira-Abbott 40 mg/0,8 ml çözünmüş enjeksiyon) dir. Etanercept p75 insan TNF alfa reseptörü proteini, infliximab fare monoklonal antikoru, Adalimumab ise insan monoklonal antikordur. Bunlardan infliximab çözünebilir TNF alfa'nın aktif olan ve olmayan formlarını bağlayabilir ve stabil kompleksler yapabilir.

Glokom cerrahisi sonrası hem konjonktiva altı alanındaki fibroblast proliferasyonu hem de cerrahi sahada gelişecek anjiogenez açılan kanalın hayatyeti üzerinde önemli rol oynamaktadır. Bir TNF alfa inhibitörü olan infliximab'ın çift yönlü (antifibroblastik ve antianjiogenetik) etkisinin olması nedeniyle cerrahi sonrası daha az skar gelişimi beklenebilir. Çalışmamızda tavşan modelinde oluşturulan cerrahi alanlarda konjonktiva, sklera ve tenon bölgesindeki fibroblastik aktivite üzerine lokal TNF alfa inhibisyonu yapan infliximab'ın etkisi histolojik olarak incelenmiştir.

GEREÇ-YÖNTEM

Çalışmamızda çözünebilir TNF alfa'nın aktif olan ve olmayan formlarını bağlayabildiği ve stabil kompleksler yapabildiği için infliximab (Remicade) kullanımı seçildi. Fibroblastik aktiviteyi durdurabilecek infliximab dozajının belirlenebilmesi amacıyla 3T3 fibroblast hücre kültüründe bir ön sağ kalım çalışması yapıldı. Kontrol grubunda ilaç uygulaması yapılmadı; çalışma gruplarına 1, 10, 100, 500 mikrogram (μ g) dozlarında infliximab dozları uygulandı. 24., 48. ve 72. saatlerde canlı fibroblast hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre kültürlerinde değişik ilaç dozları uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece 500 μ g dozda uygulanan infliximab'ın fibroblastların sağ kalımı üzerinde anlamlı şekilde etkili olduğu bulundu. Yapılacak cerrahide uygulanacak infliximab dozajı için 500 μ g ön değer olarak kabul edildi, ancak cerrahi yaraya bağlı fibroblast aktivasyonu olacağı düşünüldüğünden başlangıç dozajı olarak 2 mg seçildi.

Çalışmada 2,5-3 aylık, 850-1100 gr ağırlığında renkli gözlü 11 tane Yeni Zellanda tavşanın 21 gözü kullanıldı. Tavşanlar Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışma öncesi İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi etik kurulu

onayı alındı. Gözler 7 gruba ayrıldı (grupların karakteristikleri Tablo 1'de görülmektedir). Her grup 3 tavşan gözü içermekteydi.

Tablo 1. Gruplar, ilaç uygulama doz, süre ve şekilleri

	3 dk Topikal	5 dk Topikal	Subkonjonktival
Infliximab 2 mg/ml	Grup A	Grup B	Grup E
Infliximab 5 mg/ml	Grup C	Grup D	Grup F
Kontrol grubu	Grup G		

Infliximab (Remicade) 100 mg flakon 10 cc steril distile su eklenerek solüsyon haline getirildi, böylelikle elde edilen 10mg/ml lik ilaç konsantrasyonu 1 ml ye 1 cc steril distile su eklenerek 5 mg/ml dozunda, 4 ml steril distile su eklenerek ise 2 mg/ml lik doz halinde hazırlandı.

Operasyon tekniği: Anestezi için kas içi ketamin hidroklorid (50 mg/kg) ve xylazine (5 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı. Betadin ile cilt temizliği yapıldıktan sonra gözler 3 dakika %50 sulandırılmış betadin solüsyonu damlatılarak bekletildi, ardından serum fizyolojik ile yıkılarak cerrahiye hazırlık yapıldı. Her grupta konjonktiva makası yardımı ile forniks tabanlı konjonktiva flebi hazırlandı. 300' lik cerrahi bıçak yardımı ile skleranın yaklaşık 2/3 kalınlığında bir flep oluşturuldu.

Grup A'ya ait 3 adet göze (göz no 1,2,3) sklera flebi oluşturulduktan sonra steril bir sponja emdirilmiş 2 mg/ml'lik infliximab 3 dakika bekletildi.

Grup B'ye ait 3 adet göze (göz no 4,5,6) aynı işlem 2mg/ml' lik dozda infliximab 5 dakika boyunca;

Grup C'ye ait 3 adet göze (göz no 7,8,9) aynı işlem 5 mg/ml dozunda infliximab 3 dk boyunca;

Grup D'ye ait 3 adet göze (göz no 10,11,12) aynı işlem 5 mg/ml infliximab 5 dk boyunca bekletilerek tekrarlandı (Resim 1).

Her grupta topikal infliximab uygulamasını takiben bölge 20 cc fizyolojik serum ile iyice yıkandı ardından konjonktiva 8/0 vicrille suture edilerek kapatıldı. Operasyon sonlandırılmadan önce profilaksi amaçlı antibiyotikli damla (tobramisin sülfat) damlatıldı. Her gözde sklera flebinin hazırlanması, yıkama işlemi, sutureasyon ve profilaktik antibiyotikli damla uygulanması standart bir yöntem olarak tekrarlandı.

Grup E'ye ait 3 gözde (göz no 13,14,15) 2mg/ml; **Grup F** ye ait 3 gözde (göz no 16,17,18) ise 5 mg/ml

Tablo 2. Deney gruplarının tüm hücre, fibroblast sayısı ve fibroblast/ hücre sayısı oranları

GRUPLAR	Hücre sayısı	Fibroblast	Fibroblast / hücre sayısı
Grup A 2mg/ ml 3dk	22,78±1,39	11,78±3,38	,5133±0,12
Grup B 2mg/ ml 5dk	22,36±1,96	8,91±2,11*	,3995±0,09*
Grup C 5mg/ ml 3dk	22,10±1,79	7,20±4,39*	,3257±0,20*
Grup D 5mg/ ml 5dk	21,64±1,43	2,91±0,83*	,1339±0,03*
Grup E sc 2 mg/ml	21,56±1,94	10,44±4,21	,4814±0,17
Grup F sc 5 mg/ml	23,44±1,59	9,00±2,06*	,3825±0,07*
Grup G Kontrol	22,60±1,71	14,70±3,65	,6470±0,13

* p<005 anlamlı

olarak hazırlanan infliximab 30 gauge steril insülin enjektörü yardımı ile cerrahi işlem standart olarak uygulamadan sonra subkonjonktival (sc) olarak yapıldı (Resim 2).

Grup G; kontrol grubu olarak alındı ve bu gruptaki 3 göze (göz no 19,20,21) sklera flebi kaldırıldıktan sonra hiçbir ilaç uygulaması yapılmaksızın sadece antibiyotik damlatılarak cerrahi sonlandırıldı.

Takiplerde tüm tavşan gözlerine 3 hafta boyunca her gün günde 3 defa tobramisin sülfat (Tobrased Bilim ilaç A.Ş.) damla damlatıldı. Kuvvetli ışık (pen-light) aydınlatması altında makroskopik olarak cerrahi alanda hiperemi, infeksiyon varlığı, ön kamara derinliği ve reaksiyon olup olmadığı değerlendirildi. Fotoğrafları çekildi. 3 haftanın sonunda tavşanlar intrakardiyak 1 ml pentobarbital enjekte edilerek sakrifiye edildi. Cerrahi uygulanan işaretlenmiş bölgeler bistüri yardımı ile eksize edilerek fosfat tamponlu %10'luk formaldehid solüsyonunda 48 saat süre ile tespit edildi. Genel topografyanın ortaya konularak doku-kesit düzleminin uygun şekilde belirlenmesi için ilk aşamada ışık mikroskopisi yapıldı. İkinci aşamada seçilen alanlar Bromodeoksiüridin (BrdU) ile boyandı ve hücre sayımı ışık mikroskopunda yapıldı.

Histolojik değerlendirme

Uygulanan TNF alfa'nın fibroblast aktivasyonu üzerindeki etkisi immünohistokimya yöntemi ile araştırıldı. Tüm işlemler İÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda yapıldı. Dokular, işlem sonrası çıkarıldıktan sonra BrdU içeren Dulbecco Modified Eagle's Medium ve F12 (1:1) ortamında 1 saat süreyle 37 0 C'de inkübe edildi. Daha sonra rutin dehidratasyon için alkol serilerinden geçirilen doku örnekleri, 560C'de 30 dk süreyle Toluol'da bekletildikten sonra parafin blokların ha-

zırlanması için 45 dk parafinle inkübe edildi. Parafin içinde bloklanan parçalardan 5 µm kalınlığında kesitler kesilerek, Poly-L-Lysine kaplanmış lamlara aktarıldı ve lamlar 1 gece süreyle 560C'de bekletildi. Kesitler deparafinize edildikten sonra sırasıyla %0,5 H2O2 solüsyonunda 20 dk, tripsinle 30 dk, HCl solüsyonunda 30 dk bekletildi. 0,1 M Boraks solüsyonu inkübasyonunu takiben 15 dk Ultra-V-Block'ta işleme tabi tutuldu. Daha sonra fare anti-BrdU primer antikorunda (mouse monoklonal antikor) nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. PBS (Phosphate buffer saline) ile yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antikorla (Biotinlylated Goat Anti-Mouse) 30 dk ve ardından streptavidin peroksidazla 30 dk bekletildi. Substrat-kromojenle (AEC Substrate System) 20 dk işlendikten sonra distile su ile yıkandı ve Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldı. Kesitlerin üzerine kapatıcı (Aqueous Ultramount) damlatılarak üzerleri lamel ile örtüldü. Hematoksilen ile çekirdek karşı boyaması yapıldı. BrdU ile pozitif boyanmış hücre çekirdeklerinin toplam hücre çekirdek sayısına oranı tespit edilerek proliferasyon indeksi hesaplandı (BrdU pozitif çekirdek sayısı/ toplam hücre sayısı x 100). Sayılan çekirdeklerin fibroblasta özgü morfolojiye sahip hücrelere ait olmasına özen gösterildi. Epitel hücreleri boyanmış olsa dahi sayılmadı (20).

İstatiksel değerlendirme

Herhangi bir ilaç uygulanmamış gözlerden oluşan kontrol grubu (grup G), TNF alfa'nın sklera flebi kaldırılıp sponja emdirilerek 2-5 mg/ml ve 3-5 dakika şeklinde uygulandığı gruplar (grup A, B, C, D) ve subkonjonktival uygulama (2-5 mg/ml) yapılan gruplar (grup E, F) ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bulguların istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 11.5 programı ile yapıldı. İstatistiksel analizde non-parametrik test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı p<0,05 alındı.

BULGULAR

A- Makroskopik bulgular

Cerrahi uygulanmış gözlerde 1. haftada operasyon alanında bölgesel hiperemi izlendi (Resim 3). 2 gözde topikal antibiyotik tedavisi ile gerileyen eksüstasyon görüldü. Ancak sakrifikasyon öncesi (3.haftada) hiçbir gözde reaksiyon görülmedi. Tüm gözlerde pupil ışık refleksi mevcut idi. Ön kamara derinlikleri normaldi ve ön kamara reaksiyonu izlenmedi. Hiçbir gözde doza ve süreye bağlı toksik etki gözlenmedi.

Üçüncü haftanın sonunda sakrifikasyon işlemi intrakardiyak 1 ml pentobarbital enjektörde gerçekleştirildi. Alınan materyaller gereç ve yöntemlerde anlatıldığı şekilde değerlendirildi.

B-Histolojik bulgular:

Infliximab'ın farklı dozaj ve sürede uygulanmasının fibroblastik aktivite üzerine olan etkisi histolojik olarak incelendi. Bu amaçla sklerada oluşturulan cerrahi yara bölgesi ve etrafındaki hücrelerin boyanma düzeyleri ve fibroblastik aktiviteleri değerlendirildi. Cerrahi işlem uygulanan alanda mitoz döngüsünün sentez evresindeki fibroblast hücrelerinin çekirdekleri, antikora bağlanmış kromojen boya ile kırmızı granüller içermekteydi. Tablo 2 ışık mikroskopisi ile cerrahi sahalarda BrdU boyaması altında fibroblast sayısını ve fibroblast sayısı/tüm hücre sayısını göstermektedir.

Histolojik kesitlerde fibroblast proliferasyon indeksinin yüksek olduğu preparatlarda yoğun kırmızı granüller yapı görülmekte idi (Resim 4). Bu bulgu uygulanan ilacın cerrahi sahada antiproliferatif etkisinin düşük olduğu şeklinde yorumlandı. Fibroblast proliferasyon indeksinin düşük, ilacın etkisinin yüksek olduğu gözlerde ise cerrahi sahada granül sayısında belirgin azalma gözlenmekteydi (Resim 5).

Histolojik kesitlerden BrdU ile boyalı fibroblast çekirdekleri ve tüm hücreler ışık mikroskopisi altında sayıldı. Her bir kesitten en az 5 değişik alanda hücreler sayılarak ortalama değerleri alındı. Ortamdaki tüm hücre sayısı kontrol grup (grup G) ile tedavi alan gruplar (A-F) arasında farklı bulunmadı ($p>0.05$). Grup G ile grup B (infiximab 2mg/ml 5dk), grup C (infiximab 5 mg/ml 3 dk), grup D (infiximab 5 mg/ml 5 dk), grup F (infiximab SC 5mg/ml) karşılaştırıldığında; fibroblast sayısı ve fibroblast sayısı / hücre sayısı oranı istatistiksel olarak anlamlı farklı saptandı ($p<0.05$). Bu değerlerde grup G ile grup A (infiximab 2mg/ml 3dk) ve grup E (infiximab SC 2mg/ml) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu ($p>0.05$).

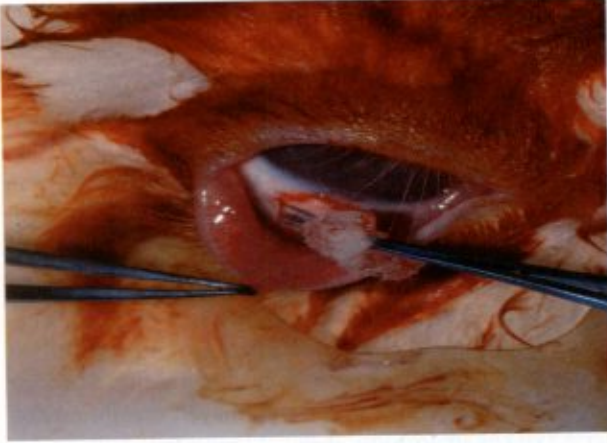
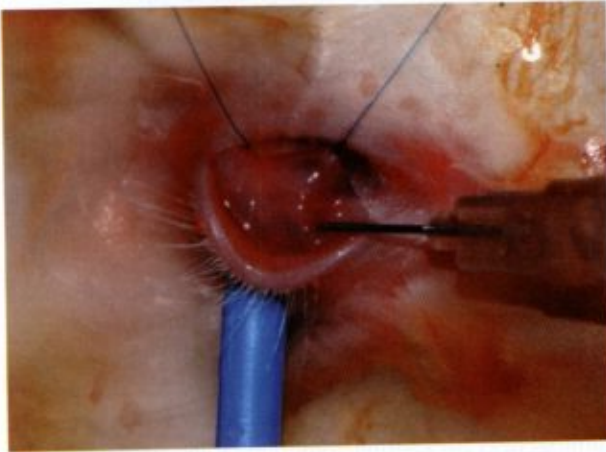
TARTIŞMA

Glokom filtrasyon cerrahisinin uzun süreli başarısında temel belirleyici faktör organizmada açılan cerrahi yaraya karşı iyileşme yanıtıdır (5,18). Glokom cerrahisinde filtran blebin kapanmasında ana neden konjonktiva altı boşlukta tenon dokusu fibroblastlarının proliferasyonu ve kollajen ile diğer ekstrasellüler materyalin sentezlenmesidir. Bu süreç sonunda oluşacak konjonktiva altı skar dokusu açılan filtran blebin kapanmasına neden olabilir (4,5,8).

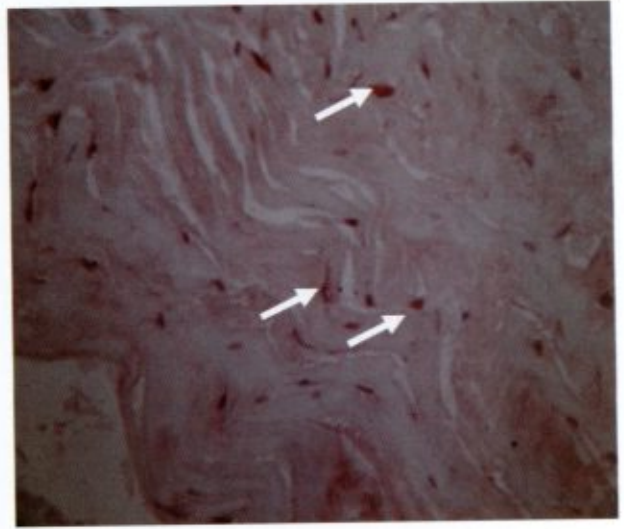
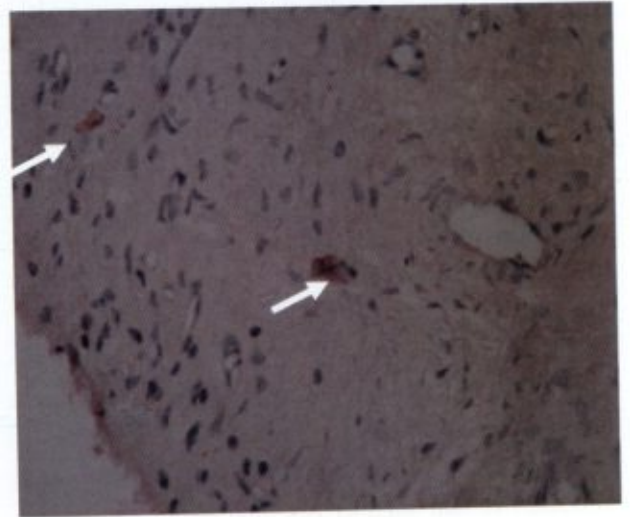
Cerrahi travmaya bağlı kanamaların yara iyileşmesini uyarıcı birçok faktörü ortama davet etmesi cerrahi sonrası gelişecek skar dokusunu artırabilir. Daha az travmaya yol açabilen penetran olmayan cerrahi tekniklerin (viskokanalostomi, derin sklerektomi) kullanılmasının yara iyileşme sürecini kontrol edebileceği düşünülsede de skarlaşma cevabından kaçınılamaz (21).

Cerrahi bir yaralanma sonrası dokuda yara iyileşme süreci, yaralanmadan hemen sonra hemostaz fazıyla başlayan ve 21.günden sonra yeniden şekillenme (remodeling) fazı ile süre gelen devamlı bir süreçtir (22). Bu süreç içinde büyüme faktörleri ve sitokinler görev alırlar. Normal yara iyileşmesi birçok hücre aktivitenin düzenli ve ardı ardına çalışmasına bağlıdır. Yeni damar oluşumu ve kollajen sentezi gibi önemli olaylar yaralanmadan 5 ila 21 gün arası oluşan proliferasyon safhasında gerçekleşmektedir. Bu dönemde aktif olan hücreler fibroblastlar ve endotel hücreleridir. Fibroblastlar kollajen sentezi yapan hücreler olup yaralanmadan birkaç gün sonra yara kenarında bulunurlar. Yeni damar oluşumu (anjiojeniz) ise kapiller tomurcuklanma ile gerçekleşir. İlk 3 haftadan sonra olgunluk fazı başlar ve bu süreç uzun zaman devam eder. Bu nedenle kullanılan ajanın fibroblastik aktiviteye etkisinin anlaşılabilmesi için özellikle proliferasyon fazında göstereceği etkinin bilinmesi gereklidir. Bu dönemde antiproliferatif etkili ajanların kullanımı glokom cerrahisinde cerrahi yetersizliğin azaltılması açısından hayati önem taşımaktadır (23).

Glokom cerrahisi sonrası ortaya çıkan skar dokusunu kontrol altına alabilmek amacıyla antifibrotik etkili çeşitli ajanlar kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan kortikosteroidlerin lokal inflamatuvar cevabı baskıladığı, hem deneysel hem de klinik olarak gösterilmiştir. Topikal kortikosteroidler trabekülektomi sonrası daha düşük GİB değerleri temin ederler (24). Ancak, uzun süreli steroid kullanımı gözde katarakt, sekonder enfeksiyona eğilim, herpes aktivasyonu, GİB'de artış gibi komplikasyonlara yol açabilir. Bu yan etkileri azaltmak amacıyla uygulanması gündeme gelen steroid olmayan antiinflamatuar ilaçların (NSAID) glokom cerrahisi sonuçları üzerine rolü ise kesinleşmemiştir (25).

Resim 1. İnfliximab emdirilmiş sponj yerleştirilmesi**Resim 2.** Subkonjonktival infliximab uygulanması**Resim 3.** 5mg/ml infliximab 5 dk uygulanan gözde postop 3. gün fotoğrafı

Günümüzde antifibrotik etki elde etmek amacıyla en sık kullanılan 5 FU ve MMC gibi antimetabolit ajan-

Resim 4. Yüksek boyanma gösteren kesit (proliferasyon indeksi yüksek, ilaç etkinliği düşük gözler) (Büyütme x 40)**Resim 5.** Düşük boyanma gösteren kesit (proliferasyon indeksi düşük, ilaç etkinliği yüksek gözler) (Büyütme x 40)

lar, filtrasyon cerrahisinin başarı oranını arttıran önemli destek kuvvet olmalarına rağmen selektif olmamaları ve uygulamaya bağlı görülen ciddi komplikasyonlarıyla iki kenarı keskin bir kılıca benzemektedirler (7,8,17). Bunun yanı sıra bu ajanlar uygulandıkları bölgede fibroblast aktivasyonunu etkilemeler bile komşu hücreler hala cerrahi yara sonrası ortama çıkan uyarıcılarla etkilenebilmektedir (26,27). Bu durum araştırmacıları normal yara iyileşme sürecinde fibrojenizi daha etkin kontrol edebilecek daha özellikli ve yan etkileri nispeten kabul edilebilir yeni ajanların arayışı içine sokmuştur. Bir bü-

yüme hormonu olan TGF- β , MMC'in etkisini engelleyebilecek kuvvette uyarıcı aktivite göstermektedir (28). Bu maddenin inhibisyonu ile filtran blebin ömrü uzatılabilir. Grisanti ve ark.(11) doğal TGF- β inhibitörü decorin'in tekrarlayan subkonjonktival uygulamasının glokom filtrasyon cerrahisi için oluşturulan tavşan modelinde skar önleyici etkisini göstermiştir. Büyüme faktörü aktivitesini suprese eden diğer ajanlar arasında, octreotide acetate (9) ve genistein (14) sayılabilir. Yine bir sitokin olan interferon- α 'nın fibroblastların skar oluşumunu azalttığı gösterilmesine rağmen, mevcut antimetabolitlerden daha iyi olduğu kanıtlanmamıştır (29). Mietz ve ark.(10) tavşan gözlerinde glokom filtran cerrahisi sırasında ve sonrasında topikal suramin uygulamasının da hedef bölgede çeşitli büyüme faktörlerini etkileyerek yara iyileşme yanıtını geciktirdiğini göstermişlerdir. Park ve ark (15) filtrasyon cerrahisi sonrası göze damlatılan siklosporin'in glokom drenaj implant cerrahisi sonuçları üzerinde olumlu etkisi olduğunu ileri sürmüşlerdir.

TNF alfa; TNF beta ile uyarılmış makrofajlar tarafından sentezlenen 157 amino asitli polipeptit yapısında proenflamatuvar bir sitokindir. Fibroblastlar için mitojenik özellik taşır, kollajen biyosentezini ve prostaglandin E-2 salınımını uyarır. In vitro olarak endotel proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir ancak anjiogenezi uyarıcı etkisini ikinci bir mesajcı yoluyla yaptığı sanılmaktadır. TNF α 'nın fibroblast aktivitesini uyardığı da gösterilmiştir (18,19). TNF alfa blokerleri kullanımı ile yara iyileşme sürecinin kontrol altında tutabileceği düşünülmektedir. Bu grup ilaçlar bir takım hastalıkların tedavi protokollerinde yer alırken, bazı hastalıklarda kullanımları deneysel aşamadır. Behçet hastalığı, psöriyazis, sarkoidoz, seronegatif spondiloartropatiler, inatçı çocukluk çağı üveitleri, poliartiküler juvenil idiyopatik artrit' de göz ve sistemik bulguların tedavisinde steroidlere alternatif kullanımı gündemdedir (30-35). TNF alfa blokerlerinin retinadaki diffüz subretinal fibrozisin önlenmesi ve deneysel koroid neovaskülarizasyonunun geriletilmesinde yeni damar oluşumunu (antianjiogenetik etki) engelleyici etkisi ortaya konulmuştur (36). Ancak TNF alfa blokajının konjonktiva ve tenonda açılan cerrahi yaranın iyileşme sürecinde bölgesel fibroblastların üzerine olan etkileri literatürde incelenmemiştir.

Çalışmamızda antiproliferatif ve antianjiogenetik etkileri olduğu bilinen bir TNF alfa blokeri infliximab (Remicade 100mg) farklı dozaj farklı süre ve farklı uygulama yolları ile kullanıldı. İnfliximab'ın sponja emdirilerek sklera üstünde 2 mg/ml dozunda 3 dk süreli topikal (düşük doz-kısa süre) ve 2mg/ml dozda SC tatbiki dışında tüm dozaj, süre ve uygulama yöntemlerinin yara iyileşmesi üzerinde engelleyici etkili olduğu, fibroblastik aktiviteyi anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi.

Daha yüksek dozlarda ve daha uzun süreli uygulamanın fibroblast proliferasyonunun engellenmesinde daha etkin sonuç verdiği gözlemlendi.

TNF alfa blokajının diğer antifibroblastik ajanlara (özellikle 5 FU ve MMC'ye) kıyasla oldukça düşük sistemik ve oküler yan etki profiline sahip olduğu bilinmektedir. Bu yan etkiler arasında göze ait kullanımını sınırlayacak çok fazla patolojinin olmaması ve topikal uygulamanın ön planda düşünülmesi gözdeki kullanımını artırıcı niteliktedir((37, 38).

Sonuç olarak glokom cerrahisinde antifibroblastik etkiye sahip olduğu düşünülen pek çok ajan klinik ve deneysel bazda uygulanmaktadır. Bunlar arasında en önemlileri olan antimetabolitlerin uzun süre devam eden etkileri ve hedef saha dışındaki "normal" komşu hücrelere de benzer etki göstermeleri glokom cerrahisinde kullanımlarını sınırlamaktadır. Çalışmamızda topikal ve subkonjonktival TNF alfa blokeri uygulamasının tenon ve konjonktiva fibroblastları üzerinde doza bağlı daha güçlü antifibroblastik etki göstermesi ve olası antianjiogenetik özellikleri bu ajanların gelecekte glokom cerrahisi sonuçlarının iyileştirilmesinde yeri olabileceğini düşündürmektedir. Çalışma sonuçlarımız bir ön araştırma olarak gelecekte daha geniş kapsamlı deneysel çalışmalara öncülük edebilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

1. Grehn F. Surgery of primary open angle glaucoma Klin Monatsbl Augenheilkd. 2008; 225(1): 30-8.
2. Souza C, Tran DH, Loman J, Law SK, Coleman AL, Caprioli J. Long-term outcomes of Ahmed glaucoma valve implantation in refractory glaucomas. Am J Ophthalmol. 2007;144(6): 893-900. Epub 2007 Oct 4.
3. Cairns JE. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. Am J Ophthalmol. 1968 Oct;66(4):673-9.
4. Migdal C, Gregory W, Hitchings RA: Long term functional outcome after early surgery compared with laser and medicine in open angle glaucoma. Ophthalmology 1994;101:1651- 1656.
5. Chang L, Crowston JG, Cordeiro MF, Akbar AN, Khaw PT. The Role of the Immune System in Conjunctival Wound Healing After Glaucoma Surgery Surv Ophthalmology 2000 45(1): 49-68.
6. Tello CA, Ahmed II, Khaw PT. Failed trabeculectomy. J Glaucoma. 2005 Dec;14(6):511-4.
7. Reinthal EK, Denk PO, Grüb M, Besch D, Bartz-Schmidt KU. Dose, timing and frequency of subconjunctival 5-fluorouracil injections after glaucoma filtering surgery. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007 Mar;245(3):369-75. Epub 2006 Oct 17.
8. Fontana H, Nouri-Mahdavi K, Lumba J, Ralli M, Caprioli J. Trabeculectomy with mitomycin C: outcomes and risk

- factors for failure in phakic open-angle glaucoma. *Ophthalmology*. 2006 Jun;113(6):930-6. Epub 2006 Apr 27.
9. Akyol N, Demir T, Cobanoglu B, Ulas F. Ciliary body toxicity of cyclosporin A and octreotide acetate in rabbit eyes: a comparison with mitomycin C and 5-fluorouracil. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2003) 241:816-822.
 10. Mietz H, Chévez-Barríos P, Feldman RM, Lieberman MW. Suramin inhibits wound healing following filtering procedures for glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1998;82:816-82.
 11. Grisanti S, Szurman P, Warga M, Kaczmarek R, Ziemszen F, Tatar O, Bartz-Schmidt KU. Decorin Modulates Wound Healing in Experimental Glaucoma Filtration Surgery: A Pilot Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46 (1):191-196.
 12. Khao D, Nguyen, Arthur T, Hoang, David A, Lee. Transcriptional control of human tenon's capsule fibroblast collagen synthesis in vitro by gamma-interferon. *Invest ophthalmol* 194;35:7 3064-369.
 13. Tina T. L. Wong, Anna L. Mead, and Peng T. Khaw. Matrix Metalloproteinase Inhibition Modulates Postoperative Scarring after Experimental Glaucoma Filtration Surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(3):1097-1103.
 14. Kim H, Peterson TG, Barnes S: Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role of its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *Am J Clin Nutrition* 1998, 68:1418S-1425S.
 15. Park KH, Kim DH, Youn DH. Cyclosporine C: a study of wound-healing modulation after trabeculectomy in rabbit. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*. 1998;(227):48-9.
 16. Chen CW, Huang HT, Blair JS, Lee CC. Trabeculectomy with simultaneous topical application of mitomycin C in refractory glaucoma. *J Ocul Pharmacol*. 1990;6:175-182.
 17. Hong SJ, Wu KY, Wang HZ, Lai YH. Toxic effects of mitomycin-C on cultured ciliary process cells and trabecular meshwork cells. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2001 Aug;17(4):331-42.
 18. Cordeiro MF, Siriwardena D, Chang L, Khaw PT. Wound healing modulation after glaucoma surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2000;11(2):121-6.
 19. Chang J, Girgis L. Clinical use of anti TNF-alpha biological agents-a guide for GPs. *Aust Fam Physician*. 2007;36:1035-8.
 20. Daniels JT, Ocleston NL, Crowston JG, Cordeiro MF, Alexander RA, Wilkins M, Porter R, Brown R, Khaw PT. Understanding and controlling the scarring response: the contribution of histology and microscopy. *Microsc Res Tech*. 1998;42:317-33.
 21. Dahan E, Drusedau MUH: Nonpenetrating filtration surgery for glaucoma: control by surgery only. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:695-701.
 22. Irvin TT. Wound healing. *Arch Emerg Med* 1985; 2(1): 3-10.
 23. Chang MR, Cheng Q, Lee DA. Basic science and clinical aspects of wound healing in glaucoma filtering surgery. *J Ocul Pharmacol Ther*. 1998;14:75-95.
 24. Araujo SV, Spaeth GL, Roth SM, et al: A ten-year follow-up on a prospective, randomized trial of postoperative corticosteroids after trabeculectomy. *Ophthalmology* 1995; 102:1753-1759.
 25. Flower, R.J. and Bleckwell, G.J. Anti-inflammatory steroids induced biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation.
 26. Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol*. 2003; 48(3):314-46.
 27. Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2003; 48 (3): 314-66.
 28. Cordeiro MF, Bhattacharya SS, Schultz GS, Khaw PT. TGF beta 1, beta2 & beta 3 in vitro: biphasic effects on tenon's fibroblast contraction, proliferation and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41:756-763.
 29. Gillies MC, Brooks AMV, Young S, et al: A randomized phase II trial of interferon- alpha2b versus 5-fluorouracil after trabeculectomy. *Aust NZ J Ophthalmol* 1999;27:37-44.
 30. Melikoglu M, Fresko I, Mat C, Ozyazgan Y, Gogus F, Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H. Short-term trial of etanercept in Behçet's disease: a double blind, placebo controlled study. *J Rheumatol*. 2005 Jan;32(1):98-105.
 31. Suhler EB, Smith JR, Wertheim MS, Lauer AK, Kurz DE, Pickard TD, Rosenbaum JT. A prospective trial of infliximab therapy for refractory uveitis: preliminary safety and efficacy outcomes. *Arch Ophthalmol*. 2005 Jul;123(7):903-12.
 32. Ali A, Samson CM. Seronegative spondyloarthropathies and the eye. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007 Nov;18(6):476-80.
 33. Mangge H, Heinzl B, Grubbauer HM, El-Shabrawi Y, Schauenstein K. Therapeutic experience with infliximab in a patient with polyarticular juvenile idiopathic arthritis and uveitis. *Rheumatol Int*. 2003 Sep;23(5):258-61.
 34. Katz JM, Bruno MK, Winterkorn JM, Nealon N. The pathogenesis and treatment of optic disc swelling in neurosarcoidosis: a unique therapeutic response to infliximab. *Arch Neurol*. 2003 Mar;60(3):426-30.
 35. Durrani OM, Reuser TQ, Murray PI. Infliximab: a novel treatment for sight-threatening thyroid associated ophthalmopathy. *Orbit*. 2005 Jun;24(2):117-9.
 36. Adán A, Sanmartí R, Burés A, Casaroli-Marano RP. Successful treatment with infliximab in a patient with Diffuse Subretinal Fibrosis syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2007 Mar;143(3):533-4. Epub 2006 Nov 28.
 37. Scheinfeld NA. comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J Dermatolog Treat*. 2004; 15(5):280-94.
 38. Giansanti F, Ramazzotti M, Vannozzi L, et al. A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Mar;49(3):1151-6.