



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

**TAVŞAN DENEY MODELİNDE SUBKONJONKTİVAL
BOTULİNUM TOKSİN-A UYGULAMASININ KORNEA SİNİR
PLEKSUSLARI VE KORNEA STROMA HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. CAN ŞİROLU**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. İLKE BAHÇECİ ŞİMŞEK**

**İSTANBUL
2023**

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**TAVŞAN DENEY MODELİNDE SUBKONJONKTİVAL
BOTULİNUM TOKSİN-A UYGULAMASININ KORNEA SİNİR
PLEKSUSLARI VE KORNEA STROMA HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. CAN ŞİROLU**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. İLKE BAHÇECİ ŞİMŞEK**

**İSTANBUL
2023**

TEŞEKKÜR

Tez hazırlık sürecimde ve uzmanlık eğitimim boyunca desteğini ve anlayışını eksik etmeyen, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli tez danışman hocam Doç. Dr. İlke Bahçeci Şimşek'e;

Asistanlık serüvenimin başından itibaren hem iyi bir insan hem de iyi bir hekim olma yönünde bana hep örnek olan, her aşamada yol gösteren, deneyimlerini içtenlikle aktaran kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Alp Kayıran'a;

Gerek bilimsel gerekse cerrahi deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman desteklerini hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Şule Ziylan ve Prof. Dr. Sinan Tatlıpınar'a;

İhtisasım boyunca üzerimde emeği olan değerli hocalarım Prof. Dr. R. Beril Küçümen'e, Prof. Dr. Ilgaz Yalvaç'a, Doç. Dr. Özge Yabaş Kızıloğlu'na, Dr. Öğr. Üyesi Vildan Öztürk'e, ayrıca kısa süre de olsa çalışma fırsatı bulduğum Doç. Dr. Yasin Özcan'a;

Birlikte çalışmaktan çok mutlu olduğum ameliyathane ekibimize, asistan arkadaşlarıma ve diğer çalışma arkadaşlarımıza;

Deneyimizi gerçekleştirmemizde büyük kolaylık sağlayan, bizlere çok yardımcı olan sayın Prof. Dr. Bayram Yılmaz'a ve veteriner hekim Engin Sümer başta olmak üzere tüm YÜDETAM ekibine;

Çalışmamız üzerindeki emeği ve teknik konulardaki üstün yardımları için Cavit Kerem Kayhan'a;

Çalışmamızın biyoistatistik kısmındaki desteğiyle yükümüzü hafifleten değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Elif Çiğdem Keleş'e;

Desteklerini her daim gösteren, her konuda tecrübesine danışabildiğim kıymetli Prof. Dr. Merih Kutlu'ya;

Hep yanımda olan, koşulsuz desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Selin'e, canım anne, baba, ağabeyime ve stresli zamanların en büyük destekçileri Kivi ile Mısıır'a çok teşekkür ederim.

Dr. Can Şirolu

İstanbul - 2023

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
İçindekiler	ii
Kısaltmalar	iii
Şekil ve Resim Dizini	iv
Tablo ve Grafik Dizini	v
1. ÖZET	vi
2. ABSTRACT	vii
3. GİRİŞ VE AMAÇ	1
4. GENEL BİLGİLER	3
5. GEREÇ VE YÖNTEM	15
6. BULGULAR	24
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
8. KAYNAKLAR	37

KISALTMALAR

APS	: Amonyum persülfat
AR	: Antijen geri kazanım
Ach	: Asetilkolin
BCA	: Bikinkoninik Asit
BoNT-A	: Botulinum toksin-A
BTX-A	: Botulinum toksin-A
DC	: Dendritik hücreler
DM	: Descemet membranı
DPN	: Diyabetik periferik nöropati
FFPE	: Formol ile fikse edilmiş parafine gömülü doku
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
HADYEK	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Igs	: İmmüoglobulinler
IHC	: İmmünohistokimya
IVCM	: İn vivo konfokal mikroskopi
μOCT	: Mikro-optik koherens tomografi
MGT	: Modifiye Gomori Trikrom
NEP	: Neprilisin
NeuN	: Nöronal nüklei
NGF	: Sinir büyüme faktörü
SNF	: Küçük sinir lifi
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	: Tetrametiletildiamin
VEGF-B	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
YÜDETAM	: Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi

ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ

Şekil 1.	İnsan kornea sinirlerinin ve bazı katmanlarının şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.	Botulinum toksin A yapısı.....	11
Şekil 3.	Botulinum toksini etki mekanizması.....	13
Resim 1.	Floresein ile tavşan korneasının boyanması.....	16
Resim 2.	Kobalt mavisi ışık altında korneanın el mikroskobu ile incelenmesi.....	17
Resim 3.	Kornea saydamlığını ve bütünlüğünü gösteren kesit.....	17
Resim 4.	Subkonjonktival enjeksiyon uygulaması.....	18
Resim 5.	Subkonjonktival enjeksiyon uygulaması.....	18
Resim 6.	Subkonjonktival enjeksiyon uygulama teyidi.....	19
Resim 7.	Tavşan kornea kesitinden bir örnek (Hematoksilen & Eozin boyası).....	26
Resim 8.	Tavşan kornea kesitinden bir örnek (MGT boyası).....	26
Resim 9.	Korneada sinir görüntülemek amacıyla uygulanan S-100 boyası.....	27
Resim 10.	S-100 boyası Antijen Geri Kazanım.....	27
Resim 11.	MGT (Modifiye Gomori Trikrom) boyası.....	28
Resim 12.	Sinir kontrol doku kesiti, MGT boyası.....	28
Resim 13.	Deney doku kesiti, MGT ile benzer tutulumlar işaretli (kırmızı oklar).....	28
Resim 14.	SDS-PAGE görüntüsü.....	31
Resim 15.	Western-Blot görüntüsü.....	31

TABLO VE GRAFİK DİZİNİ

Tablo 1.	BOTOX® flakon 100 Allergan ünitesi için seyreltme tablosu.....	19
Tablo 2.	Fibroblast ve Sinir Hücre Skorları.....	29
Tablo 3.	BCA tahlili standardize edilmiş konsantrasyonları.....	30
Tablo 4.	Deneyimizin BCA tahlili konsantrasyonları.....	30
Grafik 1.	Histogram grafiği.....	29



ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, tavşan deney modelinde subkonjonktival botulinum toksin-A (BoNT-A) uygulamasının kornea sinir pleksusları ve kornea stroma hücreleri (fibroblast) üzerinde oluşturduğu histopatolojik ve moleküler düzeydeki değişiklikleri araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya altı yetişkin Yeni Zelanda beyaz tavşanı dahil edildi. Tavşanlar iki gruba ayrıldı: toksin grubu (n=6 göz) ve kontrol grubu (n=6 göz). Toksin grubuna subkonjonktival botulinum toksin-A enjeksiyonları yapılırken, kontrol grubuna serum fizyolojik enjeksiyonu uygulandı. İki hafta sonra her iki gruptan kornealar bütün olarak çıkarıldı. Histopatolojik ve protein izolasyonu incelemeleri, kornea sinir pleksuslarındaki sinir liflerinde ve kornea stroma hücrelerindeki değişiklikleri değerlendirmek amacıyla yapıldı.

Bulgular: Histopatolojik analiz, toksin grubunda kornea sinir pleksuslarındaki sinir liflerinin kontrol grubuna kıyasla önemli değişiklikler olduğunu ortaya koydu. Kornea sinir pleksuslarında, sinir lifi yoğunluğunda azalma olduğunu işaret eden bulgular saptandı. Toksin (denek) ve kontrol grubundaki sinir hücre skoru istatistiki olarak anlamlı bulundu ($p=0.016$), ancak fibroblast skorunda anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.63$). Kontrol grubunun sinir hücre skoru için ortalama (mean), medyan değerleri sırasıyla 8923.0, 7477.0; toksin (denek) grubu için 4112.7, 3786.5; kontrol grubunun fibroblast skoru için ortalama (mean), medyan değerleri sırasıyla 5725.0, 5830.0; toksin (denek) grubu için 5381.7, 5045.0 olarak hesaplandı.

Sonuç: Tavşan deney modelinde subkonjonktival botulinum toksin-A uygulaması, kornea sinir pleksuslarında histopatolojik değişikliklere yol açabileceği yönünde bulgular görüldü. Bu bulgular, BoNT-A uygulamasının kornea sinir pleksusları üzerine potansiyel etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Bu histopatolojik değişikliklerin işlevsel sonuçları ve oftalmolojideki potansiyel klinik önemini açıklığa kavuşturmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Botulinum toksin-A, korneal sinir pleksusları, korneal stromal hücreler, histopatolojik inceleme, tavşan deneysel modeli.

ABSTRACT

Purpose: The objective of this study was to investigate the histopathological and molecular based changes induced by subconjunctival application of botulinum toxin-A (BoNT-A) on corneal nerve plexuses and corneal stromal cells in a rabbit experimental model.

Methods: Six adult New Zealand white rabbits were included in the study. The rabbits were divided into two groups: the toxin group (n=6 eye) and the control group (n=6 eye). The toxin group received subconjunctival injections of BoNT-A, while the control group received saline injections. After a designated period (2 weeks), corneal specimens were collected from both groups. Histopathological and protein isolation studies were performed to evaluate the alterations in corneal nerve plexuses and corneal stromal cells.

Results: The histopathological analysis revealed significant changes in the corneal nerve plexuses or corneal dendritic cells in the toxin group compared to the control group. In the corneal nerve plexuses, there were findings indicating a decrease in nerve fiber score. The nerve cell score in the toxin (subject) and control groups was statistically significant ($p=0.016$), but there was no significant difference in the fibroblast score ($p=0.63$). The mean and median values for nerve cells in the control group were 8923.0, 7477.0; 4112.7, 3786.5 in the toxin (subject) group, respectively; the mean and median values for fibroblasts in the control group were 5725.0, 5830.0; 5381.7, 5045.0 in the toxin (subject) group, respectively.

Conclusion: Subconjunctival application of botulinum toxin-A in the rabbit experimental model resulted in histopathological changes in corneal nerve plexuses. These findings suggest that BoNT-A administration can potentially affect to corneal nerve plexuses. Further studies are warranted to elucidate the functional implications of these histopathological alterations and their potential clinical relevance in ophthalmology.

Keywords: Botulinum toxin-A, corneal nerve plexuses, corneal stromal cells, histopathological examination, rabbit experimental model.

GİRİŞ VE AMAÇ

Tıp alanındaki sürekli gelişim, insan sağlığını daha iyi anlamamıza ve tedavi yöntemlerini iyileştirmemize olanak tanımaktadır. Bu bağlamda, göz hastalıklarının anlaşılması ve tedavisinde yapılan araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Gözün şeffaf en dış tabakası olan kornea, görme keskinliğinde ve göz formunun korunmasında çok önemli bir rol oynar. Duyusal inervasyondan sorumlu karmaşık korneal sinir ağı ve korneanın yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan korneal stromal hücreler, özellikle fibroblastlar, oküler sağlık ve fonksiyonun temelini oluşturur. Bununla birlikte, bu bileşenler arasındaki etkileşim ve terapötik ajanların işlevsellikleri üzerindeki potansiyel etkileri, kapsamlı araştırma gerektiren alanlardır.

Uygun deney modelleri bu alandaki çalışmaların temelini oluşturarak yeni bilgilerin elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Botulinum toksin-A uygulamaları son yıllarda göz hastalıkları alanında dikkat çeken bir tedavi yöntemi olarak öne çıkmıştır. Botulinum toksini, modern tıpta çeşitli uygulamaları olan iyi bilinen bir nörotransmitter inhibitörüdür. Bu yöntemin kornea sinir pleksusları ve kornea stroma hücreleri üzerindeki etkileri, göz sağlığının anlaşılmasına katkı sağlayabilecek önemli bir araştırma alanını oluşturmaktadır.

Kornea, yoğun sinir ağı içeren hassas bir yapıdır¹. Histolojik katmanları arasında bulunan sinir pleksusları kornea refleksinin çalışması yani temel olarak kornea bütünlüğünün korunması için elzemdir². Ekstraoküler kaslara botulinum toksin-A enjeksiyonu (subkonjonktival) şaşılık cerrahisine alternatif bir yöntemdir³. Şaşılığı olan çocuklarda, kayması 40 dioptr prizmadan daha az olan hastalarda, komplike vakalarda vb. botulinum enjeksiyonu uygulaması sık tercih edilen bir yöntemdir⁴. Botulinum toksin-A'nın kas ve sinir dokularının yapısı üzerine etkileri olduğu da gösterilmiştir^{5,6}. BoNT-A kozmetik amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır ve genellikle güvenli kabul edilse de kullanımıyla ilişkili riskler de mevcuttur. BoNT-A enjeksiyonlarının potansiyel yan etkilerinden biri diplopidir^{75,76}. Botoks enjeksiyonları bağlamında, ilacın komşu dokulara yayılması, subkonjonktival alana sızması ve göz hareketinden sorumlu kasları etkilemesi sonucu diplopi oluşabilir^{75,76}. Aynı şekilde kozmetik amaçlı uygulamalar sonrası komşu dokulara sızma riski bulunan BoNT-A, korneayı da bu şekilde etkileyebilir.

Subkonjonktival yolla uygulanan botulinum toksin-A'nın kornea sinir pleksusları ve kornea fibroblast hücreleri üzerine etkileri bir hayvan deneyi modeli üzerinde daha önce çalışılmamıştır. Ayrıca, korneadaki sinirlerle benzer olan ve birçok farklı dokuda da bulunan

“small nerve fiber”lar (küçük sinir lifleri) üzerinde botulinum toksin-A’nın etkisi olduğu periferik nöropatili hastalarda ağrı yönetimi için botulinum toksin-A enjeksiyonu yapıldığında saptanmıştır⁷. Botulinum toksin-A’nın kornea sinir hassasiyetinin azalmasıyla ilişkili olan nörotrofik keratit riskini artırabileceğini araştırmak diğer amaçlarımızdan birisidir. Bu çalışmayla subkonjonktival botulinum toksin-A uygulamasının göz dokuları üzerindeki etkilerini detaylı bir şekilde inceleyerek, göz hastalıklarının tedavi stratejilerine yeni bir bakış açısı sunmayı da amaçladık.

Elde edilen sonuçların, gelecekteki araştırmalar ve tedavi yöntemlerinin tasarımına rehberlik edebileceği, böylece göz sağlığı alanındaki yeniliklerin ve iyileştirmelerin önünün açılacağı öngörüldü.

Özetle, kozmetik amaçlı ve şaşılık tedavisinde sık tercih edilen botulinum toksin-A enjeksiyonunun kornea sinir ağı ve kornea stromal (fibroblastlar) hücreleri üzerine etkilerini histopatolojik ve moleküler düzeyde incelemek ve korneaya olası etkilerini değerlendirmek amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Kornea

Kornea Embriyolojisi

Embriyonik gelişim sırasında kornea, oluşumuna ve farklılaşmasına yol açan bir dizi karmaşık süreçten geçer. Korneanın gelişimi çeşitli sinyal yollarının, transkripsiyon faktörlerinin ve hücre hareketlerinin etkileşimini içerir.

Gözün ön kısmında yer alan, şeffaf bir tabaka olan kornea, intrauterin dönemin 5 ile 6. haftaları arasında oluşmaya başlar. Yüzey ektodermi ve nöral krest kökenli hücreler korneanın temelini oluşturur. Yüzey ektoderminden aynı zamanda göz merceği de gelişir; lens vezikülü adı verilen bir yapıdan orijin alır. Kornea taslağı (primitif kornea) ve epitel, lens vezikülünün ektoderminden ayrılması sonrası kalan hücrelerden gelişir⁸. Nöral krest kökenli mezenşimal hücreler intrauterin altıncı haftaya gelindiğinde, lens ve epitel arasına göç ederek korneal endotele dönüşürler⁸. Yedinci haftaya gelindiğinde, ileride keratositleri meydana getirecek olan nöral krest hücreleri, yüzey ektodermi ve endotel arasına göç ederek kolajen sentezine ve böylece korneanın stroma tabakasını oluşturmaya başlarlar. Bowman membranı, kornea epitel hücreleri için bir bazal membran görevi görür ve kolajen açısından zengin bir yapıdır. Korneanın iç yüzeyinde bulunan, tek katlı kuboidal korneal endotel hücrelerinin bazal membranı olarak adlandırılan yapıya ise Descemet membranı (DM) denmektedir.

Kornea Anatomisi

Kornea, görmede çok önemli bir rol oynayan karmaşık ve şeffaf bir dokudur. Epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endotel olmak üzere beş tabakadan oluşur^{9,10,11}. Epitel, korneanın en dış tabakasıdır ve yüzeysel poligonal hücreler, kanatlı hücreler ve bazal kolumnar hücrelerden oluşur⁹. Epitelin altında, korneaya yapısal destek sağlayan fibröz bir ağ yapısı olan Bowman tabakası bulunur^{9,10}. Stroma, korneanın en kalın tabakasıdır ve esas olarak lameller halinde düzenlenmiş kolajen liflerinden oluşur⁹. Bu kolajen lifler korneaya gücünü ve şeffaflığını verir⁹. Descemet membranı stromanın altında yer alır ve korneaya destek sağlar^{9,10}. Son olarak, endotelyum korneanın en iç tabakasıdır ve sıvı dengesini düzenleyerek korneanın şeffaflığını koruyan ince, tek katmanlı bir hücreden oluşur⁹.

Kornea avaskülerdir, yani kan damarlarından yoksundur ve gözyaşı filmi ile aköz hümörden besin ve oksijen alır⁹. Kornea ayrıca kornea hassasiyetinden sorumlu olan ve normal kornea yapısının ve işlevinin korunmasında rol oynayan yoğun bir sinir ağı içerir¹². Kornea hassasiyetindeki değişiklikler, korneanın ilerleyici bir şekilde incelendiği keratokonus gibi hastalıklarda da gözlemlenmiştir¹².

Bazı araştırmalar belirli proteinlerin ve enzimlerin kornea anatomisi ve yara iyileşmesindeki rolünü anlamaya da odaklanmıştır. Örneğin, nöropeptidleri parçalayarak enflamasyonu modüle eden bir enzim olan neprilisin (NEP) insan kornea epitelinden salındığı bulunmuştur¹³. Çalışmalar NEP'in kornea yara iyileşmesinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir¹³. Ayrıca, NEP'in korneadaki ekspresyonu, kornea innervasyonunun ve vaskülarizasyonunun düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir¹³.

Kornea beş katmandan oluşur. Bunlar epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endotel olarak sıralanır. Kornea avaskülerdir, besinler ve oksijen için gözyaşı filmine ve aköz hümöre bağımlıdır. Yoğun bir sinir ağı tarafından düzenlenen kornea hassasiyeti, normal kornea yapısını ve işlevini korumak için önemlidir. NEP gibi spesifik protein ve enzimlerin korneal yara iyileşmesi ve enflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bulunmuştur.

Kornea Histolojisi

Kornea histolojik olarak beş katmandan oluşur: Epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endotel¹⁴. Kornea histolojisini araştırmak ve yapısı ve işlevi hakkında bilgi sağlamak için çeşitli görüntüleme teknikleri ve moleküler analizler kullanılmıştır.

Posterior korneanın mikro-anatomik yapılarını görselleştirmek için mikro-optik koherens tomografi (μ OCT) kullanılmıştır¹⁴. Poligonal endotel hücrelerinin, yıldız keratositlerin, kolajen liflerinin, kornea sinir liflerinin ve endotel hücrelerinin kubbe şeklindeki bazolateral tarafı ve endotel ile Descemet zarı arasındaki arayüzde kafes yapılar gibi diğer yapıların varlığı ortaya koyulmuştur¹⁴.

Korneanın orta tabakası olan korneal stroma, şeffaflığına ve hidrasyonuna katkıda bulunan benzersiz bir proteoglikan bileşiminden oluşur¹⁵. Keratan sülfat korneada en bol bulunan glikozaminoglikandır ve dokunun hidrofilik karakterinin korunmasından

sorumludur¹⁵. Keratokan ve lumikan gibi farklı çekirdek proteinleri kornea stromasında bulunur ve kornea saydamlığının korunmasında farklı rollere sahiptir¹⁵.

Kornea histolojisini anlamak, kornea hastalıkları hakkındaki bilgilerimizi ilerletmek ve etkili tedaviler geliştirmek için çok önemlidir.

Korneanın Beslenmesi

Korneanın beslenmesi, düzgün fonksiyon göstermesi ve dayanıklılığı için esastır. Kornea, gözyaşı filmi, aköz hümör ve trigeminal ganglion tarafından üretilen nöral peptitler dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan beslenir¹⁶. Trigeminal gangliondan türetilen kornea sinirleri yalnızca dış uyarımı algılamakla kalmaz, aynı zamanda korneanın beslenmesini de sağlar¹⁶. Kornea sinir dokusunun varlığı, oküler yüzeyin ıslaklığını ve bazal gözyaşı oluşumunu sürdürmek için önemlidir¹⁶.

Korneanın avasküler yapısı, besin temini ve şeffaflığın korunması açısından benzersiz zorluklar ortaya koymaktadır. Kornea, gözyaşı filmi ve aköz hümörden gelen oksijen ve besin kaynağına dayanır¹⁷. Besin maddelerinin kornea endoteline iletilmesi kornea saydamlığının korunması için çok önemlidir ve besin maddesi tedarikindeki aksaklıklar kornea işlevini tehlikeye atabilir¹⁷. Korneanın avasküler doğası çeşitli mekanizmalarla korunur ve bu mekanizmaların göreceli katkıları hala araştırılmaktadır¹⁷.

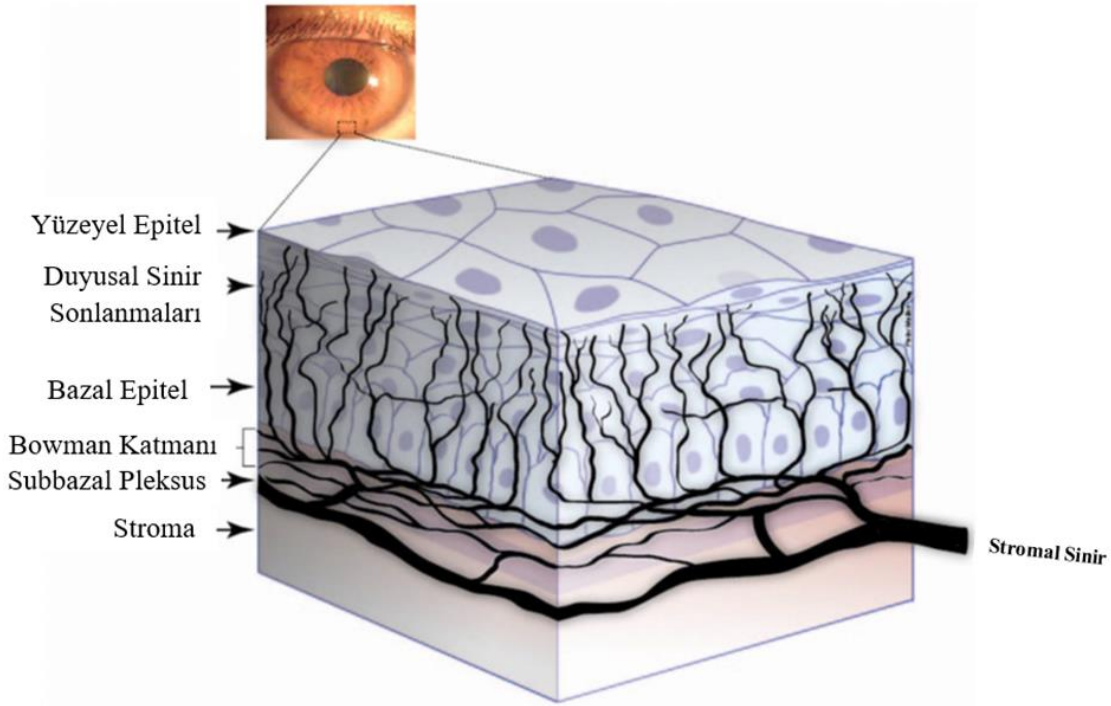
Çalışmalar, kornea sinirlerinin cerrahi prosedürler, kornea enfeksiyonları, uzun süreli göz damlası kullanımı ve diyabet gibi sistemik hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden zarar görebileceğini göstermiştir¹⁶. Kornea sinirlerinin hasar görmesi, korneanın sağlığını ve işlevini etkileyebilecek kornea duyarlılığı kaybına ve kornea beslenmesinin bozulmasına yol açabilir.

Korneanın İnnervasyonu

Kornea yüksek düzeyde innervasyona sahiptir ve zengin bir duyuşal ve otonom sinir kaynağına sahiptir¹⁸. Korneadaki sinirler, kornea sağlığının, hassasiyetinin ve işlevinin korunmasında çok önemli bir rol oynar¹⁹. Duyuşal bilgilerin iletilmesinden, gözyaşı üretiminden ve göz kırpmaya reflekslerinin düzenlenmesinden sorumludurlar²⁰. Kornea

innervasyonu, kornea homeostazı, yara iyileşmesi ve oküler yüzeyin bütünlüğünün korunması için gereklidir²⁰.

Korneanın innervasyonu öncelikle trigeminal sinirin oftalmik dalı tarafından sağlanır¹⁸. Trigeminal sinir lifleri limbustan korneaya girer ve kornea epitelinin altındaki subbazal pleksusta yoğun bir sinir lifi ağı oluşturur²¹. Subbazal pleksustan sinir lifleri dallanır ve epitel katmanlarına nüfuz ederek korneanın yüzeysel katmanlarına ulaşır²². Kornea sinirleri karmaşık ve girift bir dallanma ve ara bağlantı modeli sergiler²³.



Şekil 1. İnsan kornea sinirlerinin ve bazı katmanlarının şematik gösterimi⁷¹

Kornea sinirleri, kornea hassasiyetini korumak için çok önemlidir²¹. Korneal innervasyon kaybı korneal hassasiyetin azalmasına, kuru göz sendromuna, korneal epitel erozyonlarına ve yara iyileşmesinin bozulmasına neden olabilir^{19,23}. Kornea hassasiyeti, korneayı potansiyel zararlı dış uyaranlardan korumak ve sağlıklı bir oküler yüzey sağlamak için önemlidir²⁴. Ayrıca gözyaşı filmi üretiminde ve göz kırpmaya reflekslerinde de rol oynar²⁰.

Kornea innervasyonunu çeşitli faktörler etkileyebilir. Sinir büyüme faktörü (NGF) içeren göz damlalarının bazı hastalarda görme keskinliğini ve elektrofonksiyonel aktiviteyi iyileştirdiği gösterilmiştir²⁵. NGF retina hücreleri üzerinde nöroprotektif bir etkiye sahiptir ve kornea hassasiyetini ve bütünlüğünü iyileştirebilir²⁵. Nörotrofik ülseri olan hastalarda, NGF'nin topikal uygulamasının kornea bütünlüğünü geri kazandırdığı ve kornea hassasiyetini artırdığı bulunmuştur²⁶. NGF, kornea duysal innervasyonu ve kornea epitel hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için gereklidir²⁶.

Diabetes mellitus da kornea innervasyonunu etkileyebilir. Diyabetik farelerde VEGF-B'nin (Vasküler endotelyal büyüme faktörü-B) kornea innervasyonunun iyileşmesini desteklediği bulunmuştur²⁷. Hiperglisemi, endojen VEGF-B ekspresyonunu baskılayarak kornea epitel rejenerasyonu ve innervasyonunun bozulmasına yol açabilir²⁷. Diyabette kornea innervasyonunun bozulması, kornea ülserleri ve nörotrofik keratit ile sonuçlanabilir²⁸.

In vivo konfokal mikroskopi (IVCM), kornea innervasyonunu incelemek için yararlı bir araçtır. IVCM, kornea sinirlerinin gerçek zamanlı olarak non-invaziv görüntülenmesine ve analiz edilmesine olanak tanır¹⁸. Korneal sinir yoğunluğunu, morfolojisini ve rejenerasyonunu değerlendirmek için kullanılabilir²¹. IVCM, tip 1 diabetes mellitus hastalarında kornea innervasyonunu incelemek ve oküler yüzey bozuklukları için risk faktörlerini belirlemek için kullanılmıştır¹⁸. Korneal innervasyonun altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamak ve korneal sinir hasarı ve disfonksiyonu için etkili tedaviler geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Tavşan Gözü Özellikleri

Tavşan gözü, insan gözüne benzerliği nedeniyle oküler fizyoloji ve patolojinin çeşitli yönlerini incelemek için yaygın olarak kullanılan bir hayvan modelidir. Tavşan ve insan gözleri arasında bazı fizyolojik ve anatomik benzerlikler olsa da farklı özellikler de vardır.

Tavşan ve insan gözleri arasındaki en önemli benzerliklerden biri kornea yapısıdır. Gözün şeffaf en dış tabakası olan kornea, her iki türde de benzer bir yapıya sahiptir²⁹. Kornea kalınlığı ve yarıçapı hem tavşan hem de insan gözlerinde incelenmiştir ve kornea kalınlığı ile yarıçapı arasındaki korelasyonda bazı farklılıklar da olsa, korneanın genel yapısı karşılaştırılabilir³⁰. Kornea, gözün şeffaflığının korunmasında ve görme için ışığın retinaya yönlendirilmesinde çok önemli bir rol oynar.

Tavşan ve insan gözleri arasındaki bir diğer benzerlik de aköz hümör hacmi ve ön kamara anatomisidir³¹. Aköz hümör, gözün ön kamarasını dolduran ve kornea ile lense besin ve oksijen sağlayan berrak bir sıvıdır³¹. Aköz hümörün hacmi ve bileşimi, göz içi basıncının ve gözün genel sağlığının korunması için önemlidir.

Göz yüzeyini kaplayan gözyaşı filmi de tavşan ve insan gözlerinde benzerdir. Gözyaşı dolaşımı ve göz kırpma oranı insan gözünde daha sık olabilir, ancak gözyaşı filminin genel bileşimi ve işlevi iki tür arasında nispeten benzerdir³¹. Gözyaşı filmi oküler yüzeyin kayganlaşmasına ve korunmasına yardımcı olur ve korneanın sağlığının ve berraklığının korunmasında çok önemli bir rol oynar.

Oküler farmakokinetik açısından, tavşan gözü, ilaç dağıtımını ve oküler dokulara penetrasyonu incelemek için bir model olarak kullanılmaktadır³². İlaçların korneal penetrasyonu ve oküler formülasyonların farmakokinetiği hem tavşan hem de insan gözünde araştırılmış ve tavşan modelinin transskleral ilaç farmakokinetiğini tahmin etmek için yararlı olduğu bulunmuştur³². Bununla birlikte, tavşan ve insan gözleri arasında ilaç metabolizması ve yanıtı açısından farklılıklar olabileceğine dikkat etmek önemlidir ve bulgular hayvan modellerinden insanlara yansıtılırken dikkatli olunmalıdır³³.

Tavşan ve insan gözleri arasındaki farklılıklardan birincisi tavşanlarda, insanların sahip olmadığı üçüncü göz kapağı olarak da bilinen bir niktitan membran vardır³⁴. İkincisi gözyaşı üretimi ve göz kırpma hızı da iki tür arasında farklılık gösterebilir³⁴. Üçüncü olarak, tavşan ve insan gözleri arasında görsel kaliteyi etkileyebilecek wavefront aberasyonların dağılımında farklılıklar olabilir³⁵.

Botulinum Toksini

Botulinum toksinleri, Clostridium botulinum bakterisi tarafından üretilen bir grup güçlü nörotoksindir. Bu toksinler modern tıpta, özellikle nöroloji, dermatoloji, kozmetoloji ve oftalmoloji alanlarında geniş bir uygulama alanına sahiptir. Botulinum toksini A (BTX-A) en yaygın kullanılan botulinum toksini türüdür ve terapötik etkileri için kapsamlı olarak çalışılmıştır.

BTX-A'nın köklü kullanım alanlarından biri servikal distoni, spastisite, migren ve diğer baş ağrısı tipleri gibi çeşitli nörolojik bozuklukların tedavisidir³⁶. Nöromüsküler kavşakta asetilkolin salınımını bloke ederek, etkilenen kaslarda doza bağlı ve geri dönüşümlü bir

zayıflığa veya felce yol açarak çalışır³⁷. BTX-A'nın ayrıca serebral palsili çocuklarda spastisite yönetiminde etkili olduğu ve ameliyat ihtiyacını azalttığı bulunmuştur³⁸.

Genel olarak, botulinum toksinlerinin, özellikle de BTX-A'nın, çeşitli tıbbi durumlarda güvenli ve etkili olduğu kanıtlanmıştır. Nöromusküler kavşaklara yüksek afinite ile bağlanmaları ve sınırlı sistemik emilimleri onları mükemmel nöromusküler bloke edici ajanlar haline getirmektedir³⁷.

Botulinum Toksin Çeşitleri

Botulinum toksini, Clostridium botulinum bakterisi tarafından üretilen bir nörotoksindir. Botulinum toksininin A, B, C1, C2, D, E ve F olmak üzere antijenik olarak ayırt edilebilen yedi serotipi vardır³⁹. Bu serotipler, nöromusküler kavşakta ana nörotransmitter olan asetilkolin salınımını bloke ederek sinirsel iletime engel olur ve kas felcine yol açar⁴⁰.

Serotipler arasında, botulinum toksini tip A (BoNT-A) en kapsamlı şekilde çalışılan ve terapötik amaçlar için yaygın olarak kullanılandır⁴¹. Hareket ve diğer bozuklukların tedavisi için önemli bir terapötik ajandır⁴¹. BoNT-A, şaşılık, blefarospazm, fokal distoniler, hemifasiyal spazm, spastik hareket bozuklukları, baş ağrıları, hipersalivasyon, hiperhidroz ve bazı kronik durumlar dahil olmak üzere çeşitli tıbbi durumlar için onaylanmıştır⁴⁰. Ayrıca migren ve diğer baş ağrısı bozukluklarının tedavisindeki potansiyeli de araştırılmıştır⁴².

Botulinum toksininin farklı serotipleri biyokimyasal ve farmakolojik etkilerinde farklılıklar gösterir⁴¹. Nörotoksin kompleksi; protein boyutu, aktive edilmiş veya bağlanmış formdaki nörotoksin yüzdesi, hücre içi protein hedefi ve etki gücü bakımından farklılıklar gösterirler⁴¹. Bu varyasyonlar, her bir botulinum nörotoksin preparatı için benzersiz etkinlik, etki süresi, güvenlik ve antijenik potansiyel kombinasyonuna katkıda bulunur⁴¹.

Botulinum toksini tip A'nın blefarospazm, şaşılık, servikal distoni gibi uygunsuz ve istemsiz kas kasılması ile karakterize çeşitli bozuklukların tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur⁴². Ayrıca migren ve diğer baş ağrısı türlerinin tedavisinde de umut vaat ettiğini göstermiştir; çalışmalar bu durumlarla ilişkili sıklık, şiddet ve engellilikte azalma olduğunu ortaya koymuştur⁴². Botulinum toksini tip A'nın ağrıyı engelleme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, ancak nosiseptif sinir terminallerinden nörotransmitter salınımının engellenmesini içerdiği düşünülmektedir⁴².

Botulinum toksini, tedavi amaçlı kullanımının yanı sıra kozmetik amaçlarla da kullanılmaktadır. Kaş çatma çizgileri, kaz ayakları ve alın çizgileri gibi yüz kırışıklıklarının ve çizgilerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır⁴³.

Botulinum toksin tip A, B ve E'nin insan zehirlenmesine neden olan en yaygın nörotoksinler olduğunu, C ve D tiplerinin nadiren insan toksisiteleri ile ilişkili olduğunu ve F tipinin minimal insan toksisitesine neden olduğunu belirtmek önemlidir³⁹. Farklı botulinum toksin tiplerinin tanımlanması serolojik özelliklerine dayanmaktadır ve farklı C. botulinum suşlarından en az yedi farklı tip tanımlanmıştır³⁹.

Botulinum Toksin-A Yapısı

Botulinum toksin-A, botulizme neden olan bir bakteri olan Clostridium botulinum tarafından üretilen bir nörotoksindir⁴⁴. 50-kDa amino-terminal L zincirine ve 100-kDa karboksil-terminal H zincirine işlenen 150-kDa'lık tek bir polipeptittir⁴⁴. H zinciri hücre yüzeyine bağlanmadan sorumluyken, L zinciri presinaptik sinir terminallerinden nörotransmitter salınımını inhibe ederek felce yol açan enzimatik bileşendir⁴⁴.

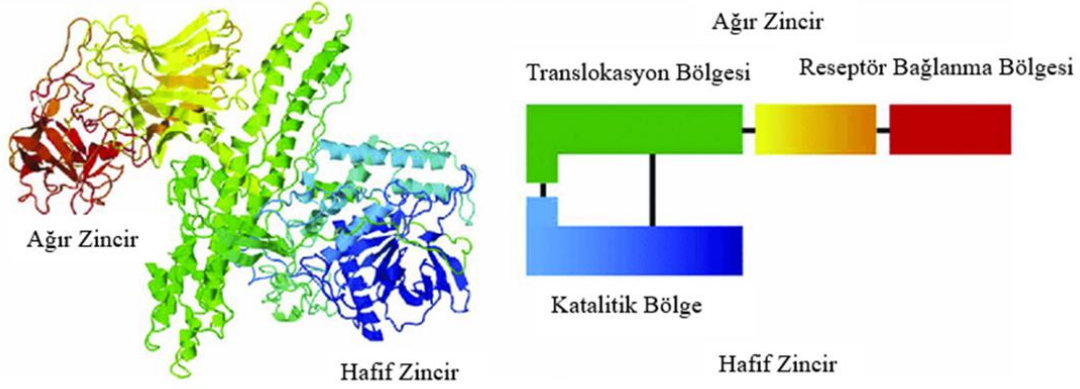
Botulinum toksin-A'nın yapısı kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bileşen I ve bileşen II olmak üzere birbirine bağlı olmayan iki alt birimden oluşur⁴⁵. Yaklaşık 100 kDa moleküler kütleyle sahip olan bileşen II, ökaryotik hücre yüzeyine bağlanmadan sorumludur⁴⁵. Moleküler kütlesi 365 kDa olan oligomerik bir yapı oluşturur ve hem hemaglutinasyon hem de hemolitik aktivitelere sahiptir⁴⁵. Yaklaşık 72 kDa moleküler kütleyle sahip proteolitik bir parça olan Bileşen I, tripsin muamelesi ile aktive edilir ve aktive edilmiş bileşen II'ye bağlanır⁴⁵.

Botulinum toksin-A'nın reseptör bağlayıcı alanının kristal yapısının tetanoz toksininin H C fragmanına yakın homolog olduğu bulunmuştur⁴⁶. Tetanoz toksininin H C parçasının iki alanı vardır: amino-terminal jel sarmal alanı ve karboksil-terminal β -trefoil alanı⁴⁶. Yapısal olarak birçok lektine benzeyen amino-terminal jel sarmal alanının gangliosidlerin bağlanmasında rol oynadığına inanılmaktadır⁴⁶. Gangliosidler, hücrelerin yüzeyinde bulunan bir karbonhidrat türüdür ve botulinum toksin-A için reseptörlerden biri olduğu düşünülmektedir⁴⁶.

Botulinum toksin-A'nın katalitik bölgesi de incelenmiştir. Botulinum toksin-A'nın C2I olarak bilinen enzim bileşeninin, G-aktini arjinin 177'de ADP-ribozile ederek aktin hücre iskeletinin depolimerizasyonuna yol açtığı bulunmuştur⁴⁷. C2I'nin ADP-ribozilasyon aktivitesi, korunmuş arjinin kalıntıları ve oldukça korunmuş bir serin-treonin-serin motifi dahil olmak

üzere işlevsel olarak önemli alanlara bağlıdır⁴⁷. Bu alanlar diğer arjinin modifiye edici ADP-riboziltransferazlarda da bulunur⁴⁷.

Botulinum toksin-A çeşitli tıbbi durumlar için terapötik olarak kullanılmıştır. Spastisite, servikal distoni ve yüz kırışıklıklarının tedavisinde kullanılmıştır^{48,49,50}. Botulinum toksin-A'nın bu terapötik uygulamalardaki etki mekanizması, felce neden olan etki mekanizmasına benzerdir. Sinir terminallerinden nörotransmitter salınımını engelleyerek kas gevşemesine ve kas spazmlarında azalmaya yol açar^{48,49,50}.



Şekil 2. Botulinum toksin A yapısı⁷²

Botulinum Toksin-A Etki Mekanizması

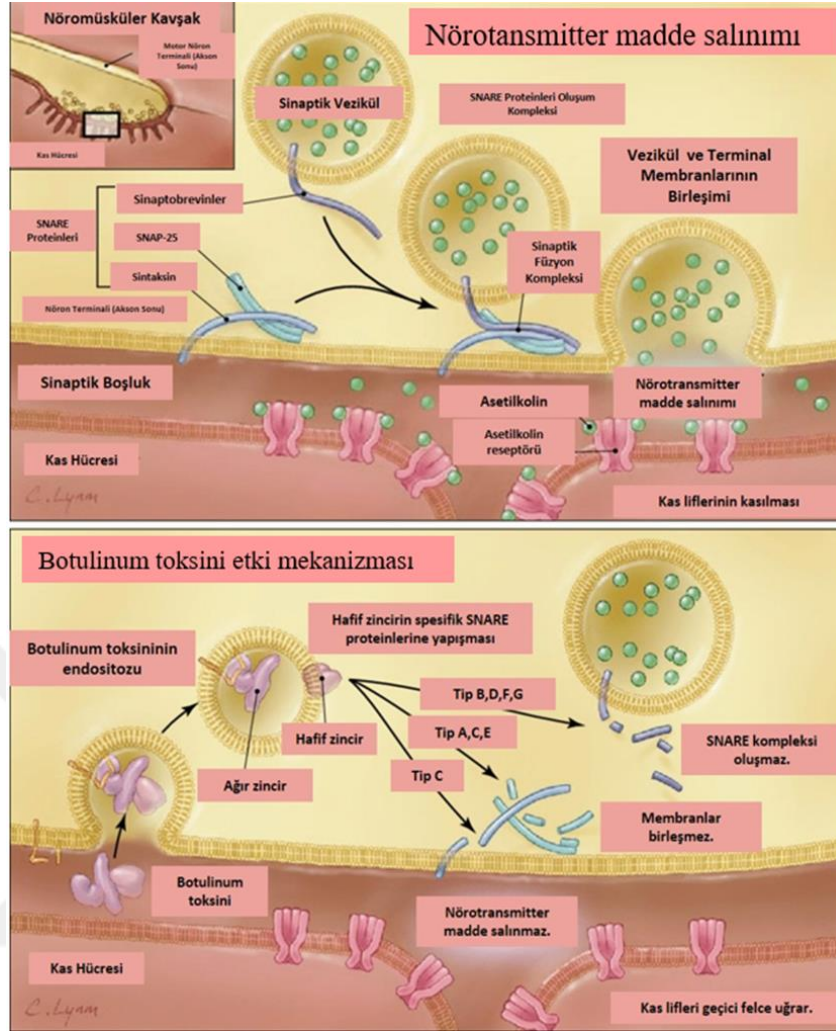
Botulinum toksini A, yaygın olarak bilinen adıyla Botox, oftalmolojide çeşitli tedavi amaçları için yaygın olarak kullanılan bir nörotoksindir⁵¹. Botulinum toksin A'nın oftalmolojideki etki mekanizması, diğer tıbbi uygulamalardaki mekanizmasına benzerdir. Nöromüsküler kavşaktaki sinir terminallerinden asetilkolin nörotransmitterinin salınımını inhibe ederek sinir uyarılarının iletimine müdahale eder⁵¹.

Oftalmolojide, botulinum toksin A öncelikle şaşılık, blefarospazm ve hemifasiyal spazm dahil olmak üzere çeşitli göz rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılır⁵¹. Botulinum toksin A, göz çevresindeki belirli kaslara enjekte edilerek, hedeflenen kasları geçici olarak zayıflatır ve gözlerdeki kaymanın ve/veya spazmların azalmasına yol açar⁵¹.

Botulinum toksini A'nın oftalmolojideki etkileri uzun süreli ancak geri dönüşümlüdür. Zamanla, daha önce inhibe edilenlerin yerine yeni sinir terminalleri oluşur ve normal kas fonksiyonunun geri dönmesine izin verir⁵¹. Bu tersine çevrilebilirlik botulinum toksin A tedavisinin önemli bir yönüdür, çünkü dozajın ayarlanmasında esneklik sağlar ve gerektiğinde potansiyel olarak yeniden tedaviye izin verir.

Botulinum toksin A'nın oftalmolojide kullanımı iyi bir şekilde belirlenmiş ve güvenli ve etkili olduğu gösterilmiştir⁵¹. Belirli göz rahatsızlıklarının tedavisinde devrim yaratmış ve minimum yan etkiyle cerrahi olmayan bir seçenek sunmuştur⁵¹. Botulinum toksin A'nın insanlardaki LD50 (nüfusun %50'si için öldürücü doz) değeri nispeten yüksektir ve bu da büyük bir güvenlik aralığına işaret etmektedir⁵¹.

Botulinum toksin A oftalmolojideki terapötik etkilerini nöromüsküler kavşakta asetilkolin salınımını inhibe ederek gösterir. Uzun süreli ancak geri dönüşümlü etkileri onu oftalmolojide değerli bir tedavi seçeneği haline getirmektedir. Botulinum toksin A'nın oftalmolojide kullanımı, çeşitli göz rahatsızlıklarının yönetimini önemli ölçüde iyileştirmiş ve hastalara güvenli, etkili ve cerrahi olmayan alternatifler sunmuştur.



Şekil 3. Botulinum toksini etki mekanizması⁷³

Botulinum Toksin-A'nın Oftalmolojide Kullanım Alanları

Botulinum Toksin-A (BoNT-A) oftalmoloji alanında çeşitli uygulamalara sahiptir. BoNT-A'nın kolinerjik motonöronlardan nörotransmitter salınımını inhibe ederek innerve edilen kasın gevşemesine veya tamamen paralize olmasına yol açabildiği kanıtlanmıştır⁵². Oftalmolojide BoNT-A, şaşılık, nistagmus, blefarospazm, hemifasiyal spazm, kapak retraksiyonu, spastik entropiyon ve periorbital estetik kullanım dahil olmak üzere çeşitli durumların tedavisinde kullanılmıştır⁵³. BoNT-A'nın oftalmolojide kullanımı 1989 yılından beri FDA tarafından onaylanmıştır⁵³.

Şaşılık, BoNT-A'nın oftalmolojide yaygın olarak kullanıldığı durumlardan biridir. BoNT-A'nın horizontal ve vertikal şaşılıkta sapma miktarını iyileştirebildiği bulunmuştur⁵³. Bununla

birlikte, BoNT-A'nın şaşılık için bağımsız bir tedavi yöntemi olarak kullanılması daha fazla açıklama ve kanıt gerektirmektedir⁵⁴. Bazı çalışmalar, şaşılık için BoNT-A tedavisine farklı yanıtlar göstermiştir⁵⁴. Ayrıca, BoNT-A'nın akut altıncı sinir felcinde görsel semptomları azaltmadaki etkinliği ve binoküler görüşü olmayan horizontal şaşılığı olan kişilerdeki yanıtı hala belirsizliğini korumaktadır⁵⁴.

BoNT-A'nın oftalmolojide kullanımı risksiz değildir. Ptozis ve anterior üveit gibi oküler yan etkiler de dahil olmak üzere BoNT-A enjeksiyonları ile ilişkili yan etkiler bildirilmiştir⁵⁵. Bununla birlikte, bu yan etkiler nispeten nadirdir ve uygun gözlem ve takip ile yönetilebilir⁵⁵.

Genel olarak, BoNT-A'nın oftalmolojide, özellikle şaşılık ve diğer ilgili durumların tedavisinde değerli bir terapötik seçenek olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, farklı oftalmik koşullarda etkinliğini, optimal dozajını ve potansiyel yan etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. BoNT-A kullanımı, her hastanın özellikleri dikkate alınarak vaka bazında dikkatlice değerlendirilmelidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; deneklere subkonjonktival botulinum toksin-A (Botox 100 Allergan ünitesi OnabotulinumtoksinA, C7395C3) ve serum fizyolojik uygulaması, sakrifikasyon ve alınan korneal dokuların hazırlanması işlemleri Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi' nde (YÜDETAM), doku örneklerinden kesitler hazırlanması, kesitlerin boyanması, histopatolojik değerlendirmeler ve fibroblastların skorlanması Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, protein izolasyonu işlemi Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji-Genetik bölümünde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür. Yeditepe Üniversitesi-HADYEK (Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu) 14.03.2022 karar tarihli, 2022-013 protokol ve 2022/03-7 karar nolu etik kurul onayı ile çalışma yürütülmüştür.

Deney Hayvanları

Çalışmanın örnek sayısı G*Power 3.1.9.2 isimli program ile hesaplanmıştır. Daha önce yapılmış (Botulinum Toxin Treatment of Extraocular Muscles in Rabbits Results in Increased Myofiber Remodeling) isimli çalışmaya, effects of botox on satellite cell activation 21 days (7,7,7) orbital kontrol ve botoks grupları arası farka dayanarak, elde edilen yüksek etki büyüklüğü 2.68, %99 güç ve %5 tip I hata payı ile çalışmanın örneklem sayısı toplamda 12 göz olarak hesaplanmıştır. Hayvanların sağ gözüne botoks uygulama, sol gözüne ise kontrol serum fizyolojik (SF) uygulaması yapılacağından toplamda 6 hayvan ile çalışmanın uygun olduğu belirlenmiştir.

G-power analizine binaen çalışmada 6 adet, sağlıklı Yeni Zelanda Irkı (3000-4000 gr) albino dişi tavşan kullanılmıştır. Deney hayvanları, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilerek, YÜDETAM'da denekler için özel üretilmiş olan tavşan kafeslerinde ayrı ayrı, günlük standart yem ve su ad libitum, sıcaklığı (21±2°C), nem oranı kontrollü odalarda ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde barındırıldı.

Uygulama Yöntemi ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Genel anestezi (Ketamin 40mg/kg, Ksilazin 5mg/kg) sonrası ilk olarak kornealar topikal % 0,5'lik proparakain hidroklorür (Alcaine; Alcon, Fort Worth, TX, ABD) uygulandıktan sonra floresein ile boyanarak (**Resim 1**) kobalt mavisi ışık altında el mikroskobu ile muayene edildi (**Resim 2**). Bu muayenede, tüm korneaların saydamlığı ve bütünlüğü doğal olarak not edildi (**Resim 3**). Sonrasında tavşanların sağ gözüne kornea limbusundan 3,5 mm mediale olacak şekilde subkonjonktival olarak BOTOX® flakon 100 Allergan ünitesi için seyreltme tablosu (**Tablo 1**) baz alınarak 5 ünite BOTOX® uygulaması yapıldı (**Resim 4 ve 5**) ve her tavşanın sol gözünde aynı lokasyona aynı miktarda serum fizyolojik uygulandı. Enjekte edilen materyalin subkonjonktival alanda olduğu teyit edildi (**Resim 6**). Botulinum toksini uygulanmış 6 göz toksin grubu, serum fizyolojik uygulanmış diğer 6 göz ise kontrol grubu olarak adlandırıldı. İşlem sonrası her iki göze de siprofloksasin (SİPROGUT %0,3 göz damlası, Bilim İlaç, İstanbul, Türkiye) göz damlası damlatıldı.

3. hafta bitiminde denekler sakrifiye edildikten sonra kornealar 360 derece peritomi ile alınarak %10'luk formaldehit içeren örnek kaplarında 2 saat içerisinde patoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Histopatolojik inceleme yapılmak üzere süreç başlatıldı.



Resim 1. Floresein ile tavşan korneasının boyanması



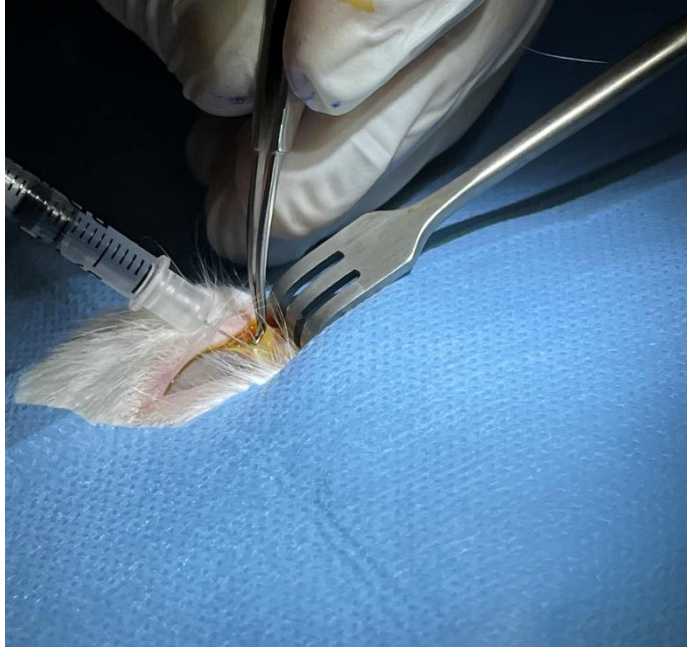
Resim 2. Kobalt mavisi ışık altında korneanın el mikroskobu ile incelenmesi



Resim 3. Kornea saydamlığını ve bütünlüğünü gösteren kesit



Resim 4. Subkonjonktival enjeksiyon uygulaması



Resim 5. Subkonjonktival enjeksiyon uygulaması



Resim 6. Subkonjonktival enjeksiyon uygulamasının doğru alana yapıldığı teyit edildi

	100 ünite flakon
Oluşan doz (ünite/0.1 ml)	Eklenen seyreltici miktarı (steril koruyucu içermeyen serum fizyolojik (enjeksiyonluk %0.9 sodyum klorür))
20 ünite	0.5 ml
10 ünite	1 ml
5 ünite	2 ml
4 ünite	2.5 ml
2.5 ünite	4 ml
1.25 ünite	8 ml

Tablo 1. BOTOX® flakon 100 Allergan ünitesi için seyreltme tablosu

Histopatoloji ve İmmunohistokimya

Laboratuvara %10 tamponlanmış formaldehit solüsyonunda gönderilen altı çift tavşan korneası, her birinden altışar vertikal kesit alınarak, her kasete iki tanesi düşecek şekilde örneklendi. Materyaller bildirilen şekilde denek ve kontrol olarak, numaralı şekilde etiketlendi. Ardından histolojik takibe alındı. Prosesi tamamlanıp çıkan parafin bloklardan 4 µm kesitler alınarak, histomorfolojik olarak değerlendirildi.

İleri inceleme işlemi olarak; “index sample” belirlenerek yine sinir doku ve hücre tespiti için, 3-4-5 µm kesitler alındı ve her bir preparata pozitif kontrol dokuları da eklenerek S-100 (4C4.9 klonu, ScyTek, Utah, ABD), Myelin Basic Protein (proteintech, Illinois, ABD), GFAP (GA-5 klonu, Biocare Medical, California, ABD), NeuN (GeneTex, Irvine, California, ABD) antikoları ile immünohistokimyasal boyamalar ile validasyon çalışması yapıldı. Validasyon çalışmaları sonucunda S-100 antikoru ile uygun dilusyonlarda çalışılmasına karar verildi. Çalışmaya dâhil tüm dokulardan 4 µm kesitler alınarak S-100, Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP), nöronal nüklei (NeuN) ile immünohistokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Ayrıca, sinir doku ayırımı için, parafin bloklardan 5 µm kesitler alınarak her bir preparata pozitif kontrol dokuları da eklenerek Modifiye Gomori Trikrom ile boyandı, histokimyasal değerlendirme yapıldı.

Protein İzolasyonu ve Western-Blot Analizi

İmmunhistokimya boyama sonrası sinir hücresi olarak düşündüğümüz tutulumları, boyanmaları verifiye edebilmek için moleküler düzeyde inceleme yapıldı. Bunun için parafin bloklarımızdan 5 µm kesitler alarak protein izolasyonu ve western blot analizi için bazı uygulamalar yapıldı. Bunlar:

- Bikinkoninik Asit (BCA Assay) Tahlili: Bir solüsyondaki çözünmüş formdaki bir proteinin konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan analitik spektroskopik bir yöntemdir.

- Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE): SDS-PAGE bir poliakrilamid jel elektrofrez varyantı olan ve biyokimyada karışımlardaki yüklü molekülleri elektrik alan varlığında moleküler kütlelerine göre ayıran analitik bir metottur. Sodyum dodesil sülfat molekülleri proteinlerin izolasyon ve tanımlanmasına yardım ederler.

Protein İzolasyonu Protokolü⁷⁴

1. FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, formal ile fikse edilmiş parafine gömülü doku) dokusunu mikrofüj tüpüne yerleştirilir. 1 mL ksilen çözücü ekleyin ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir.
2. Çözelti çıkarılır, 1 mL ksilen çözücü eklenir ve (1)'deki gibi inkübe edilir.
3. Çözelti çıkarılır, 1 mL mutlak etanol eklenir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
4. Çözelti çıkarılır, 1 mL mutlak etanol eklenir ve (3)'teki gibi inkübe edilir.
5. Çözelti çıkarılır, 1 mL %70 etanol eklenir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
6. Çözelti çıkarılır, 1 mL %70 etanol eklenir ve (5)'teki gibi inkübe edilir.
7. Çözelti çıkarılır, 1 mL %30 etanol eklenir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
8. Çözelti çıkarılır, 1 mL %30 etanol eklenir ve (7)'deki gibi inkübe edilir.
9. Çözelti çıkarılır, 1 mL su ekleyin ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir.
10. Çözelti çıkarılır, 1 mL su eklenir ve (9)'daki gibi inkübe edilir.
11. Çözelti çıkarılır, 10 mM sitrat tamponu + %2 SDS + 1X proteaz inhibitörü içeren 1 ml lizis tamponu eklenir.
12. Örnek dokular, 98°C'de 30 dakika boyunca çalkalanır (600 rpm) ve inkübe edilir.
13. Tüpler ısıtma bloğundan çıkarılır ve 4°C'de 10 dakika soğumaya bırakılır.
14. Örnek doku sonikatör ile 2 dakika boyunca homojenize edilir.
15. Tüpler 14.000 x g'de 10 dakika santrifüjlenir.
16. BCA tahlili ile protein konsantrasyonu tayini yapılır.

Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi⁷⁴

Reaktif maddesi bikinkoninik asittir (BCA). İki reakssiyondan oluşur: ilk reaksiyon biüret reaksiyonudur. Cu⁺² iyonları peptid azotlarına bağlanır ve Cu⁺¹ iyonunu indirgenirler. İkinci reaksiyonda ise bu indirgenmiş Cu⁺¹ iyonları BCA ile renkli bir kompleks oluştururlar ve bu rengin şiddeti protein yoğunluğu ile orantılıdır. Oluşan bu renk kompleksi 562 nm dalga boyunda ölçüm alınarak saptanır.

1. Mikrolitrede 0,2 ila 50 mikrogram protein içeren numuneler hazırlanır.
2. Her 20 mikrolitre örneğe 1 ml standart çalışma solüsyonu eklenir ve karıştırılır. 60 derecede 30 dakika inkübe edilir.
3. Örnekler soğutulur ve 562 nm'de okunur.

SDS-PAGE Poliakrilamid Jel Elektroföresi Yöntemi⁷⁴

1. SDS-Poliakrilamid jellerin hazırlanacağı camlar alkol ile temizlenir.
2. Yürütme ve toplama jelleri hazırlanır. (Tetrametiletilediamin (TEMED) ve Amonyum pesülfat (APS) ilave edilmez)
3. % 10 APS taze olarak hazırlanır.
4. Koşurma jeli APS ve TEMED ilave edildikten sonra hafifçe karıştırılıp uygun şekilde yerleştirilmiş camların arasına dökülür ve üzeri % 20 izopropanol ile kapatılır.
5. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol dökülür.
6. Distile su ile yıkanır ve koşurma jeline temas edilmeden camların yüzeyi ve jelin üzerinde kalan su Whatman kağıdı ile temizlenir.
7. Toplama jeline APS ve TEMED ilave edilir ve koşurma jelinin üzerine dökülür.
8. Üzerine çalışmamız için uygun tarak yerleştirilir.

Western Blot Yöntemi⁷⁴

Membrana aktarımla protein saptanması, Western emdirimi (“Blotting”); dokudaki spesifik bir proteini analiz etmek için kullandığımız bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu yöntem ile dokuda bulunan bir proteinin varlığı ve farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması vb. incelenebilir.

1. Öncelikle kullanılacak numunenin proteinini uygun bir yöntemle saflaştırılır.
2. Kullanılan numunedeki protein miktarını belirleyerek (örn. BCA testi kullanarak) protein konsantrasyonu ölçülür.
3. Numuneler, eşit miktarda protein içeren SDS poliakrilamid jellerine yüklenir, yürütme işlemine başlanır.
4. PVDF membranını jel boyutunda kesin ve 10 dakika bekletin. %100 metanol ile çalkalayıcıda çalıştırılır.
5. Membran ve yürütmesi tamamlandıktan sonra jel, 1X Towbin transfer tamponu kullanılarak 15 dakika çalkalayıcıda çalıştırılır.
6. Membran ve jel sandviç yöntemiyle western blot transfer aparatına (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, 170-3930, 170-3935, Bio-Rad) yerleştirilir. Bu işlem için sünger 1X Towbin transfer tamponuyla ıslatılır. Üzerine bir adet kalın transfer kağıdı transfer tamponuyla ıslatılıp koyulur. Onun üzerine jel koyulur. Jelin üzerine membrane düzgün bir şekilde yerleştirilir ve yine sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış kağıt ve sünger koyulur.

Hava kabarcığı kalmaması için silindirik bir malzemeye üstünden bastırılır. Daha sonra sıkıştırma aparatına jel tarafı siyah tarafa gelecek şekilde koyulur ve sıkıştırılır. Transfer aparatına yine siyah taraf siyah tarafa gelecek şekilde yerleştirilir.

7. 1X Towbin transfer tamponuyla 100 V'de 1 saat transfer işlemi gerçekleştirilir. Transfer buz üstünde yapılır, ayrıca tankın içine de buz aküsü koyulur.

8. Proteinlerin transfer olduğu membran %5 BSA'lı (w/v) TBST içinde (bloklama tamponu) 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bloklanır.

9. Bloklama tamponu dökülür ve membran 3 kere 10'ar dakika TBST ile yıkanır (Her seferinde bir önceki dökülür).

10. Bloklama tamponunun içinde ilgilenilen proteine özgün "primary antibody" (birincil antikor) uygun oranda seyreltilerek 12-16 saat çalkalayıcıda +4°C'de çalkalanır.

11. Bloklama tamponunda seyreltmesi yapılan birincil antikor solüsyonu atılmaz, tekrar kullanım için ayrı bir tüpe alınarak +4°C'de saklanır.

12. Membran 5'er dakika 4 kere TBST ile çalkalayıcıda muamele edilir.

13. Membran, bloklama tamponu içinde uygun oranda seyreltilerek hazırlanmış "secondary antibody" (ikincil antikor) ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat muamele edilir.

14. Membran 5'er dakika 4 kere TBST ile çalkalayıcıda muamele edilir (Her seferinde bir önceki dökülür).

15. Kitin içindeki SuperSignal West Femto Luminol/Enhancer Solution ve SuperSignal West Femto Stable Peroxide Solution reaktiflerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla "çalışma çözeltisi" elde edilir. Elde edilen "çalışma çözeltisi" içinde membran 5 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıda muamele edilir ve görüntülenir. Çalışma çözeltisi ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlıkta gerçekleştirilmelidir.

İstatistiksel Analizler

İkili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların hem ortalama, hem median değerlerini analiz edildi. Hesaplanan P değeri <0.05 olduğunda, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada subkonjonktival olarak uygulanan botulinum toksin-A'nın kornea sinir pleksusu ve stromal hücrelerinden fibroblastlara etkileri histopatoloji, immünohistokimya ve moleküler biyoloji düzeyinde incelendi.

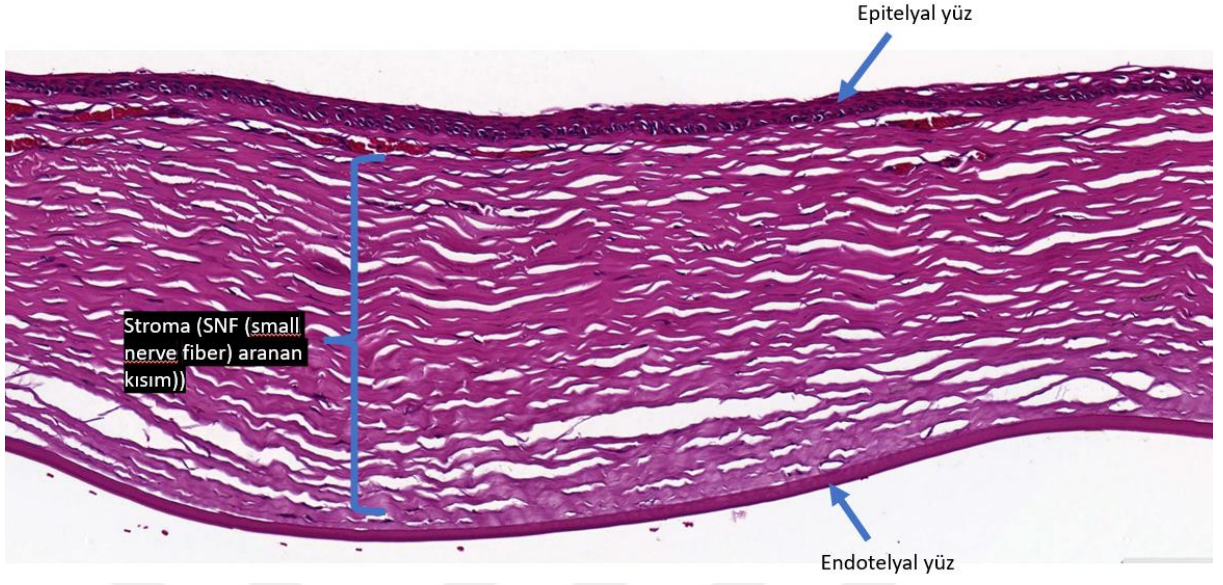
Histolojik incelemede hematoksilin&eozen (**Resim 7**) ve Modifiye Gomori Trikrom (MGT) (**Resim 8**) boyası kullanılarak temel katmanların görülmesi sağlandı.

İmmünohistokimya incelemelerinde S-100, GFAP, NeuN gibi çeşitli antikorlar kullanıldı. Rutin immünohistokimyasal incelememizde kullanılan anti-rabbit antikorlardan ötürü yoğun zemin boyanması görülmüştür (**Resim 9**). İmmünohistokimyasal incelemedeki çapraz reaksiyon kaynaklı zemin boyanmasının önüne geçmek için “antigen retrieval” (**Resim 10**) uygulandı; stromada boyanan bazı noktaların (kırmızı okla işaretli, resim) sinir pleksusu komponenti olabileceği düşünüldü. MGT (Modifiye Gomori Trikrom) (**Resim 11**) ile, S-100 boyası ile sinir hücresi tutulumu olduğundan şüphelenilen stromal elemanların verifikasyonu için uygulama yapıldı. Bu şüpheli elemanlara karşılık gelen net bir boyanma görülmedi ve tutulum gösteren elemanların dentritik hücre de olabileceği yorumu getirildi. Bununla birlikte tutulum gösteren yapılar toksin ve kontrol grubunda yoğunluk (dansite) bakımından kıyaslandı. Deney preparatlarımızdaki boyanma-tutulum, sinir kontrol dokusunun kesitiyle (**Resim 12**) karşılaştırıldığında benzer tondaki boyanmalar baz alındı (**Resim 13**). Bu karşılaştırmada dijital patoloji kullanıldı; fibroblastlar ayrı sinir dokusu tutulumları (sinir kontrol kesiti ile benzer tondaki tutulumlar) ayrı olarak yapay zekaya tanıtıldı ve bu tutulumların yoğunluk (dansite) ölçümü yapıldı. Bu sinir yoğunluk ölçümü, sinir hücre skoru olarak ifade edildi. 10 mm²'lik alan içerisinde toksin (denek) ve kontrol grubunda her iki hücre özelinde skorlama yapıldı (**Tablo 2**). Toksin (denek) ve kontrol grubundaki sinir hücre skoru istatistiki olarak anlamlı bulundu ($p=0.016$), ancak fibroblast skorunda anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.63$). Kontrol grubunun sinir hücreleri için ortalama (mean), medyan değerleri sırasıyla 8923.0, 7477.0; toksin (denek) grubu için 4112.7, 3786.5; kontrol grubunun fibroblastlar için ortalama (mean), medyan değerleri sırasıyla 5725.0, 5830.0; toksin (denek) grubu için 5381.7, 5045.0 olarak hesaplandı. Histogram oluşturuldu (**Grafik 1**).

Sinir kontrol dokusu kesitindeki sinir spesifik tutulumlar baz alınarak yapılan yoğunluk (dansite) skorlamasında istatistiki olarak hipotezimizi destekleyen anlamlı sonuç elde edildi. Ayrıca bu yoğunluk ölçümünün moleküler düzeyde ileri incelemeyle değerlendirilmesi planlandı. Sinir spesifik protein seçilerek; protein izolasyonu, poliakrilamid jel elektroforez

(SDS-PAGE), BCA tahlili ve western-blot yöntemleri uygulandı. Ancak her iki grupta da protein konsantrasyonları beklenen düzeyin altında tespit edildi (**Tablo 3. BCA tahlili standardize edilmiş konsantrasyonları. Tablo 4. deney BCA tahlili konsantrasyonları**). Bu nedenle protein bantları ileri çalışmalar olan jel elektroforez (**Resim 14**) ve western-blot'ta (**Resim 15**) optimum düzeyde saptanamadı.

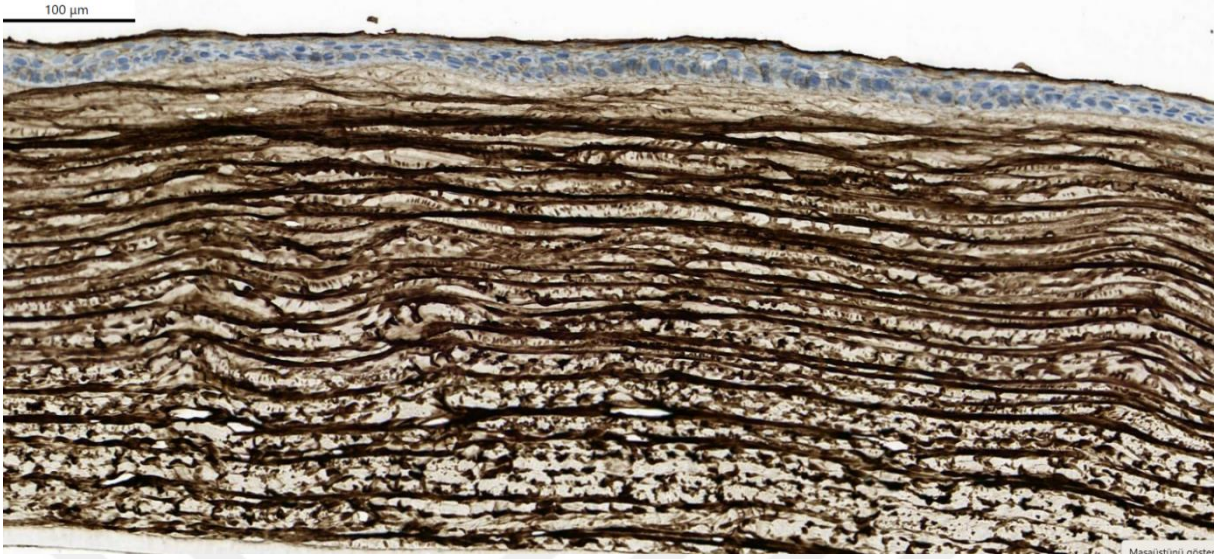




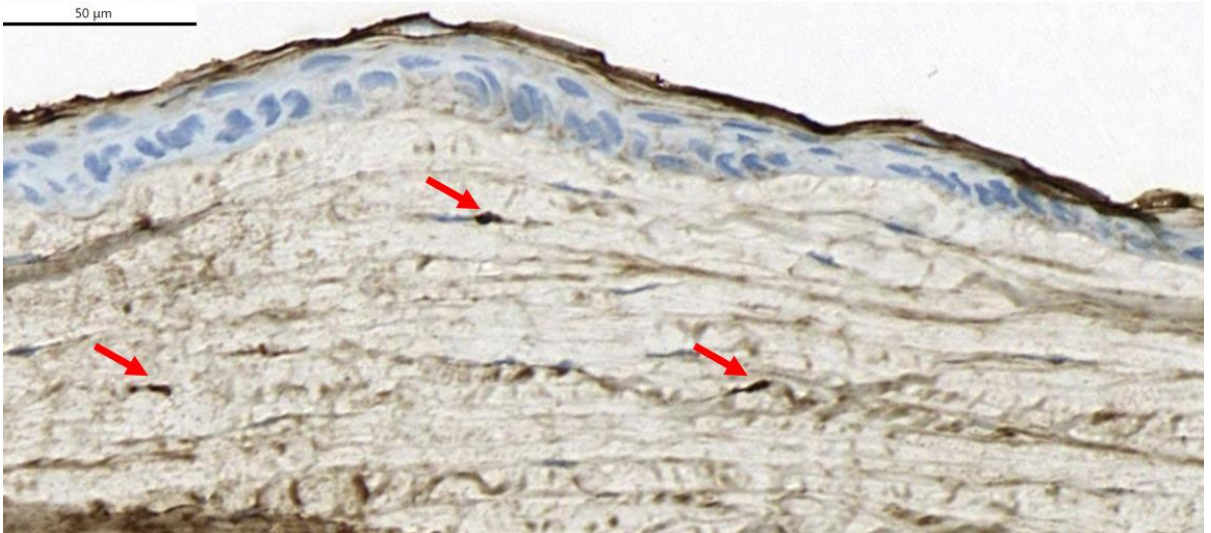
Resim 7. Tavşan kornea kesitinden bir örnek (Hematoksilen & Eozin boyası)



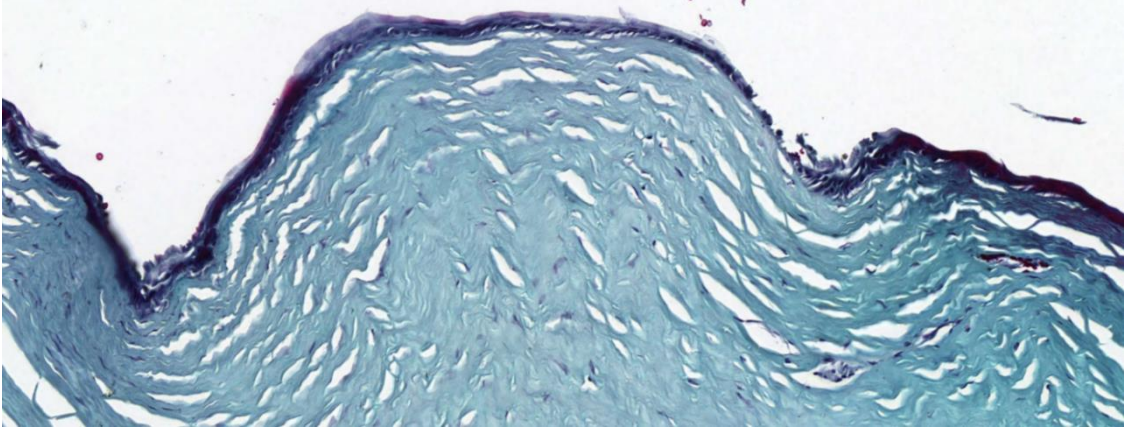
Resim 8. Tavşan kornea kesitinden bir örnek (MGT boyası)



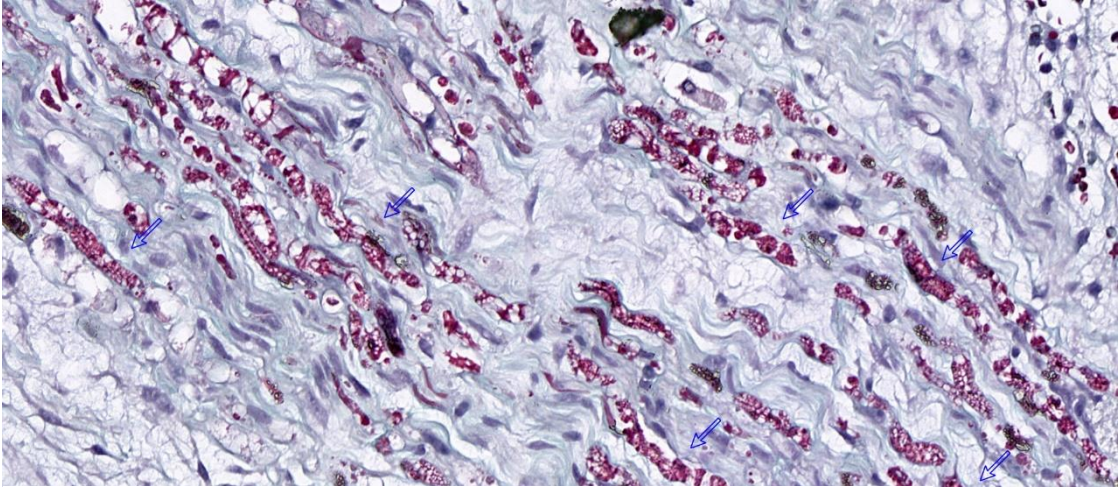
Resim 9. Korneada sinir görüntülemek amacıyla uygulanan S-100 boyası



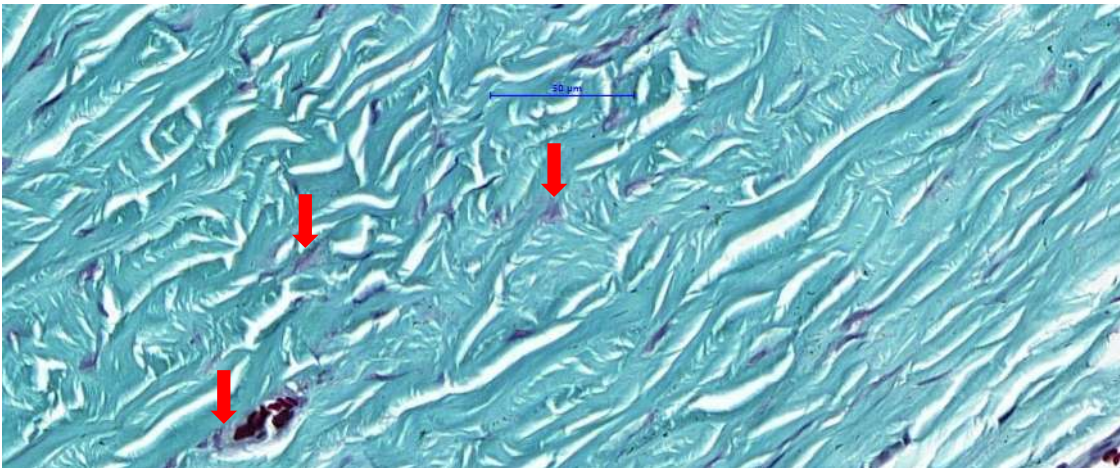
Resim 10. S-100 boyası, antijen geri kazanım (Kırmızı oklar, sinir hücresi elemanı olma ihtimali içeren boyanmaları göstermekte)



Resim 11. MGT (Modifiye Gomori Trikrom) boyası



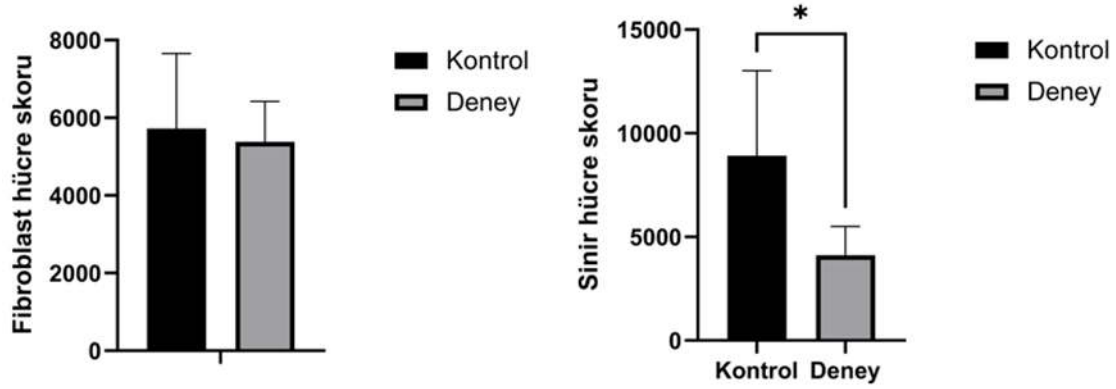
Resim 12. Sinir kontrol doku kesiti, MGT boyası



Resim 13. Deney doku kesiti, MGT ile benzer tutulumlar işaretli (kırmızı oklar)

		Alan (mm2)	Fibroblast Skoru	Sinir Hücre Skoru
1	Kontrol1	10	6100	8508
	Denek1	10	4280	3000
2	Kontrol2	10	6570	6446
	Denek2	10	6660	3064
3	Kontrol3	10	2660	5132
	Denek3	10	4900	4293
4	Kontrol4	10	4950	16243
	Denek4	10	5190	3443
5	Kontrol5	10	5560	10776
	Denek5	10	4590	6746
6	Kontrol6	10	8510	6433
	Denek6	10	6670	4130

Tablo 2. Fibroblast ve Sinir Hücre Skorları



Grafik 1. Histogram grafiği

Standart - 10 mM Citrate Buffer + 2% SDS			
Konsantrasyon (ug/ml)	OD's 1	OD'S 2	OD Ortalama
2000 ug/ml	1.587	1.564	1.576
1500 ug/ml	1.199	1.172	1.186
1000 ug/ml	0.870	0.846	0.858
750 ug/ml	0.661	0.639	0.650
500 ug/ml	0.500	0.483	0.492
250 ug/ml	0.293	0.289	0.291
125 ug/ml	0.191	0.194	0.193
25 ug/ml	0.103	0.100	0.102
Boş	0.086	0.081	0.084

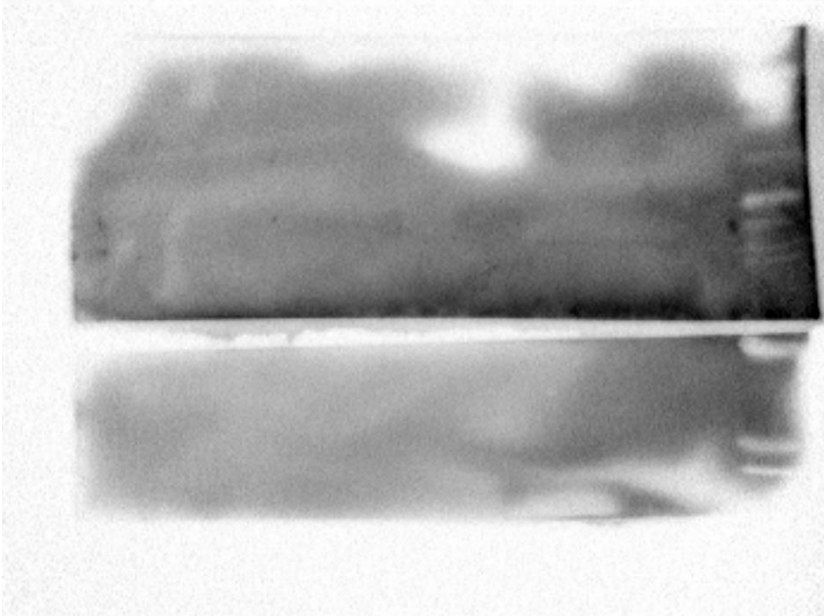
Tablo 3. BCA tahlili standardize edilmiş konsantrasyonları (OD: Optical density, optik yoğunluk)

Örnekler	OD's 1	OD'S 2	OD Ortalama
CS-D1	0.093	0.093	0.093
CS-D2	0.090	0.090	0.090
CS-D3	0.091	0.091	0.091
CS-D4	0.093	0.094	0.094
CS-D5	0.091	0.092	0.092
CS-D6	0.089	0.089	0.089
CS-K1	0.090	0.091	0.091
CS-K2	0.092	0.090	0.091
CS-K3	0.094	0.095	0.095
CS-K4	0.092	0.091	0.092
CS-K5	0.093	0.094	0.094
CS-K6	0.098	0.098	0.098

Tablo 4. Deneyimizin BCA tahlili konsantrasyonları



Resim 14. SDS-PAGE görüntüsü



Resim 15. Western-Blot Görüntüsü

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kornea sinir pleksuslarının sinir lifi yoğunluğu, sinir lifi uzunluğu ve sinir lifi dallanmaları açısından incelenmesi sistemik hastalıklar ile ilişkileri bakımından gelecekte daha fazla önem arz edeceği düşünülmektedir. Örneğin, korneal sinir morfolojisinin değerlendirilmesi, diyabetik periferik nöropatinin (DPN) tespiti için yeni bir oftalmik belirteç olarak umut vaat ettiğini göstermiştir⁵⁶. Kornea sinir lifi uzunluğu, kornea sinir dalı yoğunluğu ve kornea sinir lifi kıvrımlılığı gibi kornea sinir parametrelerinin DPN ile ilişkili olduğu bulunmuştur⁵⁶. Özellikle kornea sinir lifi uzunluğu, nöropatinin diğer tanısal testleri ve nöropati için belirlenmiş risk faktörleri ile en güçlü ilişkileri göstermiştir⁵⁶. Bu nedenle topikal ve subkonjonktival enjeksiyon uygulamalarının kornea sinir ağına etkilerini incelemenin önemi artacaktır.

Korneal sinir pleksusu migren bağlamında da incelenmiştir. Kronik migren hastalarında korneal sinir lifi yoğunluğunun azaldığı bulunmuştur⁵⁷. Bu durum, korneal sinir anormallikleri ile migren bozuklukları arasında potansiyel bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

Botulinum toksin tip A (BoNT-A), oftalmoloji de dahil olmak üzere çeşitli tıbbi alanlarda yaygın olarak kullanılan bir nörotoksindir. Nöromusküler kavşakta asetilkolin salınımını inhibe ederek kas felcine yol açma yeteneği ile bilinir. Bununla birlikte, son çalışmalar BoNT-A'nın sinir sistemi ve diğer hücre tipleriyle etkileşimler de dahil olmak üzere nöromusküler etkilerinin ötesinde etkilere sahip olabileceğini öne sürmüştür⁵⁸.

BoNT-A'nın yüz mimik kasları üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir ve corrugator, orbicularis oculi ve frontalis kaslarında kas hareketini kısıtlamak için kullanılmıştır⁵⁸. BoNT-A enjeksiyonunun yüz mimik kaslarında kullanım için güvenli ve etkili olduğunu bildirmiştir⁵⁸.

Speeg-Schatz ve arkadaşları (2017) ve Pellegrini ve arkadaşları (2019), BoNT-A'nın kuru göz semptomları da dahil olmak üzere çeşitli göz rahatsızlıklarının tedavisinde kullanımını tartışmaktadır. BoNT-A'nın korneal nöroseptörleri inhibe edebileceğinden⁵⁹ ve kuru göz semptomlarını azaltabileceğinden bahsetmektedirler⁶⁰. Seriler halinde uygulanan BoNT-A enjeksiyonları ile uzun süreli tedavi edilen hemifasiyal spazmlı hastalarda, tedavi edilen gözde kontralateral göze kıyasla gözyaşı filmi üretimi ve stabilitesinin yanı sıra kornea hassasiyetinde azalma görülmüştür⁶⁰.

BoNT-A'nın subkonjonktival uygulaması, inaktif Graves orbitopatisi olan hastalarda göz kapağı retraksiyonu da (üst kapak altından subkonjonktival yolla levator kasa uygulama) dahil

olmak üzere çeşitli oftalmik durumlarda kullanılmıştır⁶¹. Subkonjonktival BoNT-A enjeksiyonlarını takip eden komplikasyonlar nadirdir, subkonjonktival kanama veya skleral perforasyon gibi geri dönüşümlü lokal riskler vardır⁵⁹. Subkonjonktival BoNT-A enjeksiyonlarının infantil esotropi tedavisi için kullanımı da bildirilmiştir⁵⁹. Özellikle esotroplarda subkonjonktival alandan rektus kaslarına yapılan BoNT-A korneaya daha yakın şekilde yapılmaktadır. Bununla birlikte, subkonjonktival BoNT-A enjeksiyonlarının etkinliğinin spesifik duruma ve hastalığın evresine bağlı olarak değişebileceğini belirtmek önemlidir⁵⁹.

Botulinum toksini A, klinik çalışmalarda potansiyel antiaritmik özellikleri açısından da araştırılmıştır⁶². Kalp hücrelerinde hızlı sodyum akımlarını ve L tipi kalsiyum akımlarını inhibe ettiği ve iletim hızında doza bağlı bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir⁶². BoNT-A'nın kalp hücreleri üzerindeki inhibitör etkisi geri dönüşümlüdür ve BoNT-A içermeyen bir ortamda 12 günlük hücre kültüründen sonra kaybolur⁶². Ayrıca, BoNT-A'nın servikal vagus sinir stimülasyonunun neden olduğu atriyal fibrilasyon gelişimini engellediği gösterilmiştir⁶².

James ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, botulinum toksininin pilorik ve antral düz kas üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir. Çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda botulinum toksin-A'nın düz kas kontraktilitesini doğrudan inhibe ettiği ve asetilkoline (ACh) karşı kontraktıl yanıtın azalmasına yol açtığı bulunmuştur⁶³. Ek olarak, düşük konsantrasyonda, botulinum toksin-A, ACh ile indüklenen kasılmaları etkilemeden elektrik alan stimülasyonu (EFS) ile indüklenen kasılma yanıtlarını azaltmıştır, bu da kolinerjik sinirlerden ACh salınımının inhibe edildiğini düşündürmektedir. ACh salınımının bu şekilde engellenmesinin, botulinum toksin-A'nın kas aktivitesini etkileme mekanizmalarından biri olduğu düşünülmektedir⁶⁴.

Cruzat ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu bir çalışmada korneada bağışıklık ve sinir sistemleri arasında potansiyel bir etkileşim olduğunu gösterilmiştir⁶⁵. Enfeksiyöz keratiti olan hastalarda, merkezi epitelyal dendritik hücrelerin (DC'ler) yoğunluğu ve morfolojik değişiklikleri artmıştır ve DC sayılarındaki artış ile subbazal korneal sinirlerin azalması arasında anlamlı bir korelasyon vardır⁶⁵. Bu durum, korneadaki enflamasyonun kornea sinirlerinin yoğunluğunu ve morfolojisini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Botulinum toksin-A'nın fibroblastlar üzerindeki spesifik etkileri kapsamlı olarak incelenmemiş olsa da, botulinum toksin-A'nın diğer hücre tipleri ve dokular üzerindeki etkileri

yoluyla fibroblast fonksiyonunu dolaylı olarak etkilemesi mümkündür. Örneğin, botulinum toksin-A'nın merkezi sinir sistemini ve bazal gangliyon devrelerini etkilediği gösterilmiştir⁵⁰. Fibroblastlar deri ve bağ dokuları dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli dokularda bulunduğundan, botulinum toksin-A'nın fibroblast aktivitesini çevreleyen doku ortamı üzerindeki etkileri yoluyla dolaylı olarak etkileyebileceği düşünülebilir.

Park ve arkadaşları (2019) BoNT-A'nın fibroblastlar üzerindeki etkilerini farklı bağlamlarda tartışmaktadır. Park ve arkadaşları (2019), BoNT-A tedavisinin skar fibroblastlarının çoğalmasını ve göçünü azaltabileceğini ve pro-fibrotik faktörlerin ekspresyonunu inhibe edebileceğini göstermektedir. Bu, BoNT-A'nın fibroblast davranışı üzerinde modülatör bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir⁶⁶. Ayrıca, transforme edici büyüme faktörü $\beta 1$ ve interlökin-6 gibi pro-fibrotik faktörlerin ekspresyon seviyeleri botulinum toksin tip A ile inhibe olduğu görülmüştür. Bununla birlikte botulinum toksin tip A'nın skar fibroblastları üzerindeki baskılayıcı etkilerinin JNK sinyal yolunun aktivasyonu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir⁶⁶. BoNT-A ile indüklenen ptozis sonrası korneal ülserlerin iyileşme hızlarında artış görülmesi ptozisin gözü kapatıcı etkisiyle açıklanmakla beraber⁶⁷; bu süreçte fibroblast aktivitesinin de artma potansiyeli olması ileri çalışmalarda incelenebilir. Botulinum toksini tip A'nın keloid fibroblastlarında apoptozu indükleyerek hipertrofik skar oluşumunu azaltabileceğini öne sürülmüştür⁶⁸.

Herhangi bir subkonjonktival enjeksiyon uygulamasının kornea üzerine etki etme potansiyeli düşünüldüğünde Dong ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları çalışma konuya ışık tutmaktadır. Çalışmada subkonjonktival bevacizumab enjeksiyonunun normal farelerde belirgin korneal sinir dejenerasyonuna, korneal duyarlılığın azalmasına ve korneal epitelyal yara iyileşmesi ve sinir rejenerasyonunun gecikmesine neden olduğu, bu durumun bevacizumab enjeksiyonunun konsantrasyonu ve süresi arttıkça daha belirgin hale geldiği görülmüştür⁶⁹.

Bu çalışmada karşımıza çıkan sorunlardan biri olarak immünohistokimiyada (IHC) aşırı arka plan boyanması, sonuçların kalitesini ve yorumlanmasını etkileyen yaygın bir sorun olabilir. Bu sorunun nedenlerini anlamak ve arka plan boyanmasını en aza indirmek için potansiyel çözümleri araştırmak önemlidir. Çeşitli çalışmalar, IHC'de aşırı arka plan boyanmasının nedenleri hakkında fikir vermektedir⁷⁰.

Ramos-Vara'nın 2005 yılında yapmış olduğu çalışmaya göre, IHC'de spesifik olmayan bağlanma ve aşırı arka plan boyanmasının nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Elektron alıcısı/elektron vericisi etkileşimleri gibi elektrostatik ve polar kuvvetlerin bir kombinasyonunun bu soruna dahil olabileceği varsayılmıştır. Ek olarak, nonspesifik boyama iyonik ve hidrofobik etkileşimlerin bir kombinasyonundan kaynaklanabilir ve bir etkileşim türüne yönelik çözümler diğerini kötüleştirebilir. Fiksatif çözeltinin iyonik gücünün artırılması, belirli antijenlerin tespitini iyileştirmek için potansiyel bir çözüm olarak önerilmiştir⁷⁰.

Fiksasyon, IHC'de önemli bir adımdır ve fiksatif seçimi arka plan boyanmasını etkileyebilir. Formaldehit IHC'de yaygın olarak fiksatif olarak kullanılır, ancak antijen tespiti üzerinde zararlı etkileri olabilir. Bu etkilere karşı koymak için, doku kesitlerinde antijenleri tespit etme yeteneğini geliştirmek üzere antijen geri kazanım (AR) teknikleri geliştirilmiştir⁷⁰. AR, doku kesitlerinin formaldehit fiksasyonunun neden olduğu çapraz bağlanmayı tersine çeviren ve böylece antijen erişilebilirliğini artıran koşullara tabi tutulmasını içerir. Bu, arka plan boyanmasını azaltmaya ve tespit sistemlerinin hassasiyetini artırmaya yardımcı olabilir⁷⁰. Bazı durumlarda, IHC'de arka plan boyanması, antikorların dokuda bulunan immünoglobulinlere (Igs) spesifik olmayan şekilde bağlanmasından kaynaklanabilir. Bu durum özellikle monoklonal antikorlar kullanıldığında sorun yaratabilir⁷⁰.

Çalışmamız, subkonjonktival yolla uygulanan botulinum toksin-A'nın kornea sinir pleksusları ve kornea fibroblast hücreleri üzerine etkilerini bir hayvan deneyi modeli üzerinde histopatolojik ve moleküler düzeyde inceleyen literatürde görebildiğimiz ilk çalışmadır.

Subkonjonktival yolla uygulanan botulinum toksin A'nın, sinir kontrol dokusu kesitinden baz alınarak yapılan sinir dokusu benzer tutulumların yoğunluk (dansite) ölçümünde; toksin grubunun kontrol grubuna göre sinir hücre skorunun daha düşük olduğu istatistiki olarak anlamlı saptandı (sinir hücresi skoru p değeri 0.016, $p < 0.05$). Ayrıca, sinir yoğunluğu ölçümünü gruplar arasında moleküler düzeyde değerlendirmek için sinir spesifik protein izolasyonu, jel elektroforezi ve western-blot analizleri yapıldı. Yapılan ileri incelemelerde optimum düzeyde sonuç elde edilemedi. Bu durumun tavşan korneasının çalışılması zor bir doku olması ve doku örnek miktarlarının standart protokollere göre ortalama düzeyin altında kalması nedeniyle olduğu düşünüldü.

Subkonjonktival yolla uygulanan botulinum toksin A'nın kornea fibroblast sayılarına istatistiki olarak anlamlı bir etkisi olmadığı saptandı. Kontrol ve toksin grubu fibroblast skorları karşılaştırıldığında p değeri 0.631 hesaplandı ($p < 0.05$ anlamlı).

Bizim çalışmamız tavşan hayvan modeli ve kornea dokusu özelinde değerlendirildiğinde, hem hayvan deneyi olmasının getirdiği laboratuvar uygulama zorlukları hem de kornea sinir pleksuslarının teknik açıdan çalışılmasının zor olması ve immünhistokimya incelemede korneanın diğer dokular kadar çalışılmamış olması birtakım kısıtlılıklar oluşturdu. Hayvan deneylerinin preparat incelemelerinde görülebilen arka plan boyanmaları çalışmalar için aşılması güç engeller oluşturabilmektedir. Sinir hücreleri tespiti için immünhistokimya ve moleküler düzeyde yapmış olduğumuz uygulamaların teknik ve diğer nedenlerle optimum seviyede sonuç vermemesi çalışmamızın limitasyonu olarak not edildi.

Sonuç olarak, tavşan deney modelinde subkonjonktival botulinum toksin-A uygulamasının kornea sinir pleksuslarında histopatolojik değişikliklere yol açabileceği yönünde bulgular saptanmıştır ancak skar dokusunda fibroblast aktivitesini ve sayısını azalttığını gösteren çalışmalara rağmen kornea fibroblastlarına istatistiki olarak anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Botulinum toksin-A'nın oftalmolojide özellikle perioküler alanda oldukça geniş bir uygulama alanı vardır. Çalışmamız, subkonjonktival botulinum toksin-A uygulamasının, kornea sinir ve fibroblast hücrelerine etkilerinin hayvan deney modeli oluşturularak araştırılması bakımından ilk olma özelliğine sahiptir. Bu olası histopatolojik değişikliklerin işlevsel sonuçlarını ve oftalmolojideki potansiyel klinik önemini açıklığa kavuşturmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Eguchi H, Hiura A, Nakagawa H, Kusaka S, Shimomura Y. Corneal Nerve Fiber Structure, Its Role in Corneal Function, and Its Changes in Corneal Diseases. *Biomed Res Int*. 2017;2017:3242649. doi:10.1155/2017/3242649
2. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res*. 2010;90(4):478-492. doi:10.1016/j.exer.2009.12.010
3. Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1980;17:21-25.
4. Başar E, Arıcı C. Use of Botulinum Neurotoxin in Ophthalmology. *Turk J Ophthalmol*. 2016;46(6):282-290. doi:10.4274/tjo.57701doi:10.1016/j.neurol.2010.11.001
5. Ugalde I, Christiansen SP, McLoon LK. Botulinum toxin treatment of extraocular muscles in rabbits results in increased myofiber remodeling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(11):4114-4120. doi:10.1167/iovs.05-0549
6. Ranoux D. Toxine botulique et douleur des neuropathies périphériques : que peut-on en attendre ? [Botulinum toxin and painful peripheral neuropathies: what should be expected?]. *Rev Neurol (Paris)*. 2011;167(1):46-50.
7. Park J, Park HJ. Botulinum Toxin for the Treatment of Neuropathic Pain. *Toxins (Basel)*. 2017;9(9):260. Published 2017 Aug 24. doi:10.3390/toxins9090260
8. Akova Y, Yağmur M. Kornea Hastalıkları. *Temel Göz Hastalıkları*, 1. Baskı, Aydın P, Akova YA eds, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001. Bölüm 7. ss:145-180.
9. Ibrahim, N., Hifny, A., Elhanbaly, R., El-Desoky, S., Gaber, W. (2023). Morphogenetic Events Influencing Corneal Maturation, Development, and Transparency: Light And Electron Microscopic Study. *Microscopy Research and Technique*, 5(86), 539-555. <https://doi.org/10.1002/jemt.24293>
10. Zhang, S., Li, J., Yin, Z., Zhang, X., Kundu, S., Lu, S. (2015). Silk Fibroin Composite Membranes For Application In Corneal Regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, 32(132), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.42407>
11. Pedrotti, E., Bonacci, E., Fasolo, A., Rossi, A., Camposampiero, D., Jones, G., ... & Sbarbati, A. (2021). Ultrastructural Analysis Of Rehydrated Human Donor Corneas After Air-

- drying and Dissection By Femtosecond Laser. *Frontiers in Medicine*, (8). <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.787937>
12. Spadea, L., Salvatore, S., Vingolo, E. (2013). Corneal Sensitivity In Keratoconus: a Review Of The Literature. *The Scientific World Journal*, (2013), 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/683090>
13. Genova, R., Meyer, K., Anderson, M., Harper, M., Pieper, A. (2018). Neprilysin Inhibition Promotes Corneal Wound Healing. *Scientific Reports*, 1(8). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32773-9>
14. Chen, S., Liu, X., Wang, N., Wang, X., Xiong, Q., Bo, E., ... & Liu, L. (2017). Visualizing Micro-anatomical Structures Of the Posterior Cornea With Micro-optical Coherence Tomography. *Scientific Reports*, 1(7). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11380-0>
15. Corpuz, L., Funderburgh, J., Funderburgh, M., Bottomley, G., Prakash, S., Conrad, G. (1996). Molecular Cloning and Tissue Distribution Of Keratocan. *Journal of Biological Chemistry*, 16(271), 9759-9763. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9759>
16. Wang, H., Xiao, C., Dong, D., Lin, C., Xue, Y., Liu, J., ... & Li, Z. (2018). Epothilone B Speeds Corneal Nerve Regrowth and Functional Recovery Through Microtubule Stabilization And Increased Nerve Beading. *Scientific Reports*, 1(8). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20734-1>
17. Beebe, D. (2008). Maintaining Transparency: a Review Of The Developmental Physiology And Pathophysiology Of Two Avascular Tissues. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2(19), 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.08.014>
18. Abicca, I., Giannini, D., Gilardi, M., Roszkowska, A., Parravano, M., Picconi, F., ... & Schiano-Lomoriello, D. (2022). A Novel Algorithm For the Evaluation Of Corneal Nerve Beadings By In Vivo Confocal Microscopy In Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Medicine*, (9). <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.897259>
19. Li, F., Carlsson, D., Lohmann, C., Suuronen, E., Vascotto, S., Kobuch, K., ... & Griffith, M. (2004). Cellular and Nerve Regeneration Within A Biosynthetic Extracellular Matrix For Corneal Transplantation. *American Journal of Ophthalmology*, 2(138), 318. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2004.06.049>

20. Okada, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Yeh, L., Wang, Y., Saika, S., ... & Liu, C. (2020). Shp2-mediated Mapk Pathway Regulates Δ Np63 In Epithelium To Promote Corneal Innervation and Homeostasis. *Laboratory Investigation*, 4(100), 630-642. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0338-2>
21. Chen, Y., Le, Q., Hong, J., Gong, L., Xu, J. (2016). In Vivo Confocal Microscopy Of Toxic Keratopathy. *Eye*, 1(31), 140-147. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.213>
22. Talbot, C. and Kubilus, J. (2018). Developmental Analysis Of Sv2 In the Embryonic Chicken Corneal Epithelium. *Experimental Eye Research*, (172), 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.04.002>
23. Suuronen, E., Nakamura, M., Watsky, M., Stys, P., Müller, L., Munger, R., ... & Griffith, M. (2003). Innervated Human Corneal Equivalents As In Vitro Models For Nerve-target Cell Interactions. *The Faseb Journal*, 1(18), 170-172. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0043fje>
24. Lum, E., Corbett, M., Murphy, P. (2019). Corneal Sensitivity After Ocular Surgery. *Eye & Contact Lens Science & Clinical Practice*, 4(45), 226-237. <https://doi.org/10.1097/icl.0000000000000543>
25. Lambiase, A., Coassin, M., Tirassa, P., Mantelli, F., Aloe, L. (2009). Nerve Growth Factor Eye Drops Improve Visual Acuity and Electrofunctional Activity In Age-related Macular Degeneration: A Case Report. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanità*, 4(45). <https://doi.org/10.1590/s0021-25712009000400014>
26. Bonini, S., Rama, P., Olzi, D., Lambiase, A. (2003). Neurotrophic Keratitis. *Eye*, 8(17), 989-995. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700616>
27. Di, G., Zhao, X., Qi, X., Zhang, S., Feng, L., Shi, W., ... & Zhou, Q. (2017). Vegf-b Promotes Recovery Of Corneal Innervations and Trophic Functions In Diabetic Mice. *Scientific Reports*, 1(7). <https://doi.org/10.1038/srep40582>
28. Wang, S., Ghezzi, C., Gomes, R., Pollard, R., Funderburgh, J., Kaplan, D. (2017). In Vitro 3d Corneal Tissue Model With Epithelium, Stroma, and Innervation. *Biomaterials*, (112), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.030>
29. Werner, L., König, M., Legeais, J., Renard, G. (1999). Confocal Microscopic Study Of Rabbit and Human Corneal Epithelia Using Two Objectives With Different Numerical

Aperture. Arquivos Brasileiros De Oftalmologia, 6(62), 705-711.
<https://doi.org/10.1590/s0004-27491999000600010>

30. Ehlers, N., Bramsen, T., Sperling, S. (2009). Applanation Tonometry and Central Corneal Thickness. Acta Ophthalmologica, 1(53), 34-43. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1975.tb01135.x>

31. Pellinen, P. and Lokkila, J. (2009). Corneal Penetration Into Rabbit Aqueous Humor Is Comparable Between Preserved and Preservative-free Tafluprost. Ophthalmic Research, 2(41), 118-122. <https://doi.org/10.1159/000192082>

32. Lee, S., Kim, S., Kim, E., Geroski, D., McCarey, B., Edelhauser, H. (2008). Trans-scleral Permeability Of Oregon Green 488®. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 6(24), 579-586. <https://doi.org/10.1089/jop.2008.0050>

33. Xia, X., Atkins, M., Dalal, R., Kuzmenko, O., Chang, K., Sun, C., ... & Goldberg, J. (2019). Magnetic Human Corneal Endothelial Cell Transplant: Delivery, Retention, and Short-term Efficacy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 7(60), 2438. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-26001>

34. Clippinger, A., Raabe, H., Allen, D., Choksi, N., Zalm, A., Kleinstreuer, N., ... & Lowit, A. (2021). Human-relevant Approaches To Assess Eye Corrosion/irritation Potential Of Agrochemical Formulations. Cutaneous and Ocular Toxicology, 2(40), 145-167. <https://doi.org/10.1080/15569527.2021.1910291>

35. Chen, L., Huang, L., Gray, B., Chernyak, D. (2014). Comparison Of Wavefront Aberrations In Rabbit and Human Eyes. Clinical and Experimental Optometry, 6(97), 534-539. <https://doi.org/10.1111/cxo.12184>

36. Cherington, M. (2004). Botulism: Update and Review. Seminars in Neurology, 02(24), 155-163. <https://doi.org/10.1055/s-2004-830901>

37. Flett, P., Stern, L., Waddy, H., Connell, T., Seeger, J., Gibson, S. (1999). Botulinum Toxin a Versus Fixed Cast Stretching For Dynamic Calf Tightness In Cerebral Palsy. Journal of Paediatrics and Child Health, 1(35), 71-77. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1754.1999.00330.x>

38. Nalapur, S. and Ambati, R. (2021). A Review On Neurotoxins From Clostridium Botulinum Against Neuro-muscular Disorders. Journal of Advances in Biology & Biotechnology, 7-14. <https://doi.org/10.9734/jabb/2021/v24i730223>

39. Nepal, M. and Jeong, T. (2020). Alternative Methods For Testing Botulinum Toxin: Current Status and Future Perspectives. *Biomolecules & Therapeutics*, 4(28), 302-310. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.200>
40. P, N. and Nigam, A. (2010). Botulinum Toxin. *Indian Journal of Dermatology*, 1(55), 8. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.60343>
41. Aoki, K. and Guyer, B. (2001). Botulinum Toxin Type a And Other Botulinum Toxin Serotypes: A Comparative Review Of Biochemical And Pharmacological Actions. *European Journal of Neurology*, s5(8), 21-29. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.00035.x>
42. Dodick, D. (2003). Botulinum Neurotoxin For the Treatment Of Migraine And Other Primary Headache Disorders: From Bench To Bedside. *Headache the Journal of Head and Face Pain*, s1(43), 25-33. <https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.43.7s.5.x>
43. Rho, N. and Kim, H. (2022). An Update On the Cosmetic Use Of Botulinum Toxin: The Pattern Of Practice Among Korean Dermatologists. *Toxins*, 5(14), 329. <https://doi.org/10.3390/toxins14050329>
44. Jeon, J., Choi, C., Kim, J., Hyun, J., Choi, E., Choi, S., ... & Rhie, G. (2021). Genetic Characterization Of clostridium Botulinum Isolated From the First Case Of Infant Botulism In Korea. *Annals of Laboratory Medicine*, 5(41), 489-492. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.5.489>
45. Aktories, K. and Wegner, A. (1989). Adp-ribosylation Of Actin By Clostridial Toxins.. *The Journal of Cell Biology*, 4(109), 1385-1387. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.4.1385>
46. Prathiviraj, R., Prisilla, A., Chellapandi, P. (2015). Structure–function Discrepancy Inclostridium Botulinumc3 Toxin For Its Rational Prioritization As a Subunit Vaccine. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 6(34), 1317-1329. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1078745>
47. Barth, H., Preiss, J., Hofmann, F., Aktories, K. (1998). Characterization Of the Catalytic Site Of The Adp-ribosyltransferase Clostridium Botulinum C2 Toxin By Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 45(273), 29506-29511. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29506>

48. Choi, E., Byun, J., Nahm, F., Lee, P. (2011). Obturator Nerve Block With Botulinum Toxin Type B For Patient With Adductor Thigh Muscle Spasm -A Case Report-. The Korean Journal of Pain, 3(24), 164-168. <https://doi.org/10.3344/kjp.2011.24.3.164>
49. Flynn, T. (2009). Use Of Intraoperative Botulinum Toxin In Facial Reconstruction. Dermatologic Surgery, 2(35), 182-188. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2008.34407.x>
50. Kikuchi, A., Takeda, A., Sugeno, N., Miura, E., Kato, K., Hasegawa, T., ... & Aoki, M. (2016). Brain Metabolic Changes Of Cervical Dystonia With Spinocerebellar Ataxia Type 1 After Botulinum Toxin Therapy. Internal Medicine, 14(55), 1919-1922. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.5843>
51. Ting, P. and Freiman, A. (2004). The Story Of clostridium Botulinum: From Food Poisoning To Botox. Clinical Medicine, 3(4), 258-261. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.4-3-258>
52. Santhanam, N., Kumanchik, L., Guo, X., Sommerhage, F., Cai, Y., Jackson, M., ... & Hickman, J. (2018). Stem Cell Derived Phenotypic Human Neuromuscular Junction Model For Dose Response Evaluation Of Therapeutics. Biomaterials, (166), 64-78. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.047>
53. AlShamlan, F., Abdulhadi, H., Alwalmany, M., Alotaibi, K. (2021). The Efficacy Of Dose Increments Of Botulinum Toxin a In The Treatment Of Childhood Esotropia. Clinical Ophthalmology, (Volume 15), 113-120. <https://doi.org/10.2147/opth.s294396>
54. Rowe, F. and Noonan, C. (2017). Botulinum Toxin For the Treatment Of Strabismus. Cochrane Database of Systematic Reviews, 3(2017). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd006499.pub4>
55. Ricci, L., Navajas, S., Carneiro, P., SÖDERBERG, S., Ferraz, C. (2015). Ocular Adverse Effects After Facial Cosmetic Procedures: a Review Of Case Reports. Journal of Cosmetic Dermatology, 2(14), 145-151. <https://doi.org/10.1111/jocd.12141>
56. Witkiewitz, K., Pritchard, N., Vagenas, D., Malik, R., Russell, A., Efron, N. (2012). Utility Of Corneal Confocal Microscopy For Assessing Mild Diabetic Neuropathy: Baseline Findings Of the Landmark Study. Clinical and Experimental Optometry, 3(95), 348-354. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2012.00740.x>
57. Kinard, K., Smith, A. G., Singleton, J., Lessard, M., Katz, B. J., Warner, J. E. A., ... & Digre, K. B. (2015). Chronic migraine is associated with reduced corneal nerve fiber density

and symptoms of dry eye. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 55(4), 543-549. <https://doi.org/10.1111/head.12547>

58. Lee, W., Ahn, T., Cheon, G., Lee, M., Yang, E. (2020). Comparative Analysis Of Botulinum Toxin Injection After Corrective Rhinoplasty For Deviated Nose and Alar Asymmetry. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2(20), 451-456. <https://doi.org/10.1111/jocd.13523>

59. Speeg-Schatz, C., P, B., Gottenkiene, S. (2017). To What Extent May Botulinum Toxin Type a Injections Be An Alternative Choice To Surgery In Infantile Esotropia?. *European Journal of Ophthalmology*, 3(27), 285-288. <https://doi.org/10.5301/ejo.5000947>

60. Pellegrini, M., Schiavi, C., Taroni, L., Sebastiani, S., Bernabei, F., Roda, M., ... & Giannaccare, G. (2019). Ocular Surface Status In Patients With Hemifacial Spasm Under Long-lasting Treatment With Botulinum a Toxin: A Comparative Fellow Eye Study. *Indian Journal of Ophthalmology*, 9(67), 1405. https://doi.org/10.4103/ijo.ijo_41_19

61. Topljak, S., Delić, M., Mandić, K., Perić, S., Baretić, M., Mandić, J. (2023). Nonsurgical Treatment For Upper Eyelid Retraction In Patients With Inactive Graves' Orbitopathy. *International Ophthalmology*, 7(43), 2291-2299. <https://doi.org/10.1007/s10792-022-02625-7>

62. Nizamieva, A., Frolova, S., Slotvitsky, M., Kovalenko, S., Tsvelaya, V., Nikitina, A., ... & Agladze, K. (2022). Antiarrhythmic Properties Of Botulinum Toxin A: In Vitro Studies On Human and Rat Cardiomyocytes.. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1711614/v1>

63. James, A., Ryan, J., Parkman, H. (2003). Inhibitory Effects Of Botulinum Toxin On Pyloric and Antral Smooth Muscle. *Ajp Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2(285), G291-G297. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00296.2002>

64. SA, C. (2022). Nonsurgical Management Of Chronic Exertional Compartment Syndrome With Botulinum Toxin-a. *Research & Investigations in Sports Medicine*, 3(8). <https://doi.org/10.31031/rism.2022.08.000688>

65. Cruzat, A., Witkin, D., Baniyadi, N., Lenardo, M., Ciolino, J., Jurkunas, U., ... & Hamrah, P. (2011). Inflammation and The Nervous System: The Connection In The Cornea In Patients With Infectious Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 8(52), 5136. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-7048>

66. Park, G., An, M., Yoon, J., Park, S., Koh, S., Mauro, T., ... & Kim, K. (2019). Botulinum Toxin Type a Suppresses Pro-fibrotic Effects Via The Jnk Signaling Pathway In Hypertrophic

Scar Fibroblasts. Archives of Dermatological Research, 10(311), 807-814. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01975-0>

67. Fuchsluger, T., Tuerkeli, E., Westekemper, H., Esser, J., Steuhl, K., Meller, D. (2006). Rate Of Epithelialisation and Re-operations In Corneal Ulcers Treated With Amniotic Membrane Transplantation Combined With Botulinum Toxin-induced Ptosis. Graefes S Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 7(245), 955-964. <https://doi.org/10.1007/s00417-006-0493-1>

68. Nien, M., Feng, J., Cui, Y. (2021). The Molecular Mechanism Of Gadd153 In Apoptosis Of Keloid Fibroblasts Exposed To Botulinum Toxin Type A. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 19(25), 9402-9410. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16881>

69. Dong, M., Di, G., Zhang, X., Zhou, Q., & Shi, W. (2017). Subconjunctival Bevacizumab Injection Impairs Corneal Innervations and Epithelial Wound Healing in Mice.. Investigative ophthalmology & visual science, 58 3, 1469-1477. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20926>.

70. Ramos-Vara, J. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. Veterinary Pathology, 42(4), 405-426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>

71. Cruzat, A., Qazi, Y., & Hamrah, P. (2017). In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves in Health and Disease. The ocular surface, 15(1), 15–47. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2016.09.004>

72. Lim, C. Y., Granger, J. H., & Porter, M. D. (2019). SERS detection of Clostridium botulinum neurotoxin serotypes A and B in buffer and serum: Towards the development of a biodefense test platform. Analytica Chimica Acta: X, 1, 100002. <https://doi.org/10.1016/j.acax.2018.100002>

73. Arnon, S. S., Schechter, R., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S., Osterholm, M. T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Swerdlow, D. L., & Tonat, K. (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management. Journal of the American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.285.8.1059>

74. Özel Duygu Demiralp, İğci Naşit, Peker Selen, Ayhan Beycan, 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

75. Kroumpouzou, G., Kassir, M., Gupta, M., Patil, A., & Goldust, M. (2021). Complications of botulinum toxin a: an update review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 20(6), 1585-1590. <https://doi.org/10.1111/jocd.14160>
76. Mya, N., Yeap, T., Yeoh, B., Tin, W., Aung, T., & Hayati, F. (2019). Botox: the deadly beauty. *Forensic Medicine and Anatomy Research*, 07(01), 13-17. <https://doi.org/10.4236/fmar.2019.71003>

