



**T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**POST-TRAVMATİK PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ  
ÜZERİNE TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ  
NİNTEDANİB'İN ETKİSİ**

**Dr. Elif ARSLAN**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA  
2022**



**T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**POST-TRAVMATİK PROLİFERATİF VİTREORETİNOPATİ  
ÜZERİNE TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ  
NİNTEDANİB'İN ETKİSİ**

**Dr. Elif ARSLAN**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Faruk ÖZTÜRK**

**ANKARA  
2022**

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde tüm bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Faruk ÖZTÜRK'e, çalışmanın histolojik ve immünohistokimyasal analizlerindeki değerli katkılarından ötürü Prof. Dr. Sevda MÜFTÜOĞLU ve Dr. Serkan TÜRELİ'ye, gösterdiği özveri ve titizliği için Dr. Ecz. Burcu ÜNER'e, çalışmanın istatistiksel analizler aşamasında yardımcı olan Esra ARSLANOĞLU'na, engin bilgi ve tecrübeleriyle uzmanlık eğitimimde emeği geçen tüm saygıdeğer hocalarıma, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm çalışma arkadaşlarıma, bu tez çalışması ile noktaladığım uzmanlık eğitimimde emeği geçen tüm Hacettepe Göz Hastalıkları ailesine, her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı gerçekleştirmem için destekte bulunan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Proje Birimine (BAP) teşekkür ederim.

## ÖZET

**Arslan E., Post-Travmatik Proliferatif Vitreoretinopati Üzerine Tirozin Kinaz İnhibitörü Nintedanib'in Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022.**

Proliferatif vitreoretinopati (PVR), regmatojen retina dekolmanı cerrahisi başarısızlığının en yaygın nedenidir ve oküler travmanın ciddi bir komplikasyonudur. Vitreus boşluğu ile retina yüzeyinin her iki tarafında hücresel membranların büyümesi ve kontraksiyonu ile karakterizedir. Günümüzde PVR için kabul edilen standart tedavi cerrahidir. Ancak cerrahi tekniklerdeki gelişmelere rağmen anatomik ve görsel sonuçlar tatmin edici değildir. Bunun yanı sıra PVR'nin tedavisi ve önlenmesi için kanıtlanmış bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır.

Çalışmamızda tavşan gözlerinde oluşturulan PVR modeli üzerinde intravitreal nintedanibin PVR oluşumunu engellediği klinik gözlem, histolojik inceleme ve immünohistokimyasal yöntemler ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 12 adet tavşan kontrol ve nintedanib olarak iki gruba ayrılmıştır. Genel anestezi altında her tavşanın bir gözüne 23G iğne yardımı ile delinme yaralanmasına neden olacak şekilde retinası hasarlanmış ve hemen üzerine dispaz solüsyonu enjekte edilmiştir. PVR modelinin oluşturulmasının ardından kontrol grubuna ait deneklerin midvitreusuna fosfat tamponlu salin (PBS), nintedanib grubuna ait olanlara %0,5'lik lipozomal nintedanib enjeksiyonu yapılmıştır. Deneklere dört hafta boyunca haftalık fundus muayenesi yapılmış ve dördüncü haftanın sonunda gözler enükle edilerek histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. PVR modeli oluşturulmamış 2 adet tavşanın her iki gözüne % 0,5'lik nintedanib enjekte edilmesinin ardından; 1, 7, 14 ve 35. günlerde vitreus örnekleri alınarak HPLC yöntemi ile vitreustaki ilaç düzeyi tayin edilmiştir. Çalışmanın sonunda nintedanib uygulanan grupta belirlenen PVR evreleri düşük bulunsa da, kontrol grubuna kıyasla aralarında anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p=0,108$ ). Histolojik incelemelerde ise epiretinal membran oluşumlarının nintedanib uygulanan grupta belirgin bir toksik etki gözlenmeden daha az meydana geldiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra immünohistokimyasal incelemelerde nintedanib uygulanan grupta kontrol grubuna göre kolajen-1 ekspresyonu için ölçülen intensite ve CTCF (Düzeltilmiş Total Hücre Floresansı) değerleri anlamlı düşük bulunmuştur ( $p=0,004$ ,  $p=0,004$ ). CTCF/alan değeri ise sınırdan anlamlı sayılabilecek düzeyde

nintedanib grubunda daha düşük saptanmıştır ( $p=0,065$ ). Nintedanib yüklü lipozom formülasyonlarının ise ilk 7 günde yaklaşık yarısını vitreus kısmına verdiği ama tamamını salmasının 25 günden daha uzun sürdüğü tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre nintedanibin belirgin bir yan etki gözlenmeden PVR oluşumunu engelleyebildiği gösterilmiştir. Bu çalışma nintedanibin PVR tedavisi ve profilaksisinde kullanılabilecek potansiyel bir ilaç olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Proliferatif vitreoretinopati, Nintedanib, Lipozomal Nintedanib



**Destekleyen Kuruluşlar:** Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi THD-2021-19176

## ABSTRACT

**Arslan E., The Effect of Tyrosine Kinase Inhibitor Nintedanib on Post-Traumatic Proliferative Vitreoretinopathy, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Ophthalmology, Ankara, 2022.**

Proliferative vitreoretinopathy (PVR) is the most common cause of rhegmatogenous retinal detachment surgery failure and is a serious complication of ocular trauma. It is characterized by growth and contraction of cellular membranes on both sides of the vitreous cavity and the retinal surface. Currently, the accepted standard treatment for PVR is surgery. However, despite the advances in surgical techniques, anatomical and visual results are unsatisfactory. In addition, there is no proven pharmacological agent for the treatment and prevention of PVR.

In our study, it was aimed to demonstrate that intravitreal nintedanib prevents PVR formation on the PVR model induced in rabbit eyes by clinical observation, histological examination and immunohistochemistry. For this purpose, 12 rabbits were divided into two groups as control and nintedanib. Under general anesthesia, one eye of each rabbit was injured with a 23G needle, causing a puncture injury, and dispase solution was injected just above it. After the induction of the PVR animal model, phosphate buffered saline (PBS) was injected into the midvitreus of the rabbits in control group and 0.5% liposomal nintedanib was injected into the midvitreus of the rabbits in nintedanib group. The rabbits were examined weekly for four weeks, and at the end of fourth week, the eyes were enucleated for histological and immunohistochemical assessment. After injecting 0.5% nintedanib into both eyes of 2 rabbits whose PVR model was not induced; Vitreous samples were taken on the 1st, 7th, 14th and 35th days and the drug level in the vitreous was determined by HPLC method. As a result, although the PVR stages determined in nintedanib group were low, there was no significant difference between nintedanib and control group ( $p=0,108$ ). In histological evaluation, it was observed that epiretinal membrane formations were less common in nintedanib treated group, without any significant toxic effect. Additionally, immunohistochemistry revealed that the intensity and CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence) values measured for collagen-1 expression were found significantly lower in nintedanib group compared

to the control group ( $p=0,004$ ,  $p=0,004$ ). The CTCF/area value was lower in nintedanib group, which could be considered borderline significant ( $p=0,065$ ). It was determined that nintedanib loaded liposome formulation gave about half of them to the vitreous part in the first 7 days, but it took longer than 25 days to release all of them. According to these findings, it was shown that nintedanib could prevent PVR formation without any significant side effects. This study shows that nintedanib is a potential drug that can be used in the treatment and prophylaxis of PVR.

**Keywords:** Proliferative vitreoretinopathy, Nintedanib, Liposomal Nintedanib



**Supported by:** Hacettepe University Scientific Research Projects (BAP)  
Coordination Unit THD-2021-19176

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	ii
<b>ÖZET</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vii
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xi
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Retinanın Anatomik ve Histolojik Yapısı	3
2.1.1. Nörosensöriyel Retina	3
2.1.2. Retina Pigment Epiteli	5
2.2. Vitreus Anatomisi ve Fizyopatolojisi	6
2.3. Proliferatif Vitreoretinopati	8
2.3.1. Proliferatif Vitreoretinopati Patogenezi	10
2.3.2. Proliferatif Vitreoretinopatide Hücresel Elemanlar ve Büyüme Faktörleri	10
2.3.3. Proliferatif Vitreoretinopati Sınıflandırılması	13
2.3.4. Proliferatif Vitreoretinopatide Tedavi	15
2.3.4.1. Cerrahi Tedavi	15
2.3.4.2. Medikal Tedavi	16
2.4. Nintedanib	19
2.5. Deneysel PVR Modelleri	22
2.5.1. İn Vitro	22
2.5.2. İn Vivo	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Lipozom İçerikli %0,5 Nintedanib Solüsyonunun Hazırlanması	24
3.2. Deney Modelinin Oluşturulması	24
3.3. Oftalmolojik Muayene	27
3.4. Vitreus Örneklerinin Alınması	27
3.5. Nintedanibin HPLC Analiz Prosesi	28
3.5.1. HPLC Analizi	28
3.5.2. Nintedanib'in Stok Solüsyonları Hazırlanarak Kalibrasyonunun Yapılması	28
3.5.3. HPLC Analizine Örnek Hazırlama	29
3.6 Doku Örneklerinin İncelenmesi	29
3.6.1. Göz Küresi Hematoksilen ve Eozin Boyama	29
3.6.2. Göz Küresi Trikrom Boyama	29
3.6.3. Göz Retinasında İmmünfloresan İşaretleme	30
3.7. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	32
4.1. Oftalmolojik Muayene Bulguları	32
4.2. Histolojik İnceleme	36
4.2.1. Trikrom Boyamada Histolojik Bulgular	37
4.2.2. İmmünohistokimyasal İnceleme Bulguları	40
4.3. HPLC Metodu ile Vitreustan İlaç Düzeyi Tayini	45
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	53
7. KAYNAKLAR	54

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>5-FU</b>	: 5-Florourasil
<b>ARVO</b>	: The Association For Research In Vision And Ophthalmology
<b>C<sub>3</sub>F<sub>8</sub></b>	: Perfloropropan
<b>CSF</b>	: Koloni Stimüle Edici Faktör
<b>CTCF</b>	: Düzeltilmiş Total Hücre Floresansı
<b>DMAH</b>	: Düşük Molekül Ağırlıklı Herparin
<b>EGF</b>	: Epidermal Büyüme Faktörü
<b>EMD</b>	: Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm
<b>ERG</b>	: Elektoretinografi
<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>FGFR</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>FVC</b>	: Zorlu Vital Kapasite
<b>G-CSF</b>	: Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör
<b>HGF</b>	: Hepatosit Büyüme Faktörü
<b>HPLC</b>	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
<b>HÜDHAM</b>	: Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
<b>IFN-β</b>	: İnterferon-β
<b>IFN-γ</b>	: İnterferon-γ
<b>IL-1</b>	: İnterlökin-1
<b>IL-10</b>	: İnterlökin-10
<b>IL-6</b>	: İnterlökin-6

<b>IL-8</b>	: İnterlökin-8
<b>ILM</b>	: İç Limitan Membran
<b>İPF</b>	: İdiyopatik Pulmoner Fibrozis
<b>Lck</b>	: Lenfosit Özgü Tirozin Protein Kinaz
<b>MHC II</b>	: Majör Doku Uyumluluk Sınıf II
<b>NV</b>	: Neovaskülarizasyon
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Salin
<b>PDGF</b>	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
<b>PDGFR</b>	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>PPV</b>	: Pars Plana Vitrektomi
<b>PVD</b>	: Posterior Vitre Dekolmanı
<b>PVR</b>	: Proliferatif Vitreoretinopati
<b>RD</b>	: Retina Dekolmanı
<b>RPE</b>	: Retina Pigment Epiteli
<b>RRD</b>	: Regmatojen Retina Dekolmanı
<b>SF<sub>6</sub></b>	: Kükürt Heksaflorür
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü $\beta$
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktörü $\alpha$
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>VEGFR</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>VO</b>	: Vazo-Obliterasyon

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Retinanın histolojik yapısı. ....	4
Şekil 2.2.	Vitreus anatomisi. ....	7
Şekil 2.4.	Nintedanibin kimyasal yapısı. ....	21
Şekil 3.1.	Deneyin uygulanışı ..... 25	25
Şekil 3.2.	Normal tavşan fundusu ve uygulama sonrası ..... 26	26
Şekil 4.1.	Tavşanlarda ön segment bulguları..... 34	34
Şekil 4.2.	Tavşanların fundus görüntüleri..... 34	34
Şekil 4.2.	<b>devamı.</b> Tavşanların fundus görüntüleri..... 35	35
Şekil 4.3.	Gross Anatomi..... 36	36
Şekil 4.4.	Kontrol grubuna ait denekte retina (☆) önünde yerleşim gösteren fibröz bant (→), Masson trikrom, 40x magnifikasyon (Denek numarası K4)..... 38	38
Şekil 4.5.	Kontrol grubuna ait denekte retina (☆) önünde yerleşim gösteren fibröz bant (→), Masson trikrom, 40x magnifikasyon (Denek numarası K5)..... 38	38
Şekil 4.6.	Nintedanib grubuna ait denekte retina önünde fibröz bant (epiretinal membran) izlenmedi, retina altında incelmış koryokapiller tabaka, Masson trikrom, 40x magnifikasyon (Denek numarası N2)..... 39	39
Şekil 4.7.	Nintedanib grubuna ait retina önünde fibröz bant (epiretinal membran) izlenmedi, retina altında incelmış koryokapiller tabaka, Masson trikrom, 100x magnifikasyon (Denek numarası N4) ..... 39	39
Şekil 4.8.	PVR modeli oluşturulmuş gözlerde Kolajen-1 ekspresyonunun gösterilmesi için immünohistokimyasal boyama: A)Denek numarası K5; B)Denek numarası N2. .... 44	44
Şekil 4.9.	Enjeksiyon sonrası günlere göre vitreustaki Nintedanib düzeyi..... 45	45

## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b>	Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi Sınıflaması (1983) .....	13
<b>Tablo 2.2.</b>	Silikon Çalışma Grubu Sınıflaması .....	14
<b>Tablo 2.3.</b>	Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi Sınıflaması (1991) .....	14
<b>Tablo 3.1.</b>	DeneySEL PVR için Fastenberg Sınıflaması .....	27
<b>Tablo 4.1.</b>	Deneklerin haftalara göre Fastenberg Sınıflaması evreleri: .....	32
<b>Tablo 4.2.</b>	Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan gruplarda evre dağılımı .....	33
<b>Tablo 4.3.</b>	Kontrol ve Nintedanib uygulanan grubun İmmünohistokimyasal bulguları ve Fastenberg Sınıflaması evresi .....	40
<b>Tablo 4.4.</b>	Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grubun ölçülen intensite düzeyi açısından karşılaştırılması .....	41
<b>Tablo 4.5.</b>	Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grubun CTCF düzeyi açısından karşılaştırılması .....	41
<b>Tablo 4.6.</b>	Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grubun CTCF/alan düzeyi açısından karşılaştırılması .....	42
<b>Tablo 4.7.</b>	Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grubun Fastenberg evreleri ile Ölçülen intensite, CTCF ve CTCF/alan arasındaki korelasyon analizi sonuçları .....	43
<b>Tablo 4.8.</b>	Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grupların ölçülen intensite düzeyleri ile CTCF ve CTCF/alan arasındaki korelasyon analizi sonuçları .....	44

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Proliferatif vitreoretinopati (PVR), regmatojen retina dekolmanı (RRD) cerrahisi başarısızlığının en yaygın nedenidir ve oküler travmanın ciddi bir komplikasyonudur. Vitreus boşluğu ile retina yüzeyinin her iki tarafında hücresel membranların büyümesi ve kontraksiyonu ile karakterizedir. Bu membranların kontraksiyonu, retinanın yeniden ayrılmasına ve regmatojen bir dekolmanın traksiyonel bir dekolmana dönüşmesine neden olabilir (1–4). Tüm retina dekolmanı vakalarında PVR insidansının %5 ila %10 arasında olduğu tahmin edilmektedir (5,6). Son 25 yılda vitreoretinal cerrahi tekniklerdeki gelişmelere rağmen, yapılan prospektif çalışmalarda PVR insidansı büyük ölçüde değişmeden kalmıştır. Hücresel proliferasyonu önlemek için adjuvan tedavilerin kullanılması, cerrahi sonrası PVR'nin veya nükslerin önlenmesi için umut vadetmektedir (7).

PVR'nin öncelikle inflamatuvar, retina ve retina pigment epiteli (RPE) hücreleri tarafından yönlendirilen anormal bir yara iyileşme yanıtı olduğu düşünülmektedir. PVR patogenezini anlamaya yönelik son çalışmalar, hastalığa katkıda bulunan hücresel olayları bloke etmek için birkaç yeni terapötik hedefin belirlenmesine yardımcı olmuştur. Sitokinler ve büyüme faktörleri, PVR patogenezinde ana oyuncular olarak kabul edilir (4,8).

PVR oluşumunun önlenmesi veya tedavisi için birçok anti-proliferatif ve anti-neoplastik ajan ile çalışma yapılmıştır. 5-fluorourasil (5-FU), fibroblast proliferasyonunu engelleyen bir antimetabolittir ve PVR tedavisi için en çok test edilen bileşiklerden biri olmuştur. 5-FU, hayvan modellerinde faydalı sonuçlar göstermesine karşın insanlarda önemli yan etkileri sebebiyle olumsuz sonuçlar vermiştir (8).

Nintedanib (BIBF1120), 2014 yılında FDA tarafından İdiopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) tedavisinde onaylanan ilk tirozin kinaz inhibitörüdür (9). Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörü- $\alpha$  ve - $\beta$ , fibroblast büyüme faktörü (FGF) reseptörü-1–3 ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) reseptörü-1–3'ü hedefleyen küçük molekülü bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Ayrıca Src ailesi kinaz lenfositöze özgü tirozin protein kinazı (Lck), koloni uyarıcı faktör (CSF)-1 reseptörünü

ve medyan inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri <100 nM olan diğer 20 kinazı inhibe eder (10).

Nintedanib ile retinal hücre kültürleri ve deney hayvanları üzerinde yeni yapılmış bir takım çalışmalar mevcuttur. Nintedanibin retina endotel hücreleri veya uzun süreli kültive edilmiş ARPE-19 hücreleri (ölümsüz retina pigment epiteli hücreleri) tarafından oluşturulan VEGF-A165 ile indüklenen bariyer bozukluklarını tamamen geri döndürdüğü gösterilmiştir (11). İnsan RPE hücrelerinden hazırlanan nekrotik hücre lizatının, RPE hücrelerinden VEGF salımını önemli ölçüde arttırdığını ve bu etkinin, nintedanib tarafından zayıflatıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca nintedanibin yaşa bağlı maküla dejenerasyonu modeli oluşturulmuş farelerde koroidal neovaskülarizasyon gelişimini hafiflettiği de gözlemlenmiştir (12). Nintedanibin oral veya intravitreal uygulanmasıyla ratlarda oluşturulmuş iskemik retinal vazo-obliterasyon (VO) modelinde vazo-obliterasyonu arttırmadığı, neovaskülarizasyon (NV) modelinde normal retinal vaskülarizasyonu hızlandırdığı, preretinal NV'ü güçlü şekilde azalttığı gösterilmiştir (13). Yine İPF tedavisinde 2014 yılında FDA tarafından onaylanan diğer antifibrotik ajan olan Pirfenidon ile yapılmış çalışmada tavşanlarda oluşturulmuş post-travmatik PVR modeli üzerine intravitreal Pirfenidon uygulamasının PVR oluşumunu engellediği gösterilmiştir (14).

Bu çalışmamızda travma sonrası PVR oluşumu üzerine intravitreal yolla uygulanan multikinaz inhibitörü nintedanibin etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Nintedanibin PVR oluşumunu daha spesifik yollar üzerinden inhibe edebileceğinin klinik değerlendirme ve derecelendirme, histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler ile gösterilmesi hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Retinanın Anatomik ve Histolojik Yapısı

Retina, embriyolojik olarak ön beynin bir çıkıntısı olan optik vezikülden köken alır. Kalınlığı bulunduğu lokalizasyona göre değişiklik gösterir. Optik sinir yakınındaki papillomaküler demette en kalın (0.23 mm), foveola (0.10 mm) ve ora serratada (0.11 mm) en incedir. Anatomik olarak santral retina (maküla) ve periferik retina olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Maküla yaklaşık 5.5 mm çapındadır ve optik sinir başı ile temporal vasküler arkadlar arasında yer alır. Periferik retinada tek sıra ganglion hücre tabakası bulunurken, makülada iki veya daha fazla ganglion hücre tabakası bulunur. Maküla topografik olarak umbo, foveola, fovea, parafovea ve perifovea bölümlerinden oluşur. Foveal avasküler bölgenin konumu yaklaşık olarak foveola ile aynıdır. Merkezden perifere doğru gidildikçe rod ve kon fotoreseptörlerinin yoğunluğu azalır (15).

Retina, nörosensöriyel (duyusal) retina ve RPE olmak üzere iki kısımda incelenir. Nörosensöriyel retinanın en dış tabakası ile RPE arasında potansiyel bir boşluk bulunur (subretinal boşluk) ve retina dekolmanında gözlenen ayrılma bu düzlemedir (15).

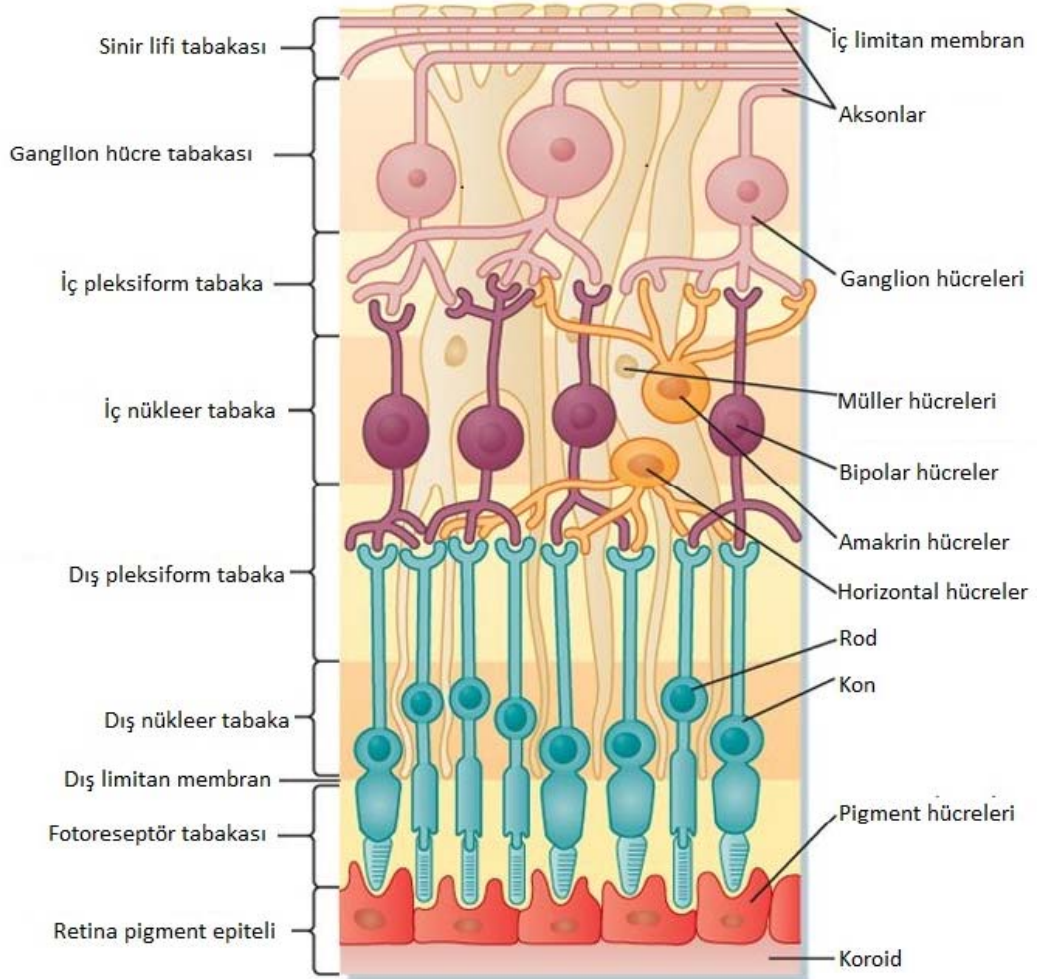
#### 2.1.1. Nörosensöriyel Retina

Nörosensöriyel retina, optik kabın iç tabakasından gelişen ince, şeffaf bir yapıdır. Nöronal, glial ve vasküler elemanlardan oluşur. Nöronal elemanlar; özelleşmiş nöroepitelyal hücreler rod ve konlar, horizontal, bipolar, amakrin ve ganglion hücrelerdir. Glial elemanlar; Müller hücreleri, fibröz ve protoplazmik astrositler ile mikroglialardır. Müller hücrelerin nükleusları iç nükleer tabakada bulunur. Diğer glial elemanlar ile birlikte retinaya yapısal destek sağlanması ve retinanın beslenmesinden sorumludur. Ayrıca iç kan-retina bariyerine katkıda bulunurlar. Vasküler elemanlar ise serebral kan damarlarına benzerlik gösteren retinal arter ve venlerdir. İç kan-retina bariyeri tek katlı, penceresiz endotelyal hücreler tarafından oluşturulur. Retina damarları koroid damarlarının aksine dikotom dallanma

gösterir. Ayrıca retina arterleri diğer arterlerle kesişmez; benzer durum retina venlerinde de mevcuttur (15,16).

Nörosensöriyel retina sırasıyla içten dışa doğru şu tabakalardan oluşur (Şekil 2.1):

- İç limitan membran
- Sinir lifi tabakası
- Ganglion hücre tabakası
- İç pleksiform tabaka
- İç nükleer tabaka
- Dış pleksiform tabaka
- Dış nükleer tabaka
- Dış limitan membran
- Fotreseptör tabakası



Şekil 2.1. Retinanın histolojik yapısı.

Retinanın vasküler beslenmesi için iç retina ve dış retinanın kaynakları farklıdır. Dış pleksiform tabaka ile başlayan dış retina tabakalarının oksijen ihtiyacı koroid dolaşımından sağlanır. İç retina tabakaları ise oftalmik arterin bir dalı olan santral retinal arterden sağlanır. Yaklaşık %18-32 oranında görülen, siliyer dolaşımdan köken alan silioretinal arter de iç retinanın bir kısmını besler. Retinadaki venüller arteriyolleri izler ve santral retinal veni oluşturarak optik sinirden gözü terkederler (15).

### 2.1.2. Retina Pigment Epiteli

Retina pigment epiteli, optik kabın dış tabakasından köken alan tek katlı hegzagonal pigmentli hücrelerdir. Siliyer cisim ve irisin pigment epiteli ile devamlılık gösterir. RPE hücreleri makülada perifere göre daha uzun ve daha yoğundur. RPE hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, koryokapillaristen difüzyona karşı bir bariyer görevi görür ve dış kan-retina bariyerini oluşturur. Işığı absorbe eden melanozomlara sahiptir (16).

Bir fetüsün gözü 4 ila 6 milyon RPE hücresi içerir. Gözün yüzey alanı yaşla birlikte önemli ölçüde artmasına rağmen, RPE hücrelerinin sayısındaki artış nispeten küçüktür. Normal yetişkin gözünün RPE'nde mitotik figürler görülmez (15).

RPE'nin görevleri:

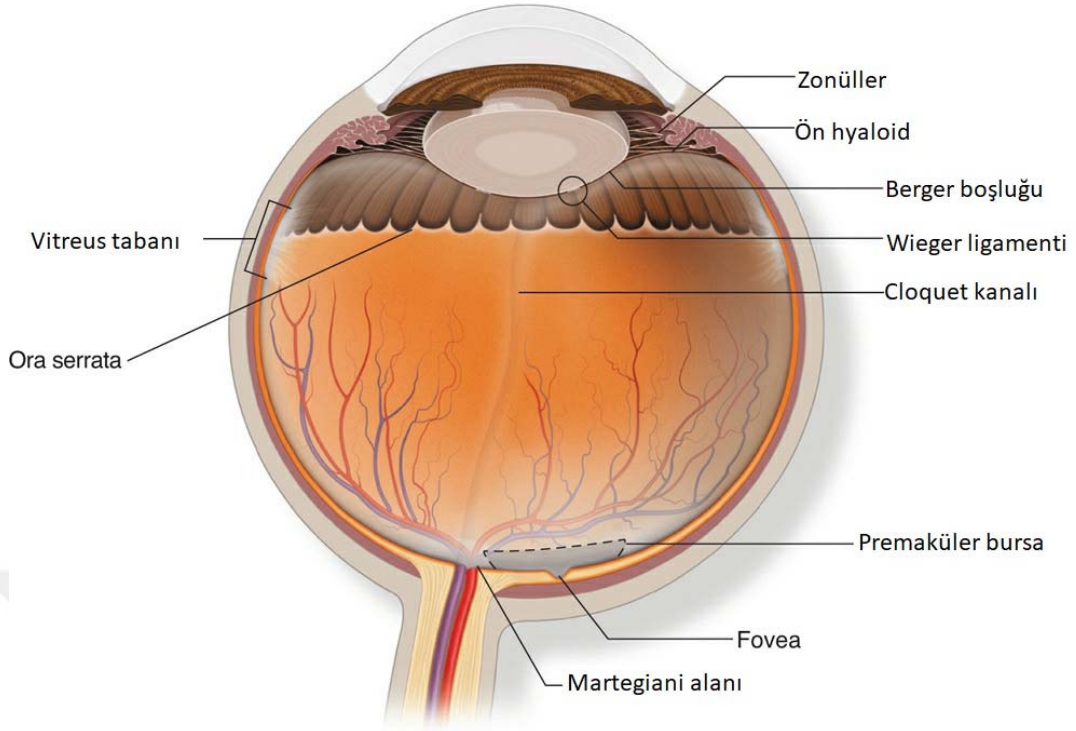
- A vitamini metabolizması
- Dış kan-retina bariyerinin oluşturulması
- Işığın absorpsiyonu
- Fotoreseptör dış segment fagositozu
- Bruch membranı bazal laminasının oluşumu
- Dış segmentleri çevreleyen mukopolisakkarit matriksinin üretimi
- Retina adezyonunun korunması
- Moleküllerin RPE içine ve dışına aktif taşınması
- Subretinal boşluğun korunması

- Yara dokusunun iyileşmesi ve skar oluşumu
- Vizüel pigmentin yenilenmesi ve geri dönüşümü

RPE hücreleri PVR patogeneğinde önemli role sahiptir. Matür RPE hücreleri, fizyolojik koşullarda mitotik aktivite göstermez; ancak nörosensöriyel retina hasara uğradığında epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) geçirerek çoğalmaya başlar (17,18).

## 2.2. Vitreus Anatomisi ve Fizyopatolojisi

Vitreus esas olarak %99'u sudan oluşan, bunun yanı sıra kolajen ve hyaluronik asit (hyalüronan) de içeren; göz hacminin %80'ini kaplayan şeffaf bir jeldir. Hacmi yaklaşık 4.0 ml'dir. Vitreus, kor (santral) ve kortikal (periferal) vitreus olmak üzere 2 ana topografik alana ayrılır. Vitreus korteksi, kor vitreusu çevreleyen ve daha yüksek bir kolajen konsantrasyonuna sahip olan ince bir tabakadır (100–300 µm). Ön vitreusun retrolental girintisine patellar fossa denir. Wieger ligamenti (hyaloideokapsüler ligament), vitreusun lens arka kapsülüne tutunduğu halka şeklinde (1-2 mm genişliğinde ve 8-9 mm çapında) bölgedir. Arka lens kapsülünün periferi ile Wieger ligamenti tarafından sınırlanan anterior kortikal jel arasındaki potansiyel boşluğa Berger boşluğu denir. Primer vitreus kalıntısı olan Cloquet kanalı bu boşluktan çıkar ve kor vitreus boyunca arkaya doğru ilerler. Cloquet kanalı, arkada Martegiani alanı olarak bilinen optik diskin önünde huni şeklinde bir bölgeye açılır. Premaküler bursa (prekortikal vitreus cebi) vitreus jelinin belirgin bir likefaksiyon alanıdır (Şekil 2.2) (16).



**Şekil 2.2.** Vitreus anatomisi.

Vitreus jeli hidratlı hyalüronik asit molekülleri ile ayrılan kolajen fibrillerinden oluşur. Vitreus kolajenleri, hyalin kıkırdak kolajenleri ile yakından ilişkilidir. Vitreusta bulunan başlıca kolajen Tip II'dir, bunun yanı sıra Tip V/XI ve Tip IX da bulunur (19). Özellikle vitreus tabanında ve kortikal vitreusta kolajen lifleri yoğundur. Vitreus retinaya en sıkı şekilde vitreus tabanında tutunur. Ayrıca lens arka kapsülünün periferine, retina damarlarına, optik sinir başı kenarına ve perimaküler bölgeye de sıkıca tutunma gösterir. Vitreus, fibronektin ve laminin adhezyon molekülleri aracılığıyla iç limitan membrana (ILM) bağlanır. Periferik vitreustaki yoğun kolajen lifleri, arka kutbun üzerinde arka hyaloid olarak da bilinen kortikal vitreusu oluşturur. Vitreoretinal arayüz, arka hyaloidin kollajen lifleri ile ILM arasında bulunur (20).

Vitreusun 2 ana yapısal bileşen olan kolajen ve hyalüronik aside ek olarak, kolajen olmayan birkaç yapısal protein ve glikoprotein de tanımlanmıştır. Bunlar kondroitin sülfat (versican), optisin, VIT1 ve fibrillindir. İnsan vitreusu ayrıca hyalüronidaz ve en az bir adet matriks metalloproteinaz (MMP-2 veya jelatinaz) da içerir, bu da vitreus yapısal makromoleküllerin devrinin (turn-over) meydana gelebileceğini destekler (15). Kondroitin sülfat da hyalüronik asit gibi bir

glukozaminoglikandır, ancak hyalüronik asidin aksine sülfat bulundurmaz. Kondroitin sülfat, vitreusun ultrayapısının korunmasında bağımsız bir rol oynar. Versican, vitreusta kondroitin sülfatın baskın şeklidir ve vitreus jeli oluşumuna katıldığı bildirilmiştir (21).

Normal fizyolojik koşullar altında, vitreus boşluğunda çok az hücre bulunur. Tanımlanan baskın hücre tipi hiyalositlerdir. Bu hücreler en yüksek konsantrasyona vitreus tabanında ve arka kortikal vitreusta ulaşır. Hiyalositler fagositik özelliklere sahiptir, antijenleri işler ve böylece vitreus boşluğu içindeki immünolojik yanıtı düzenlerler (22).

İnsan vitreus jeli, yaklaşık 40 yaşından itibaren kademeli olarak likefaksiyona uğrar, böylece tipik olarak 80-90 yaşlarında vitreusun yarısından fazlası sıvı hale gelir. Likefaksiyon sürecinde ince (12-15 nm) kolajen fibrillerinin daha küçük parçalara ayrılması kritik bir adımdır. Plazminojen gibi bazı proteolitik enzimler, artan yaşla birlikte yüksek vitreus konsantrasyonlarına ulaşabilir. Ayrıca artan yaşla birlikte, kortikal vitreus jeli ve ILM arasında uzanan vitreoretinal arayüzdeki adezyonda zayıflamalar oluşur. Bu süreçler sonunda 50 yaşından büyük bireylerin yaklaşık %50'sinde posterior vitreus dekolmanı (PVD) oluşur (23). PVD, kortikal vitreus jelinin ILM'dan vitreus tabanının arka sınırına kadar ayrılmasıdır; o bölgedeki vitreus ve retina arasındaki güçlü adezyon nedeniyle bu ayrılma vitreus tabanına uzanmaz. Ancak bu çekinti yırtıklı retina dekolmanı, epiretinal membranlar ve makula deliklerinin oluşumuna sebebiyet verebilir (24).

Vitreus, oksidatif hasara karşı koruma sağlayan yüksek askorbat seviyelerine sahiptir. Mevcut askorbat oksijene bağlanarak çevreleyen hücreler tarafından alınan dehidroaskorbat oluşturur. Vitrektomi geçiren gözlerde, oksijen miktarı temizleme kapasitesini aşar, bu durum lenste oksidatif stres yaratan reaktif bileşiklerin üretimine yol açarak katarakt oluşumunu hızlandırır (25).

### **2.3. Proliferatif Vitreoretinopati**

Proliferatif vitreoretinopati (PVR), regmatojen retina dekolmanı (RRD) cerrahisi başarısızlığının en yaygın nedenidir ve oküler travmanın ciddi bir

komplasyonudur. PVR terimi 1983 yılında ilk kez Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi tarafından kullanılmıştır (1). Anormal bir yara iyileşme yanıtı olan PVR, vitreus boşluğu ile retina yüzeyinin her iki tarafında hücresel membranların büyümesi ve kontraksiyonu ile karakterizedir. Bu zarların kontraksiyonu sonucu maküler büzüşme (maküler pucker), yeni retina yırtıkları, tekrarlayan retina dekolmanları ve oküler hipotoni oluşabilir (1-4).

PVR, tedavi edilen RRD vakalarının %5-10'unda görülür. Vitreoretinal cerrahi teknolojisindeki gelişmelere rağmen değişmeyen bir durum olan nihai cerrahi başarısızlığın temel nedenini oluşturur (5-7).

PVR Risk Faktörleri; (3-5,8,26,27)

- Çok sayıda ve dev retinal yırtıklar
- Büyük RD
- Vitreus hemorajisi
- Operasyon öncesi PVR mevcudiyeti
- Afaki
- Uzamış inflamasyona bağlı hipotoni
- Enfeksiyöz retinit
- Koroid dekolmanı
- Uzun süreli inflamasyon veya üveit
- Vitrektomi
- Aşırı kriyopeksi kullanımı
- Aşırı endolazer kullanımı
- Tekrarlayan cerrahi prosedürler
- Hava veya kükürt heksaflorür (SF<sub>6</sub>) kullanımı
- Vitreusta yüksek protein seviyeleri
- Sigara kullanımı (tek değiştirilebilir risk faktörü) (28)

### 2.3.1. Proliferatif Vitreoretinopati Patogenezi

PVR, multifaktöriyel bir süreçtir. Doku yaralanmasını takiben oluşan; inflamasyon, proliferasyon ve skar modülasyonunu içeren dinamik bir yara iyileşme sürecine benzerlik gösterir. Bu süreç yeniden şekillenme ve doku onarımı ile normal oküler yara iyileşmesi şeklinde ilerleyebileceği gibi, henüz mekanizması tam anlaşılamamış olarak anormal şekilde de ilerleyebilir (3,5,8,18).

Temel olay retina yırtığının oluşmasıdır. Hasara yanıt olarak retinal glial aktivasyon oluşur ve PVR gelişiminde merkezi bir rol oynar (7). RPE hücreleri yırtık alanından preretinal alana ve vitreusa göç ederler. Bunu glial hücre proliferasyonu, epiretinal ve subretinal boşluklara yayılım izler, ekstraselüler matriks oluşturulur. Bu hücreler, kontraksiyon elemanlarına sahip oldukları ve kolajen biriktirdikleri için miyofibroblast özellikleri kazanırlar. Ayrıca retina yüzeyinde fibrotik membran oluşumuna sebep olarak retinanın tekrar ayrılmasına yol açarlar. Dış retina iskemik hale gelir ve retinal fotoreseptörler apoptozise uğrar. PVR'nin hücresel kökenleri kritik olmasına karşın, patogenezinde ekstraselüler ortam da belirleyici bir rol oynamaktadır (29,30). PVR membranlarında bulunan ekstraselüler matriksin ana bileşeni olan başlıca kolajen tipi kolajen Tip I'dir (31,32).

### 2.3.2. Proliferatif Vitreoretinopatide Hücresel Elemanlar ve Büyüme Faktörleri

Anormal bir yara iyileşme yanıtı olarak kabul edilen PVR'de sitokinler ve büyüme faktörleri, patogenezinde ana oyuncularındır (4,8,18). PVR'de retinal hasarı takiben 2 temel olay meydana gelir; kan-retina bariyerinin bozulması ve inflamasyon. RRD, kan-retina bariyerinde bozulmaya neden olarak hücre göçünü ve proliferasyonunu tetikler. Kan-retina bariyerinin bozulması vitreus boşluğunda kemotaktik ve mitojenik aktivitede artışa yol açar. Bu durum sistemik dolaşımdan hem sitokinlerin hem de büyüme faktörlerinin akışı ile meydana gelir (33). PVR hastalarının vitreus sıvısında ve epiretinal membranlarında makrofajlar, CD4+ ve CD8+ T lenfositler, B lenfositler, majör doku uyumluluk sınıf II (MHC II) pozitif

hücreler dahil olmak üzere birçok inflamatuvar hücre tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra immünoglobulin ve kompleman birikintileri de saptanmıştır (4,34).

RPE hücreleri, PVR'nin gelişmesinde kilit bir unsurdur. Epiretinal membranlarda en çok bulunan hücreler RPE hücreleridir (35,36). Bunun yanı sıra Müller/glial hücreler ve fibroblastlar da membranların içeriğinde bulunur. RPE hücreleri fotoreseptörlerle teması kaybettikten sonra meydana gelen değişiklikler, PVR'nin başlaması için tetikleyici mekanizma kabul edilebilir (5,34). Gelişimin başlarında postmitotik hale gelen ve fotoreseptörleri desteklemek için özel roller üstlenen tek katlı RPE hücreleri; kolajen, fibronektin, trombospondin ve diğer matriks proteinlerini içeren geçici bir ekstraselüler matriks içinde farklılaşmamış hücreler oluşturur. Ardından preretinal alana ve vitreusa göç eder. RPE hücrelerinin göçü ve çoğalmasında inflamatuvar hücreler tarafından salgılanan sinyaller, temas kaybı, fotoreseptörlerden gelen sinyaller ve vitreusta bulunan faktörlere yanıt dahil olmak üzere farklı sinyallerin rol oynadığı gösterilmiştir (8). Bruch membranından ayrılarak epitel morfolojilerini kaybedip nöral retinadaki bir yırtık yoluyla vitreusa göç eden RPE hücreleri, nöral retinanın yüzeyinde epiretinal membran oluşumuna katılırlar. Epiretinal membranlar, yara iyileşmesine benzer şekilde büyür ve kasılır, bu da daha fazla retina dekolmanına ve görme kaybına neden olur (17). Bu süreç, epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) olarak adlandırılır, PDGF (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü) ve TGF-  $\beta$  (Dönüştürücü Büyüme Faktörü  $\beta$ ) gibi vitreustaki ajanlar tarafından yönlendirilir. EMD, polarize bir epitel hücrelerinin alttaki bazal membrandan ve komşu hücrelerden ayrılarak epitel özelliklerini kaybederken; gelişmiş göç kapasitesi, istilacılık, apoptoza direnç ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin üretimini içeren bir mezenkimal hücre fenotipi kazanmasıdır. Böylelikle PVR'de, RPE hücreleri çoğalan ve göç etme yeteneği kazanan fibroblast benzeri hücreler haline gelirler (17,37,38).

Müller/glial hücreleri de epiretinal membranlarda bulunur (35). Retina dekolmanı hem fotoreseptör dejenerasyonunu hem de Müller/glial hücrelerinin çoğalmasını tetikler. Retinanın hızlı şekilde yeniden yatıştırılması bu değişikliklerin bazılarını durdurup tersine çevirse de, nöral retinada glial skar oluşumunun görsel fonksiyondaki bozulmanın parçası olduğu düşünülmektedir (30,39).

Büyüme faktörleri ve sitokinler/kemokinler, bozulmuş kan-retina bariyeri yoluyla ve immün hücreler ile retina ve vitreusun lokal hücreleri arasındaki etkileşim yoluyla vitreus boşluğuna girer. En önemlilerinden bazıları platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF), asidik ve bazik fibroblastik büyüme faktörü (aFGF ve bFGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1, bağ dokusu büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interlökin 1 (IL-1), interlökin 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interlökin 6 (IL-6), interlökin 8 (IL-8), interlökin 10 (IL-10) ve CC motifli kemokin ligandı 3, 4 ve 5 (CCL3, CCL4 ve CCL5) gibi kemokinlerdir. Bu büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin birçoğu, RPE ve glial hücrelerin uyarılmasıyla ilişkilendirilmiştir (36,40–45).

PDGF ve reseptörü (PDGFR) patogeneizde ana oyuncular ve yeni terapötik hedefler olarak daha fazla dikkat çekmektedir. PDGF dimerik yapıya sahip, kemoatraktan, mitojen ve RPE hücreleri için hücre sel kasılmanın aracısı olarak görev yapan bir büyüme faktörüdür. PDGF reseptörleri PDGFR- $\alpha\alpha$ , PDGF- $\beta\beta$  ve PDGFR- $\alpha\beta$  oluşturarak homodimerize veya heterodimerize olabilen iki gen tarafından kodlanır (46). Epiretinal membran örneklerinde hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  formları tanımlanmıştır. Bununla birlikte PDGFR- $\alpha$  daha kolay aktive edilir ve PVR'yi indüklemeye daha etkilidir (47). PVR'li gözlerde PDGFR- $\alpha$ 'nın daha yüksek oranda aktive olduğu gösterilmiştir (48).

TGF- $\beta$ , PVR patogeneizinde rol oynadığı düşünülen bir başka büyüme faktörüdür ve fibrozis oluşumundaki görevi bilinmektedir. Primat gözlerinin arka segmentinde baskın form olan TGF- $\beta$ 2 ile RPE hücreleri, fibroblastlar, trombositler ve makrofajlar tarafından salgılandığı bulunan güçlü bir kemoatraktanır (49). RPE hücrelerinin mezenkimal fibroblastik hücrelere dönüştürülmesinde ve RPE hücrelerinde farklı yollardan Tip I kolajen sentezinin indüklenmesinde ve fibrozise neden olmasında önemli bir rol oynar (32). PDGF'ye benzer şekilde, PVR'li hastaların vitreusunda TGF- $\beta$  seviyeleri daha yüksek bulunmuştur. Spesifik olarak, arka

segmentteki baskın TGF- $\beta$  izoformu olan TGF- $\beta$ 2 konsantrasyonu, PVR'nin şiddeti ile önemli ölçüde ilişkilidir (50,51).

### 2.3.3. Proliferatif Vitreoretinopati Sınıflandırılması

PVR için ilk yaygın olarak tanınan sınıflandırma sistemi, Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi tarafından 1983 yılında yayınlanmıştır (Tablo 2.1) (1). Bu sınıflandırmanın en büyük eksikliklerinden biri ön ve arka PVR arasında ayırım yapılmamasıdır. Söz konusu eksiklikleri gidermek için, Silikon Çalışma Grubu tarafından yeni bir sınıflandırma şeması önerilmiştir (Tablo 2.2) (52). Bu sınıflandırmada A ve B dereceleri aynı kalırken, farklı olarak C ve D dereceleri P (posterior form) ve A (anterior form) ile değiştirilmiştir. P ve A dereceleri, kasılma türleri ile ayrıca detaylandırılarak, PVR'nin yayılımı saat kadranı cinsinden derecelendirilmiştir (52).

**Tablo 2.1.** Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi Sınıflaması (1983) (1)

Derece	Klinik Bulgular
A	Vitreus bulanıklığı, vitreusta pigment kümeleri
B	İç retina yüzeyinde kırışıklık ve sertleşme, retinal yırtık kenarında kıvrılma, retina damarlarında kıvrım artışı
C	Tam kalınlıkta sabit retina katlantıları
C-1	1 kadranda
C-2	2 kadranda
C-3	3 kadranda
D	Dört kadranda sabit retina katlantılar
D-1	Geniş huni şekilli
D-2	Dar huni şekilli
D-3	Optik diskin görülemediği kapalı huni şekilli

**Tablo 2.2.** Silikon Çalışma Grubu Sınıflaması (52)

Derece	Klinik Bulgular
A	Vitreus bulanıklığı, vitreusta pigment kümeleri
B	İç retina yüzeyinde kırışıklık ve sertleşme, retinal yırtık kenarında kıvrılma, retina damarlarında kıvrım artışı
P	Starfold ve/veya arka retinada yaygın kontraksiyon ve/veya arka retinada subretinal membranlar
P1	1 kadranda (1-3 saat)
P2	2 kadranda (4-6 saat)
P3	3 kadranda (7-9 saat)
P4	4 kadranda (10-12 saat)
A	Ön retinada çevresel ve/veya dikey (perpendiküler) ve/veya ön traksiyon
A1	1 kadranda (1-3 saat)
A2	2 kadranda (4-6 saat)
A3	3 kadranda (7-9 saat)
A4	4 kadranda (10-12 saat)

**Tablo 2.3.** Retina Cemiyeti Terminoloji Komitesi Sınıflaması (1991) (53)

Derece	Klinik Bulgular
A	Vitreus bulanıklığı, vitreusta pigment kümeleri
B	İç retina yüzeyinde kırışıklık ve sertleşme, retinal yırtık kenarında kıvrılma, retina damarlarında kıvrım artışı
CP1-P12	Tam kalınlıkta sabit retina katlantıları veya ekvatorun gerisinde yerleşmiş subretinal bantlar
Tip 1 (fokal)	Vitreus tabanının arkasında starfold
Tip 2 (diffüz)	Vitreus tabanının arkasında birbirine bitişik starfold, optik disk görülemez
Tip 3 (subretinal)	Retina altında proliferasyon, diske yakın halkasal bant, lineer bantlar, güve yemiş görünümünde tabakalar
CA1-A12	Tam kalınlıkta sabit retina katlantıları veya ekvatorun önünde yerleşmiş subretinal bantlar, kondanse vitreus bantları
Tip 1 (çepe çevre)	Vitreus tabanının arka kenarında içe doğru retina kontraksiyonu, retinanın santrale çekilmesi, periferik retinada gerginlik, arka retinada ışınal katlantılar
Tip 2 (anterior)	Vitreus tabanındaki retinada öne kontraksiyon, siliyer cisim dekolmanı ve episiliyer membran, iris retraksiyonu

Sınıflandırma şeması Retina Derneği Terminoloji Komitesi tarafından 1991 yılında güncellenmiştir. Yeni sınıflandırmada, artan şiddetin 3 derecesi tanımlanmış ve proliferasyonun ön ve arka konumları vurgulanmıştır. A ve B dereceleri aynı kalırken, D çıkarılmıştır. C ise proliferasyonun yeri, kasılma türleri ve saat kadranı cinsinden yayılımın daha ayrıntılı bir tanımını içerecek şekilde değiştirilmiştir (Tablo 2.3) (53). Bununla birlikte, bu sınıflandırmanın karmaşıklığı nedeniyle nadiren klinik pratikte kullanılmaktadır. PVR hakkında yeni bilgileri içeren ve terapötik ajanlar için yeni potansiyel hedeflere işaret eden revize edilmiş bir sınıflandırma üretmenin faydalı olabileceği düşünülmektedir (54).

### **2.3.4. Proliferatif Vitreoretinopatide Tedavi**

#### **2.3.4.1. Cerrahi Tedavi**

PVR için cerrahi müdahale birincil tedavi seçeneğidir (4,8). Bu prosedürlerin ana hedefleri arasında retina yırtıklarının onarımı, traksiyon kuvvetlerinin hafifletilmesi, retinanın stabilizasyonu ve nüksün azaltılması yer alır. Hafif ve orta dereceli vakalar genellikle geleneksel cerrahi ile tedavi edilir. Ancak daha ileri vakalar skleral çökertme, vitrektomi, membran soyma, perflorokarbon sıvılarının kullanımı, retinotomiler ve silikon yağı/gaz ile tamponadı içeren teknik olarak zor ameliyatlara gerektirir. Cerrahi sonrası anatomik başarı vakaların şiddetine göre %60-80 arasında bildirilmektedir; ancak anatomik olarak başarılı cerrahi geçirdiği düşünülen hastaların sadece %40-80'inde fonksiyonel başarı (görme keskinliği 5/200 veya daha iyi) sağlanabilmektedir (4,8,55).

PVR için ideal cerrahi zamanlaması tartışmalıdır. Cerrahinin neden olduğu kontrollü travma hücresel proliferasyonu uyarabileceğinden, klinik aktivite belirtilerinin varlığının cerrahi müdahaleyi birkaç hafta geciktirmenin bir göstergesi olabileceği öne sürülmektedir. PVR'de epiretinal proliferasyonun tamamen gelişmesi ortalama 6-12 hafta sürer. Operasyonu geciktirmek membran soyulmasını kolaylaştırmakta ve zarların daha eksiksiz bir şekilde çıkarılmasını sağlamaktadır. Ameliyatı erteleme kararı, makulanın durumu ve daha fazla erteleme ile görsel iyileşme potansiyeli üzerindeki etkileri ile dengelenmelidir. Bununla birlikte bu

görüşlerin klinik bulgularla ne ölçüde ilişkili olduğunu aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (55).

Şiddetli PVR'li retina dekolmanı vakalarında primer skleral çökertme cerrahisi ile anatomik başarı oranı %34-47'dir (4,55). PVR için yüksek riskli hastalarda pars plana vitrektomi (PPV) ve skleral çökertme uygulanması, tek başına PPV ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek anatomik başarı oranları ile ilişkilendirilmiştir (56). Tamponad seçenekleri arasında ise perfloropropan ( $C_3F_8$ ) ve silikon yağı sonuçlarının benzer olduğu, ayrıca her iki tamponadın da kükürt heksaflorür'e ( $SF_6$ ) üstün oldukları saptanmıştır (57,58).

Görünen tüm membranların diseksiyonuna rağmen, bazı durumlarda retinanın kontraksiyonuna ve kışalmasına yol açan intraretinal fibrozis nedeniyle yeniden yatıştırılması mümkün olmayabilir. Bu gibi durumlarda retinotomi (gevşetici insizyon) veya retinektomi düşünülmelidir. Bu insizyonlar, retinanın kısaldığı bölgelerde, genellikle kasılmış dokunun arkasında çevresel şekilde yapılır. Kanama nedeniyle daha fazla inflamasyon gelişme olasılığını azaltmak için retinektomi/retinotominin kenarına titiz şekilde hemostazın sağlanması önerilir. Retina traksiyonu tamamen rahatlatıldıktan sonra, retinektomi/retinotominin ve yırtıkların kenarlarına endolazer uygulanmasının ardından sıvı-hava değişimi yapılır (59).

PVR, vitreoretinal cerrahideki ilerlemelere rağmen yönetimi zor bir problem olmaya devam etmektedir. Hücresel çoğalmayı önlemek için ek tedavilerin kullanılması, cerrahi sonrası PVR'nin veya nükslerin önlenmesi için umut vadetmektedir (7).

#### **2.3.4.2. Medikal Tedavi**

Günümüzde PVR'nin tedavisi veya önlenmesi için kanıtlanmış bir farmakolojik ajan yoktur. Farmakolojik müdahaleler çoğunlukla inflamasyonu, hücre proliferasyonunu ve fibrozisi baskılamaya yöneliktir. İncelenmekte olan birçok antiinflamatuvar, antiproliferatif, antineoplastik, büyümeyi önleyici ve antioksidan ajan ilgili patolojilerden bir veya daha fazlasını hedefler (4,8).

Kortikosteroidler PVR için test edilen ilk ajanlardır. Deneysel hayvan modellerinde intravitreal triamsinolon asetonid veya topikal ve sistemik kortikosteroidlerin bir miktar etkili buldukları gösterilmesine rağmen, hastalar üzerinde yapılan klinik deneylerde gözlenen yanıtlar zayıftır (4,8,60). Standart cerrahi tedavi ve silikon yağı tamponadı ile yapılan PVR tedavisine ek olarak yavaş salınımlı 0,7 mg deksametazon intravitreal implantın (Ozurdex; Allergan Inc., Irvine, CA) etkinliğinin araştırıldığı bir prospektif çalışmada, deksametazon implant uygulanmayan grupla karşılaştırıldığında anatomik veya fonksiyonel başarıda fark olmadığı gözlenmiştir (61).

PVR profilaksisi veya tedavisi için incelenen antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antineoplastik ajanlar arasında 5-florourasil (5-FU), daunorubisin, taksol, kolşisin, retinoik asit, ribozimler, vinkristin, sisplatin, adriamisin, etopsid, takrolimus, mitomisin C, N-asetilsistein, okreotid, glukozamin, dekorin, hiperisin ve daktomisin gibi bileşikler yer alır. Tüm bu bileşikleri içinde 5-FU, PVR tedavisi için en çok test edilen bileşiklerden biri olmuştur (4,8).

5-FU, DNA sentezini ve fibroblast proliferasyonunu engelleyen bir antimetabolittir. Timidin oluşumunu engelleyerek DNA sentezine etki eder. Filtran glokom cerrahisinde skar oluşumunu azaltmak için sıklıkla kullanılır. 5-FU, PVR oluşturulmuş hayvan modellerinde faydalı sonuçlar göstermesine rağmen insanlarda önemli yan etkileri nedeniyle yeterli sonuçlar vermemiştir (8,62). İnsanlar üzerinde yakın zamanda yapılan randomize kontrollü çalışmalarda 5-FU ve vitrektomi sonrası fibronektin ve büyüme faktörlerine bağlanarak postoperatif fibrini azaltan düşük moleküler ağırlıklı heparin (DMAH), plasebo ile karşılaştırmıştır. 5-FU ve DMAH ile adjuvan tedavi uygulanan grupta postoperatif PVR insidansında ve tekrarlayan ameliyat oranlarında anlamlı bir azalma bulunurken, görme keskinliği ve komplikasyon oranları açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır (63). Diğer çalışmada ise kombine 5-FU ve DMAH'nin PVR için uygulanan vitreoretinal cerrahinin başarı oranını önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür (64). Başka bir çalışmada ise tedavi ve plasebo gruplarında PVR insidansı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (65). Sonuçların tutarsızlığı nedeniyle daha fazla veri elde edilene kadar, 5-FU ile DMAH kullanımına ilişkin gelecekteki araştırmaların yalnızca

postoperatif önemli ölçüde retina skarı geliştirmesi muhtemel olan RD hastalarında yapılması önerilmektedir. (66).

Daunorubisin, hücre döngüsünden bağımsız bir şekilde DNA ve RNA sentezini inhibe eden bir topoizomeraz inhibitörüdür. Daunorubisin Çalışma Grubu tarafından PVR'li gözlerde vitrektomi sırasında hücre çoğalmasını ve hücre göçünü durduran bir antrasiklin grubu antibiyotik olan daunorubisinin güvenliğini ve etkinliğini araştırılmıştır. Daunorubisin kullanımının retina cerrahisi geçiren PVR hastalarında yeniden ameliyat oranında küçük bir azalma ile sonuçlandığı görülmüş, 1 yılda görme keskinliği ve yeniden bağlanma oranında fark saptanmamıştır (67). Çoğalan hücrelerdeki nükleer antijeni hedefleyen DNA-RNA kimerik ribozimleri, prelinik çalışmalarda umut vadetmesine rağmen PVR için çok merkezli klinik çalışmalarda anatomik veya görsel fayda sağladığı gösterilememiştir (68,69).

Taksol ve kolşisin hücrelerin göçünü ve çoğalmasını azaltabilen, mikrotübül oluşumunu stabilize etme ve engelleme işlevi gören ajanlardır. Bu ajanların prelinik çalışmalarda başarılı olduğu bulunmuştur (70–72). Ancak farklı etiyojiye sahip PVR'si olan hastalara verilen düşük doz oral kolşisinin (1.2 mg/gün) klinik sonuçlarının kontrol grubu ile arasında anlamlı fark bulunmamıştır (73).

Anti-VEGF ajanlarının, dolaylı olarak PDGFR aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla deneysel PVR modellerini inhibe etmede etkili olduğu gösterilmiştir (74). Fakat yapılan klinik çalışmalarda vitrektomi sonrası intravitreal bevacizumab alan ve almayan gruplar arasında görme keskinliği ve anatomik başarı açısından anlamlı fark gözlenmemiştir (75,76).

Retinoik asit, *in vitro* olarak RPE hücrelerinin büyümesinin durdurulmasını teşvik eder. Vitrektomi geçiren PVR hastalarında oral retinoik asit kullanımına ilişkin 35 hastayı içeren prospektif randomize bir klinik çalışma, oral retinoik asit ile tedavi edilen hastalarda retina dekolmanı ve maküler pucker oluşumunu önemli ölçüde azalttığını ve görmede iyileşme olduğunu göstermiştir (77). Yakın zamanda yapılan bir çalışma izotretinoinin, yüksek PVR riski olan primer RRD'li hastalarda PVR kaynaklı yeniden ayrılma riskini azaltmada olumlu etkiye sahip olabileceğini; ancak

yerleşik PVR'ye sahip rekürren RRD vakalarında olumlu etkisinin olmadığını göstermektedir (78).

Metotreksat bir folat antagonistidir. Metotreksatın hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve düzenlenmiş hücre ölümünü indükleyerek *in vitro* PVR modelini inhibe ettiği gösterilmiştir (79). PVR hastalarının vitrektomi sırasında intravitreal metotreksat infüzyonu ile tedavi edildiğinde daha düşük PVR insidansına sahip olduğunu bir başka retrospektif çalışmada saptanmıştır (80). Yeni yapılan diğer bir çalışmada metotreksatın PVR riski yüksek hastalarda ve PVR riski olmayan hastalarda, metotreksatsız PPV'ye kıyasla daha iyi fonksiyonel sonuçlar verdiği; ancak yerleşik PVR'si olan vakalarda aynı başarıya ulaşamadığı saptanmıştır (81).

Mitomisin-C günümüzde antiproliferatif etkileri nedeniyle cerrahi başarı oranlarını artırmak için oküler cerrahide (trabekülektomi, pterijyum eksizyonu vb. gibi) kullanılan bir anti-neoplastik ajandır. Yapılan bir çalışmada mitomisin-C emdirilmiş süngerler ile lokalize intraoküler Mitomisin-C uygulamasının travma sonrası PVR oranını ve buna bağlı komplikasyonları azaltmada potansiyel bir rolü olduğu saptanmıştır (82). Yakın zamanda yapılmış bir başka çalışmada; vitreoretinal cerrahide “mitomisin-C sandviç tekniği” ile geçici intraoküler uygulamanın, PVR'li veya yüksek PVR gelişme riski olan şiddetli travmatik RD olgularında iyi anatomik ve görsel sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Ayrıca mitomisin-C uygulamasının vitreoretinal cerrahi sonrası daha fazla PVR gelişimini engellediği görülmüştür (83).

PVR'nin önlenmesi ve tedavisi için çeşitli tıbbi ajanları araştıran randomize çalışmalar henüz klinik yaklaşımı yönlendirememektedir (84). Şimdiye kadar PVR tedavisi için herhangi bir farmakolojik ajan bulunamamıştır, ancak profilaksi için umut verici yaklaşımlar mevcuttur (85).

#### **2.4. Nintedanib**

Nintedanib (BIBF1120), 2014 yılında FDA tarafından İdiopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) tedavisinde onaylanan ilk tirozin kinaz inhibitörüdür (9). Gerçekleştirilen klinik çalışmalar (TOMMOROW, INPULSIS-1, INPULSIS-2), nintedanib ile tedavinin hastalığın ilerlemesini yavaşlatma etkinliğini zorlu vital

kapasitedeki (FVC) yıllık düşüşü önemli ölçüde azaltarak gösterdiğini doğrulamıştır. İPF tedavisi için oral yolla, günde iki kez 150 mg dozunda kullanımı önerilmektedir (86). En sık bildirilen yan etkiler arasında, diyare, mide bulantısı ve kusma, abdominal ağrı, iştahta azalma, vücut ağırlığında azalma ve hepatik enzimlerde yükselme bulunur. Nintedanib'in etki mekanizması nedeniyle, artan kanama riski yaratabileceği belirtilmiştir. INPULSIS çalışmalarında, kanamaya bağlı yan etki gözlenen hastaların yüzdesi, nintedanib alanlarda biraz daha yüksek bulunmuştur. Ancak bunlar genellikle küçük burun kanamaları veya küçük yaralanmalarla birlikte artan morluklar şeklinde bildirilmiş olup, ciddi kanama insidansının çok düşük olduğu gözlenmiştir (86).

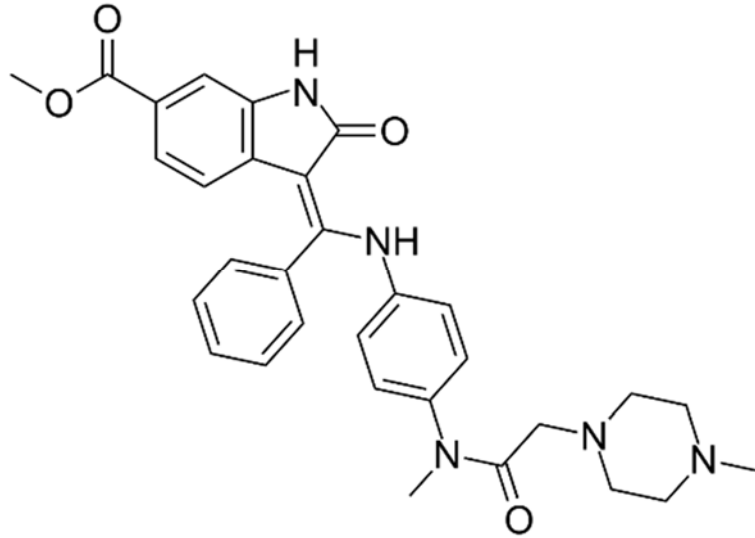
Nintedanib PDGF reseptörü- $\alpha$  ve - $\beta$ , FGF reseptörü-1-3 ve VEGF reseptörü-1-3'ü hedefleyen küçük molekülü bir multikinaz inhibitörüdür. Ayrıca Src ailesi kinaz lenfositte özgü tirozin protein kinazı (Lck), koloni uyarıcı faktör (CSF)-1 reseptörünü (CSF1R) ve medyan inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri <100 nM olan diğer 20 kinazı inhibe eder. İkamelı bir oksindol türevi olan BIBF 1120, VEGFR-2'nin ATP rekabetçi inhibitörlerini ve diğer proanjyogenik reseptör tirozin kinazlarını tanımlamak için tasarlanmış bir kimyasal öncül optimizasyon programında tanımlanmıştır (10,87). Bu bileşik VEGF reseptörleri (VEGFR), FGF reseptörleri (FGFR) ve PDGF reseptörleri (PDGFR) üzerindeki güçlü ve spesifik inhibisyonuna ek olarak diğer insan kinazları ile düşük çapraz reaktivitesi nedeniyle seçilmiştir (87). Hedef kinazların ATP bağlanma yerlerini işgal ederek ve aktivasyonlarını önleyerek rekabetçi bir inhibitör görevi görür. Anjyogeneze katkıda bulunan üç hücre tipinde (endotelial hücreler, perisitler ve düz kas hücreleri) protein kinaz sinyal yollarını inhibe ederek hücre proliferasyonu ve apoptozis inhibisyonunu sağlar (88). Nintedanibin farmakolojik profilinin önemli bir özelliği, hedef kinaz inhibisyonunun dikkat çekici şekilde sürdürülebilme süresidir. VEGFR-2'nin *in vitro* inhibisyonunun, sadece 1 saat boyunca nintedanibe maruz bırakılan VEGFR-2 ile transfekte edilmiş NIH3T3 hücrelerinde en az 32 saat sürdürülebildiği saptanmıştır. Bu durum yavaş reseptör ayrışma kinetiğini düşündürmektedir (10).

Sağlıklı bireylerden alınan farmakokinetik verileri, nintedanibin oral uygulamayı takiben hızla emildiğini, maksimum plazma konsantrasyonuna (Cmax) ulaşma medyan süresinin 1,3 saat ve terminal yarılanma ömrünün 13,7 saat olduğunu

göstermektedir (89). Nintedanib intravenöz uygulanmasından sonra periferik dokulara yaygın dağılım gösterir ve yüksek bir dağılım hacmine sahiptir (1050 L). Sıçanlarda nintedanibin santral sinir sistemi dışındaki periferik dokulara hızlı ve homojen bir şekilde dağıldığı gösterilmiştir. Bu durum nintedanibin kan-beyin bariyerini geçemediğini düşündürmektedir. Nintedanib plazma proteinlerine %97.8 oranında bağlanır. Albümin ana bağlayıcı proteindir (88).

Nintedanib hidrolitik ester bölünmesi yoluyla metabolize edilir, daha sonra glukuronidasyona uğrayan ve feçesle atılan serbest asit parçasının oluşumuyla sonuçlanır. Özellikle sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilen ilaçlarla etkileşim için düşük bir potansiyele sahiptir. P glikoprotein inhibitörleri veya indükleyicileri olan ilaçların birlikte uygulanması farmakokinetiği etkileyebilir. (88).

Nintedanibin yarı ömrü, bevacizumab, sunitinib ve sorafenib dahil olmak üzere diğer antianjiyogenik ajanlardan belirgin şekilde daha kısadır (90). *In vitro* gözlemlendiği gibi, nispeten kısa yarılanma ömrü ve maruziyetten uzun süre sonra hedef kinazların sürekli inhibisyonu, nintedanib farmakolojisinin uygun bir güvenlik/etkinlik profili sağlayabileceğini göstermektedir (10).



Şekil 2.4. Nintedanibin kimyasal yapısı

## 2.5. Deneysel PVR Modelleri

### 2.5.1. İn Vitro

RPE hücreleri ve fibroblastlar, PVR patogeneğinde rol oynayan önemli hücre tipleridir. İnsan PVR membranlarından türetilen birincil kültürler, *in vitro* modeller olarak yaygın kullanılmaktadır. İlaç araştırmaları için hücrelerin kullanılmasının bariz bir avantajı, uygulanabilirliği ve kontrol edilebilirliğidir. Bununla birlikte farklı hücre tiplerinin belirli ilaçlara duyarlılığı oldukça değişken olabilir ve bu değişkenlik, ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde zorluklara yol açabilir (91).

### 2.5.2. İn Vivo

İlk geliştirilen PVR modelleri, PVR'yi başlatmak için sıklıkla dermal fibroblastlar enjekte edilmesini içermekteydi. Daha sonrasında PVR stimölasyonu için kornea, koroid ve konjonktival fibroblastlar, RPE hücreleri ve makrofajlar gibi diğer hücre tipleri de kullanılmıştır. Hücre enjeksiyon modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Basit hücre enjeksiyon modellerinin önemli avantajı, minimal invaziv oluşudur. Buna ek olarak, PVR oluşumunu arttırmak için belirli büyüme faktörleri ve trombositler de aynı anda enjekte edilebilir. Farklı hücre türlerinin enjeksiyonuna ek olarak, diğer manipölasyonlar (trombositten zengin plazma/kan enjeksiyonu ve cerrahi manipölasyon gibi) sinerjistik olabileceğinden sıklıkla kullanılmaktadır (92). Retinotomi, kriyopeksi, dispaz enjeksiyonu ve skleral hasarlama gibi cerrahi manipölasyonlar retina hasarını ve kan-retina bariyerinin yıkımını taklit etmek için uygulanabilmektedir.

Farklı hayvan türlerinin kendilerine özgü artıları ve eksileri bulunmaktadır. Tavşan modelleri oftalmolojik araştırmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş vitreus hacimleri nedeniyle lens ve retina hasarı riskinin daha az oluşu ile manipölasyon kolaylığı en büyük avantajıdır. Ancak tavşanların kan damarları ve sinir lifi dağılımı başta olmak üzere retina yapısı insan retinasından farklıdır. Bu durum patolojik ve immünohistokimyasal incelemelerde kısıtlamalara neden olmaktadır (91).

Literatürde yer alan başlıca *in vivo* PVR modelleri şunlardır; (91)

- Otolog dermal fibroblast hücre enjeksiyonu
- Yapay travma uygulanması
- Homolog dermal/korneal/koroidal/konjonktival fibroblast enjeksiyonu
- Homolog RPE hücre enjeksiyonu
- Aktive makrofaj enjeksiyonu
- Çoklu cerrahi manipülasyonlar (pars plana lensektomi, sklerotomi, vitrektomi, retinotomi vs.)
- Gaz kompresyonu + homolog RPE hücresi/fibroblast enjeksiyonu
- Disfaz enjeksiyonu
- Plateletten zengin plazma enjeksiyonu

Bu modeller tek başına kullanılabilceği gibi kombinasyonları da uygulanabilmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜDHAM), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulundan 25/11/2020 tarihli 2020/54 kayıt numarası ile onay alınmıştır. Bu çalışmadaki tüm hayvan deneyi uygulamaları, Oftalmik ve Görme Araştırmalarında Hayvanların Kullanımına İlişkin ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Beyanı hükümlerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Lipozom İçerikli %0,5 Nintedanib Solüsyonunun Hazırlanması

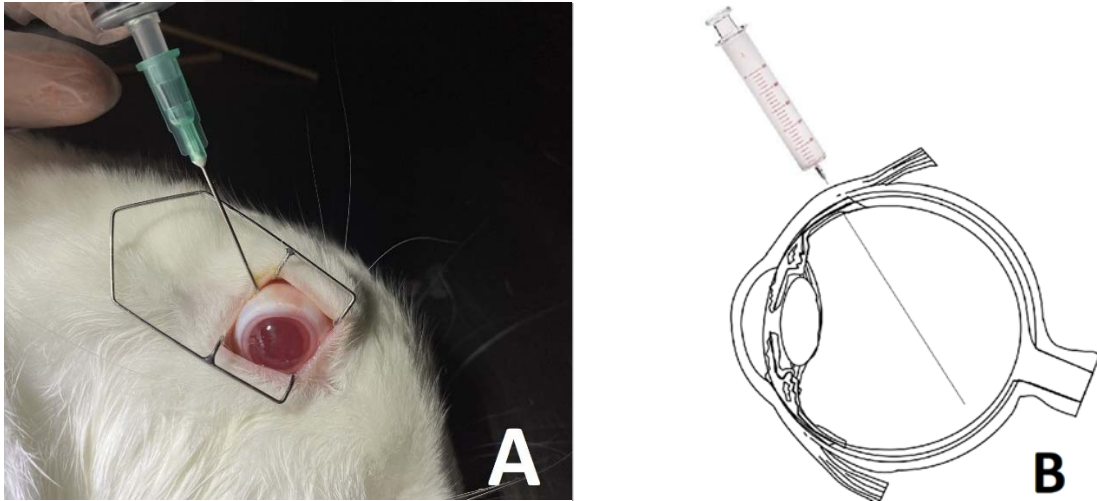
%0,5 Nintedanib (MedChemExpress, ABD) içeren lipozomların hazırlanmasında dehidrasyon-rehidratasyon yöntemi kullanılmıştır (93). Yumurta fosfatidilkolin (Sigma Aldrich, Almanya), 1:3 molar oranlı kolesterol (Sigma Aldrich, Almanya) ve nintedanib (5 mg/ml) ilave edilerek metanol:kloroform (2:1) içinde çözündürülmüştür. Balon joje içerisinde bulunan bu çözeltinin, düşük basınç altında buharlaştırılması ve lipit filmin balon jojenin cam yüzeyi etrafında homojen bir şekilde yapışması için rota evaporatöre (Heidolph, Almanya) bağlanmıştır. Çözücünün uçurulmasından sonra lipit film, fosfat tamponlu bir salin (PBS) (0.1 mmol / L, pH 7.4) eklenerek 10 dakika ultrasonik banyoda (Isolab, Almanya) bekletilmiştir. Daha sonra hazırlanan nintedanib yüklü lipozomlar, laminar akış kabini (Biobase, ABD) UV ışığı altında steril 0,22 µm polikarbonat filtre (Millipore Co., Billerica, MA, ABD) ile filtre edilerek 1,5 mL viallere (Agilent, ABD) doldurulmuştur. Kullanıma kadar +4 derecede iklimleme kabini (Binder, Almanya) muhafaza edilmiştir.

#### 3.2. Deneysel Modelinin Oluşturulması

Deneysel modelini oluşturmak üzere Tarım ve Orman Bakanlığı deneysel amaçlı hayvan üretim ve tedarik ruhsatına sahip yetiştiriciden 14 adet, yaklaşık 2 kg ağırlığında, her iki cinsiyetten, beyaz Yeni Zelanda tavşanları temin edildi. Çalışma

süresince denekler uygun beslenme ve barınma koşulları sağlanarak HÜDHAM'de muhafaza edildi.

Deneklerin tamamı uygulama öncesi merkezde 1 haftalık aklimatizasyon süresini tamamladı. Ardından genel anestezi sağlanması amacı ile intramusküler yolla 35 mg/kg ketamin (Keta-control %10, Doğa İlaç, Türkiye) ve 5mg/kg ksilazin (Basilazin %2, Bavet, Türkiye) uygulandı. 12 adet tavşanın rasgele belirlenen bir gözüne tropikamid (Tropamid %0.5, Bilim İlaç, Türkiye) damlatılarak pupiller dilatasyon sağlandı. Deneye dahil edilen tavşanların görme fonksiyonları etkileneceğinden her deneğin bir gözüne uygulama yapıldı. Uygulamanın hemen öncesinde proprakain (Alcain %0.5, Alcon, Belçika) ile lokal anestezinin de sağlanmasından sonra deneğin gözüne blefarosta yerleştirildi. İndirekt oftalmoskop ve 20D lens ile tüm deneklere fundus muayenesi yapıldı ve anatomik olarak normal yapıya sahip oldukları doğrulandı. Ardından uygulama yapılacak alandaki konjonktiva % 5 povidon iyot ile silindi. Yaklaşık saat 11 hizasında, supraorbital kasların yakınında, limbusun yaklaşık 5 mm gerisinden 23G iğne yerleştirildi (Şekil 3.1). İşlem sırasında lense ve diğer çevre dokulara temas etmemeye özen gösterildi.



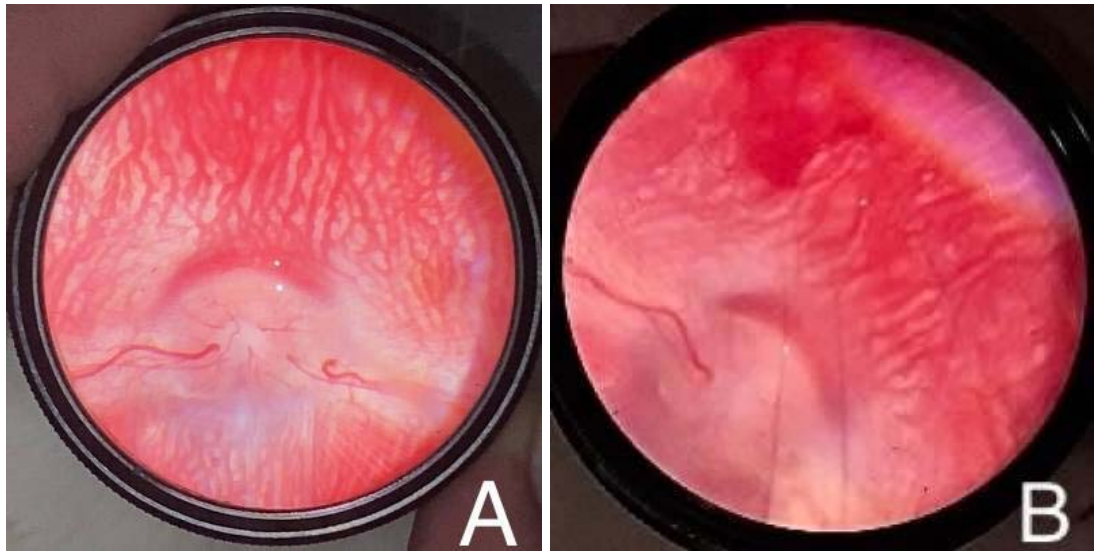
**Şekil 3.1.** Deneyin uygulaması

A) 23G iğnenin yerleştirilmesi; B) Hasarlanan bölgenin şematik gösterimi.

İndirekt oftalmoskop eşliğinde iğne 45 ° açı ile 12.5 mm derinliğe kadar vitreus boşluğuna doğru nazikçe ilerletildi. Daha sonra retinaya doğru eğilerek, keskin uçla delinme yaralanmasına neden olacak şekilde retinaya dokunulup vitreus hemorajisinin

oluşturduğuna emin olundu (Şekil 3.2). Bu esnada iğne hafifçe geri çekilerek 0.1 ml vitreus aspirasyonu yapıldı. Hasarlanan bölgenin hemen üzerine enjektör kısmı değiştirilerek 0,05 U/0,1 ml dispaz çözeltisi (Boehringer Mannheim, ABD) enjekte edildi. Daha önce yapılmış çalışmalarda kabul edilebilir düzeyde vitreus bulanıklığı ve katarakt oluşumuna sebebiyet veren dozun 0,05-0,07 U olarak tespit edilmesi sebebiyle uygulama bu dozda yapılmıştır (94,95). İğnenin yavaşça geri çekilmesi esnasında enjektör kısmı değiştirilerek midvitreusa gelindiğinde, deneklerin rasgele belirlendiği gruba göre enjeksiyon yapıldı. Rasgele belirlenen 6 tavşanın midvitreusuna 0.1 ml %0,5'lik nintedanib enjekte edildi. Kontrol grubu olarak belirlenen diğer 6 adet tavşanın midvitreusuna ise 0.1 ml fosfat tamponlu salin (PBS) enjekte edildi. Enjeksiyonlardan hemen sonra uygulama yapılan göze Tobramisin (Tobrased %0.3, Bilim İlaç, Türkiye) damlatıldı. Tavşanlar enjekte edilen maddenin özelliğine göre; PBS enjekte edilerek kontrol grubuna dahil olanlar K1, K2, K3, K4, K5, K6 olarak numaralandırıldı. İlaç verilen gruptakiler ise N1, N2, N3, N4, N5, N6 olarak numaralandırıldı.

Denekler dördüncü haftanın sonunda yüksek doz ketamin ve ksilazin ile ötenazi edilerek uygulama yapılan gözleri entükle edildi. Entükle edilen gözler formaldehit solüsyonu içinde fikse edildi.



**Şekil 3.2.** Normal tavşan fundusu ve uygulama sonrası

A) Tavşan fundusunun meranjyotik yapısı ve optik disk; B) Uygulamadan hemen sonra gözlenen hemoraji

### 3.3. Oftalmolojik Muayene

Deney modelinin oluşturulmasından sonra deneklere 4 hafta boyunca haftalık genel anestezi altında fundus muayenesi yapıldı ve görüntüler akıllı telefon yardımı ile kaydedildi. Fundus bulguları Fastenberg skalasına göre derecelendirildi (96). Dördüncü haftanın sonunda portatif slit lamba (SL-15, Kowa, Japonya) ile ön segment muayenesi de yapıldı. Denekler korneal ödem, üveit ve lens opasitesine yönelik muayene edildi.

**Tablo 3.1.** Deneysel PVR için Fastenberg Sınıflaması (96)

Evre	Özellikleri
Evre 0	Değişiklik yok, normal retina
Evre 1	İntravitreal membran
Evre 2	Fokal traksiyon; lokalize vasküler değişiklikler; hiperemi; tıkanıklık; dilatasyon; vasküler elevasyon
Evre 3	Medüller rayda lokalize dekolman
Evre 4	Geniş retina dekolmanı; total medüller ray dekolmanı; peripapiller retina dekolmanı
Evre 5	Total retina dekolmanı; retinal foldlar ve delikler

### 3.4. Vitreus Örneklerinin Alınması

PVR modeli oluşturulmamış 2 adet tavşanın her iki gözüne genel anestezi altında 0,1 ml % 0,5'lik nintedanib enjekte edilmesinin ardından; 1, 7, 14 ve 35. günlerde vitreus örnekleri alındı. Her gözden belirlenen zaman aralıklarının birinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) için örnek alındı ve örnekler +4 derecede saklandı. Daha sonrasında denekler ötenazi edilerek gözleri enükle edildi ve ilacın normal retinaya olan etkilerinin histolojik olarak incelenmesi için formaldehit solüsyonunda muhafaza edildi.

### 3.5. Nintedanibin HPLC Analiz Prosesi

#### 3.5.1. HPLC Analizi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), Agilent 1100 serisine ait G1311A QUATPUMP model pompa, G1379A gaz giderici ve G1315A model UV absorbans dedektöründen oluşmaktadır. HPLC için bir Zorbax Agilent Eclipse XDB-C18 kolon ( $250 \times 3.0$  mm, iç çapa göre uzunluk, 5  $\mu$ m partikül boyutu, Agilent Technologies inc., ABD) kullanılacaktır. Mobil faz, 20 mmol potasyum fosfat tamponu (pH 3.0) / asetonitril (7:3) karışımından oluşmaktadır. Mobil faz akışı izokrotik yöntem kullanılarak yapıldı, 35° C'de 0.6 ml / dak'lık bir akış hızında gerçekleştirildi. Nintedanibe ait dalga boyu 390 nm'lik UV absorbans saptamasıyla izlendi (97). Örnek enjeksiyon hacmi 10  $\mu$ L ve toplam çalışma süresi 14 dakikadır. Kromatogramlar, bir çevrimiçi bilgisayar aracılığıyla ve Agilent Chemstation yazılımı (Agilent Technologies, Inc., CA, ABD) kullanılarak entegre edilip ve işlendi.

#### 3.5.2. Nintedanib'in Stok Solüsyonları Hazırlanarak Kalibrasyonunun Yapılması

Standart stok çözeltisi (1 mg / ml) nintedanib deiyonize su içerisinde çözündürülerek hazırlandı ve sırasıyla 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ve 8  $\mu$ g / ml konsantrasyonlara seyreltildi. Kalibrasyon çözeltileri deiyonize su ile seyreltilerek standart nintedanib solüsyonları (12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 ng / ml) hazırlandı. Validasyonda kullanılan kalibrasyon çözeltileri, nintedanib uygulaması olmaksızın tavşanlardan toplanan vitreus sıvıları kullanılarak standart solüsyonlarla aynı şekilde hazırlandı. Vitreus sıvısının ekstraksiyonu HPLC metodunda yer alan mobil faz (20 mmol fosfat tamponu (pH 3.0) / asetonitril (7: 3)) kullanılarak yapıldı. Nintedanibin mobil faz içerisinde 8000ng / ml konsantrasyonda çözeltisi hazırlandıktan sonra, çözeltilerden 500  $\mu$ l alınıp fosforik asit içerisinde çözüldü. Bu çözeltilere, 500  $\mu$ l asetonitril ilave edildikten sonra 30 saniye boyunca vorteksle karıştırıldı. Son işlem olarak azot gazı altında uçurulup deiyonize suda çözündürülmesiyle gerçekleşti (98). Tüm çözeltiler kullanımdan önce +4 ° C'de saklandı.

### 3.5.3. HPLC Analizine Örnek Hazırlama

Vitreus örneğinin (80 µl) ekstraksiyonu, Bölüm 3.5.2’de açıklanan şekilde yapıldıktan sonra Süpernatant, 0.22 µm’lik bir filtreden (Millipore Co., Billerica, MA, ABD) geçirilerek, HPLC sistemine enjekte edildi.

## 3.6 Doku Örneklerinin İncelenmesi

### 3.6.1. Göz Küresi Hematoksilen ve Eozin Boyama

Enükle edilen tavşan gözleri %10 tamponlu formaldehitte fiksasyon sonrası Doku Takip Cihazı (Leica TP1020, Leica Microsystems, Almanya) ile takibi yapıldıktan sonra parafine gömüldü. Kızaklı Mikrotom (Leica SM2000R, Leica Microsystems, Almanya) ile 5 µm kalınlığında kesitler alınıp, rodajlı lamlara alındı. Ksilende deparafinize edilen preparatlar dereceli alkollerden geçirilerek rehidrate edildi. Ardından Hematoksilen-Eozin boyama tekniğine uygun bir şekilde önce 8 dakika Mayer’s hematoksilende bekletilip, akarsuda yıkandı. Sonrasında 1 dakika eozin boyası ile boyanıp, dereceli alkollerde dehidrate edildikten sonra kapatıldı ve aydınlık alan mikroskobunda (Leica DM6000 B, Leica Microsystems, Almanya) incelendi.

### 3.6.2. Göz Küresi Trikrom Boyama

Enükle edilen tavşan gözleri %10 tamponlu formaldehitte fiksasyon sonrası Doku Takip Cihazı (Leica TP1020, Leica Microsystems, Almanya) ile takibi yapıldıktan sonra parafine gömüldü. Kızaklı Mikrotom (Leica SM2000R, Leica Microsystems, Almanya) ile 5 µm kalınlığında kesitler alınıp, rodajlı lamlara alındı. Ardından Azan trikrom set (BO 04-001802, Bio-optica, İtalya) ile boyaması yapıldı. Aydınlık alan mikroskobunda (Leica DM6000 B, Leica Microsystems, Almanya) incelendi.

### 3.6.3. Göz Retinasında İmmünfloresan İşaretleme

Tavşan gözleri enükle edildikten sonra %10 fosfat tampon %4 fenol içeren formaldehitte fiksasyonu yapıldı. Fiksasyon sonrası kasetlenen dokular Doku Takip Cihazı (Leica TP1020, Leica Microsystems, Almanya) ile takibi yapıldıktan sonra gömülmeye hazır hale getirildi. Takip sonrası parafine gömülen dokulardan Kızaklı Mikrotom (Leica SM2000R, Leica Microsystems, Almanya) ile 5 µm kalınlığında kesitler alınıp, HistoBond®+ lamlara alındı. Ardından kolajen-1'i göstermek için kolajen-1 monoklonal (MA1-26771, Thermo, ABD) ve sekonder antikor Alexa flour 488 (A-11001, Thermo, ABD) kullanılarak indirekt immünfloresan tekniği ile işaretlendi. Bunun için preparatlar ksilende deparafinize edildikten sonra dereceli alkollerden geçirilerek rehidrate edildi ve sitrat tamponda antijen geri çağırma yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesi blokladı. PBS ile yıkandıktan sonra kolajen-1 monoklonal antikoru ile bir gece boyunca inkübe edildi. Ardından kesitler her biri 5 dakika olmak üzere 3 kere yıkandı ve Alexa Flour 488 ile inkübe edildi. Ardından kesitler tekrar yıkayıp DAPI ile boyandıktan sonra kapatıldı ve floresan mikroskobu (Leica DM6000 B, Leica Microsystems, Almanya) ile fotoğraflandı. Ardından kolajen-1 yoğunluğu belirlenmesi için ImageJ görüntü analiz programı (National Institutes of Health, ABD) ile fotoğraflar açılarak, floresan ışımaya intensitesi belirlendi. Ölçülen intensitelerin yarı niceliksel (semi-kantitatif) olarak belirlenmesi için her ölçüm 3 kez tekrarlandı.

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Araştırma %95 güven düzeyinde 2 grup literatürde önerilen etki büyüklükleri içerisinde geniş düzey etki büyüklüğünde ( $d=1.80$ , Cohen,J) en az 12 genişliğinde (6 ilaç ve 6 kontrol) örneklem seçildiğinde %80 güç elde edilmiştir (Örneklem genişliği GPower 3.1 versiyonu programı kullanılarak hesaplanmıştır).

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package Social Sciences) 22.0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Nicel veriler aritmetik ortalama ( $\bar{x}$ ), standart sapma (SS), medyan (ortanca), birinci çeyreklik ve üçüncü çeyreklik değerleri ile değerlendirilirken nitel verileri sayı ve yüzdeler ile değerlendirilmiştir.

Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğunu değerlendirmek amacıyla Shapiro Wilk testi uygulanmıştır. Bu test sonucunda iki bağımsız grup karşılaştırmalarında, normal dağılım göstermeyen verilerde Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Nitel verilerin karşılaştırılmasında Fisher Exact test kullanılmıştır. İki nicel veri arasındaki ilişki ve seviyesinin belirlenmesi için Spearman korelasyon analizi uygulanmıştır. Bütün istatistiksel analizlerde önemlilik seviyesi olarak  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir. P değeri 0,05-0,1 arası ise sınırda anlamlı olarak kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 14 adet tavşan haftalık oftalmolojik muayeneden geçirilmiş ve sorumlu veteriner tarafından sistemik açıdan da takibi yapılmıştır. Tavşanların herhangi birinde sistemik toksisite bulgusu gözlenmemiştir ve tamamı çalışmaya dahil edilebilmiştir. Ayrıca deneklerde anesteziye bağlı bir komplikasyon gelişimi de gözlenmemiştir.

### 4.1. Oftalmolojik Muayene Bulguları

Dört hafta boyunca haftalık genel anestezi altında oftalmolojik muayeneye tabi tutulan 12 adet tavşanın fundus görüntüleri 20D mercek ve akıllı telefon aracılığı ile kaydedildi. Fastenberg sınıflamasına göre kontrol (K) ve ilaç (N) gruplarının evreleri Tablo 4.1’de özetlenmiştir. Deneklerin birçoğunda 2-3 hafta içinde retina dekolmanı bulguları gözlenmeye başlamıştır.

**Tablo 4.1.** Deneklerin haftalara göre Fastenberg Sınıflaması evreleri:

Denek No	1.Hafta	2.Hafta	3.Hafta	4.Hafta
K1	1	2	4	5
K2	1	2	2	2
K3	1	2	2	4
K4	1	3	3	4
K5	1	1	3	5
K6	1	4	4	5
N1	0	0	1	1
N2	1	1	2	1
N3	1	3	3	5
N4	0	1	1	1
N5	1	3	3	4
N6	0	1	1	1

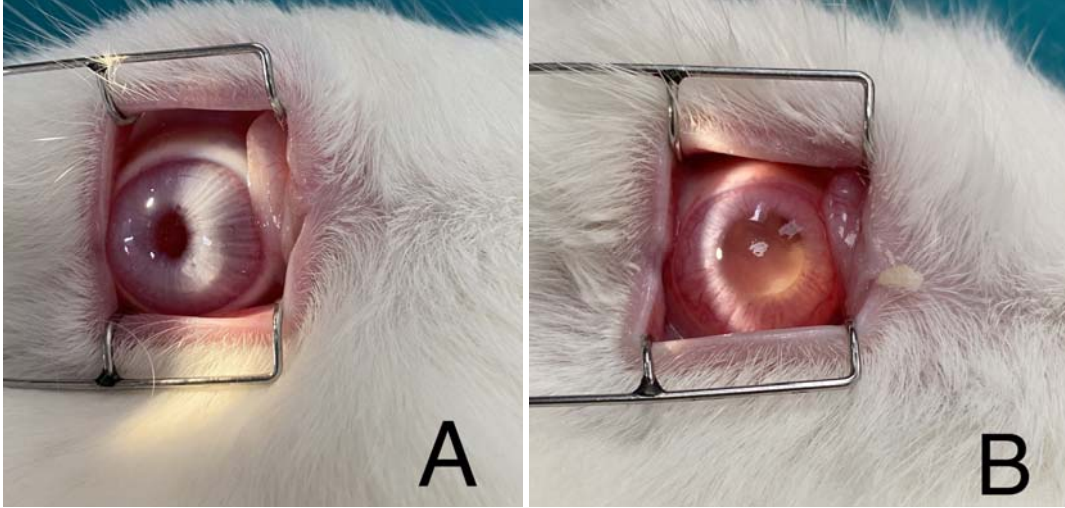
Nintedanib tedavisi uygulanan ve kontrol grubunda bulunan deneklerin buldukları evre açısından karşılaştırma sonuçlarına tablo 4.2’de yer verilmiştir. Nintedanib tedavisi uygulanan deneklerin %66,7’si (n:4) evre 1, %16,7’si (n:1) evre 4 ve %16,7’si (n:1) ise evre 5’tir. Kontrol grubunda bulunan deneklerin ise %16,7’si (n:1) evre 2, %33,3’ü (n:2) evre 4 ve %50’si (n:3) ise evre 5’tir. Uygulanan Fisher Exact test sonucuna göre, gruplar arasında deneklerin evresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $\chi^2:6,333$  p:0,108)

**Tablo 4.2.** Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan gruplarda evre dağılımı

	<b>Nintedanib (n:6)</b>	<b>Kontrol Grubu (n:6)</b>	<b><math>\chi^2/p</math></b>
<b>Evre 1</b>	4 (66,7%)	-	6,333/0,108
<b>Evre 2</b>	-	1 (16,7%)	
<b>Evre 4</b>	1 (16,7%)	2 (33,3%)	
<b>Evre 5</b>	1 (16,7%)	3 (50,0%)	

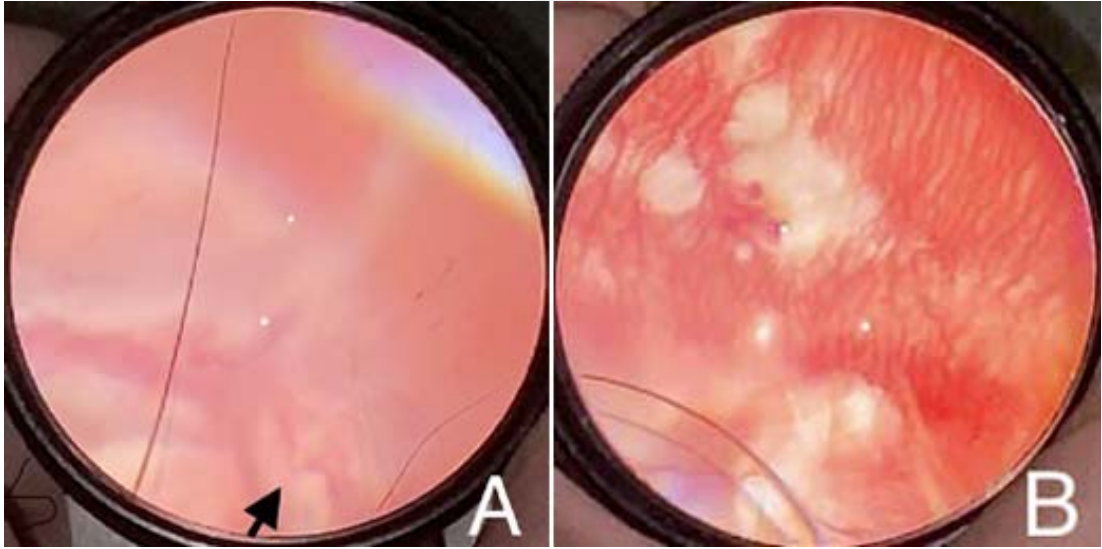
Kategorik veriler sayı (yüzde) ile değerlendirilmiştir.  $\chi^2$ :khi kare değeri

Dördüncü haftada gerçekleştirilen ön segment muayenesinde 12 tavşanda kapak ödemi, konjonktivit, kornea ödemi, ön kamarada reaksiyon gibi inflamatuvar değişiklikler gözlenmedi. Muhtemel lens travmasına bağlı sadece N5 ve K1 numaralı deneklerde fundus muayenesine engel olmayacak katarakt oluşumu gözlendi. Katarakt oluşumu, yoğun fibrozis, total dekolman gibi ortam opasiteleri nedeniyle klinik değerlendirmenin optimal olarak yapılamadığı durumlarda; enükle edilen gözler korneanın tam ortasından optik diske uzanan vertikal planda ikiye ayrılarak, mikroskop altında yapılan anatomik değerlendirme ile klinik evreler doğrulandı.



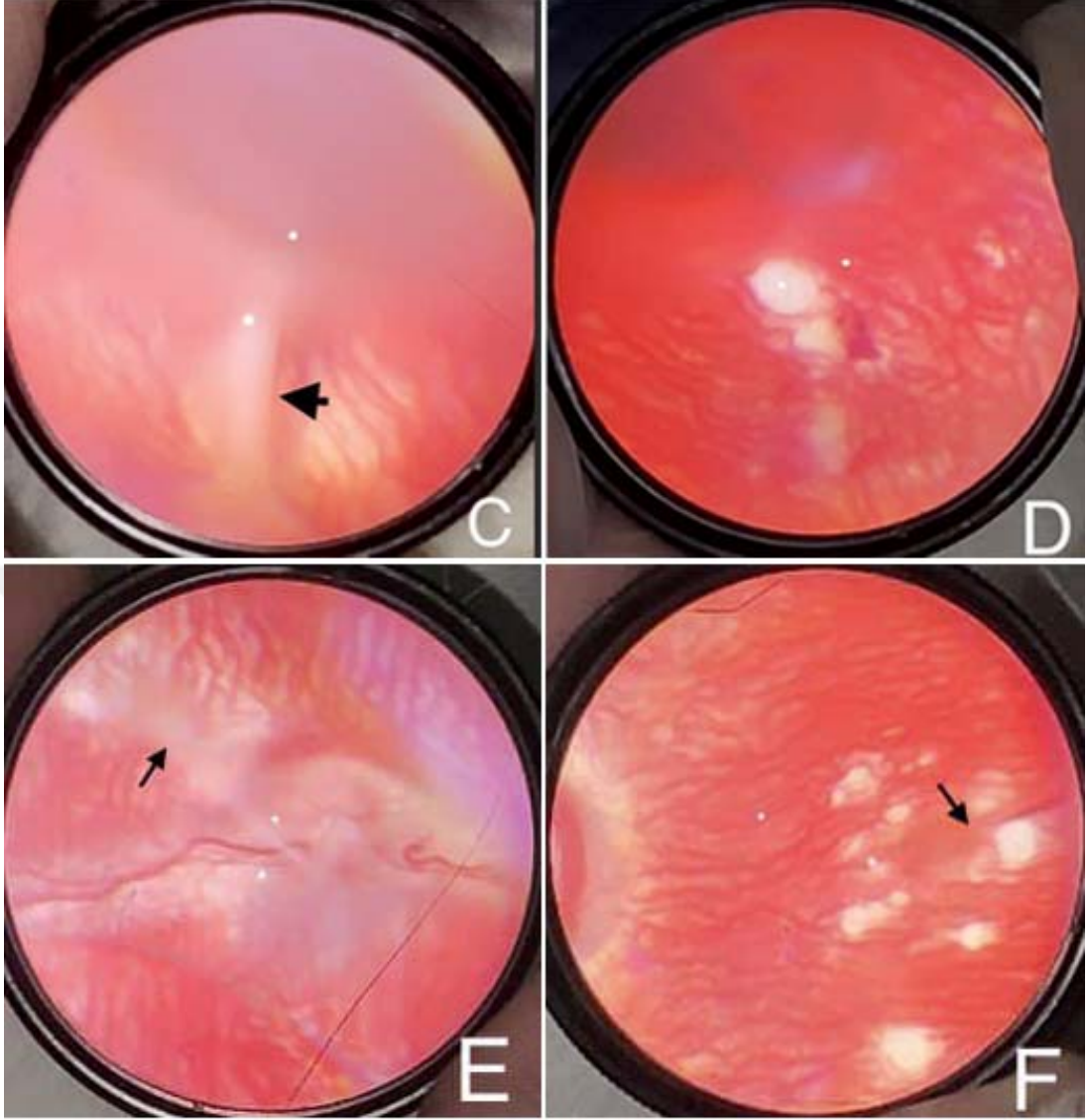
**Şekil 4.1.** Tavşanlarda ön segment bulguları

**A)** Normal tavşan ön segmenti (Denek numarası N1); **B)** Retina dekolmanı ve lens arka yüzeyine yapışık fibrotik membranlar (Denek numarası N3).



**Şekil 4.2.** Tavşanların fundus görüntüleri

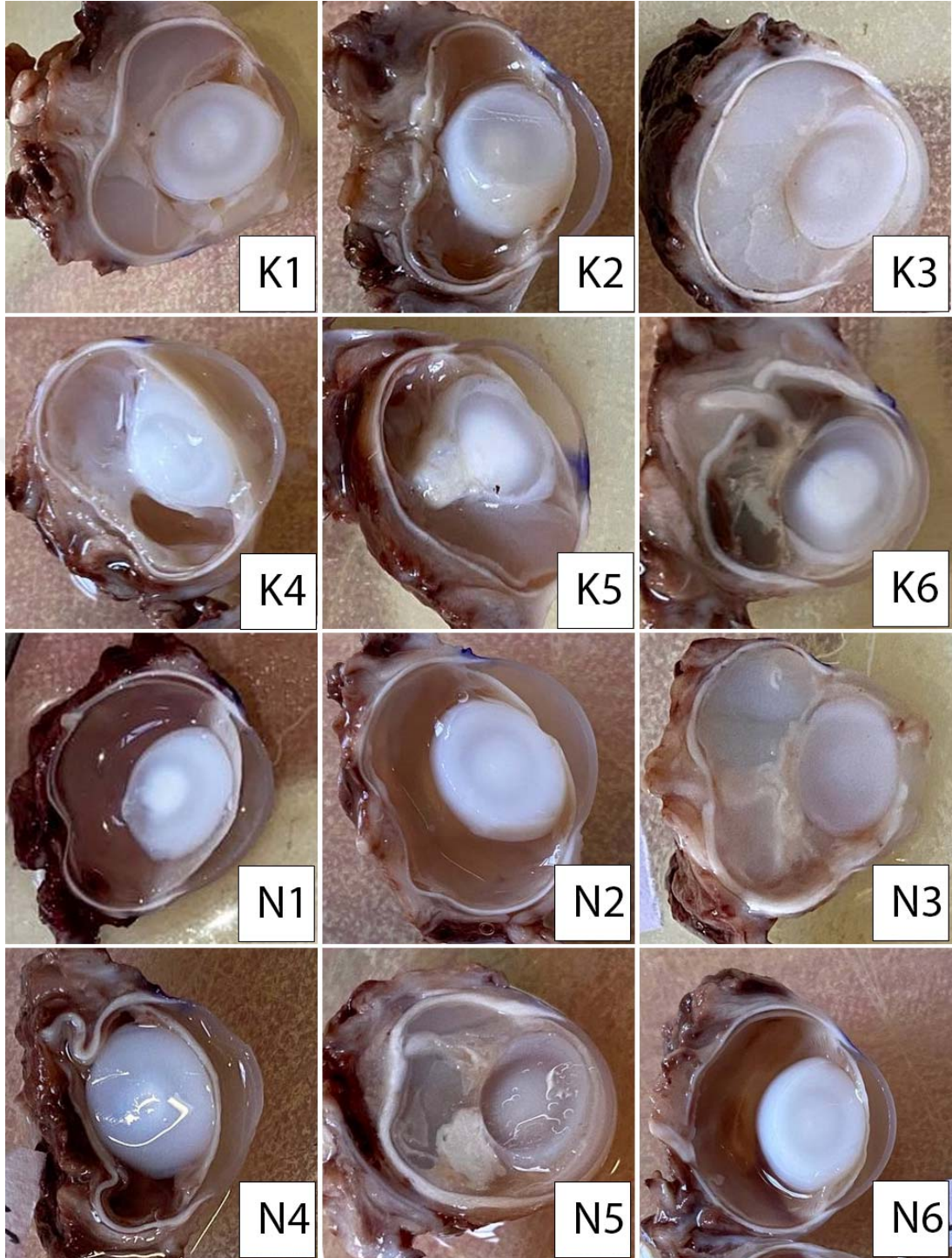
**A)** Total retina dekolmanı, disk ok (↑) ile gösterilmektedir (Denek numarası K1, Evre 5); **B)** Fokal traksiyon ve intravitreal membran oluşumları, retinada gliotik değişiklikler (Denek numarası K2, Evre 2).



**Şekil 4.2 devamı.** Tavşanların fundus görüntüleri

**C)** Traksiyon oluşturan membran (↑) ve geniş dekolman sahası (Denek numarası K4, Evre 4); **D)** İntravitreal membran, vitreus opasiteleri ve retinada gliotik değişiklikler (Denek numarası N1, Evre 1); **E)** Diskten uzanım gösteren ve traksiyon oluşturmeyan membran ok (↑) ile gösterilmekte (Denek numarası N2, Evre 1); **F)** Ok (↑) ile gösterilen intravitreal membran ve retinada gliotik değişiklikler (Denek numarası N6, Evre 1).

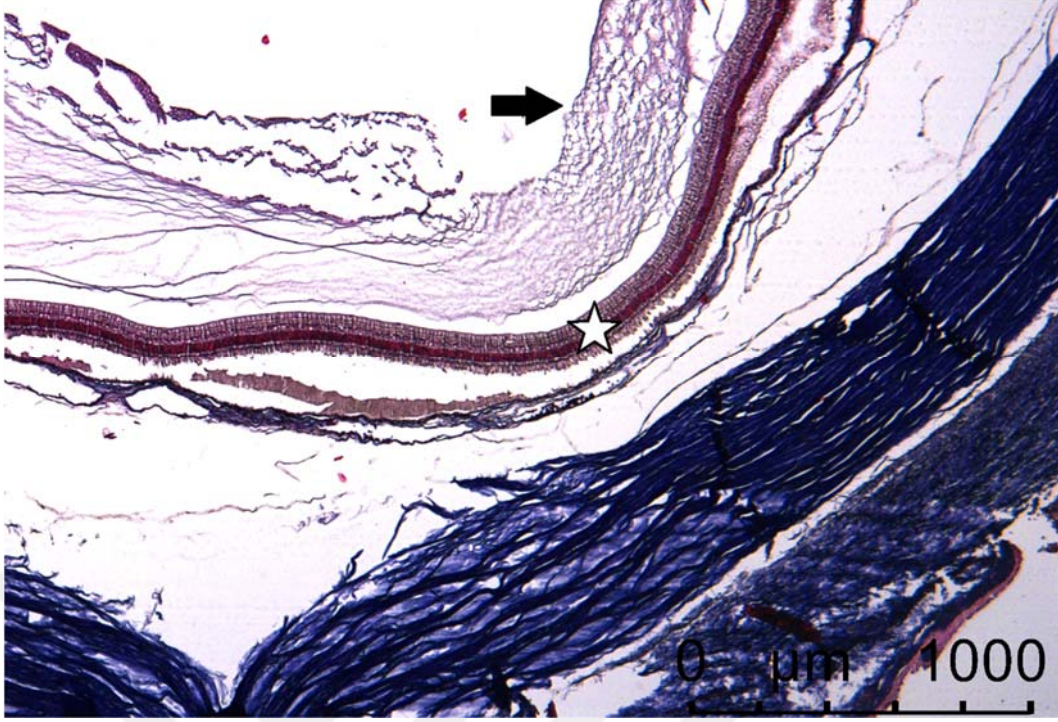
#### 4.2. Histolojik İnceleme



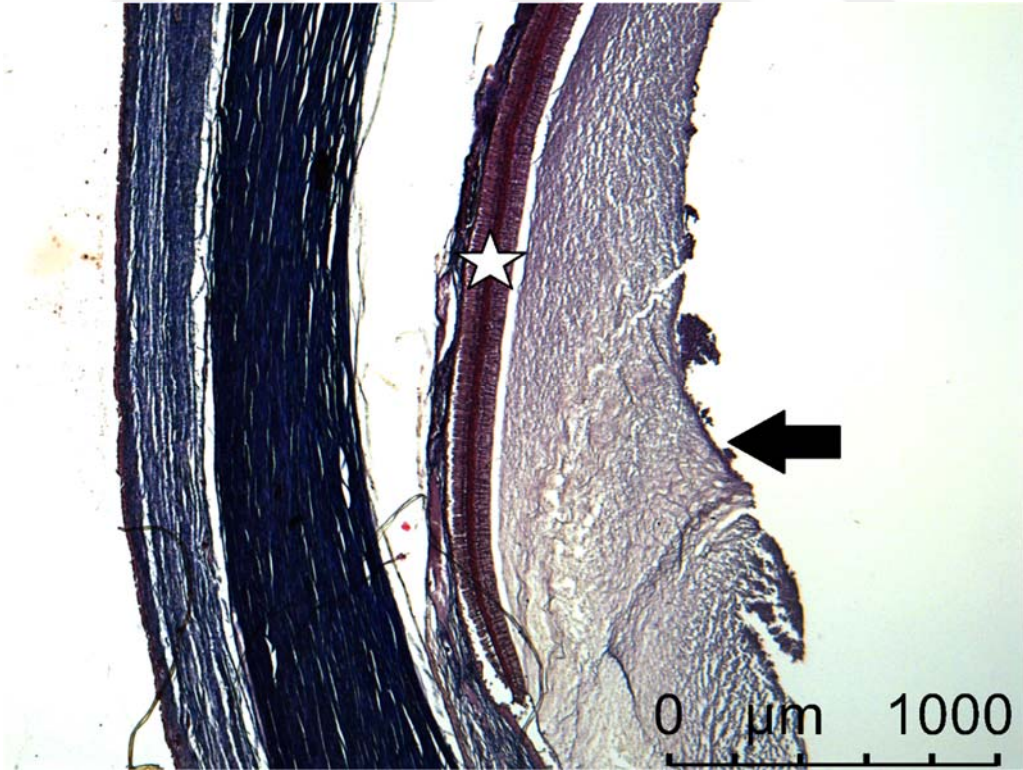
**Şekil 4.3.** Fiksasyon sonrası kontrol (K) grubuna ait ve Nintedanib (N) uygulanan gözlerin optik sınırdan geçecek şekilde vertikal düzlemde alınmış kesitlerinin gross anatomisi (N4 numaralı gözde enükleasyon sırasında perforasyon geliştiği için vitreus kaybı oluşmuş, oluşan şekil bozukluğu artefakt olarak değerlendirilmiştir.)

#### 4.2.1. Trikorom Boyamada Histolojik Bulgular

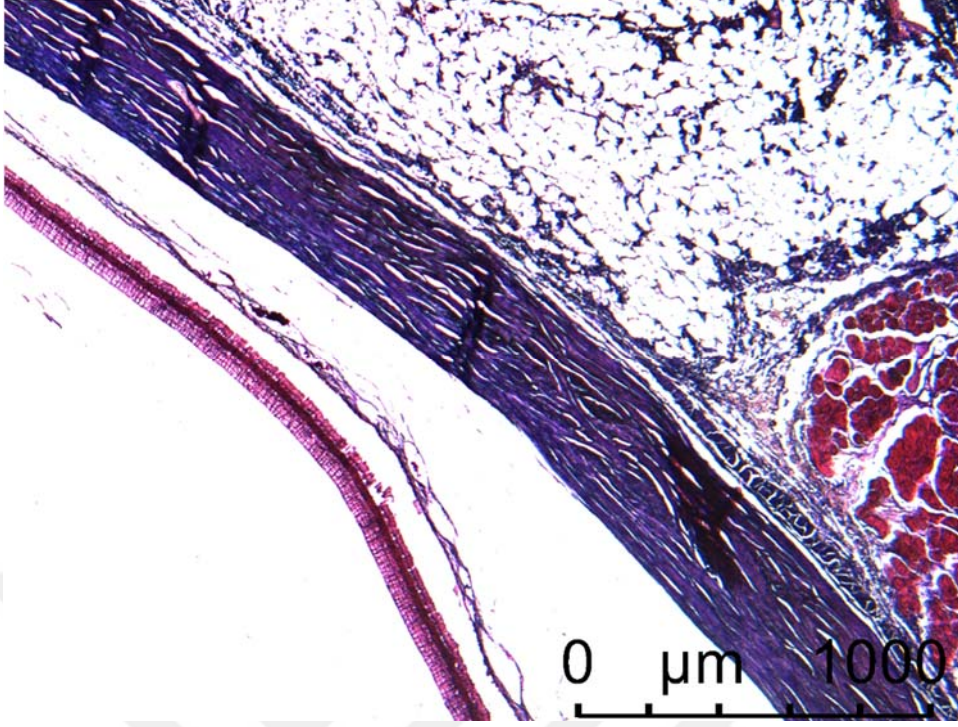
Kornea ve sklera, kontrol (PBS uygulanan) ve deney grubunda (Nintedanib uygulanan) normal tüm histolojik tabakaları ve hücreleri ile izlendi. Preperatlarda lens fibrilleri ile lens bütünlüğünün parçalanmış olarak gözlenmesi doku takibine bağlı artefakt olarak değerlendirildi. Kontrol grubunun bazılarında iris ile lens arasında vasküler bir doku varlığı gözlemlendi, lensin sublüksasyon ile bağlantılı olabileceği düşünüldü. Deney grubunda ise sadece bir hayvanda benzer histolojik yapılanma belirlenirken, diğer hayvanlarda bu bölgede artmış vasküler doku özelliği izlenmedi. Kontrol dokularında hastalık modeli oluşturulması için giriş yapılan bölgede kanama/trombüs görünümü ile uyumlu alanlar gözlemlendi. Göz küresinin posterior kısmı incelendiğinde koryokapiller tabakanın deney grubunda kontrol grubuna oranla çok daha ince olduğu dikkati çekti. Gruplar arasındaki bu farkın kontrol grubunda venlerdeki dilatasyon sonucu oluşan ödemden ve deney grubunda uygulanan nintedanibin potansiyel ödem azaltıcı etkisinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Hastalık modelinde gözlenmesi beklenen epiretinal membranla uyumlu olarak, kontrol dokusunda retina ve siliyer cisim önünde lense doğru uzanan fibrotik membran oluşumları gözlemlendi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Nintedanib uygulaması yapılan grupta fibrotik membranların retina önünde azaldığı, iris önünde ise bulunmadığı saptandı (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



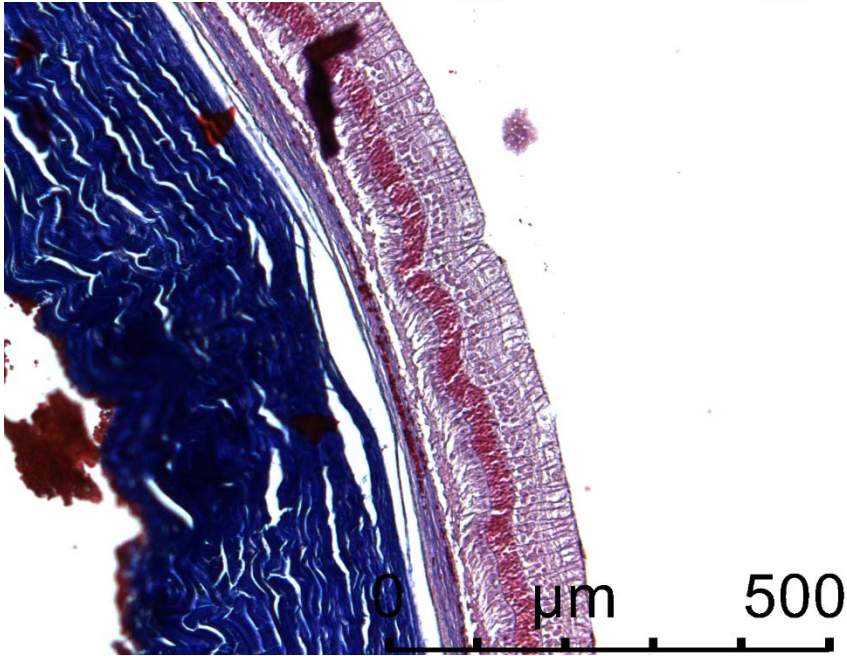
**Şekil 4.4.** Kontrol grubuna ait denekte retina (☆) önünde yerleşim gösteren fibröz bant (→), Masson trikrom, 40x magnifikasyon (Denek numarası K4).



**Şekil 4.5.** Kontrol grubuna ait denekte retina (☆) önünde yerleşim gösteren fibröz bant (→), Masson trikrom, 40x magnifikasyon (Denek numarası K5).



**Şekil 4.6.** Nintedanib grubuna ait denekte retina önünde fibröz bant (epiretinal membran) izlenmedi, retina altında incelmış koryokapiller tabaka, Masson trikrom, 40x magnifikasyon (Denek numarası N2).



**Şekil 4.7.** Nintedanib grubuna ait retina önünde fibröz bant (epiretinal membran) izlenmedi, retina altında incelmış koryokapiller tabaka, Masson trikrom, 100x magnifikasyon (Denek numarası N4)

#### 4.2.2. İmmünohistokimyasal İnceleme Bulguları

Nintedanib tedavisi uygulanan (n=6) ve kontrol grubunda bulunan (n=6) deneklerin ölçülen intensite düzeyleri, düzeltilmiş total hücre floresansı (CTCF), CTCF/alan ölçümleri ve dördüncü hafta sonundaki Fastenberg sınıflaması evreleri Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Kontrol ve Nintedanib uygulanan grubun İmmünohistokimyasal bulguları ve Fastenberg Sınıflaması evresi

Denek Numarası	Fastenberg Sınıflamasına göre PVR evreleri	Ölçülen İntensite	Düzeltilmiş Total Hücre Floresansı (CTCF)	CTCF/Alan
K1	5	2217447094	2215888740	12,79747377
K2	2	513582057,7	483344772,6	2,942849274
K3	4	672673946,5	669758187,5	4,134651588
K4	4	773559949,2	695231160,2	3,910680261
K5	5	758800117	757997534	3,777790197
K6	5	1915042550	1911617803	15,07080416
N1	1	97859980,9	97859980,9	0,569331766
N2	1	335493139,5	107140570,9	0,687831444
N3	5	237821709,1	232431682,3	2,371740059
N4	1	326999421,2	326999421,2	3,149715732
N5	4	356153206,9	351238983,7	3,430750016
N6	1	570438609,6	553243153,7	5,533893553

Nintedanib tedavisi uygulanan ve kontrol grubunda bulunan deneklerin ölçülen intensite düzeyleri açısından karşılaştırma sonuçlarına Tablo 4.4’de yer verilmiştir. Sonuçlara göre, nintedanib uygulanan deneklerin ölçülen intensite düzeyi ortalaması  $320.794.344,53 \pm 155.184.570,43$  iken, medyanı  $331.246.280,35$  ( $Q_1:237.821.709,10$ - $Q_3:356.153.206,90$ )’dür. Kontrol grubundaki deneklerin ölçülen intensite düzeyi ortalaması ise  $1.141.850.952,40 \pm 728.278.432,86$  iken, medyanı  $766.180.033,10$  ( $Q_1:672.673.946,50$ - $Q_3:1.915.042.550,00$ )’dur. Uygulanan Mann Whitney-U test

sonucuna göre, nintedanib uygulanan deneklerin ölçülen intensite düzeyi kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşüktür ( $t$  p:0,004).

**Tablo 4.4.** Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grubun ölçülen intensite düzeyi açısından karşılaştırılması

Ölçülen intensite	Gruplar		Test ist/p
	Nintedanib (n:6)	Kontrol Grubu (n:6)	
$\bar{X} \pm SS$	320.794.344,53 $\pm$ 155.184.570,43	1.141.850.952,40 $\pm$ 728.278.432,86	<b>-2,722</b>
<b>Med (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)</b>	331.246.280,35 (237.821.709,10-356.153.206,90)	766.180.033,10 (672.673.946,50-1.915.042.550,00)	<b>0,004</b>

Sürekli veriler  $\bar{X}$ : Aritmetik Ortalama, SS: Standart Sapma ve medyan (Q<sub>1</sub>:birinci çeyreklik- Q<sub>3</sub>:üçüncü çeyreklik) ile değerlendirilmiştir. Test ist: standartlaştırılmış test istatistiği

Nintedanib tedavisi uygulanan ve kontrol grubunda bulunan deneklerin CTCF düzeyleri açısından karşılaştırma sonuçlarına Tablo 4.5'te yer verilmiştir. Sonuçlara göre, nintedanib uygulanan deneklerin CTCF düzeyi ortalaması 278.152.298,78 $\pm$ 171.606.170,68 iken, medyanı 279.715.551,75 (Q<sub>1</sub>:107.140.570,90- Q<sub>3</sub>:351.238.983,70)'dür. Kontrol grubundaki deneklerin CTCF düzeyi ortalaması ise 1.122.306.366,22 $\pm$ 741.231.526,78 iken, medyanı 726.614.347,10 (Q<sub>1</sub>:669.758.187,50- Q<sub>3</sub>:1.911.617.803,00)'dur. Uygulanan Mann Whitney-U test sonucuna göre, Nintedanib uygulanan deneklerin CTCF düzeyi kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşüktür ( $t$  p:0,004).

**Tablo 4.5.** Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grubun CTCF düzeyi açısından karşılaştırılması

Düzeltilmiş Total hücre floresansı (CTCF)	Gruplar		Test ist/p
	Nintedanib (n:6)	Kontrol Grubu (n:6)	
$\bar{X} \pm SS$	278.152.298,78 $\pm$ 171.606.170,68	1.122.306.366,22 $\pm$ 741.231.526,78	<b>-2,722</b>
<b>Med (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)</b>	279.715.551,75 (107.140.570,90-351.238.983,70)	726.614.347,10 (669.758.187,50-1.911.617.803,00)	<b>0,004</b>

Sürekli veriler  $\bar{X}$ : Aritmetik Ortalama, SS: Standart Sapma ve medyan (Q<sub>1</sub>:birinci çeyreklik- Q<sub>3</sub>:üçüncü çeyreklik) ile değerlendirilmiştir. Test ist: standartlaştırılmış test istatistiği

Nintedanib tedavisi uygulanan ve kontrol grubunda bulunan deneklerin CTCF/alan düzeyleri açısından karşılaştırma sonuçlarına Tablo 4.6'da yer verilmiştir. Sonuçlara göre, nintedanib uygulanan deneklerin CTCF/alan düzeyi ortalaması  $2,62 \pm 1,87$  iken, medyanı  $2,76$  ( $Q_1:0,69$ -  $Q_3:3,43$ )'dür. Kontrol grubundaki deneklerin CTCF/alan düzeyi ortalaması ise  $7,11 \pm 5,35$  iken, medyanı  $4,02$  ( $Q_1:3,78$ -  $Q_3:12,80$ )'dir. Uygulanan Mann whitney-U test sonucuna göre, nintedanib uygulanan deneklerin CTCF/alan düzeyi her ne kadar kontrol grubuna oranla daha düşük bulunsada istatistiksel olarak sınırda anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $t$  p:0,065).

**Tablo 4.6.** Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grubun CTCF/alan düzeyi açısından karşılaştırılması

CTCF/Alan	Gruplar		Test ist/p
	Nintedanib (n:6)	Kontrol Grubu (n:6)	
$\bar{X} \pm SS$	$2,62 \pm 1,87$	$7,11 \pm 5,35$	-1,922
<b>Med (<math>Q_1</math>-<math>Q_3</math>)</b>	$2,76$ (0,69-3,43)	$4,02$ (3,78-12,80)	0,065

Sürekli veriler  $\bar{X}$ : Aritmetik Ortalama, SS: Standart Sapma ve medyan ( $Q_1$ :birinci çeyreklik-  $Q_3$ :üçüncü çeyreklik) ile değerlendirilmiştir. Test ist: standartlaştırılmış test istatistiği

Kontrol grubu ve nintedanib uygulanan grupların evreleri ile ölçülen intensite, CTCF ve CTCF/alan arasındaki korelasyon analizi sonuçlarına Tablo 4.7'de yer verilmiştir. Sonuçlara göre; nintedanib uygulanan deneklerde evre ile Ölçülen intensite ( $r:-0,101$  p:0,848), CTCF ( $r:0,135$  p:0,798), CTCF/alan ( $r:0,135$  p:0,798) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. Kontrol grubundaki deneklerde evre ile CTCF/alan ( $r:0,67$  p:0,192) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmazken, evre ile CTCF arasında pozitif yönlü yüksek derecede istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır ( $r:0,926$  p:0,008). Kontrol grubunda evresi yüksek olan deneklerin CTCF düzeyleri de yüksek bulunmuştur. Ayrıca kontrol grubunda ( $r:-0,772$  p:0,072) deneklerin evreleri ile ölçülen intensite değerleri arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı bir ilişki bulunmaktadır

**Tablo 4.7.** Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grubun Fastenberg evreleri ile Ölçülen intensite, CTCF ve CTCF/alan arasındaki korelasyon analizi sonuçları

			<b>İntensite</b>	<b>CTCF</b>	<b>CTCF/Alan</b>
<b>Nintedanib</b>	<b>Evre</b>	<b>r</b>	-0,101	0,135	0,135
		<b>p</b>	0,848	0,798	0,798
<b>Kontrol Grubu</b>		<b>r</b>	0,772	<b>0,926</b>	0,67
		<b>p</b>	0,072	<b>0,008</b>	0,192

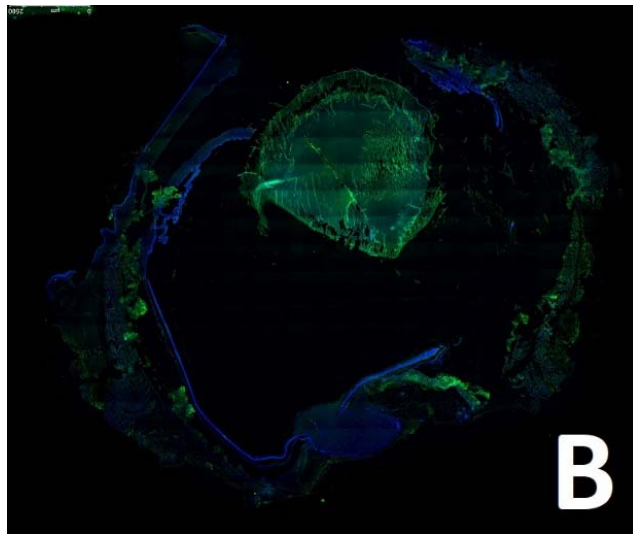
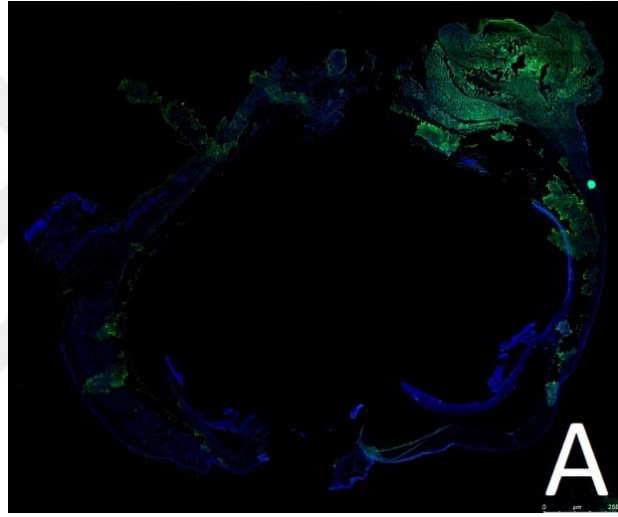
r: Spearman korelasyon katsayısı

Kontrol grubu ve nintedanib uygulanan grupların ölçülen intensite düzeyleri ile CTCF ve CTCF/alan arasındaki korelasyon analizi sonuçlarına Tablo 4.8’de yer verilmiştir. Sonuçlara göre, nintedanib uygulanan deneklerde ölçülen intensite düzeyleri ile hem CTCF (r:0,829 p:0,042) hem de CTCF/alan (r:0,829 p:0,042) arasında pozitif yönlü istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Nintedanib uygulanan deneklerde ölçülen intensite düzeyleri yüksek olan deneklerin hem CTCF düzeyi hem de CTCF/alan düzeyleri yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu deneklerde ölçülen intensite düzeyleri ile CTCF (r:0,943 p:0,005) düzeyleri arasında pozitif yönlü istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Kontrol grubu deneklerde ölçülen intensite düzeyleri ile CTCF/alan (r:0,771 p:0,072) düzeyleri arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı bir ilişki bulunmaktadır.

**Tablo 4.8.** Kontrol grubu ve Nintedanib uygulanan grupların ölçülen intensite düzeyleri ile CTCF ve CTCF/alan arasındaki korelasyon analizi sonuçları

			CTCF	CTCF/Alan
<b>Nintedanib</b>	<b>Ölçülen İntensite</b>	<b>r</b>	<b>0,829</b>	<b>0,829</b>
		<b>p</b>	<b>0,042</b>	<b>0,042</b>
<b>Kontrol Grubu</b>		<b>r</b>	<b>0,943</b>	0,771
		<b>p</b>	<b>0,005</b>	0,072

r:spearman korelasyon katsayısı



**Şekil 4.8.** PVR modeli oluşturulmuş gözlerde Kolajen-1 ekspresyonunun gösterilmesi için immünohistokimyasal boyama: A)Denek numarası K5; B)Denek numarası N2.

### 4.3. HPLC Metodu ile Vitreustan İlaç Düzeyi Tayini

PVR modeli oluşturulmamış iki adet tavşanın her iki gözüne nintedanib enjeksiyonu sonrası belirli zaman aralıklarında alınan vitreus örneklerinden elde edilen bulgular Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Nintedanib yüklü Lipozom formülasyonlarının ilk 7 günde yaklaşık yarısını vitreus kısmına verdiği ama tamamını salmasının 25 günden daha uzun sürdüğü tespit edildi. Salım kinetikleri açısından değerlendirilecek olursa birinci derece kinetiğe uygun salım yaptığı ( $r^2$ , 0,9993) ve difüzyon yoluyla içeriğini vitreus kısmına verdiği tespit edildi. Bunun yanı sıra permeabilite katsayısı 113,12 cm/gün olarak ve akı değeri (flux) 423,18 mcg/cm<sup>2</sup>/gün olarak tespit edildi (Permeabilite katsayısı hesaplanırken teğet açısı tayini yöntemi ve akı değeri hesaplanırken ise korelasyon katsayısı kullanılmıştır).



Şekil 4.9. Enjeksiyon sonrası günlere göre vitreustaki Nintedanib düzeyi

## 5. TARTIŞMA

PVR, regmatojen retina dekolmanı cerrahisi başarısızlığının en yaygın nedenidir ve oküler travmanın ciddi bir komplikasyonudur (3,4). Günümüzde PVR için kabul edilen standart tedavi cerrahidir. Ancak vitreoretinal cerrahi tekniklerindeki gelişmelere rağmen anatomik ve görsel sonuçlar tatmin edici değildir. PVR hala ciddi görme kaybının yaygın bir nedeni olmaya devam etmektedir. PVR'nin ilerlemesini önlemek veya durdurmak için yeni terapötik stratejiler gerekmektedir (8).

PVR'nin patogenezi henüz tam olarak anlaşılmış olmasa da, birçok büyüme faktörü ve sitokin ana oyuncular olarak kabul edilmektedir (8,45). Bu büyüme faktörleri ve sitokinler, daha fazla mediyatör salgılanmasını tetikleyen, inflamatuvar reaksiyonu güçlendiren ve sonunda proliferatif membranların oluşumuna yol açan sinyal molekülleri olarak işlev görmektedir. İnflamatuvar araçların tanımlanması, PVR tedavisi için yeni ve etkili terapötik hedefler sağlamaktadır (45). Bu hedeflere yönelik birçok antiinflamatuvar, antiproliferatif, antineoplastik, büyümeyi önleyici ve antioksidan ajan; PVR tedavisi ve profilaksisi için hem prelinik hem klinik çalışmalarla test edilmiştir. Ancak günümüzde PVR' nin tedavisi ve önlenmesi için kanıtlanmış bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır (4).

Literatürde deneysel PVR modelini oluşturmak için birçok yöntem tanımlanmıştır. Tavşan modelleri geniş vitreus hacimleri ve lens/retina için daha az hasar riski ile manipülasyon kolaylığı sağlaması bakımından oftalmolojik çalışmalar için avantaj sağlamaktadır. Ancak tavşan retinası meranjyotik yapısı nedeniyle kan damarları ve sinir lifi dağılımı açısından insanlardan farklıdır. Bu durum patolojik ve immünohistokimyasal incelemelerde çeşitli kısıtlılıklara sebep olmaktadır. Farklı modeller için değişken bir zaman süreci olmasına rağmen, hayvan modellerinde PVR'nin ilerlemesi genellikle insanlara göre çok daha hızlıdır. Temel modelde PVR'nin olağan gelişimi, membranlar ve bantlar görüldüğünde oldukça erken başlar. Retina dekolmanı günler içinde ortaya çıkabilir ve çoğu modelde 4 haftada tam bir PVR gelişimine ilerlemektedir (91). Bizim çalışmamızda da dekolman belirtileri 2-3 hafta içinde görülmeye başlamıştır ve deney 4 hafta tamamlandığında sonlandırılmıştır.

İlk geliştirilen PVR modellerinde sıklıkla PVR oluşumunu başlatmak için otolog dermal fibroblast enjeksiyonları kullanılmıştır (99,100). Bunun yanı sıra homolog dermal, korneal, koroidal ve konjonktival fibroblastlar, RPE hücreleri ve makrofajlar gibi diğer hücre tipleri de kullanılmıştır (96,101). Hücre enjeksiyon modellerinin en büyük avantajı minimal invaziv oluşlarıdır. Ancak insan PVR patogenezi dermal, konjonktival, korneal fibroblastlar yer almamaktadır. Kültüre edilmiş RPE ve makrofaj hücre enjeksiyonları insanda görülen PVR modelini daha iyi taklit etse de, yüksek teknoloji laboratuvar şartları gerektirmeleri ve yüksek maliyetli oluşları nedeniyle bizim çalışmamızda tercih edilmemiştir (91).

Yapay travma modelleri pars planadan yapılan skleral insizyon ve diğer manipülasyonları (gaz kompresyon, vitrektomi, kriyoterapi, retinotomi vb.) da içerir (102–104). Bunun yanı sıra iğne ile arka kutupta penetran göz travması uygulanarak oluşturulmuş PVR modelleri de mevcuttur (14,105). Bu cerrahi manipülasyonlar sonrası plateletten zengin plazma, otolog kan, ferröz demir ve hücre enjeksiyonları ile sinerjistik etki oluşturabilmek mümkündür (91).

Dispaz *Bacillus polymyxa*'dan elde edilen, deneysel çalışmalarda hücre toplama ve doku ayrıştırılmasında kullanılan bir nötral proteazdır. Bazal membranın yapısında bulunan Tip IV kolajen ve fibronektini selektif olarak yıkar (106). PVR indüksiyonu için intravitreal olarak uygulandığında retinal glial hücrelerin ve devamlılığı bozulan RPE hücrelerinin vitreus ve subretinal boşluğa doğru göçünü uyarır. İnsanlardaki PVR modelini anımsatacak şekilde, dispaz modelinde kültüre edilmiş hücre enjeksiyonu modellerinin aksine endojen hücre ve faktörler yer alır. Vitreus bulanıklığı, katarakt oluşumu ve zonulolizis gibi yan etkileri olan dispaz ile kabul edilebilir düzeyde bu yan etkileri oluşturarak PVR indüksiyonunu gerçekleştirebilen en etkili dozun 0,05 U-0,07 U olduğu Frenzel ve ark. tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca tek başına uygulanan dispaz enjeksiyonunun, kasıtlı oluşturulan retinal yırtık olmadan da PVR oluşumunu başlatabileceği gösterilmiştir (94). Maliyeti ucuz ve kolay ulaşılabilir bir enzim olan dispazın katarakt ve zonulolizis yan etkilerinin bir toksik reaksiyonla ilişkili olmadığı, bu proliferatif değişikliklerin PVR patogenezi ile de ilişkili olabileceği Kralinger ve ark. tarafından yapılan çalışmada ortaya konulmuştur. Ayrıca enjeksiyon yönteminin değiştirilerek bu

yan etkilerin önlenip önlenemeyeceğine yönelik daha fazla araştırma gerektiği de ifade edilmiştir (95). Bizim çalışmamızda tüm bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları göz önünde bulundurularak yapay travma ile kombine edilmiş, etkili olduğu gösterilen minimum dispaz enjeksiyonu modeli kullanılmıştır. PVR patogenezinde retina yırtığı oluşumu temel olay olduğu için (7), bu iki modelin kombinasyonunun insan PVR modelini daha iyi yansıtabileceği düşünülmüştür.

Lipozomlar, fosfolipid ile hazırlanan bir veya daha fazla kompartmandan oluşan veziküller nanotaşıyıcı sistemlerdir (107). Lipozomlar sayesinde, hidrofilik ilaçlar sulu iç fazda taşınırken, hidrofobik ilaçlar da membranların içerisinde taşınabilmektedir. Bu formülasyonlar “rezervuar tipi” taşıyıcı görevi görürler ve bu sayede gözün arka segmentinde kullanımları için ideal hale gelen taşıyıcı sistemler arasında değerlendirilmektedirler. Sentetik pirimidin analogu 5-FU, lipozomlar içinde kapsüllenen ilk bileşiktir (108,109). İlaçların lipozomal dağıtımının avantajları şunlardır: 1) dozlama sıklığının azalması potansiyeli, 2) toksisitenin azalmasıyla sonuçlanan pik konsantrasyonların azalması, 3) daha yüksek terapötik indeks ve sağlıklı dokuya toksisitenin azalmasıyla sonuçlanan istenen dokuya spesifik hedefleme ve 4) mononükleer fagositik sistemi pasif olarak hedefleme yeteneği (110). Lipozomlar özellikle bağışıklık sisteminin fagositlerini etkileyen hastalıkların tedavisinde etkilidir, çünkü lipozomlar onları yabancı istilacılar olarak tanıyan fagositlerde birikir. Bu sebeple daha önceki araştırmalarda RPE hücrelerinin fagositik olduğunun ve lipozomların retiküloendotelial sistem hücreleri tarafından fagosite edildiğinin gösterilmesi üzerine, PVR’yi tedavi etmek için lipozom kapsüllü ilaçların kullanımı akla gelmiştir (111). Lipozomal doksorubisin ile yapılan bir çalışmada, oküler dokuda lipozomal doksorubisinin basit doksorubisine kıyasla daha düşük toksisiteye ve daha uzun etki süresine sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, lipozomal doksorubisinin deneysel PVR’de retinal glial yanıtı azalttığı saptanmıştır (112). Bizim çalışmamızda ortalama 236.6 nm boyutunda lipozomlara yüklenmiş %0,5’lik nintedanib solüsyonu kullanılmış olup; bu yöntemle ilacın yarı ömrünün uzatılarak tekrarlayan enjeksiyonlara gereksinimi azaltmak, ilacın sağlıklı dokulara toksisitesini azaltmak amaçlanmıştır. Deneyde ayrıca bir grup tayşana boş (ilaçsız) lipozom uygulaması yapılmamıştır. Çünkü daha önce yapılmış birçok çalışmada boş lipozom uygulaması yapılan gözler ile kontrol grubu arasında; uygulanan Elektoretinografi

(ERG) tetkikleri açısından ve histolojik olarak farklılık saptanmamıştır. Ayrıca boş lipozom enjekte edilen grupta herhangi bir yan etki gözlenmemiştir (113–115).

Çalışmamızdaki histolojik kesitlerin birçoğunda retina dekolmanı görülmeyen gözlerde de retinal ayrılmanın olduğu gözlenmiştir. Bu durum daha önce Nassar ve ark. tarafından PVR modeli oluşturulmuş gözlerde fiksatif özelliklerinin kıyaslandığı bir çalışmada, formaldehit solüsyonunun yüksek osmolariteye sahip olmasına bağlı gelişen artefakt olarak açıklanmıştır (116). Ancak gerçek retina dekolmanını dejenere fotoreseptörler ve subretinal sıvının mevcudiyeti ile artefakta bağlı retina ayrılmasından histolojik olarak ayırt etmek mümkündür. Gross patolojiye dayalı olarak değerlendirilen PVR evreleme yöntemlerinin fiksatif seçiminden önemli ölçüde etkilendiği gösterilmiştir (116).

PVR membranlarındaki ekstraselüler matriksin ana bileşeni Tip I kolajendir (31,32). Rekürren RD, travma, inflamatuvar süreçler ve diyabet gibi farklı etyolojilere bağlı gelişen proliferatif membranlarda, kolajen tip I ve III ve fibronektin her zaman ekstraselüler matriksin düzenli bileşenleri olarak immünofloresan tekniği ile gösterilmiştir (31). Bu sebeple bizim çalışmamızda gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizlerde PVR membranlarındaki kolajen-1 intensitesinin saptanması amacıyla kolajen-1 monoklonal antikoru ile işaretleme yapılmıştır.

Günümüzde İPF tedavisi için kullanılan nintedanib ile yapılmış bir takım *in vivo* ve *in vitro* oftalmolojik çalışmalar mevcuttur. Rivera ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada yeni doğmuş ratlarda oksijenle indüklenen retinopati modeli oluşturulmuş ve nintedanib intravitreal veya oral yolla uygulanmıştır. Oksijenle indüklenmiş retinopatinin erken evrelerinde enjekte edildiğinde, preretinal NV'u inhibe ettiği ve uzun vadeli fonksiyonel hasarı önlemek için gerekli olan normal vaskülarizasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir. Yüksek oksijen maruziyeti ile oluşturulmuş vazo-obliterasyon (VO) modelinde ise intravitreal nintedanibin VO'u arttırmadığı gösterilmiştir. Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurularak bu çalışmada, nintedanibin iskemik retinopatilerin tedavisi için anti-VEGF terapilerine alternatif olabileceği öne sürülmüştür (13).

Huu ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada lazer ile indüklenmiş koroidal NV modeli oluşturulmuş ratlarda, ultraviyole ile salınımı tetiklenen taşıyıcılar içine yüklenmiş nintedanibin intravitreal uygulanması ile koroidal NV'nun azaldığı gösterilmiştir (117).

Hatano ve ark. tarafından insan RPE hücrelerinden hazırlanan nekrotik hücre lizatının, RPE hücrelerinden VEGF salınımı önemli ölçüde arttırdığını ve bu etkinin, nintedanib tarafından zayıflatıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca nintedanibin yaşa bağlı maküla dejenerasyonu modeli oluşturulmuş farelerde koroidal neovaskülarizasyon gelişimini hafiflettiği de gözlemlenmiştir (12).

Lin ve ark. tarafından yapılan çalışmada nintedanibin insan tenon fibroblastlarının TGF- $\beta$  etkisiyle farklılaşmasını önlediği ve doz bağımlı olarak fibroblastların proliferasyon ve migrasyonunu baskıladığı saptanmıştır. Nintedanibin insan tenon fibroblastları üzerinde güçlü antifibrotik etkilere sahip olduğu ve subkonjonktival fibroz için potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (118).

Nintedanib gibi İPF tedavisinde FDA onayı almış bir diğer kinaz inhibitörü olan pirfenidon ile Khanum ve ark. tarafından yapılan çalışmada; intravitreal uygulananan pirfenidonun tavşanlarda oluşturulmuş post-travmatik PVR modelinde PVR formasyonunu engellediği klinik değerlendirme, gross histoloji, histopatoloji ve immünohistokimya yoluyla gösterilmiştir. IL-6, TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  düzeylerinde ise pirfenidon uygulanan grupta PBS uygulanan gruba göre anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır. Pirfenidonun intravitreal enjeksiyonu sonrasında herhangi bir yan etki göstermemiş, herhangi bir anormal klinik belirti, ERG'de önemli bir değişiklik ve retina histolojisinde değişiklik gözlenmemiştir (14).

Bizim çalışmamızda nintedanib uygulanan grupta kolajen-1'e yönelik ölçülen intensite ve CTCF değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur (sırasıyla p:0,004 ve p:0,004). CTCF/alan değerlerinde her ne kadar nintedanib uygulanan grup kontrol grubuna göre daha düşük saptansa da istatistiksel olarak sınırda anlamlılık mevcuttur (p:0,065). Her iki grubun klinik evreleri arasında da anlamlı farklılık saptanmamıştır (p:0,108). Bu durum her gruba düşen denek sayısının

az olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca histolojik incelemede nintedanib uygulanan grupta retina önünde daha az fibrotik membran oluşumunun gözlenmesi de immunfloresans ölçümleri ile tutarlılık göstermektedir. Deneklerin Fastenberg evrelerinin nintedanib uygulanan grupta ölçülen intensite, CTCF ve CTCF/alan değerleri ile arasında korelasyon saptanmamıştır. Benzer şekilde kontrol grubunda da evre ile CTCF/alan değerleri arasında korelasyon gözlenmezken, bu grupta evre ve CTCF değerlerinin pozitif yönde yüksek korelasyon gösterdiği saptanmıştır (p:0,008). Ayrıca kontrol grubundaki deneklerin evreleri ile ölçülen intensite arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (p:0,072). Nintedanib grubundaki evre ile bu parametreler arasında anlamlı farklılık saptanmazken kontrol grubunda anlamlı farklılık saptanmasının, muhtemelen intravitreal nintedanib uygulamasıyla olağan sürecin sekteye uğratılması sebebiyle olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda ilaç uygulanan grupta 6 tavşanın 2'sinde oftalmolojik muayenede RD oluşumu (Evre 3 ve üzeri) gözlenmiştir. Buna karşılık kontrol grubundaki 6 tavşanın 5'inde RD oluşumu gözlenmiştir (Evre 3 ve üzeri). Bunun sebebi çalışmamızda nintedanibin farklı konsantrasyonlarının uygulanarak bir doz çalışması yapılmamış olması ve her gruba mümkün olabilecek az sayıda deneğin dahil edilmesi olabilir. Farklı konsantrasyonlarda nintedanibin fibrotik membran oluşumuna ve bundan kaynaklanan RD oluşumuna etkisinin incelenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürde herhangi bir PVR modeli üzerinde nintedanibin etkisinin gösterildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamız bir tirozin kinaz inhibitörü olan nintedanibin PVR modeli üzerinde denendiği ilk çalışmadır. Aynı şekilde lipozom içinde kapsüllenmiş nintedanibin intravitreal uygulanması ile ilgili de şimdiye dek yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda oluşturulan PVR modeli üzerinde nintedanibin PVR formasyonunu engellediği klinik gözlem, histolojik inceleme ve immünohistokimyasal yöntemler ile gösterilmeye çalışılmıştır. Elde edilen birçok veri arasında istatistiksel anlamlılık saptansa da çalışmamızda bir takım kısıtlılıklar mevcuttur. Bunlar; denek sayısının az tutulması, ilacın farklı konsantrasyonlarının denenmemesi, retinal toksisitenin yalnızca histolojik olarak

değerlendirilmesi, deneklere ERG uygulanmaması, deney modeli üzerinde ilaçsız (boş) lipozom uygulanan ayrıca bir grubun yer almaması, HPLC ile vitreustaki ilaç düzeyinin tespiti için her zaman aralığında yalnızca bir denekten örnek alınmasıdır. Çalışmamızda nintedanibin PVR modeli üzerinde ilk kez denendiği göz önünde bulundurulacak olursa, farklı PVR modellerinde ve farklı konsantrasyonlarda etkilerini inceleyen gelecek çalışmalar ile PVR tedavisi ve proflaksisi için umut vadedebileceğini düşünmekteyiz.



## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda tavşan gözlerinde oluşturulmuş PVR modeli üzerinde intravitreal nintedanibin etkisi klinik gözlem, histolojik inceleme ve immünohistokimyasal yöntemler ile incelenmiştir. Nintedanib uygulanan grupta oftalmolojik muayene ile belirlenen Fastenberg evreleri her ne kadar daha düşük gözükse de, kontrol grubuna kıyasla aralarında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Histolojik incelemelerde ise epiretinal membran oluşumlarının nintedanib uygulanan grupta belirgin bir toksik etki gözlenmeden daha az meydana geldiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra immünohistokimyasal incelemelerde nintedanib uygulanan grupta kontrol grubuna göre kolajen-1 ekspresyonu için ölçülen intensite ve CTCF değerleri anlamlı düşük bulunmuştur. CTCF/alan değeri ise sınırdan anlamlı sayılabilecek düzeyde nintedanib grubunda düşüktür. Nintedanib yüklü lipozom formülasyonlarının ise ilk 7 günde yaklaşık yarısını vitreus kısmına verdiği ama tamamını salmasının 25 günden daha uzun sürdüğü tespit edilmiştir.

Çalışmamızda nintedanibin belirgin bir yan etki gözlenmeden deneysel PVR modeli üzerinde PVR oluşumunu engelleyebildiği gösterilmiştir. Bu çalışma nintedanibin PVR tedavisi ve profilaksisinde kullanılabilecek potansiyel bir ilaç olduğunu göstermektedir. Nintedanibin güvenlik ve etkililiğini gösteren daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Hilton G, Machemer R, Michels R, *et al.* The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology* 1983;**90**:121–5.
2. Ryan SJ. The pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in its management. *American Journal of Ophthalmology* 1985;**100**:188–93.
3. Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: An overview. *Survey of Ophthalmology* 1998;**43**:3–18.
4. Idrees S, Sridhar J, Kuriyan AE. Proliferative vitreoretinopathy: A review. *International Ophthalmology Clinics* 2019;**59**:221–40.
5. Pastor JC, De La Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: Risk factors and pathobiology. *Progress in Retinal and Eye Research* 2002;**21**:127–44.
6. Asaria RHY, Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: Developments in pathogenesis and treatment. *Comprehensive Ophthalmology Update* 2006;**7**:179–85.
7. Charteris DG, Sethi C, Lewis G FS, Lewis GP, Fisher SK. Proliferative vitreoretinopathy - Developments in adjunctive treatment and retinal pathology. *Eye* 2002;**16**:369–74.
8. Sadaka A, Giuliari GP. Proliferative vitreoretinopathy: Current and emerging treatments. *Clinical Ophthalmology* 2012;**6**:1325–33.
9. Fala L. Ofev (Nintedanib): First Tyrosine Kinase Inhibitor Approved for the Treatment of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American health & drug benefits* 2015;**8**:101–4.
10. Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, *et al.* BIBF 1120: Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Research* 2008;**68**:4774–82.
11. Deissler HL, Stutzer JN, Lang GEGK, *et al.* VEGF receptor 2 inhibitor nintedanib completely reverts VEGF-A165-induced disturbances of barriers formed by retinal endothelial cells or long-term cultivated ARPE-19 cells. *Experimental Eye Research* 2020;**194**:108004.

12. Hatano M, Tokuda K, Kobayashi Y, *et al.* Inhibitory effect of nintedanib on VEGF secretion in retinal pigment epithelial cells induced by exposure to a necrotic cell lysate. *PLoS ONE* 2019;**14**:1–17.
13. Rivera JC, Noueihed B, Omri S, *et al.* BIBF1120 (Vargatef) Inhibits Preretinal Neovascularization and Enhances Normal Vascularization in a Model of Vasoproliferative Retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2015;**56**:7897–907.
14. Khanum BNMK, Guha R, Sur VP, *et al.* Pirfenidone inhibits post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 2017;**31**:1317–28.
15. AAO. Section 02: Fundamentals and Principles of Ophthalmology. In: *Basic and Clinical Science Course*. American Academy of Ophthalmology 2019. 119–43.
16. AAO. Section 12: Retina and Vitreous. In: *Basic and Clinical Science Course*. American Academy of Ophthalmology 2019. 29–47.
17. Chiba C. The retinal pigment epithelium: An important player of retinal disorders and regeneration. *Experimental Eye Research* 2014;**123**:107–14.
18. Pastor JC, Rojas J, Pastor-Idoate S, *et al.* Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences. *Progress in Retinal and Eye Research* 2016;**51**:125–55.
19. Bishop PN. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Progress in Retinal and Eye Research* 2000;**19**:323–44.
20. Le Goff MM, Bishop PN. Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye* 2008;**22**:1214–22.
21. Theocharis D, Skandalis S, Noulas A, *et al.* Hyaluronan and chondroitin sulfate proteoglycans in the supramolecular organization of the mammalian vitreous body. *Connective Tissue Research* 2008;**49**:124–8.
22. Sakamoto T, Ishibashi T. Hyalocytes: Essential cells of the vitreous cavity in vitreoretinal pathophysiology? *Retina* 2011;**31**:222–8.
23. Bishop PN, Holmes DF, Kadler KE, *et al.* Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004;**45**:1041–6.

24. Fincham GS, James S, Spickett C, *et al.* Posterior Vitreous Detachment and the Posterior Hyaloid Membrane. *Ophthalmology* 2018;**125**:227–36.
25. Shui Y-B, Holekamp NM, Kramer BC, *et al.* The Gel State of the Vitreous and Ascorbate-Dependent Oxygen Consumption: Relationship to the Etiology of Nuclear Cataracts. *Archives of ophthalmology* 2009;**127**:475.
26. Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research* 1998;**17**:77–98.
27. Kon CH, Asaria RHY, Occleston NL, *et al.* Risk factors for proliferative vitreoretinopathy after primary vitrectomy: A prospective study. *British Journal of Ophthalmology* 2000;**84**:506–11.
28. Elliott D, Stryjewski TP, Andreoli MT, *et al.* Smoking is a risk factor for proliferative vitreoretinopathy after traumatic retinal detachment. *Retina* 2017;**37**:1229–35.
29. Campochiaro PA, Bryan JA, Conway BP, *et al.* Intravitreal Chemotactic and Mitogenic Activity: Implication of Blood-Retinal Barrier Breakdown. *Archives of Ophthalmology* 1986;**104**:1685–7.
30. Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK, *et al.* Glial remodeling and neural plasticity in human retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2005;**46**:329–42.
31. Scheiffarth OF, Kampik A, Günther H, *et al.* Proteins of the extracellular matrix in vitreoretinal membranes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 1988;**226**:357–61.
32. Kimoto K, Nakatsuka K, Matsuo N, *et al.* p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF- $\beta$ 2 in human retinal pigment epithelial cells ARPE-19. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004;**45**:2431–7.
33. Campochiaro PA. Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy. *Archives of Ophthalmology* 1997;**115**:237–41.
34. Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: Pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment. *British Journal of Ophthalmology* 1995;**79**:953–60.
35. Baudouin C, Fredj-Reygrobelle D, Brignole F, *et al.* Growth factors in vitreous and subretinal fluid cells from patients with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Research* 1993;**25**:52–9.

36. Cui JZ, Chiu A, Maberley D, *et al.* Stage specificity of novel growth factor expression during development of proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 2007;**21**:200–8.
37. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 2009;**119**:1420–8.
38. Chen Z, Shao Y, Li X. The roles of signaling pathways in epithelial-to-mesenchymal transition of PVR. *Molecular Vision* 2015;**21**:706–10.
39. Lewis GP, Charteris DG, Sethi CS, *et al.* The ability of rapid retinal reattachment to stop or reverse the cellular and molecular events initiated by detachment. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2002;**43**:2412–20.
40. Limb GA, Alam A, Earley O, *et al.* Distribution of cytokine proteins within epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Current Eye Research* 1994;**13**:791–8.
41. Andrews A, Balciunaite E, Leong FL, *et al.* Platelet-derived growth factor plays a key role in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1999;**40**:2683–9.
42. Hinton DR, He S, Jin ML, *et al.* Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 2002;**16**:422–8.
43. Dieudonné SC, La Heij EC, Diederens RMH, *et al.* Balance of vascular endothelial growth factor and pigment epithelial growth factor prior to development of proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Research* 2007;**39**:148–54.
44. Lei H, Velez G, Hovland P, *et al.* Growth factors outside the PDGF family drive experimental PVR. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2009;**50**:3394–403.
45. Dai Y, Dai C, Sun T. Inflammatory mediators of proliferative vitreoretinopathy: hypothesis and review. *International Ophthalmology* 2020;**40**:1587–601.
46. Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: Mechanism of action and possible in vivo function. *Molecular Biology of the Cell* 1990;**1**:555–66.
47. Cui JZ, Lei H, Samad A, *et al.* PDGF receptors are activated in human epiretinal membranes. *Experimental Eye Research* 2009;**88**:438–44.

48. Lei H, Rhéaume MA, Velez G, *et al.* Expression of PDGFR $\alpha$  is a Determinant of the PVR potential of ARPE19 cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2011;**52**:5016–21.
49. Pfeffer BA, Flanders KC, Guérin CJ, *et al.* Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye. *Experimental Eye Research* 1994;**59**:323–33.
50. Connor TB, Roberts AB, Sporn MB, *et al.* Correlation of fibrosis and transforming growth factor- $\beta$  type 2 levels in the eye. *Journal of Clinical Investigation* 1989;**83**:1661–6.
51. Kita T, Hata Y, Arita R, *et al.* Role of TGF- $\beta$  in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;**105**:17504–9.
52. Lean JS, Stern WH, Irvine AR, *et al.* Classification of Proliferative Vitreoretinopathy Used in the Silicone Study. *Ophthalmology* 1989;**96**:765–71.
53. Machemer R, Aaberg TM, Freeman HM, *et al.* An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *American Journal of Ophthalmology* 1991;**112**:159–65.
54. Di Lauro S, Kadhim MR, Charteris DG, *et al.* Classifications for Proliferative Vitreoretinopathy (PVR): An Analysis of Their Use in Publications over the Last 15 Years. *Journal of Ophthalmology* 2016;**2016**.
55. Coffee RE, Jiang L, Rahman SA. Proliferative vitreoretinopathy: Advances in surgical management. *International Ophthalmology Clinics* 2014;**54**:91–109.
56. Storey P, Alshareef R, Khuthaila M, *et al.* Pars plana vitrectomy and scleral buckle versus pars plana vitrectomy alone for patients with rhegmatogenous retinal detachment at high risk for proliferative vitreoretinopathy. *Retina* 2014;**34**:1945–51.
57. Silicone Study Group. Vitrectomy with Silicone Oil or Sulfur Hexafluoride Gas in Eyes with Severe Proliferative Vitreoretinopathy: Results of a Randomized Clinical Trial: Silicone Study Report 1. *Archives of Ophthalmology* 1992;**110**:770–9.
58. Schwartz SG, Flynn HW, Wang X, *et al.* Tamponade in surgery for retinal detachment associated with proliferative vitreoretinopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020;**2020**.

59. Williamson TH, Gupta B. Planned delayed relaxing retinotomy for proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Surgery Lasers and Imaging* 2010;**41**:31–4.
60. Pastor JC, Rodríguez E, Marcos MA, *et al.* Combined pharmacologic therapy in a rabbit model of proliferative vitreoretinopathy (PVR). *Ophthalmic Research* 2000;**32**:25–9.
61. Banerjee PJ, Quartilho A, Bunce C, *et al.* Slow-Release Dexamethasone in Proliferative Vitreoretinopathy: A Prospective, Randomized Controlled Clinical Trial. *Ophthalmology* 2017;**124**:757–67.
62. Moysidis SN, Thanos A, Vavvas DG. Mechanisms of inflammation in proliferative vitreoretinopathy: From bench to bedside. *Mediators of Inflammation* 2012;**2012**:11.
63. Asaria RHY, Kon CH, Bunce C, *et al.* Adjuvant 5-fluorouracil and heparin prevents proliferative vitreoretinopathy: Results from a randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Ophthalmology* 2001;**108**:1179–83.
64. Charteris DG, Aylward GW, Wong D, *et al.* A randomized controlled trial of combined 5-fluorouracil and low-molecular-weight heparin in management of established proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology* 2004;**111**:2240–5.
65. Wickham L, Bunce C, Wong D, *et al.* Randomized Controlled Trial of Combined 5-Fluorouracil and Low-Molecular-Weight Heparin in the Management of Unselected Rhegmatogenous Retinal Detachments Undergoing Primary Vitrectomy. *Ophthalmology* 2007;**114**:698–704.
66. Sundaram V, Barsam A, Virgili G. Intravitreal low molecular weight heparin and 5-Fluorouracil for the prevention of proliferative vitreoretinopathy following retinal reattachment surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013;**2013**.
67. Wiedemann P, Hilgers RD, Bauer P, *et al.* Adjunctive daunorubicin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy: Results of a multicenter clinical trial. *American Journal of Ophthalmology* 1998;**126**:550–9.
68. Mandava N, Blackburn P, Paul DB, *et al.* Ribozyme to proliferating cell nuclear antigen to treat proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2002;**43**:3338–48.
69. Schiff WM, Hwang JC, Ober MD, *et al.* Safety and efficacy assessment of chimeric ribozyme to proliferating cell nuclear antigen to prevent recurrence of proliferative vitreoretinopathy. *Archives of Ophthalmology* 2007;**125**:1161–7.

70. Van Bockxmeer FM, Martin CE, Thompson DE, *et al.* Taxol for the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1985;**26**:1140–7.
71. Daniels SA, Coonley KG, Yoshizumi MO. Taxol treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 1990;**228**:513–6.
72. Lemor M, de Bustros S, Glaser BM. Low-Dose Colchicine Inhibits Astrocyte, Fibroblast, and Retinal Pigment Epithelial Cell Migration and Proliferation. *Archives of Ophthalmology* 1986;**104**:1223–5.
73. Berman DH, Gombos GM. Proliferative vitreoretinopathy: does oral low-dose colchicine have an inhibitory effect? A controlled study in humans. *Ophthalmic surgery* 1989;**20**:268–72.
74. Pennock S, Kim D, Mukai S, *et al.* Ranibizumab is a potential prophylaxis for proliferative vitreoretinopathy, a nonangiogenic blinding disease. *American Journal of Pathology* 2013;**182**:1659–70.
75. Ghasemi Falavarjani K, Hashemi M, Modarres M, *et al.* Intrasilicone oil injection of bevacizumab at the end of retinal reattachment surgery for severe proliferative vitreoretinopathy. *Eye (Basingstoke)* 2014;**28**:576–80.
76. Tousi A, Hasanpour H, Soheilian M. Intravitreal injection of bevacizumab in primary vitrectomy to decrease the rate of retinal redetachment: A randomized pilot study. *Journal of Ophthalmic and Vision Research* 2016;**11**:271–6.
77. Chang YC, Hu DN, Wu WC. Effect of Oral 13-Cis-Retinoic Acid Treatment on Postoperative Clinical Outcome of Eyes With Proliferative Vitreoretinopathy. *American Journal of Ophthalmology* 2008;**146**:440–6.
78. London NJS, Kaiser RS, Khan MA, *et al.* Determining the effect of low-dose isotretinoin on proliferative vitreoretinopathy: The DELIVER trial. *British Journal of Ophthalmology* 2019;**103**:1306–13.
79. Amarnani D, Machuca-Parra AI, Wong LL, *et al.* Effect of methotrexate on an in vitro patient-derived model of proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2017;**58**:3940–9.
80. Sadaka A, Sisk RA, Osher JM, *et al.* Intravitreal methotrexate infusion for proliferative vitreoretinopathy. *Clinical Ophthalmology* 2016;**10**:1811–7.

81. El Baha S, Leila M, Amr A, *et al.* Anatomical and Functional Outcomes of Vitrectomy with/without Intravitreal Methotrexate Infusion for Management of Proliferative Vitreoretinopathy Secondary to Rhegmatogenous Retinal Detachment. *Journal of Ophthalmology* 2021;**2021**.
82. Assi A, Khoueir Z, Helou C, *et al.* Intraocular application of Mitomycin C to prevent proliferative vitreoretinopathy in perforating and severe intraocular foreign body injuries. *Eye* 2019;**33**:1261–70.
83. Gürelik G, Sül S, Üçgül AY. Intraocular mitomycin C use in the treatment and prophylaxis of proliferative vitreoretinopathy in severe traumatic retinal detachments. *European Journal of Ophthalmology* 2021;**31**:3284–93.
84. Khan MA, Brady CJ, Kaiser RS. Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: An update. *Retina* 2015;**35**:165–75.
85. Schaub F, Abdullatif AM, Fauser S. Proliferative vitreoretinopathy prophylaxis: Mission (im)possible. *Ophthalmologie* 2021;**118**:3–9.
86. Martusewicz-Boros M, Górska K. Nintedanib — efficacy, safety and practical aspects of treatment for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Advances in Respiratory Medicine* 2020;**88**:599–607.
87. Roth GJ, Heckel A, Colbatzky F, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of indolinones as triple angiokinase inhibitors and the discovery of a highly specific 6-methoxycarbonyl-substituted indolinone (BIBF 1120). *Journal of Medicinal Chemistry* 2009;**52**:4466–80.
88. Wind S, Schmid U, Freiwald M, *et al.* Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. *Clinical Pharmacokinetics* 2019;**58**:1131–47.
89. Stopfer P, Rathgen K, Bischoff D, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of BIBF 1120 after oral dosing to healthy male volunteers. *Xenobiotica* 2011;**41**:297–311.
90. Reck M, Heigener D, Reinmuth N. Nintedanib for the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 2014;**7**:579–90.
91. Hou H, Nudleman E, Weinreb RN. Animal Models of Proliferative Vitreoretinopathy and Their Use in Pharmaceutical Investigations. *Ophthalmic Research* 2018;**60**:195–204.

92. Khoroshilova-Maslova IP, Leparskaya NL, Nabieva MM, *et al.* Experimental Modeling of Proliferative Vitreoretinopathy. An Experimental Morphological Study. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2015;**159**:100–2.
93. Honda M, Asai T, Umemoto T, *et al.* Suppression of choroidal neovascularization by intravitreal injection of liposomal SU5416. *Archives of Ophthalmology* 2011;**129**:317–21.
94. Frenzel EM, Neely KA, Walsh AW, *et al.* A new model of proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1998;**39**:2157–64.
95. Kralinger MT, Kieselbach GF, Voigt M, *et al.* Experimental model for proliferative vitreoretinopathy by intravitreal dispase: Limited by zonulolysis and cataract. *Ophthalmologica* 2006;**220**:211–6.
96. Fastenberg DM, Diddie KR, Dorey K, *et al.* The role of cellular proliferation in an experimental model of massive periretinal proliferation. *American Journal of Ophthalmology* 1982;**93**:565–72.
97. Reddy Bethi M, Purnachand D, Veerareddy A, *et al.* Development and validation of a simple and sensitive stability indicating RP-HPLC assay method for determination of Nintedanib and stress degradation studies. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2015;**7**:774–82.
98. Sousa F, Cruz A, Fonte P, *et al.* A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Scientific Reports* 2017;**7**.
99. Algvere P, Kock E. Experimental fibroplasia in the rabbit vitreous - Retinal detachment induced by autologous fibroblasts. *Albrecht von Graefes Archiv für Klinische und Experimentelle Ophthalmologie* 1976;**199**:215–22.
100. Sugita G, Tano Y, Machemer R, *et al.* Intravitreal autotransplantation of fibroblasts. *American Journal of Ophthalmology* 1980;**89**:121–30.
101. Wiedemann P, Sorgente N, Ryan SJ. Proliferative vitreoretinopathy: The rabbit cell injection model for screening of antiproliferative drugs. *Journal of Pharmacological Methods* 1984;**12**:69–78.
102. Cardillo JA, Farah ME, Mitre J, *et al.* An intravitreal biodegradable sustained release naproxen and 5-fluorouracil system for the treatment of experimental post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. *The British Journal of Ophthalmology* 2004;**88**:1201.

103. Nassar K, Lüke J, Lüke M, *et al.* The novel use of decorin in prevention of the development of proliferative vitreoretinopathy (PVR). *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2011;**249**:1649–60.
104. Chen XF, Du M, Wang XH, *et al.* Effect of etanercept on post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. *International Journal of Ophthalmology* 2019;**12**:731–8.
105. Greene W, Burke T, Bramblett G, *et al.* Detection of Retinal Fibrosis in a Rabbit Model of Penetrating Eye Injury. *Military Medicine* 2020;**185**:443–7.
106. Stenn KS, Link R, Moellmann G, *et al.* Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *Journal of Investigative Dermatology* 1989;**93**:287–90.
107. Guidetti B, Azema J, Malet-Martino M, *et al.* Delivery Systems for the Treatment of Proliferative Vitreoretinopathy: Materials, Devices and Colloidal Carriers. *Current Drug Delivery* 2008;**5**:7–19.
108. Joondeph BC, Peyman GA, Khoobehi B YB. Liposome-encapsulated 5-fluorouracil in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic surgery* 1988;**19**:252–6.
109. Fishman P, Peyman GA, Hendricks R, *et al.* Liposome-encapsulated 3H-5FU in rabbits. *International Ophthalmology* 1989;**13**:361–5.
110. Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ. Applications of liposomes in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology* 2005;**50**:167–82.
111. Patel HM. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1992;**9**:39–90.
112. Kuo HK, Chen YH, Wu PC, *et al.* Attenuated glial reaction in experimental proliferative vitreoretinopathy treated with liposomal doxorubicin. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012;**53**:3167–74.
113. Gariano RF, Assil KK, Wiley CA, Munguia D, Weinreb RN FW. Retinal toxicity of the antimetabolite 5-fluorouridine 5'-monophosphate administered intravitreally using multivesicular liposomes. *Retina* 1994;**14**:75–80.
114. Hui YN, Liang HC, Cai YS, *et al.* Corticosteroids and daunomycin in the prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy induced by macrophages. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 1993;**231**:109–14.

115. Shinohara K, Tanaka M, Sakuma T, *et al.* Efficacy of daunorubicin encapsulated in liposome for the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Surgery Lasers and Imaging* 2003;**34**:299–305.
116. Nassar K, Lüke J, Lüke M, *et al.* Effect of different fixative solutions on eyes with experimental proliferative vitreoretinopathy. *International Journal of Experimental Pathology* 2015;**96**:103–10.
117. Huu VAN, Luo J, Zhu J, *et al.* Light-responsive nanoparticle depot to control release of a small molecule angiogenesis inhibitor in the posterior segment of the eye. *Journal of Controlled Release* 2015;**200**:71–7.
118. Xianchai Lin, Jiamin Wen, Rongjiao Liu, Wuyou Gao, Bo Qu MY. Nintedanib inhibits TGF- $\beta$ -induced myofibroblast transdifferentiation in human Tenon's fibroblasts. *Molecular Vision* 2018;**24**:789–800.