

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

**DENEYSEL KORNEA NEOVASKÜLARİZASYONUNDA
TOPIKAL VE SUBKONJONKTİVAL AFLİBERCEPTİN
ETKİNLİĞİ VE KORNEAL ADROPİN DÜZEYLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Rabiätül Büşra AKDAN BİLEN**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Onur ÇATAK**

**ELAZIĞ
2017**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.




Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.


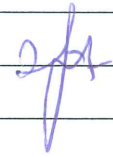
Yrd. Doç. Dr. Onur ÇATAK



Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

TEŞEKKÜR

İhtisasım boyunca iyi bir eğitim almamı sağlayan değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER, Sn. Prof. Dr. Tamer DEMİR, Sn. Prof. Dr. Orhan AYDEMİR, Sn. Doç. Dr. Burak TURGUT ve Sn. Yard. Doç. Dr. Onur ÇATAK başta olmak üzere eğitimimde emeği geçen tüm öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle tez çalışmama katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Yard. Doç. Dr. Onur ÇATAK'a, Sn. Yard. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU, Sn. Prof. Dr. Süleyman AYDIN, Sn. Yard. Doç. Dr. Gökhan ARTAŐ 'a ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Asistanlık sürem boyunca birlikte çalıştığım asistan doktor arkadaşlarıma ve kliniğimiz personeline teşekkür ederim.

Ayrıca sıkıntılı zamanlarımda desteklerini esirgemeyen anneme, babama, eşim Abdülkadir'e teşekkür ederim.

ÖZET

Kornea avasküler bir dokudur. Çeşitli nedenlerle neovaskülarizasyon gelişmesi görme kalitesini önemli ölçüde azaltır. Çalışmamızın amacı deneysel kornea neovaskülarizasyonunda topikal ve subkonjonktival afliberceptin etkinliğini değerlendirmek, anjiogenezle ilgili olaylarda rol oynadığı düşünülen adropin düzeylerine bakılarak kornea neovaskülarizasyonundaki olası etkisini incelemektir.

Çalışmada 42 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat rastgele altı gruba ayrıldı. Birinci gruba herhangi bir işlem ve tedavi kullanılmadı. Diğer tüm gruplarda kornea santraline kimyasal koterizasyon yapılarak korneal yanık oluşturuldu. İkinci gruba tedavi verilmedi, üçüncü gruba topikal 2x1 serum fizyolojik, dördüncü gruba subkonjonktival 0,08 ml SF, beşinci gruba topikal 25mg/ml aflibercept 2x1 damla, altıncı gruba 0,08 ml 25mg/ml aflibercept enjeksiyon uygulaması yapıldı. Yeni damarlar ile kaplı kornea yüzeyinin tüm kornea alanına yüzdesi ölçülerek karşılaştırıldı. 10.günde anestezi altında dekapitasyon yapıp gözler enükle edildi. Tüm kornealar eşit 4 parçaya bölünerek birisinde, korneal VEGF, VEGFR-2, adropin düzeyleri ELİSA yöntemi ile değerlendirildi ve Total Antioksidan Seviyesi (TAS), Total Oksidan Seviyesi (TOS) değerlerine bakıldı. Diğer parçalarda ise TUNEL boyama, Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF), Vasküler Endotelial Growth Faktör Reseptörü 2 (VEGFR-2) ve adropinin immün boyanması yapılarak histoskorlama yapıldı.

Sonuç olarak neovaskülarizasyon alanlarının tüm korneaya yüzdesi, tedavi gruplarında, vaskülarizasyon grubundan ($p<0.05$) anlamlı olarak daha düşük saptandı. Tedavi grupları arasında da subkonjonktival aflibercept uygulanan grupta anlamlı olarak daha düşüktü. Grup 2 ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitifliği, VEGF, VEGFR-2 ve adropin histoskorlaması tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde azalmıştı. Grup 5 ve Grup 6 da VEGF ELİSA düzeyleri ve apoptotik indeks değerleri vaskülarizasyon grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Aflibercept, kornea neovaskülarizasyon tedavisinde her iki uygulanış şekliyle de etkili bulunmuştur, fakat klinik olarak subkonjonktival uygulamanın daha etkin olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Korneal neovaskülarizasyon, adropin, aflibercept

ABSTRACT

The Efficacy Of Topical And Subconjunctival Aflibercept And Corneal Adropin Levels In Experimental Corneal Neovascularization

The cornea is an avascular tissue. The development of neovascularization due to a variety of reasons reduces visual quality significantly. The aim of our study was to assess the efficacy of topical and subconjunctival aflibercept in experimental corneal neovascularization and to examine possible effects of corneal neovascularization on the levels of adropin that are thought to play a role in angiogenesis-related events.

In the study, 42 male Sprague Dawley rats were randomly divided into six groups. No operations or treatments were applied for the first group. In all other groups, cornea center was cauterized by chemical cauterization. Second group wasn't treated. We used topical 2x1 saline drop in the third group, subconjunctival 0.08 ml SF in the fourth group, topical 25 mg / ml aflibercept 2x1 drops in the fifth group topical 25 mg / ml aflibercept 2x1 drops, and 25 mg / ml subconjunctival aflibercept in the sixth group. The percentage of corneal surface covered with new vessels was measured and compared. On the 10th day, after the decapitation and enucleation all corneas divided into four equal parts and in one part corneal VEGF, VEGFR-2, adropine levels were assessed by ELISA method and Total Antioxidant Level (TAS) and Total Oxidant Level (TOS) values were evaluated. Other components were histochemically stained with TUNEL staining, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) and adropinin immunostaining.

As a result, the percentage of neovascular corneal area was significantly lower in treatment groups than vascularization group ($p < 0.05$). TUNEL positivity, VEGF, VEGFR-2, and adropin histocorrelation were decreased ($P < 0.05$) in group 5 and group 6 compared to group 2. VEGF ELISA levels and apoptotic index were found to be significantly lower in the group 5 and group 6 groups than in the vascularization group ($p < 0.05$). Aflibercept was found to be effective in both neovascularization treatment of corneal neovascularization, but it was observed that subconjunctival administration was more effective in clinical practice.

Key words: corneal neovascularization, adropin, aflibercept.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler	4
1.2.1. Kornea Anatomisi	4
1.2.1.1. Makroskopik Anatomi	4
1.2.1.2. Prekorneal Gözyaşı Film Tabakası	4
1.2.1.3. Mikroskopik Anatomi	5
1.2.1.3.1. Epitel ve Bazal Membran	5
1.2.1.3.2. Bowman Zarı	8
1.2.1.3.3. Stroma Tabakası	8
1.2.1.3.4. Descement Membranı	9
1.2.1.3.5. Endotel Tabakası	9
1.2.1.4. Limbus	10
1.2.2. Kornea Embriyolojisi	10
1.2.3. Kornea Fizyolojisi	11
1.2.3.1. Gözyaşı Fizyolojisi	11
1.2.3.2. Epitel Fizyolojisi	12
1.2.3.3. Endotel Fizyolojisi	12
1.2.4. Kornea Yara İyileşmesi	13
1.2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi	14
1.2.4.1.1. Lag Fazı	14

1.2.4.1.2. Hücre Göçü	14
1.2.4.1.3. Hücre Çoğalması ve Farklılaşması	15
1.2.4.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi	15
1.2.4.3. Epitel ve Yüzeyel Stromal Defekt	16
1.2.4.4. Stroma Yara İyileşmesi	16
1.2.4.5. Endotel Yara İyileşmesi	17
1.2.5. Kornea Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	18
1.2.5.1. Yaş	18
1.2.5.2. Beslenme	18
1.2.5.3. Travma	18
1.2.5.4. Yara Apozisyonu	18
1.2.5.5. İnfeksiyon	18
1.2.5.6. Enflamasyon	19
1.2.5.7. Duyusal İnnervasyon	19
1.2.5.8. İntraoküler Basınç	19
1.2.5.9. Gözyaşının Etkisi	20
1.2.5.10. Vaskülarizasyon	20
1.2.5.11. İlaçlar	20
1.2.5.11.1. Antibiyotikler	20
1.2.5.11.2. Kortikosteroidler	21
1.2.5.11.3. Lokal Anestezikler	21
1.2.5.11.4. Benzalkonyum Cl (% 0.01)	21
1.2.5.11.5. Asetilkolin	21
1.2.5.11.6. Epinefrin	21
1.2.5.11.7. Antiviral İlaçlar	22
1.2.5.12. Fibronektin (Fn)	22
1.2.5.13. İnterlökin – 6	22
1.2.5.14. Retinoik Asit	22
1.2.6. Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Medyatörler	23
1.2.6.1. Büyüme Faktörleri	23
1.2.6.1.1. Epidermal Growth Faktör	23
1.2.6.1.2. Fibroblast Growth Faktör	24

1.2.6.1.3. Transforming Growth Faktör Alfa ve Beta	24
1.2.6.1.4. Keratinosit Growth Faktör	25
1.2.6.1.5. Hepatosit Growth Faktör	26
1.2.6.1.6. Platelet Derived Growth Faktör	26
1.2.6.1.7. Diğer Büyüme Faktörleri	26
1.2.7. Kornea Yara İyileşmesinde Enflamatuvar Sitokinlerin Rolü	27
1.3. Kornea Neovaskülarizasyonu	27
1.3.1. Epidemiyoloji	28
1.3.2. Kornea Neovaskülarizasyon Fazı	30
1.3.2.1. Erken Prevasküler Faz	30
1.3.2.2. Vasküler Tomurcuklanma Fazı	30
1.3.2.3. Vasküler Matürasyon Fazı	31
1.3.3. Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyarıcı Faktörler	31
1.3.3.1. Tümör Nekrozis Faktör- α	31
1.3.3.2. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör	32
1.3.3.3. Fibroblast Growth Faktör	33
1.3.3.4. İnsülin Like Growth Faktör	33
1.3.3.5. Anjiopoetin	33
1.3.3.6. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	33
1.3.3.7. Vasküler Endotelial Growth Faktör	34
1.3.4. Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler	36
1.3.4.1. Anjiostatin	36
1.3.4.2. Endostatin	36
1.3.4.3. Pigment Epiteli Derived Faktör	37
1.3.4.4. Trombospondin-1	37
1.4. Aflibercept	37
1.5. Adropin	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM	40
2.1. Anestezi Tekniği	41
2.2. Cerrahi Teknik	41
2.3. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi	41
2.4. TUNEL Metodu	42

2.5. VEGF, VEGFR-2 ve Adropin İmmünohistokimyasal Boyanması	43
2.6. VEGF, VEGFR-2 ve Adropin ELISA Yöntemi İle Protein Düzeyi Ölçümü	45
2.7. Total Antioksidan-Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi	45
2.8. İstatistiksel Analiz	46
3. BULGULAR	47
3.1. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması	47
3.2. TUNEL Boyama	50
3.3. Korneal VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması	55
3.4. Korneal Adropin İmmünreaktivitesi	58
3.5. Korneal VEGFR-2 İmmünohistokimyasal Boyanması	63
3.6. Korneal VEGF ELİSA Düzeyleri	68
3.7. Korneal VEGFR-2 ELİSA Düzeyleri	69
3.8. Korneal Adropin ELİSA Düzeyleri	70
3.9. Korneal TAS TOS Düzeyleri	70
4. TARTIŞMA	72
5. KAYNAKLAR	79
6. ÖZGEÇMİŞ	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kornea Neovaskülarizasyonuna Neden Olan Hastalıklar	28
Tablo 2. Anjiogenik ve Antianjiogenik Faktörler	29
Tablo 3. TUNEL Boyama Prosedürü.	43
Tablo 4. Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdelerinin ortalama ve standart sapma değerleri	47
Tablo 5. Apoptotik indeks (%)	51
Tablo 6. VEGF ve Adropin İmmünreaktivitesi	62
Tablo 7. Gruplardaki VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri.	64
Tablo 8. Gruplardaki korneal VEGF ELİSA ve standart sapma değerleri	68
Tablo 9. Gruplardaki korneal VEGFR-2 ELİSA ve standart sapma değerleri	69
Tablo 10. Gruplardaki korneal adropin ELİSA ve standart sapma değerleri	70
Tablo 11. Gruplardaki korneal TAS ve TOS düzeyleri ve standart sapma değerleri	71

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Korneanın mikroskopik anatomisi (26)	5
Şekil 2. Kornea epitel kesiti (29)	7
Şekil 3. Korneanın embriyolojik gelişimi (34)	11
Şekil 4. Vaskülarizasyon grubundaki ratın kornea neovaskülarizasyonu	48
Şekil 5. Vaskülarizasyon grubu 4.gün Girdi İmgesi ve Histogramı eşitlenmiş çıktı imgesi	48
Şekil 6. Vaskülarizasyon grubu 4.gün damar bilgileri ve genişletilmiş çıktı ve MATLAB R2015 b versionuna göre neovaskülarizasyon alanı hesaplanması	48
Şekil 7. Vaskülarizasyon 10.gün damar girdi ve damar oranı hesaplanmış çıktı	49
Şekil 8. Vaskülarizasyon grubu 10.gün damar bilgileri ve genişletilmiş çıktı ve MATLAB R2015 b versionuna göre neovaskülarizasyon alanı hesaplanması	49
Şekil 9. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF neovaskülarizasyon alanı	50
Şekil 10. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept neovaskülarizasyon alanı	50
Şekil 11. Apoptotik indeks grafiği	51
Şekil 12. Kontrol grubunun TUNEL ile boyanması	52
Şekil 13. Vaskülarizasyon grubunun TUNEL ile boyanması	52
Şekil 14. Vaskülarizasyon + topikal SF grubunun TUNEL ile boyanması	53
Şekil 15. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubunun TUNEL ile boyanması	53
Şekil 16. Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubunun TUNEL ile boyanması	54
Şekil 17. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubunun TUNEL ile boyanması	54
Şekil 18. Kontrol grubundaki rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması	55
Şekil 19. Vaskülarizasyon grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması	56
Şekil 20. Vaskülarizasyon + topikal SF grubundaki bir rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması	56
Şekil 21. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubundaki bir rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması	57

Şekil 22. Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubundaki bir rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması	57
Şekil 23. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubundaki bir rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması	58
Şekil 24. Kontrol grubundaki rat korunmasının adropin immunohistokimyasal boyanması	59
Şekil 25. Vaskülarizasyon grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması	59
Şekil 26. Vaskülarizasyon+topikal SF grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması	60
Şekil 27. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması	60
Şekil 28. Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması	61
Şekil 29. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması	61
Şekil 30. VEGF immünreaktivite grafiği	62
Şekil 31. Adropin immünreaktivite grafiği	63
Şekil 32. VEGFR-2 immünreaktivite grafiği	64
Şekil 33. Kontrol grubundaki rat VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması	65
Şekil 34. Vaskülarizasyon grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması	65
Şekil 35. Vaskülarizasyon+topikal SF grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması	66
Şekil 36. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması	66
Şekil 37. Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması	67
Şekil 38. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması	67
Şekil 39. Korneal VEGF ELİSA düzey grafiği	68
Şekil 40. Korneal VEGFR-2 ELİSA düzey grafiği	70

KISALTMALAR LİSTESİ

Ang	: Anjiopoetin
AP-1	: Aktivatör protein-1
D	: Diyoptri
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EGF	: Epidermal Growth Faktör
FDA	: Food and Drug Administration
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
Fn	: Fibronektin
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
G1	: Grup 1
G2	: Grup 2
G3	: Grup 3
G4	: Grup 4
G5	: Grup 5
G6	: Grup 6
HGF	: Hepatosit growth faktör
HIF	: Hipoksi indüklenebilen faktör
IGF	: İnsulin-like Growth Faktör
IL	: İnterlökin
Kd	: KiloDalton
KGF	: Keratinosit growth faktör
KNV	: Koroid neovasküler membran
MAP	: Mitojen aktive protein
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
MEK	: Mitojen ekstrasellüler sinyal regüle eden kinaz
MHC	: Major histokompatibilite kompleks

MIF	: Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
MMP	: Matriks metalloproteinazlar
Nd	: Neodymium:
NK	: Natürel Killer
NO	: Nitrik oksit
NV	: Neovaskularizasyon
OCT	: Optik Kohorens Tomografi
PAS	: Periyodik Asit Shift
PDGF	: Platelet-Derived Growth Faktör
PDR	: Proliferatif diabetik retinopati
PED	: Persistan epitel defektinde
PEDF	: Pigment epiteli derive faktör
PGE1	: Prostaglandin E1
PIGF	: Plasenta Growth Faktör
PMNL	: Polimorfonükleer lökositler
PMSF	: Fenilmetil sülfonil florit
RIPA	: Radio-Immunoprecipitation Assay
SBF	: Sinir büyüme faktörü
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TGF	: Transforming Growth Faktör
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TOS	: Total Oksidatif Stres Seviyesi
Tsp	: Trombospondin
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
VEGF-R	: VEGF reseptör
VEGF-TRAP	: VEGF Tuzağı
YAG	: Yttrium Aliminium Garnet

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Kornea göz küresinin ön kısmında yerleşmiş olan saydam, avasküler bir dokudur. Kornea yapı özelliklerinin sonucu olarak hem mekanik bariyer hem de ön refraktif yüzey oluşturmaktadır. Korneanın saydamlığının korunması, göze gelen ışınların retinaya iletilmesindeki ve böylelikle görmenin sağlanmasında içerdiği önemli görev nedeniyle oldukça önem kazanmaktadır. Kornea saydamlığı; stromada bulunan kollajen liflerinin düzenli dizilimi, damardan ve lenfatikten yoksun olmasına bağlı immün ayrıcalıklı bir doku olması ve kısmi dehidratasyonu ile sağlanmaktadır (1,2)

Korneal neovaskülarizasyon; korneanın saydamlığını azaltan, istenmeyen yeni damarların oluştuğu bir patolojidir. Yeni damarların oluşumu ve modellenmesi vaskülojeniz, anjiogenez ve arteriogenez olmak üzere üç şekilde tanımlanmaktadır (3). Vaskülojeniz embriyonik dönemde de nova olarak progenitör hücrelerin vaskülarizasyon alanına migrasyonu ve endotelial hücrelere dönüşümünü tanımlayan primitif damar oluşumudur. Anjiogenez mevcut damarlardan yeni damarların tomurcuklanmasını ifade ederken, arteriogenez ise kan akımının artışına bağlı olarak mevcut arter lümeninin çapının arttırarak yeniden modellenmesini tanımlamaktadır (4). Anjiogenez kornea ve retina hastalıklarına bağlı yeniden damarlanmanın yaygın mekanizmasını oluşturmaktadır. Anjiogenez patolojik ve fizyolojik anjiogenez olmak üzere iki grup halinde incelenmektedir. Miyokard iskemisi, menstrüel siklus, yara iyileşmesi, organ bütünlüğünün sağlanması gibi durumlarda anjiogenez fizyolojiktir ve hayati fonksiyonu bulunmaktadır. Romatoid artrit, kanserler ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıklarda patolojik anjiogenez görülmektedir (5). Gözde diyabetik retinopati, eksüdatif tip yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, prematüre retinopatisi, neovasküler glokom ve korneanın çeşitli hastalıklarında görülmektedir (1).

Korneada neovaskülarizasyon genellikle kronik hipoksi ve inflamasyona bağlı olarak meydana gelmektedir. Kontakt lens kullanımı, kimyasal yanıklar, enfeksiyonlar, travmatik olaylar, immünolojik ve dejeneratif hastalıklar korneal neovaskülarizasyona neden olan durumlardır. Korneal avaskülaritenin devamı için

anjiogenik faktörler düşük düzeyde bulunması gerekirken antianjiogenik faktörler yüksek oranda bulunmalıdır. Çeşitli nedenlerle bu dengenin bozulması korneal neovaskülarizasyona sebep olmaktadır. Anjiogenik faktörlerin salınması çeşitli inflamatuvar sitokinlerin salınımı ve hipoksi ile indüklenir. Bu anjiogenik faktörler epitel, stroma, endotel gibi kornea tabakalarında üretilebileceği gibi sistemik dolaşımdan da korneaya gelerek neovaskülarizasyona neden olmaktadır (6,7,8).

Korneal neovaskülarizasyon patogenezi henüz tam olarak aydınlatılmış olmamakla birlikte korneal anjiogenezin düzenlenmesinde bilinen faktörler içerisinde en önemlilerinden bir tanesi vasküler endotelyal growth faktördür (VEGF) (9,10).

VEGF anjiogeneizde proteolitik aktivite, migrasyon, endotel hücre çoğalması ve kapiller tüp oluşumu gibi birçok basamakta görev alır. VEGF düzeyleri farklı koşullara göre değişiklik göstermekle birlikte korneada epitel hücreleri, stroma, kornea ve vasküler endotel hücrelerinde; skar dokusunda ise fibroblast ve makrofajlar tarafından üretilmektedir (9). VEGF üretiminin özellikle inflame ve vaskülarize kornealarda arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (11).

VEGF etkisini göstermek için VEGF reseptör 1 (VEGFR-1) ve VEGF reseptör 2 (VEGFR-2) olarak adlandırılan ve tirozin kinaz ailesinin üyesi olan reseptörlere bağlanır (10).

Adropin lipid metabolizması düzenlenmesini sağlayan yeni bir metabolik hormondur. Esas görevi enerji metabolizmasında bulunmasına rağmen damar endotel fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi metabolik olmayan durumlarda da etkili olduğu gösterilmiştir (12). Adropin VEGFR-2 reseptörlerini artırarak endotel hücrelerini artırır ve angiogenezele ilişkili olaylarda rol oynar (12). Adropinin kornea neovaskülarizasyondaki etkisi ve düzeylerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Korneal neovaskülarizasyon tedavisinde birçok cerrahi, laser ve medikal tedavi yöntemleri denenmiştir. Argon ve Nd:YAG laser yeni oluşan damarların koagüle edilerek ve aşındırılarak oklüze edilmesine neden olur. Bunun sonucunda vaskülarizasyonun gerilemesi amaçlanır. Ancak bu tedavi esnasında korneal hemoraji ve inceleme gibi komplikasyonların gelişmesi, damar derinlik ve çaplarındaki farklılık nedeniyle başarısızlık oranlarının yüksek olması, irritasyona bağlı inflamasyonu tetikleyebilmesi bu tedavinin dezavantajlarıdır (13,14). Diğer bir tedavi yöntemi de verteporfirin ile uygulanan fotodinamik tedavidir. Uygulanan diod

lazer enerjisi ile sitotoksik serbest oksijen radikalleri üretilir. Bu radikaller endotel hücrelerinde hasara ve trombüs oluşumu ile damar oklüzyonuna neden olmaktadır. Maliyetinin yüksek olması, laser irritasyonu ve reaktif oksijen radikallerine bağlı komplikasyonlar kullanımında kısıtlamalara neden olur (15).

Kortikosteroidler makrofajların, mast hücrelerinin, anjiogenezi artıran büyüme faktörleri ve heparin salgılayan diğer inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu ve migrasyonunu baskıladığı için medikal yöntemlerin başında gelmektedir. Ancak hipoksiye sekonder neovaskülarizasyon veya limbal kök hücre yetmezliğine sekonder neovaskülarizasyon gibi inflamatuvar nedenlere bağlı olmayan neovaskülarizasyonda etkisinin sınırlı olması; glokom, katarakt, uzun süreli kullanımlarında mikrobiyal keratit gibi yan etkilerinin bulunması ve sistemik absorpsiyon nedeniyle kullanımları sınırlıdır (16). Bu yüzden neovaskülarizasyonun geriletilmesi için siklosporin-A, somatostatin, somatostatin analogu oktreotid, anti-tümör nekroz faktör- α , anti-interselüler adezyon molekülü, suleparoid (heparan sulfat), talidomid, suramin, genistein, rapamisin, anjiostatin, metotreksat gibi doğal ve sentetik birçok madde denenmiştir (17,18). Ancak bütün bu çabalara rağmen kornea neovaskülarizasyonunun önlenmesi halen önemli bir problem olarak karşımızda durmaktadır.

Anti-VEGF ajanların korneal neovaskülarizasyonu azaltmada etkili olduğu hem klinik hem de hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Aflibercept insan IgG1'in Fc parçası ve ekstrasellüler VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerinden oluşan VEGF-Trap bir füzyon proteinidir (19). Çalışmalarda afliberceptin VEGF'e afinitesinin benzer etki gösteren ranibizumab ve bevasizumaba göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (19,20). Afliberceptin yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, diyabetik maküler ödem ve retinal ven oklüzyonlarında FDA onayı bulunmaktadır (21,22). Korneal neovaskülarizasyonda da etkinliği gösterilmiş olmakla birlikte topikal ve subkonjonktival uygulamalarda karşılaştırılma yapılan, etkili uygulama şeklini belirten bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızın amacı korneal neovaskülarizasyon tedavisinde aflibercept kullanarak, bu ajanın etkinliğini göstermek, etkili uygulama şeklini belirlemek ayrıca endotel fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkili yeni bir molekül olan adropinin korneal neovaskülarizasyon etyopatogenezindeki etkinliğini değerlendirmek olarak

belirlenmiştir. Bunun birlikte kornea dokusunda total antioksidan seviyeleri ve total oksidatif stres seviyelerinin tespit edilerek patolojide oksidatif sürecin araştırılması amaçlanmıştır.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Kornea Anatomisi

1.2.1.1. Makroskopik Anatomi

Kornea göz küresinin ön kısmında yerleşmiş olan, saydam, avasküler, refraktif özelliği bulunan, gözü enfeksiyona ve yapısal hasara karşı mekanik bir bariyer olarak görev yapan bir dokudur. Ön yüzeyi konveks ve asimetric yapıdadır. Perifere doğru kalınlığı artarak sklera ile devamlılık gösterir. Üzerini örten gözyaşı film tabakasıyla birlikte düzgün kırıcı bir ortam oluşturan kornea gözün en önemli refraktif kısmını oluşturmaktadır. Refraktif güç önde +48.8 Dioptri (D), arka yüzde ise -5.8 D olup toplam kırma gücü +43 D'dir. Bu +43D'lik refraktif değer göz küresinin toplam refraktif gücünün %70'ini oluşturmaktadır (23). Kornea'nın vertikal çapı 10.5 (9-11) milimetreken horizontal çapı 11.5 (11-12) milimetredir. Kornea santralde ortalama 520 µm kalınlığında iken periferde doğru kalınlaşarak 650 µm ye kadar ulaşabilir (24). Kornea kurvatürü yenidoğanlarda ve çocuklarda bakıldığında erişkinlere göre daha büyük olduğu görülür. Doğum sonrası ilk aylarda düzleşme gerçekleşmektedir. Kornea gelişimi yaklaşık 6 yaş civarında tamamlanmaktadır. Korneanın ön eğrilik çapı (konveks) 7.8 milimetre, arka eğrilik çapı (konkav) ise 6.2 milimetredir (25).

1.2.1.2. Prekorneal Gözyaşı Film Tabakası

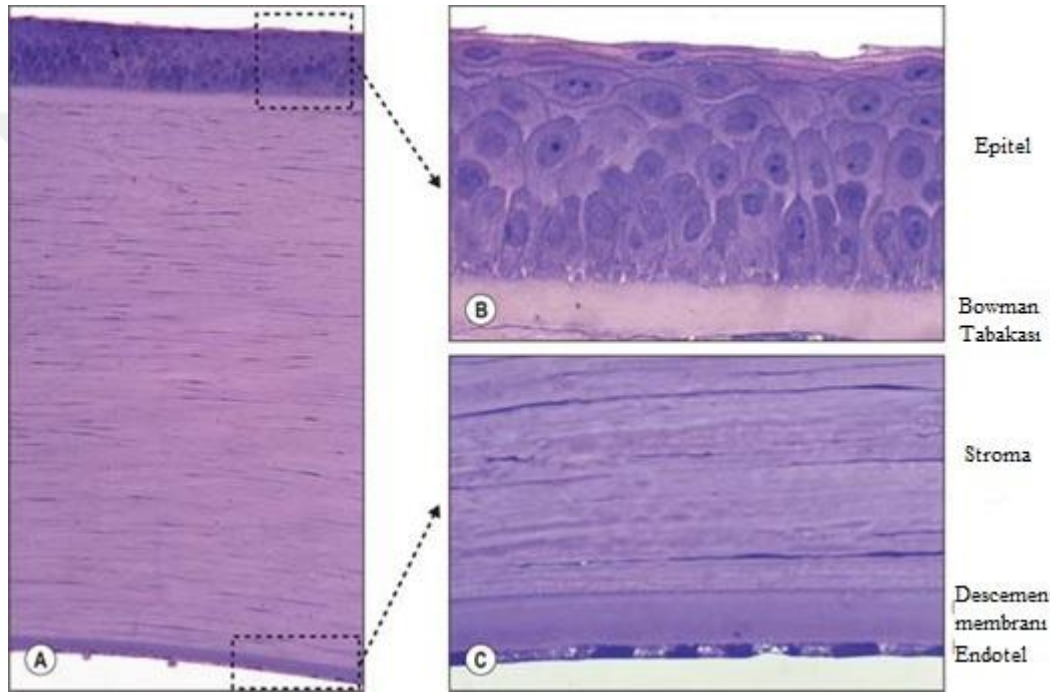
Kornea yüzeyi, üç tabakadan oluşan 7 µm kalınlığında gözyaşı film tabakası ile kaplıdır. Düzgün kırıcılık sağlanmasında gözyaşı tabakası önemli bir role sahiptir. Bu tabakalar;

- a. Ön tabaka Meibomian, Zeis (sebace yapıda) ve Moll (ter bezi yapısında) bezlerince salgılanan hidrofobik lipid tabaka.
- b. Aksesuar lakrimal bezler (Krause, Wolfring ve Manz bezleri) ve ana lakrimal bez tarafından salgılanan hidrofilik aköz tabaka.

c. Başlıca Goblet hücrelerince ve Manz bezlerince salgılanan müsin tabaka. Gözyaşı-hava ara yüzeyi alttaki kornea ile birlikte gözün toplam kırıcılığının üçte ikisine sahiptir.

1.2.1.3. Mikroskopik Anatomi

Kornea önden arkaya doğru sırayla epitel, Bowman tabakası, stroma, Descement membranı ve endotel olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır. Kornea yapısı normal şartlarda kan ve lenf damarı içermemektedir.



Şekil 1. Korneanın mikroskopik anatomisi (26)

1.2.1.3.1. Epitel ve Bazal Membran

Kornea epiteli non-keratinize yapıdadır. Korneanın en dış kısmında bulunan, sıkı ve koruyucu özellikte olan kornea epiteli nöroektodermden köken alır. Kalınlığı santralde 50µm, periferde ise 80µm'e kadar ulaşabilen ve yüzeyi yaklaşık 123 milimetrekare olan kornea epiteli; düzenli dizilim gösteren, üç katlı ve aşağıdan yukarıya doğru farklılaşan epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Bunlar tek katlı bazal epitelyal, iki-üç katlı kanat ve iki katlı yüzeyel yassı hücre şeklinde sıralanmışlardır (25). Santralde 5-6 kat hücre bulunurken bu sayı perifere doğru 8-10 kata kadar artar. Bazalde bulunan tek katlı silindirik hücre tabakası altındaki bazal membrana

hemidesmozomlar aracılığıyla tutunmuştur. Bazal membran gerçek bir membran yapısında olup PAS (+) boyanma özelliğine sahiptir. Bazal membranın yapısı tip IV kollajen, laminin, fibronektin ve fibrini içermektedir. Lamina lucida ve lamina densa olarak adlandırılan iki adet zon bulunmaktadır. Lamina lucida ön kısımda bulunup daha gevşek yapıdayken lamina densa arka kısma yerleşmiştir ve daha sıkı yapıdadır. Epitel için yapısal destek sağlayan ve epitel hücrelerinin stromadan ayrılmasını sağlayan bazal membran rejenerasyon yeteneğine sahip değildir. Kornea epitel hücreleri sürekli dökülmektedir. Dökülen bu hücrelerin yerini bazal epitel hücrelerinden mitozisle çoğalan hücreler doldurmaktadır. Bu farklılaşma aynı zamanda periferden kornea santraline doğru da olmaktadır. Farklılaşma süreci yaklaşık yedi ile on dört gün arasında tamamlanarak tüm epitelin yenilenmesini sağlamaktadır (25,27).

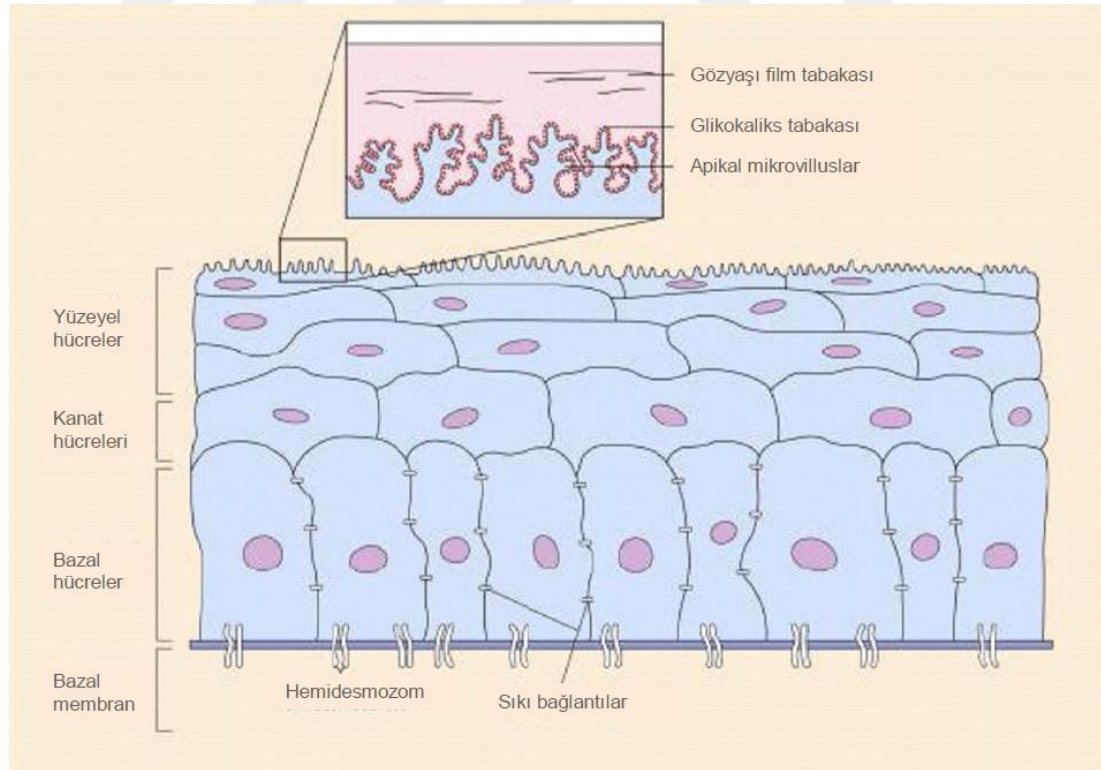
Bazal hücreler oval nükleusa sahip basit dizilimli hücrelerdir ve mitotik aktiviteleri bulunmaktadır. Mitoz gösteren bazal hücreler yüzeye doğru ilerlerken yavaş yavaş farklılaşır, çekirdekleri küçülür, organelleri ortadan kalkar ve sonuçta dejenere olup kornea yüzeyinden dökülürler (25,27).

Bazal epitel hücrelerinin üstünde 2-3 sıra halinde yanlara doğru kanatsız uzantıları bulunan poligonal hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler “Wing hücreleri – kanat hücreleri” olarak adlandırılır. Yüzeye yaklaştıkça bu hücreler uzantılarını kaybedip yassılaşmaya başlar ve yüzeyel yassı hücrelere dönüşür. Bu hücrelerin gözyaşı tabakası ile temas içinde bulunan apikal yüzeyleri mikrovili ve mikroplikalar nedeniyle oldukça düzensizdir. Apikal yüzeydeki bu çıkıntılara gözyaşı mütin tabakasının glikokaliksleri tutunur. Böylelikle mikrovili ve mikroplikalar tarafından oluşturulan bu düzensizlik gözyaşı film tabakası aracılığıyla ortadan kaldırılır; düzgün dengeli bir optik yüzey oluşturulur ve bakterilere karşı bariyer elde edilir.

Epitel hücrelerinin sıkı olarak tutulabilmesi için hücreler arasında çok sayıda desmozom bulunmaktadır. Bu bağlantılardan yüzey epitel hücreleri arasında bulunanlar zonula okludens, yüzey epitel hücreleri ile kanat hücreleri arasında bulunanlar makula okludens, bazal epitel hücreler ile bazal membran arasında bulunanlar ise hemidesmozomlardır. Zonula okludenslerin yüzey hücrelerinin etrafını tamamen çevrelemektedir bu sayede kornea yüzeyi suya ve elektrolitlere geçirgenliği çok az olan yarı geçirgen ve yüksek dirençli bir membran gibi davranır

(27). Epitel tabakasının periferik kısımlarında histiyositler, makrofajlar, lenfositler, melanositler ve immünolojik özelliği olan Langerhans hücreleri bulunabilmektedir. Epitelde bulunan miyelinsiz sinir lifi ağı genelde bazal hücreler arasında yer alır ve kanat hücreleri arasında seyrek olarak bulunmaktadır (25).

Epitel adezyon kompleksi bazal hücrelerde başlayan ve yüzeyel stromada sonlanan bir yapıdır. Bu kompleks bazal hücreler, çapa fibrilleri, bazal membran ve yüzeyel stromadaki çapa plaklarından oluşmaktadır. Hemidesmozomlara komşu hücre zarından başlayan tip VII kollajen yapısındaki çapa fibrilleri, bazal membranı ve Bowman tabakasını geçip stroma içerisinde yaklaşık 2 mikrometre kadar ilerledikten sonra, Tip VII kollajenin globüler formu ile lamininden oluşmuş çapa plaklarında sonlanmaktadır. Temel işlevi bazal membranı Bowman zarına bağlamak olan adezyon kompleksleri korneada homojen olarak dağılım göstermektedir. Santral korneadaki adezyon kompleksleri dışarıdan gelen travmalara ve göz kapaklarının ayırıcı kuvvetlerine daha çok maruz kalmaları nedeniyle daha sık olarak yerleşmişlerdir (28).



Şekil 2. Kornea epiteli kesiti (29)

1.2.1.3.2. Bowman Zarı

Kornea stromasının ön kısmı olduğu kabul edilen ve hücre içermeyen bu tabaka elastik ve kollajen fibrillerinin yoğunlaşmasıyla meydana gelmiştir. 8 – 14 mikrometre kalınlığındadır. Tip I ve V kollajen ile bu kollajenlerin arasını dolduran Tip VI kollajen filamanları ve proteoglikanlardan oluşmuştur. Bu tabakada epitele uzanan miyelinsiz sinir lifleri için kanallar bulunmaktadır. Bowman zarı Descement membranının aksine hasara uğradığında rejenerer olmaz ve skar dokusu ile iyileşir. Epitel ile stroma arasında önemli bir bariyer oluşturan Bowman tabakasının yapısı ve kalınlığı yaşam boyu aynı kalır (25).

1.2.1.3.3. Stroma Tabakası

Korneal stroma, çoğunlukla kollajen lifler ve proteoglikanlardan oluşan yoğun, avasküler ve relatif olarak asellüler yapıda olan bir kornea tabakasıdır (30). Yaklaşık olarak 500 µm kalınlığında olan stroma kornea kalınlığının %90'lık kısmını meydana getirmektedir. Stromanın su içeriği yaklaşık %76'dır. Kuru ağırlığının %80'lik kısmı kollajen fibrillerden, %15'i matriksten, %5'i hücresel elementlerden oluşur (31).

Keratositler yüksek oranda Tip I kollajen lifi üretirken daha az oranda Tip III, IV, V kollajen lifi üretirler. Bu kollajen lifler düzenli, uniform yapıda ve 300 angström çapındadır. Stromanın her bölgesinde lameller oluşturan kollajen lifler ön 1/3 stromada oblik, arka 2/3 stromada ise paralel lameller halde yerleşim gösterirler. Glikozaminoglikan ve proteoglikan yapıda olan ara madde %60 oranda keratan-sülfat ve %40 oranda kondroitin-sülfat tarafından meydana gelmiştir. Kollajen lameller arasında bulunan matriks, fibriller arasındaki mesafenin korunarak düzenli bir yapının devam etmesini ve korneanın saydam olmasını sağlamaktadır. Stromal elemanların yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin sağlanması korneanın şeffaflığının, kalınlığının ve bütünlüğünün korunması için oldukça önemlidir. Ekstrasellüler matriks (ECM) temel olarak matriks metalloproteinazlar (MMP) tarafından yıkılır. Endotel disfonksiyonuna bağlı stromaya su geçerse glikozaminoglikanların su çekip şişmesi sonucunda kollajen fibrillerinin dizilimi düzensiz hal alarak stromal opaklaşma meydana gelir ve korneal kalınlık artar.

Keratositler embriyonik olarak nöral krest kaynaklı kontraktil özelliğe sahip stromal hücrelerdir. Keratositler kollajen lameller arasında bulunmaktadır. Sitoplazmalarında mikroorganeller, mikrotübüller, lizozomlar, lipit partikülleri ve değişik inklüzyon cisimcikleri bulunur. Normal koşullarda yavaş ama sürekli bir sentetik aktivite ile ECM'nin idamesini sağlayan bu hücreler, akut ödem veya yaralanma sonrasında fibroblasta dönüşebilirler. Stromada ayrıca az sayıda polimorfonükleer lökositler (PMNL), plazma hücreleri ve makrofajlar da bulunur. Yenidoğan ve çocuklarda stromalarında yetişkinlere oranla daha fazla keratosit yerleşmiştir. Periferik stromada yaşla birlikte kolesterol ve fosfolipid birikimi gerçekleşebilir (arcus senilis) (31).

1.2.1.3.4. Descement Membranı

Endotel bazal membranı olarak görev yapan Descement membranı gerçek membran yapısındadır. Doğumda 3-4 mikrometre kalınlığında olan bu membran erişkinlerde yaklaşık 10-12 mikrometre kalınlığa ulaşmaktadır. Descement membranı çizgili anterior zon ve çizgisiz posterior zon olmak üzere iki kısımdan oluşur. Anterior zon intrauterin dönemde gelişir. Yaşam boyu endotel tarafından desteklenmekte olan çizgisiz posterior zon ise başlıca bazal membran bileşenlerinden olan tip IV kollajen, laminin, fibronektinden oluşmaktadır ve periferde Schwalbe çizgisi ile sonlanmaktadır. Proteolitik enzimlere karşı oldukça dirençli olan Descement membranı ağır keratit vakalarında bile sağlam kalabilmektedir. Fakat travmalarda stromadan kolayca sıyrılabilmektedir. Bunun nedeni Descement membranının stromaya gevşek olarak bağlanması ve göz içi basıncının yardımıyla stromaya tutunmasıdır. Bu tür zedelenmeler endotel tarafından onarılmaktadır (31).

1.2.1.3.5. Endotel Tabakası

Endotel tabakası yaklaşık olarak 4-6 µm kalınlığında, nöroektodermal kökenli mikrovillusları bulunan tek katlı hegzagonal hücrelerden oluşan bir tabakadır. Tipik olarak daha genç hücrelerde büyük bir nükleusa, aktif transportta ve stromanın su kapsamında önemli rol oynayan çok sayıda mitokondriye sahiptir. Endotel hücrelerinde yaşlanmaya birlikte mitozla daha nadir rastlanırken hücre sayısı da buna bağlı olarak azalmaya başlar. Doğumda 5000 hücre/mm² olan endotel hücre sayısı erişkinde 2500 hücre/mm² civarına düşer, 800 hücre/mm² altına indiğinde ise korneal

fonksiyonlar bozulmaya başlar. Endotel hücreleri fonksiyonlarını kaybettiklerinde, stromal hidrasyon artar ve sonuç olarak ödem, kalınlık artışı ve opasifikasyon gelişir (27). Stres altında veya stabil olmayan kornea endotel hücrelerinde büyüme ve şekil değişikliği olan polimegatizm izlenmektedir.

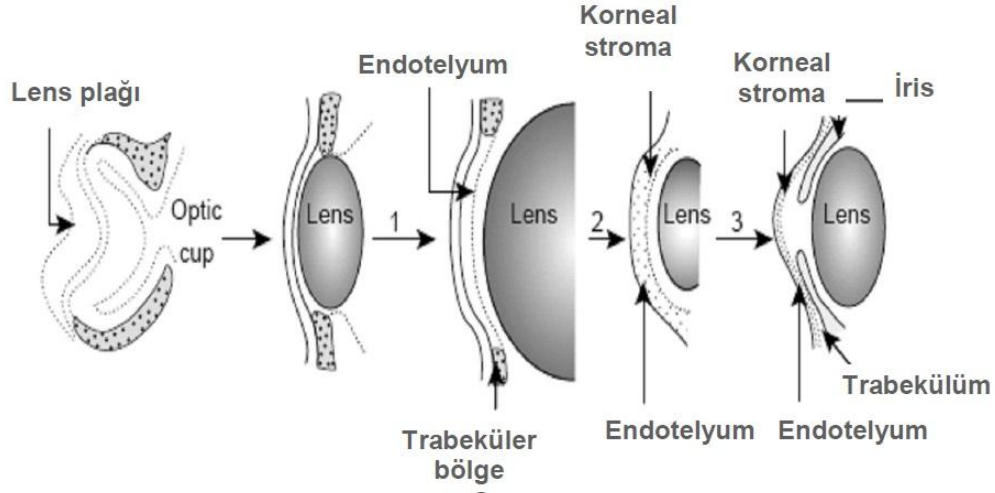
1.2.1.4. Limbus

Kornea ile sklera arasındaki geçiş zonunu oluşturan limbus konjonktiva, tenon kapsülü, episklera, korneoskleral stroma ve aköz dışı akım aparatı gibi yapıları içermektedir. Anatomik olarak Bowman ve Descement tabakalarının sonlandığı yerden geçen düzlem ile arkada Schlemm kanalı tarafından sınırlanan 1-1.5 milimetrelik alanı kapsamaktadır ve korneaskleral bileşke olarak adlandırılmaktadır. Konjonktiva epiteli ile kornea eşitlik arasındaki geçiş zonunu oluşturan limbus epiteli 10-12 katlıdır ve melanosit, Langerhans hücreleri, kan damarlarını içermektedir. Bazal epitel hücreleri kök hücrelerinin oldukça yavaş bölünmesiyle meydana gelmektedir. Kornea epiteli kök hücrelerinin, limbal epitel hücrelerin bazal tabakasında bulunduğu bildirilmektedir. Kök hücrelerinin aktif metabolizmalarının olduğu düşünülmektedir. Konjonktivada bulunan goblet hücrelerine limbusta rastlanmaz. Limbal kök hücreler önemli miktarda hasarlanırsa kornea epitelinin yerini hızla konjonktiva ve kan damarları alır (konjonktivalizasyon) (32).

1.2.2. Kornea Embriyolojisi

Kornea temel olarak yüzey ektodermi ve mezodermden gelişir. İntrauterin dönemin beşinci haftasında; nöral krest kökenli epitel ve endotel hücreleri yüzey ektoderminden gelişirken, 13. haftasında; Descement membranı yassılaştırmış endotel hücrelerinden gelişmektedir. Mezodermden gelişen stroma ise intrauterin dönemde altıncı haftanın sonunda oluşmaya başlar ve dördüncü ayda epitel altında yoğunlaşarak Bowman tabakasını meydana getirir. Altıncı haftaya kadar yüzey epiteli ve lens ön yüzeyi arasındaki boşluk iyi organize olmamış mezoderm ile doluyken bu haftanın sonunda kornea ve ön kamara gelişmeye başlar. Bu haftanın sonunda mezoderm içinde dar bir şerit halinde beliren boşluk genişlemeye başlayarak mezodermi, korneal stromayı oluşturacak olan ön tabaka ve iris stromasını oluşturacak olan arka tabaka olmak üzere iki kısma bölmektedir. Bu iki tabaka arasındaki boşluk ise ön kamarayı oluşturur. Ön kamara gelişmesini

tamamladıktan hemen sonra Descement endoteli şekillenmeye başlar. Korneaskleral açıdan başlayarak iç yüzey boyunca gelişen nöroektodermal kökenli hücreler, arka yüzeyi örten yassı endotel hücrelerine dönüşürler ve endotel ön yüzeyine hyalen membran sağlarlar (33).



Şekil 3. Korneanın embriyolojik gelişimi (34)

1.2.3. Kornea Fizyolojisi

1.2.3.1. Gözyaşı Fizyolojisi

Kornea fonksiyonların devamı için oldukça önemli bir role sahip olan gözyaşının normal salınımı 0.9-2.2 µl /dak kadardır. En dış kısımda bulunan, lumbrikan özellik taşıyan lipid tabaka hidrofobik yapısıyla buharlaşmayı ve gözyaşı menisküsünün kapak dışına taşmasını önler.

Aköz orta tabaka ise avasküler korneanın oksijen ve besin gereksiniminden sorumludur. Bu tabaka %98 oranında su içerirken, %2'lik oran ise solid kısmı oluşturmaktadır. İçeriğinde bulunan K⁺ ve Cl⁻ serum düzeyinden daha yüksek olmasına rağmen Na⁺ ve HCO₃ miktarları serumla aynı düzeydedir. Glukoz içeriği çok düşük olmasına karşılık yüksek miktarda protein içerir (7 mg/ml). Salgısal Ig A, Ig G ve Ig E gibi immünglobülinler ile beraber içeriğindeki muramidaz etkisi gösteren lizozimler ile lizis etkisi yaratan laktoferrin (Fe⁺⁺ bağlar) sayesinde Fe⁺⁺ bağımlı B.subtilis, S.aureus ve epidermidis, P.aeuroginosa gibi mikroorganizmalar için bakteriyostatik etki göstermektedir.

En alt tabakayı oluşturan müsinoz tabaka ise yüzey gerilimini düşürerek aköz tabakanın kornea ve konjonktiva üzerinde üniform yayılımını sağlar (35).

1.2.3.2. Epitel Fizyolojisi

365–2500 nm dalga boyundaki elektromanyetik radyasyonu geçirici özellikte olan kornea gözün ana refraktif elemanı olarak aköz hümörle birlikte yaklaşık +43 D lik bir kırma gücüne sahiptir. Kornea epitel ve endotel hücreleri gerek mekanik bariyer, gerekse sıvı ve iyon dengesinin sağlanmasıyla, korneanın korunmasında önemli görev üstlenmektedirler. Korunmada keratosit, endotel ve epitel hücreleri metabolik olarak aktif olup, canlılıklarını devam ettirmek için enerjiye ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Metabolik olarak en aktif hücreler olan kornea epitel hücreleri lipid geçirgen özelliktedir. Epitel tabakası oksijeni gözyaşı aracılığıyla difüzyon ile sağlarken göz kapalı iken limbal ve tarsal konjonktiva damarlar aracılığıyla sağlar. Epitel tabakasının aminoasit ve vitamin desteği ise aköz hümörden sağlanmaktadır (36).

Epitel hücrelerinin başlıca enerji kaynağı glikoz ve glikojendir. Glikoz çoğunlukla aköz hümörden elde edilmekle birlikte %10 veya daha az kısmı limbal damarlar veya gözyaşından da sağlanabilmektedir. Epitel hücrelerinin glikojen depolama kapasiteleri mevcuttur. Hipoksi, travma gibi durumlarda epitel hücreleri depoladıkları bu glikojeni kullanırlar. Aköz hümörde pO₂ artışı, stroma ve bazal epitel hücrelerinde pO₂ artışı ile sonuçlanmasına rağmen yüzey epitelde değişiklik görülmez. Bu sonuç aköz hümörün kornea epitelinin oksijen gereksinimini karşılamakta yetersiz kaldığını gösterir. İn vivo olarak endotel, normal pompa fonksiyonu için yeterli O₂ desteğini aköz hümörden alır (37).

Epitel hücreleri, aralarında bulunan sıkı bağlantılar nedeniyle, iyon geçirgenliğine en fazla direnç gösteren hücrelerdir. Bu özellikleriyle, stromanın su dengesine katkıda bulunurlar (38). Ayrıca epitel bu sıkı bağlantılar (tight junctions) ile koruyucu bir bariyer oluşturarak stromaya sıvı ve patojen mikroorganizmaların girişini engellemektedir (39).

1.2.3.3. Endotel Fizyolojisi

Endotel hücreleri ana enerji kaynağı olarak aköz hümörden sağlanan glikozu kullanır. Aktiviteleri için genellikle anaerobik yolları kullanmakla birlikte daha az

olarak da aerobik yolları kullanırlar. Korneanın sağlam ve şeffaf kalmasının sağlanması endotelin en önemli görevidir. Endotel bunu yaparken hem aktif bir pompa gibi çalışır, hem de mekanik bir bariyer oluşturur. Endotel hücreleri normal pompa fonksiyonu için gerekli olan oksijeni aköz hümörden sağlamaktadır. Kornea endoteli dehidratasyon görevini yaptığı sürece, stromanın su içeriği %78 ve kalınlığı 550 µm civarında kalır ve normal fonksiyonlarını sürdürebilir. Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bariyer görevi görürler. Endotel tabakası metabolik aktivitesini stromadan aköz hümöre su pompalayarak gerçekleştirir. Aköz hümör (-) yüklüdür. Korneal pompanın dört ana komponenti vardır:

1. Aköz yüzeyde Na^+/K^+ iyon pompası
2. Lateral yüzlerde Na^+/H^+ iyon pompası,
3. K^+ , Cl^- ve HCO_3^- in aköz hümöre pasif difüzyonu,
4. Karbonik anhidraz sisteminin ürettiği H^+ ve HCO_3^-

Net su akımı için Na^+ , K^+ veya H^+ konsantrasyon gradientinin gerçekleşmesi gereklidir. Bu gerekli gradient pompalar aracılığı ile sağlanmaktadır. Endotel hücrelerin dış kenarlarına lokalize olan sodyum-potasyum-adenozintrifosfaz pompa sistemi ile su ve elektrolitler dengelenerek, aynı seviyede tutulur. Bu pompa, enerji harcayarak sodyumun hücre dışına çıkmasını sağlarken bunu suyun pasif olarak hücreyi terk etmesi izler. Böylelikle kornea stromasından ön kamaraya doğru devamlı sıvı geçişi sağlanarak korneanın şeffaflığı korunur. Korneadan ön kamaraya geçen sıvının geri dönmesi ise endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar sayesinde engellenmektedir.

Hekzagonal yapıda olan endotel hücreleri, sıvı regülasyonu için ideal dizilimi oluşturmaktadır. Bu geometrik düzen maksimum sayıda hücre ve maksimum sayıda pompa yoğunluğunu temin etmektedir. Korneanın şeffaflığının korunması, endotel hücrelerinin etkin fonksiyonlarının yanı sıra, korneada damarsal yapıların bulunmamasına, sinir liflerinin miyelinsiz olmasına ve stroma tabakasındaki kollajen lamellerin düzenli dizilimine de bağlıdır (40).

1.2.4. Kornea Yara İyileşmesi

Kornea gözün en önemli refraktif bölümü olması nedeniyle mekanik, kimyasal, enflamatuar cevap korneanın optik performansını etkileyecektir. Bu

yüzden herhangi bir travma sonrası stabil görmeye ulaşmak amacıyla kornea yara iyileşmesinde birtakım mekanizmalar söz konusudur. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri, sitokinler ve extrasellüler matriks (ECM) proteinleri etkileşim içerisindeyler. Korneada farklı tabakalarda farklı mekanizmalarla yara iyileşmesi gerçekleşir.

1.2.4.1. Epitel Yara İyileşmesi

Birçok hücreyel yapının ve sinyal moleküllerinin epitel yara iyileşmesine karşılıklı etkileşimi mevcuttur. Kornea epitel yapısının devamı için hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi önemli rol oynamaktadır. Kornea epitel yara iyileşmesi birbirinin üzerine binen üç faz olarak incelenebilir (41). Birinci fazda hemidesmozomlar kaybolur ve “fokal temas” denen geçici yapışkanlık kompleksi gerçekleştirilmektedir. Bu faz süresince epitel hücreleri düzleşir ve yara kenarını koruyan bir kalkan halini alır. Bu faz proliferasyondan bağımsızdır. İkinci fazda proliferasyon ve farklılaşma meydana gelir. Üçüncü fazda ise hemidesmozomlar oluşturularak ECM sentezi ve yeniden yapılanması gerçekleştirilir. Bu basamakları epitel hücrelerinin metabolizmalarını arttırdıkları lag fazı takip eder.

1.2.4.1.1. Lag Fazı

Yaralanmanın hemen sonrasında hücre göçünün başlamasına kadar geçen süre lag fazı olarak adlandırılmaktadır. Bu faz önemli oranda hücreyel organizasyon ve protein sentezi ile ilişkilidir. Vinkulin, aktin, talin ve integrin gibi sitoskeletal proteinler ile hyaluronan, reseptör CD44 gibi diğer hücre yüzey proteinleri sentez edilir (42). Bu proteinler yara iyileşmesi tamamlandıktan sonra başlayan ve hemidesmozomların yeniden sentezlenmesine kadar olan süre içinde epitelin bazal membrana bağlanmasını sağlamaktadır. Bunların yanında hücre yüzey glioproteinleri ve glikolipitleri de sentezlenmektedir.

1.2.4.1.2. Hücre Göçü

Lag fazı tamamlandığında oküler yüzey epitelinin yeniden oluşturulması için yaraya komşu hücreler göç etmeye başlar. Normalde limbal kök hücrelerden köken alan bazal hücreler santrale doğru haftada yaklaşık 120 mikrometre hızında göç eder. Ancak yaralanmadan yaklaşık beş saat sonra hücreler çeşitli yönlerden yara

merkezinde buluşmak üzere saatte 60-80 mikrometre hızla göç eder. Hücrelerin göçü intrastoplazmik aktin-miyozin kontraksiyonu ile oluşan ameboid hareketlerle gerçekleşir. Defekt tek hücre katıyla örtüldükten sonra normal epitel kalınlığı mitoz aracılığıyla sağlanır. Zedelenmeden üç saat sonra rejenere olan epitel uçlarında ve bazal laminada PMNL'ler belirterek bu bölgede 36 saat kadar kalır, daha sonra giderek azalıp kaybolurlar. Büyük defektlerde onarıma konjonktiva epiteli de katılabilir. Kornea epiteli, abrazyonu 1-4 gün içinde örterken, konjonktiva epiteliyle iyileşme 1-2 hafta veya daha uzun zaman gerektirir (28).

1.2.4.1.3. Hücre Çoğalması ve Farklılaşması

Hücrelerin göçünden sonra hücre çoğalması gerçekleşir. Periferik limbal hücreler santral epitel defekti oluştuğunda santrale doğru göç ederek, kornea epitelinin devamlılığını sağlamaktadırlar. Bu hücreler en yüksek mitoz hızına sahip hücrelerdir. Epitel iyileşmesi sırasında bazal hücrelerle limbal kök hücreler arasında bir denge bulunmaktadır. Bu görüş Thoft'un "X, Y, Z" hipotezi ile ortaya konmuştur. X; bazal epitel hücre çoğalmasını, Y; limbal hücre çoğalmasını ve santrale göçünü, Z; yüzeyden epitel hücre kaybını yansıtmak üzere denge konumunda $X+Y=Z$ olmalıdır. Kornea epitel debrütmanı hücre çoğalmasını limbal hücrelerde 4.5, korneanın periferik hücrelerinde ise 3.2 kat artırır (43).

1.2.4.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi

Enflamatuar hücreler debrütmanı takiben açığa çıkan bazal membrana bağlanır. Bu durum bazal membranı sindirebilen proteazların ortaya çıkması ile sonuçlanır. Ayrıca proteaz içerdiği için gözyaşı ve kornea epitel hücreleri tarafından salgılanan bazal membranı sindirme yeteneğine sahip metalloproteinazlar da bazal membranın sindirilmesine katkıda bulunur (44). Bazal membranın proteaz sindirimi sonrasında yapısı ve fonksiyonu değişir. Bazal membranın parçalanması, yeniden epitelizasyonu birkaç biçimde etkiler.

a-Stromal ECM ile epitel hücrelerinin etkileşime girebilmesi. Bu durum göç eden endotel hücrelerinde yeni integrin oluşması ve aktivasyonunu indükler.

b-Göç eden epitel hücrelerinin intraselüler sinyallerini düzenler. Yaralanmadan sonra sitokinler bazal membrana bağlanmak suretiyle matrikse

tutunurlar. Böylece bazal membranın kısmi bozulması hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve/veya apoptozunu düzenler (45).

Bazal membran epitel morfolojisi, farklılaşması ve devamında dinamik bir role sahip olması nedeniyle kornea epitelinin iyileşmesinde önemli bir role sahiptir. Fotoablasyondan 24 saat sonra göç eden epitel hücreleri, etraflarına laminin-1 sentez eder ve bu sentezledikleri laminini depolar (46). Laminin-1 adezyon, proliferasyon, farklılaşma gibi birçok hücreyel olayları ve hücre göçünü düzenleyen bazal membranın ana bileşenidir. Laminin ile eş zamanlı olarak konneksin, desmoglein-1 ve -2 üretimi de artar. Bu proteinler yara iyileşmesinin tamamlanmasından sonra başlayacak olan hemidesmozomların yeniden sentezine kadar, epitelin bazal membrana tutunmasını böylelikle geçici bir adezyon oluşumunu sağlar. Yeni hemidesmozomlar bazal membranda daha önce var olan çapa fibrillerinin karşısına gelecek şekilde sentezlenir ve adezyon kompleksleri kısa sürede bütünlüklerine kavuşur. Eğer yaralanma bazal membranı da içeriyorsa, epitelin önce bazal membran sentezlemesi gerekir ki bu durumda adezyon komplekslerinin sentezinin tamamlanması yaklaşık bir yıl sürer (28).

1.2.4.3. Epitel ve Yüzeyel Stromal Defekt

Epitelle birlikte Bowman zarı ve ön stroma tabakasının kaybının olduğu durumdur. Epitel iyileşmesi ile farklı iyileşme sürecidir ve bu süre daha uzundur (en az altı hafta). Alttaki yüzey, yani stroma, yara iyileşmesi için ideal bir platform değildir. Bowman zarı ve normal stroma rejenerasyon olmayacağı için defektin yerini kollajenöz skar dokusu alabilir veya defekt hiperplastik bir epitle doldurulabilir (47).

1.2.4.4. Stroma Yara İyileşmesi

Stromal iyileşme, yeni kollajen sentezi, bunların birbirine bağlanması, proteoglikan sentezi ve stromanın gerilme gücünün yeniden oluşmasını sağlayan yara yeri şekillenmesi aşamalarından meydana gelmektedir. Zedelenmeden 1.5 saat sonra stromal hiperplastik hasarlanma bölgesinde polimorfnükleer lökositler görülmeye başlar. Polimorfnükleer lökositler 12 saatte pik yapar, 72 saat sonra ise giderek azalır. Bu hücreler fagositoza yardımcıdırlar. Hasar gören epitel tabakasının altındaki keratositlerde apoptozis gözlenir. Hasarlı epitel ve apoptozise uğrayan

keratositlerden salınan sitokinlerle birlikte iyileşme kaskadı başlamaktadır. Keratositlerde hasarlanmadan 1.5 saat sonra kollajen sentezi başlar ve sekizinci günde sonlanır. Yara direnci stroma iyileşmesi ile yakından ilişkilidir. Ancak insanlarda 2-3 yılda bile %50 direnç düzeyine erişilememektedir. Normalde hareketsiz olan keratositler, çevresel değişikliklere oldukça duyarlıdır. Epitel yaralanmalarında, yaralanmanın altındaki bölgede keratositler dejenere olur. Bunun sonucunda hücresiz kalan stromal bölgeye bir süre sonra çevreden gelen yeni keratositler yerleşir. Stromal yaralanmalarda da keratositlerde epitel yaralanmalarında olduğu gibi bir dizi yapısal değişiklik izlenmektedir. Keratositler birbirleriyle olan bağlantılarını kaybederek büyür ve çoğalır. Ortaya çıkan bu hücreler fibroblastların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini taşır. Stromal iyileşme sırasında keratositler, aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşmektedir (28).

Kontraktıl özellikte olan bu hücreler kollajenleri, glikozaminoglikanları ve diğer matriks proteinlerini üretmektedir. Normal stroma yapısında tip I kollajen bulunurken korneal skar dokusu büyük oranda tip III kollajen içerir. Skar dokusunun yeniden düzenlenmesi sonrasında tip III kollajen, stromanın normal yapısında olan tip I kollajen ile yer değiştirmektedir. İlk hafta içerisinde stromada hyaluronik asit üretimi görülmeye başlar ve zamanla yerini kondroitin sülfat ve keratan sülfata bırakmaktadır. Ayrıca keratositlerden keratinosit growth faktör (KGF), hepatosit growth faktör (HGF) gibi büyüme faktörleri de salgılanmaktadır (44).

Stromal iyileşmenin tam olarak gerçekleşmesi haftalar almasına rağmen keratositlerde hipertrofi ve çok sayıda nükleolus gelişimi gibi yapısal değişiklikler oldukça erken dönemde gözlenmektedir. Hasar sonrası ikinci haftada kontraktıl faz başlar. Miyofibroblastlarda kas hücrelerindeki benzer şekilde aktin ve miyozin kontraktıl ünitleri oluşur. Yara iyileşmesi ve korneanın gerilme gücünün yeniden oluşması erken dönemlerde duraklayabileceği gibi dört yıl sonra bile hala devam edebilmektedir (47).

1.2.4.5. Endotel Yara İyileşmesi

İnsan endotel hücreleri doğumdan sonra neredeyse hiç mitoz bölünme gerçekleştirmez. Yaşlılıkta olduğu gibi endotel hücreleri yavaşça kaybolursa, komşu hücrelerin genişlemesiyle oluşan bu boşluklar kapatılır. Daha büyük ve çok sayıda

hücrenin etkilendiği bir defekt söz konusu olduğunda ise 250 mikrometre uzaktaki hücreler bile yara yerine doğru uzayarak 80-100 mikrometre/gün hızla yara yerini kapatmak üzere ilerler. Yayılma ve göçme sırasında hücreler birbirinden ayrılmazlar. Tek katlı tabakanın oluşumu tamamlandığında bariyer ve pompa fonksiyonları tekrar devreye girer. Böylelikle kornea ödemi yavaş yavaş geriler. Defekt bir kez kapatıldıktan sonra, normal heksagonal yapının oluşturulması için hücreler yeniden düzenlenmeye başlar. Birkaç hafta sonra zedelenme alanını kaplayan endotel yeni Descemet membranını salgılamaya başlar. Yaklaşık 2-3 ay içinde oldukça homojen, heksagonal bir yapı elde edilir. Kronik enflamasyon veya fiziksel travma durumunda yeniden düzenlenme gecikir ve hücre kaybı devam eder (28).

1.2.5. Kornea Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

1.2.5.1. Yaş

Genç popülasyonda birkaç gün ile hafta arasında değişen kısa sürede iyileşme görülürken, yaşlılarda aynı tipteki bir yaranın iyileşmesi aylar alabilir (48).

1.2.5.2. Beslenme

Protein, vitamin A ve vitamin C yara iyileşmesi için gereklidir. Malnütrisyon durumunda yara iyileşmesinde belirgin bir gerileme izlenir. Şiddetli vitamin A eksikliğinde korneal ülserasyon sık izlenir (48).

1.2.5.3. Travma

1.2.5.4. Yara Apozisyonu

Kötü pozisyon sonrası ön ve/veya arka yara dudağında basamaklanmaya yol açabilir ve yara iyileşmesini belirgin geciktirir. İnfeksiyon, inkarserasyon veya yabancı doku adhezyonu olasılığını artırarak retrokorneal membran ile sonuçlanabilen epitelyal ve stromal ingrowth gelişimine zemin hazırlar (48).

1.2.5.5. İnfeksiyon

İnfeksiyon durumunda mikroorganizmalar inflamatuvar yanıt artırarak aşırı kollajen yıkımı ve hücre ölümüyle indirekt olarak ve salgıladıkları enzimlerle

glikozaminoglikan ve/veya kollajen yıkımını artırmak yoluyla da direkt olarak yara iyileşmesini geciktirir veya engellerler (48).

1.2.5.6. Enflamasyon

Farklı travma tipleri farklı inflamatuvar yanıtlar ortaya çıkarır. Örneğin, yabancı cismin uzaklaştırılmadığı laserasyonlar dev hücre reaksiyonu ve aşırı skar dokusu ile sonuçlanmaktadır. Erken inflamatuvar süreç topikal steroidlerle baskılanırsa yara iyileşmesi önemli ölçüde gecikir. Yaralanma sonrası korneaya inflamatuvar hücre akımı dokuyu onarıma hazırlanmasına rağmen iyileşmeyi bozabilecek etkiye de sahiptir. Dokudan serbestleşen lokal faktörler (lökotrienler, C5a, C3a.) PMNL aktivitesi için temizleme görevi görürler. PMNL'ler epitel migrasyonunu inhibe ederek iyileşmeyi geciktirirler. Bu nedenle çok miktarda PMNL birikimi persistan epitel defekti, hatta ülser gelişimine yol açar. Steroidler lizozomal veya diğer membranların stabilizasyonunu sağlayarak PMNL'ler için çağırıcı rol oynayan mediatör salınımını engellemektedirler. Bunun sonucunda inflamatuvar yanıt azalır. Fakat steroidler fagositozu, süperoksit radikal oluşumunu etkilemez. Uzun süre kullanımında ise epitel migrasyonunu inhibe eder. PMNL'lerin kollajenaz aktivasyonu etkisini potansiyalize ederek ülserasyon riskinde artışa sebep olurlar. Bu yüzden steroidlerin kullanımı dikkatli takip edilmelidir. PMNL inhibisyonu için kullanılabilen topikal Na sitrat PMNL birikimini, fagositozunu, degradasyona yol açan enzim salınımını ve serbest O₂ radikal oluşumunu önler. Bu etkilerini PMNL aktivasyonu için gerekli olan Ca⁺⁺ iyonuna şelasyon yaparak gerçekleştirir (49).

1.2.5.7. Duyusal İnnervasyon

Normal epitel iyileşmesinde sinirsel uyarım da gereklidir. Duyusal innervasyon yokluğunda hücre göçü ve adhezyonunun bilinmeyen bir mekanizmayla önemli oranda azaldığı gösterilmiştir (50).

1.2.5.8. İntraoküler Basınç

İntraoküler basıncın yüksek olması halinde stromal yara iyileşmesinde skar dokusunun kontraksiyonu önlenir (50).

1.2.5.9. Gözyaşının Etkisi

Epitel bütünlüğünün sağlanabilmesi ve epitelin sağlıklı bir şekilde kalabilmesinde gözyaşı kalitesi hayli önem taşımaktadır. Göz açıkta kaldığında orta kısımda bulunan aköz tabaka buharlaşma ve nazolakrimal drenaja bağlı olarak giderek incelir, yüzeydeki lipid tabaka en alt kısımda bulunan müsin tabakaya ulaşır. Aköz tabaka gözkapağının açma kapama hareketiyle yenilenmezse bu iki tabaka arasındaki temas nedeniyle hidrofobik epitelyal alanlar oluşur. Aköz tabaka eksikliğinde yüzeysel kuruluk, punktat epitelyal boyanma, mukus plak, iyileşmeyen epitel defektleri gözlenir. Lipid tabaka eksikliğinde ise oküler yüzey keratinizasyonu, yüzey mikropilika kaybı, epitel defekti, korneal ülserasyon, keratomalazi gözlenir. Göz kapakları gözyaşının devamlı ve yeterli miktarda dağılımını sağlamaktadır. Kapak skatrizasyonu, malpozisyonu veya nörojenik fonksiyon bozukluğunda hidrofobik epitelyal yüzeyler oluşur (35).

1.2.5.10. Vaskülarizasyon

Korneal vaskülarizasyon gelişiminde birçok faktörün rol oynadığı gösterilmiştir. Bu faktörler;

- a. Prostaglandin E1 (PGE1), deneysel olarak akut enflamasyon ve vaskülarizasyon oluşturabilme yeteneğindedirler.
- b. Travmanın limbusa yakın bölgede oluşması vaskülarizasyon gelişim sıklığını artırmaktadır.
- c. Korneal nekroz, zayıf yara apozisyonu, yaraya iris adezyonu gibi nedenler vaskülarizasyona predispozisyon oluşturmaktadır (51).

1.2.5.11. İlaçlar

1.2.5.11.1. Antibiyotikler

Düşük dozda basitrasinin (500u/ml), gentamisin sülfatın (3 mg/ml), neomisinin (3.5 mg/ml) ve kloramfenikolün (4 mg/ml) korneal epitelizasyona etkileri yoktur. Ancak artmış doza bağımlı olarak kloramfenikol dışında basitrasinin (10.000 u/ml), gentamisin (10 mg /ml) ve neomisin (8 mg/ml) epitelizasyonu belirgin biçimde inhibe ederler (52). Bir çalışmada epitel defekti sonrası moxifloksasin ve

gatifloksasin kullanılan grup karşılaştırıldığında moxifloksasin kullanılan grupta epitel iyileşmesinin daha hızlı olduğu gösterilmiştir (53).

1.2.5.11.2. Kortikosteroidler

Korneal epitel, stroması ve endotel yara iyileşmesini inhibe etmektedirler. Araşidonik asit metabolitleri korneal neovaskularizasyon (NV) patojenezinde önemli role sahiptirler (14). Prostaglandinler, özellikle E serisi, neovasküler cevabın potent uyarıcısıdır (15). Lökotrienler, lökosit göçünü stimüle ederek korneal NV'a neden olurlar (54).

Deneyssel olarak oluşturulan lineer perforan insizyonda gerginliğe karşı yara direncinin medroksiprogesteron ile %20, prednizolon ile %11 oranında azaldığı gösterilmiştir. Skar dokusunda kollajen formasyonunu prednizolon %43 azaltırken, medroksiprogesteron ise %39 azaltmaktadır. Yine aynı çalışmada termal yanıkta ülserasyon gelişimini azalttıkları gösterilmiştir (55).

1.2.5.11.3. Lokal Anestezikler

Epitel iyileşmesi için temel olan aktin etkileşimini bozarlar. Kronik topikal tedavi persistan epitel defektine neden olabilir (56).

1.2.5.11.4. Benzalkonyum Cl (% 0.01)

Topikal ilaçların büyük kısmında koruyucu olarak kullanılmaktadırlar. Koruyucular içerisinde en toksik olanıdır. Bu kimyasal maddeyi içeren topikal ilaçların kullanımında hasarlanmış epitel üzerinde adheransta zayıflama, membran aktivite kaybı, oluşan epitel tabakanın yerinden ayrılması gibi etkiler gözlenmiştir (56).

1.2.5.11.5. Asetilkolin

Endotel hücre hasarını arttırdığı saptanmıştır (56).

1.2.5.11.6. Epinefrin

1/1000'lik konsantrasyonda irreversible kornea ödemeine yol açabileceği bilinmektedir. 1/5000'lik konsantrasyonunun kullanılması önerilmektedir (56).

1.2.5.11.7. Antiviral İlaçlar

Epitel iyileşmesini inhibe ederler (56).

1.2.5.12. Fibronektin (Fn)

Fibronektin (Fn), hücre adhezyonu ve migrasyonunda rol aldığı düşünülen Multi fonksiyonel bir ekstraselüler matriks proteindir. İyileşen epitel yara yüzeyinde epitelizasyon tamamlanana kadar korneal Fn gözlenir ve tamamlanınca da ortadan kaybolur (57). Organ kültüründe tavşan korneası üzerinde epitel migrasyonunun araştırıldığı Nishida ve ark.nın bir çalışmasında epitel hücrelerinin gösterdiği migrasyon aktivitesinin ortama eklenen Fn ile belirgin olarak arttığı, etkinin eklenen Fn miktarı ile doğru orantılı olduğu, ortama anti-Ig G tavşan plazma Fn antikoru eklendiğinde ise anlamlı migrasyon inhibisyonu olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada korneanın değişik lezyonlarında (insizyon, deneysel büllöz keratopati, termal yanık...) yapılan immunohistokimyasal analizlerle Fn'in sadece gözyaşı kaynaklı olmadığı ve stromal keratositlerce sentezlenebildiği, eksojen Fn'in stromal kollajenlere bağlanarak kemotaktik aktivite oluşturabildiği de bildirilmiştir (58).

Bilindiği üzere yüzeysel epitel defektlerinde yaranama oluştuktan 8-36 saat sonra Fn gözyaşından veya limbal vasküler yapılardan köken almaktadır. Stromal yaralarda ise Fn, keratositlerce üretilir (59). Nishida ve ark. blok halinde kültür ortamına konulan tavşan kornealarında epidermal growth faktör (EGF) ve Fn'in epitel migrasyonuna etkisini de araştırmışlardır. Sonuçlar Fn'in aksine epitel hücrelerinin bir kez uyarı sinyali aldıktan sonra EGF'nin varlığına gereksinim duymadığını, EGF stimülasyonunun Fn bağımlı bir yanıt ve Fn'nin EGF'den bağımsız olduğunu, EGF'nin epitel migrasyonuna etkisinin Fn tarafından düzenlendiğini ortaya koymaktadır (60).

1.2.5.13. İnterlökin – 6

Tavşan korneasında integrin reseptörlerini uyararak epitel hücre migrasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (61).

1.2.5.14. Retinoik Asit

Tavşanlarda kornea epitel defektlerinde topikal retinoidlerin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada % 0.1'lik all-trans-retinoik asit 3x1/gün kullanımı ile iyileşme hızında % 21, 5x1/gün dozunda ise % 35 oranında artış olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar all-trans- retinoik asitin cerrahi sonrasında ve persistan epitel defektinde (PED) iyileşmeyi hızlandırıcı olarak kullanılabileceğini göstermektedir (62).

1.2.6. Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Medyatörler

1.2.6.1. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri birçok hücre tarafından salgılanan, hücre çoğalmasını, göçünü ve hayatının devamını uyararak, bazı durumlarda ise bunları engelleyen peptidlerdir. Hareketlerini yaygın bir şekilde parakrin mekanizma ile gerçekleştirmekle birlikte otokrin, jukstakrin mekanizmaları da kullanılabilir. Karşılıklarına gelen hücre yüzey reseptörleri tirozin kinaz veya G proteiniyle eşleşen transmembran glikoproteinleridir. İlgili reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri deoksiribonükleik asit (DNA) sentezinin sentez fazını uyarır ve ardından hücre çoğalması gerçekleşir (63).

Göz, birçok büyüme faktörü için hedef doku konumundadır. Bu faktörler: Epidermal growth faktör (EGF), Platelet-derived growth faktör (PDGF), İnsulin-like growth faktör (IGF), Transforming growth faktör (TGF) - α ve - β , Fibroblast growth faktör (FGF)'dir (64).

1.2.6.1.1. Epidermal Growth Faktör

Epidermal growth faktör epitel hücreleri için potent bir mitojendir. EGF normal kornea epitel kalınlığının devam ettirilmesinde önemlidir. EGF fibroblastlarda mitoz ve migrasyonu aktive eder. Topikal EGF epitel iyileşmesini uyarmakta, özellikle limbal ve periferal kornea epitel rejenerasyonunda maksimum etki göstermektedir (65). EGF kornea epitelinin normal kalınlığının idame

ettirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca stromada timidin alınmasını artırır ve aktive fibroblastların insizyon yerinde çoğalmasını sağlayacak kemotaksisten sorumludur. Epitel ve stromal iyileşmeye olan etkileri ile gerginliğe karşı yara direncini artırır (66). Bu etkilerinin yanı sıra EGF'nin korneal vaskülarizasyonu ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (65).

Epidermal growth faktör reseptörü konjonktiva epitelinde, kornea epitel ve endotelinde, irisin pigment tabakasında, lens epitelinde mevcuttur. Epidermal growth faktörün reseptörüne bağlanması tirozin kinazı aktive eder ve böylece fibronektin, hyaluronik asit gibi ECM moleküllerinin salgılanmasına ve kontakt inhibisyonunun olmadığı hücrelerin çoğalmasına neden olan DNA sentezini uyarır. Reseptör fosforilasyonu, hücre göçüne yardımcı olan hücre iskeletindeki aktinin yeniden düzenlenmesini de sağlar (67). Hem yüksek hem de düşük afiniteli EGF reseptörleri özellikle limbal bölgede olmak üzere kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır.

Bu bulgular EGF'nin, otokrin, parakrin ve jukstakrin mekanizmalarla kornea hücrelerini etkilediğini düşündürmektedir.

1.2.6.1.2. Fibroblast Growth Faktör

Fibroblast growth faktör ailesi yaklaşık 18 kiloDalton ağırlığında olan, 20 kadar heparin bağlayarak birçok dokuda farklılaşma, göç, çoğalma, ECM depolanması, anjiyogenez gibi çeşitli olayların düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir protein grubudur. Düşük afiniteli heparan sülfat proteoglikanlara bağlanarak parçalanmaktan korunurlar. Etkilerini hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Asidik FGF, Bowman tabakası ve Descement membranlarında, endotel hücrelerinde ve daha az oranda ise epitelde tespit edilmiştir. Lakrimal bez tarafından da salınan bu faktörün epitel hücrelerinde hem parakrin hem de otokrin etkileri vardır.

Asidik ve bazik FGF epitel, stroma ve endotel hücrelerinde mitojeniktir (68). Bazik FGF, kornea fibroblastlarında DNA sentezini, yara gerginliğine direncini ve endotel hücrelerinde mitotik hızı artırır (69).

1.2.6.1.3. Transforming Growth Faktör Alfa ve Beta

Transforming growth faktör- α , EGF gibi gözyaşında bulunur ve olası kaynak yine lakrimal bezlerdir. Ek olarak kornea epitel hücreleri TGF- α , TGF α mRNA'sı ve proteinini içerirler. Bu durum EGF ve TGF- α üreten epitel hücrelerinin otokrin mekanizmayla normal epitel sikluslarını devam ettirdiklerini düşündürmektedir. Endotel hasarında aköz hümörde TGF- α konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir (64). Transforming growth faktör- β aktivasyonu ECM üretimi, hücre büyüme ve farklılaşması gibi cevaplara neden olur (70). Transforming growth faktör- β 'nin genel olarak epitel, endotel hücreleri, lökositlerin büyümesini engellediği ve fibroblast üretimini uyardığı kabul edilmektedir (71). Transforming growth faktörün epitelden stromaya salgılanması ve gözyaşında üretimi stromal hücrelerde çoğalma ve göçe neden olur. TGF- β 'nin enflamasyon odağına fibroblast, monosit ve makrofajları çekme özelliği de vardır (72). Bunların dışında İnterlökin (IL)-1, IL-6, TNF- α epitel göçünde indirekt olarak etkili olabilmektedirler (73). Tavşanlarda korneal insizyonlarda gerilmeye karşı yara direncini artırıcı etki gösterir. Bu etkisini insizyon yerinde kemotaksis ile fibroblast sayısını artırarak gerçekleştirir.

1.2.6.1.4. Keratinosit Growth Faktör

Yaklaşık 28 kiloDalton ağırlığında tek zincirli bir polipeptit olan keratinosit growth faktör (KGF) FGF ailesinin üyelerinden biridir ve keratinositler ile epitel hücreleri için mitojenik etkiye sahiptir. Keratinosit growth faktörün EGF, TGF- α , FGF ile aynı sinyal yolağını paylaştığı düşünülmektedir. Keratinosit growth faktörün hedef hücrelere salınma ve depolanmanın yapıldığı stromada birikmesi için heparine bağlanabileceği düşünülmektedir (69).

Keratinosit growth faktör reseptörü mRNA'sının in vitro olarak kornea epitel hücrelerinde anlamlı miktarda bulunduğu ama stroma keratositlerinde çok düşük miktarda olduğu tespit edilmiştir (73). Bu durumun aksine KGF'nin kültürde keratositlerde üretildiği, ancak epitel hücrelerinde üretilmediği tespit edilmiştir. Bu tablo KGF'nin stromada üretildiği ve parakrin mekanizma ile epitel hücreleri üzerine etkili olduğunu göstermektedir (74). Keratinosit growth faktörün sürekli olarak düşük miktarda salınmasının sağlıklı korneal epitel bütünlüğünün sağlanmasında rolünün olduğunun göstergesi olarak düşünülebilir (75). Yapılan çalışmalarda IL- α

ve IL- β gibi sitokinlerin keratositlerden KGF salgılanmasında rol aldığı kabul edilmektedir (76).

1.2.6.1.5. Hepatosit Growth Faktör

Hepatosit growth faktör (HGF) mezenşimal kökenli hücrelerden sağlanır. Travma, enflamatuar olaylar gibi uyarılarla ve koagülasyon kaskadındaki proteazlarla aktif hale gelen HGF keratinosit growth faktöre benzer olarak çeşitli ECM bileşenlerine bağlanabilir. Hepatosit growth faktör reseptörü tirozin kinaz özelliği taşımaktadır. Korneada HGF reseptörü en yoğun olarak epitel hücrelerinde bulunur; ancak HGF klasik parakrin etki ile fibroblastlardan üretilerek epitel hücrelerine etki etmektedir (77).

Keratinosit growth faktörün tersine, HGF üretimi ve reseptörü kornea santralinde daha yoğundur. HGF aynı zamanda gözyaşında da bulunmaktadır. Stroma fibroblastlarına etkisi minimal olan hepatosit growth faktör hücre göçünü uyarır ve korneada ise epitel katının bütünlüğünün sürdürülmesinde katkısının olduğu düşünülmektedir. Aköz hümörde bulunan HGF'nin endotel hücrelerine bağlanarak, bu hücrelerin bütünlüklerinin devamında otokrin mekanizma ile rol oynadığı sanılmaktadır (78).

1.2.6.1.6. Platelet Derived Growth Faktör

Platelet derived growth faktör (PDGF) reseptörleri kornea fibroblastlarında ve endotel hücrelerinde bulunur. Platelet derived growth faktör-BB proteini epitel hücrelerinde üretilir ve en yüksek miktarda bazal membrana bağlanır (72). Endotel hücrelerinin ve fibroblastların göçü PDGF-BB ile uyarılır. Fibronektin varlığında PDGF-AA ve -BB epitel hücrelerinin kemotaksisini uyarmaktadır (72). Platelet derived growth faktör aköz hümörde eser miktarda bulunur ve fibroblastların TGF- β 'ya olan çoğalma cevabını artırır (79).

1.2.6.1.7. Diğer Büyüme Faktörleri

Çalışmalarda sinir büyüme faktörü (SBF), nörotropin-3 ve 4, glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör gibi nörotrofik faktörler ile reseptörlerinin korneada bulunduğunu ve bunların epitel hücre çoğalmasını uyardığını göstermektedir (80). Bu durum ise kornea epitel bütünlüğünün devamında kornea sinirlerinin önemli

rolünün olduğu düşündürmektedir. Bu nedenle kornea sinirlerinden salınan nörotrofik faktörler de doku homeostazında rol oynayabilir (81). Kültürde stroma fibroblastlarının büyümeleri SBF ile arttırılmaktadır (80).

İnsülin like growth faktörü ile reseptörleri kornea epitel, stroma, trabeküler ağda bulunmaktadır ve hücre farklılaşması ve çoğalmasında rol oynar (76).

1.2.7. Kornea Yara İyileşmesinde Enflamatuvar Sitokinlerin Rolü

Kornea epitelinde travma sonrası çeşitli sitokinlerin düzeyi artmaktadır. Bu durum sitokinlerin korneal yara iyileşmesine önemli rol oynadığının göstergesidir. Bu sitokinlerden en önemlileri IL-1, IL-6 ve TNF- α 'dır (72). İnterlökin-1 in vitro epitel yara kapanmasını EGF ile sinerjik biçimde artırırken TNF- α ile birlikte kollajenin yeniden şekillendirilmesinde önemli rol oynar (82). İnterlökin-6 ise integrinleri düzenleyerek kornea epitelinde göçü uyarmaktadır (83). Bunlar kornea fibroblastlarında IL-8, monosit kemotaktik protein gibi birtakım kemokinlerin üretimini arttırır ve ilginç bir biçimde sadece epitel yaralanmasında üretilir (84). Fakat bu sitokinlerin etkileri her zaman yararlı değildir. IL-1, IL-6 ve IL-8 kornea stromasında erimeyi uyabilir (85).

1.3. Kornea Neovaskülarizasyonu

Embriyogenez ve erken çocukluk döneminde damarların oluşumu ve modellenmesi vaskülogenez, anjiogenez ve arteriogenez olmak üzere üç şekilde gerçekleşmektedir (3). Vaskülogenez embriyonik dönemde de nova olarak progenitör hücrelerin vaskülarizasyon alanına migrasyonu ve endotelial hücrelere dönüşümünü tanımlayan primitif damar oluşumudur. Anjiogenez mevcut damarlarda yeni damarların tomurcuklanmasını ifade ederken arteriogenez ise kan akımının artışına bağlı olarak mevcut arter lümenin çapının artırarak yeniden modellenmesini tanımlamaktadır (4).

Vaskülogenez emriyonik dönemin sonunda durur ve endotel hücre proliferasyonu yetişkinlerde sonlanmıştır (86). Yetişkinlerde sadece anjiogenez ve arteriogenez görülür ve yara iyileşmesi, ovulasyon ve plasental maturasyon gibi fizyolojik fonksiyonlardan sorumludur. Regülasyon bozulduğunda endotel hücreleri anormal bölünerek tümör gelişmesi ve anjiogenez yoluyla bazı oküler hastalıklar gibi patolojik durumlar meydana gelir (87).

Korneanın besleyici damarı oftalmik arterden çıkan siliyer arterlerden gelmektedir. Siliyer arterler limbus bölgesinde perikorneal pleksusta sonlanır. Kornea neovaskularizasyonu da perikorneal pleksusta var olan kapiller ve venüllerden kaynaklanmaktadır.

Kornea neovaskularizasyonu stromal neovaskularizasyon (genellikle stromal keratitlerden kaynaklanmaktadır) ve vasküler pannus (oküler yüzeysel hastalıklardan kaynaklanan periferik yüzeysel korneada bağ dokusu proliferasyonudur) olmak üzere iki klinik formda görülmektedir (88).

1.3.1. Epidemiyoloji

Korneal neovaskularizasyon toplumda görülen önemli problemlerden biridir. Amerika Birleşik Devleti'nde bir yıl içinde 1.4 milyon hasta kornea neovaskularizasyonu geliştirmektedir. Yapılan çalışmalarda göz şikayetleri nedeniyle başvuran hastaların yaklaşık %4'ünde kornea neovaskularizasyonu bulunmaktadır ve kornea nakli sırasında elde edilen kornea örneklerinin %20'sinde histopatolojik olarak neovaskularizasyon olduğu gösterilmiştir (89) (Tablo-1). Ülkemizde henüz bu konuda yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Tablo 1. Kornea Neovaskularizasyonuna Neden Olan Hastalıklar

Enflamatuar hastalıklar

- Oküler pemfigoid
- Rozasea
- Greft rejeksiyonu
- Lyell's sendromu
- Stevens-Johnson sendromu

Enfeksiyöz keratitler

- Viral
 - Herpes simpleks
- Bakteriyel
 - Psödomonas
 - Klamidya trakomatis
 - Sifiliz
- Fungal
 - Kandida
 - Fusarium
 - Asperjillus
- Parazitik
 - Onkoserkiazis

Dejeneratif-konjenital bozukluklar

Pterijyum

Terrien'in marjinal dejenerasyonu

Travmatik-iatrojenik bozukluklar ve diğeri

Kontakt lens**Alkali yanığı****Korneal ülser****Kök hücre yetmezliği**

Neovaskularizasyon (veya anjiogenez) ortamda var olan damarlardan birtakım faktörlerin aktivasyonu ile yeni damar oluşumudur. Organizmada bu durum anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin dengesi sağlanarak sıkı bir şekilde kontrol edilir (Tablo 2). Anjiogenik ve anti anjiogenik faktörler dengesinde anjiogenik faktörler ağırlık gösterdiği zaman anjiogenez oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda neovaskularizasyon için sadece anjiogenik faktörlerin yükselmesi değil aynı zamanda anti-anjiogenik faktörlerin azalması da gerekmektedir (90).

Tablo 2. Anjiogenik ve Antianjiogenik Faktörler

Anjiogenik Faktörler

Tümör nekrozis faktör- α

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör

Vasküler endotelyal growth faktör

Asidik and bazik fibroblast growth faktör

Plasenta growth faktör

Platelet-derived epidermal growth faktör

Transforming growth faktör

Epidermal growth faktör

Hepatosit growth faktör

Platelet-activating faktör

İnsulin-like growth faktör

Anjiogenin

Anjiopoetin-1

Granulosit-makrofaj koloni-stimulan faktör

Granulosit koloni-stimulan faktör

İnterlökin-1,2,6,8

Prostaglandin E1, E2

Vascular integrin α ve β 3

Matriks metalloproteinazlar

Histamin

Antianjiogenik Faktörler

Thrombospondin

Fibronektin

Anjiostatin
Endostatin
İnterferon- α, β, γ
İnterlökin-12
Matriks metalloproteinaz inhibitörleri
Platelet faktör 4
Retinoik asit

1.3.2. Kornea Neovaskülarizasyon Fazı

Korneal neovaskülarizasyon 3 fazdan oluşmaktadır.

1.3.2.1. Erken Prevasküler Faz

Enflamasyona sekonder oluşan hasara bağlı damarlarda dilatasyon, geçirgenlik artışı ve ödem meydana gelir. Hasarlanmadan 2-3 saat sonra PMNL'ler damar dışına çıkarak, kornea stromasına doğru göç ederler. 24-48 saat sonra da PMNL infiltrasyonu pik yapar. Polimorfonükleer lökositler kemotaksisi başlatarak bazı sitokinlerin salınımına neden olur. Lökositlerden salınan proteolitik enzimler damarların bazal membranı parçalar. Bunun sonucu olarak damar geçirgenliği artar ve ödem meydana gelir. Damar geçirgenliğinde artış ve ödem normalde sıkı bir dizilim gösteren kollajen fibrillerin birbirinden ayrılmasına neden olur. Ödemle beraber ekstravasküler dokuya geçen fibrinojen pıhtılaşarak vaskülarizasyonda önemli rol oynar (91).

1.3.2.2. Vasküler Tomurcuklanma Fazı

Bazal membran devamlılığının proteazlarca bozulmasından sonra endotel hücreleri psödopotları aracılığıyla hasarlı bölgeden göç eder. Endoteldeki morfolojik değişimleri bazal membrandaki parçalanmanın izlediği bilinmektedir. Daha sonra endotel hücrelerinde mitoz ve yeni damar tomurcuğu oluşumu gözlenir. Matriks metalloproteinazlar ECM bileşenlerini bozarak, göç eden endotel hücreleri için gerekli olan yolu açar. Anjiyogenik faktörler endotel hücrelerinde MMP'lerin salınmasını ve fonksiyonlarını arttırabilir (92). Göç olayı tek başına neovaskülarizasyon için yeterli olmakta, hücrel proliferasyon olmasa bile endotel hücrelerinin yayılımı, göçü ve yeniden dağılımı ile yeni damar oluşumu

gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle endotel hücre göçünün vaskülarizasyondaki en önemli basamak olduğu söylenebilir. Bu fazda henüz vasküler lümen oluşmamıştır (93).

Normal koşullarda olgun kan damarlarında hücre bölünmesi sıklığı %0,1'den azdır. Neovaskülarizasyon gelişimi sırasında bu oran %8'e kadar yükselmektedir. Vasküler endotel hücrelerinin normal yaşam döngüsü iki ay iken enflamasyon döneminde 36 saat içinde mitotik aktivite gözlenebilmektedir. Bu fazda henüz vasküler lümen oluşmamıştır (94).

1.3.2.3. Vasküler Matürasyon Fazı

Endotel hücreleri zamanla çoğalarak lümen şeklinde yan yana gelir ve primitif damar şeklini alır. Bu sırada endotel hücrelerinden anjiogenik uyarı sonucu ECM proteinleri ortaya çıkar. Ekstrasellüler matriks proteinleri perivasküler boşluğa ulaşarak, hücre proliferasyonunu gerçekleştirdiği gibi, damar çeperinin düzenli olmasını da sağlar. Yeni oluşan damarların bazal membranları zaman içinde devamlı hale gelir ve perisitlerin endotel hücrelerini çevrelemesi ile ana damar oluşumu izlenir (91).

Postkapiller venüllerden oluşan primitif damarlar zamanla birbirleriyle ilişkiye geçtikten sonra kan akımı başlar. Anjiogenik uyarının yetersiz kaldığı durumlarda ise vasküler yapılarda daha fazla uzama gerçekleşmez ve regresyon gözlenir (91).

1.3.3. Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyarıcı Faktörler

1.3.3.1. Tümör Nekrozis Faktör- α

Düşük yoğunluklarda lökosit ve endotel hücreleri için lokal olarak parakrin ve otokrin düzenleyici olan TNF genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (lenfotoksin) olmak üzere iki çeşittir. Sağlıklı bireylerde plazma TNF düzeyleri 0-35 pg/ml arasında değişkenlik göstermektedir.

TNF'nin başlıca anjiogenez, hepatositleri etkileyerek akut faz reaktanlarının sentezini uyarmak, nötrofil adezyonunu artırmak, fibroblast ve mezenşimal hücre proliferasyonu, nöronların çoğalması ve fonksiyonlarının regülasyonu, T hücre aktivasyonu ve B hücre proliferasyonunun indüksiyonu gibi biyolojik etkilere

sahiptir. Damar düz kasını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır. Bu etkiyi prostasiklin ve nitrik oksit (NO) gibi damar genişleticileri uyararak indirekt yoldan yapar. İntravasküler koagülasyona neden olarak doku perfüzyonunu azaltır (95).

TNF- α T hücreleri, aktive Natürel Killer (NK) hücreleri ve aktive mast hücreleri tarafından salgılanan ve mononükleer fagositlerden köken alan bir proteindir. TNF- α ; IL-1, IL-6, kemokinleri ve TNF'nin kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır. IL-6 ile sinerjik etki gösterir. TNF- α , birçok proinflamatuvar ve immün modulator fonksiyonların medyatörüdür (89). TNF- α , NO sentezinde rol alarak anjiogenezin erken dönemlerinde vazodilatasyona yol açar (96).

Alkali kimyasal yanık, korneal stromada ciddi hasara neden olarak persistan ülserasyon, opasifikasyon ve neovaskularizasyon oluşturur ve kalıcı görme kaybına neden olabilir. Alkali yanık oluşturulan korneada açığa çıkan faktörlerden biri proinflamatuvar pleotropik sitokin olan TNF- α 'dır. İnflamasyon ve fibroziste hücresel cevabın düzenlenmesinde TNF- α 'nın rolü tam olarak açıklanamamıştır. TNF- α iyileşmekte olan kornea epiteli ve inflamatuvar hücrelerde tesbit edilmiştir (97). TNF- α ayrıca MIF salınımını regüle ederken VEGF, FGF ve TGF üretimini arttırarak neovaskularizasyonu arttırır (98).

1.3.3.2. Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF), Guinea piglerde makrofajların kapillerlerin dışına migrasyonunu önlediği keşfedilen ilk lenfokindir. Evrimsel olarak korunmuş bir protein olan MIF insanlarda ve primat olmayan memelilerde bol miktarda sentezlenmektedir. Sitokin benzeri fonksiyonu olmasının yanı sıra anjiogenik ve hücre içi antioksidan etkisi bulunmaktadır (99).

MIF, T lenfosit ve makrofajlardan salınan ve inflamasyonda anahtar rolü olan potent pro-inflamatuvar sitokindir (100). İnsanlarda MIF protein ve mRNA'sının korneal bazal epitelyal ve endotelyal hücrelerde, iris ve silyer cisim epitelinde, retinal astrosit, Müller ve retina pigment epiteli (RPE) hücrelerinde varlığı gösterilmiştir (101). Henüz MIF membran reseptörü tanımlanmamış olmasına rağmen bazı çalışmalarda reseptör aracılı yolak olduğu iddia edilmiştir. MIF fonksiyonları için

muhtemel bir diğerk mekanizma ise katalitik aktivitesidir. MIF tatomeraz, izomeraz ve thiol protein oksidoredüktaz aktiviteleri gösterir. Enzimatik aktivite için protein substratının olduğu gösterilmiştir. MIF ilişkili uyarıda mitojen aktive protein (MAP) kinaz ve aktivatör protein-1 (AP-1)'in ekstraselüler uyarı düzenlenmesinde (ERK 1/2) önemli rolü olduğuna dair yayınlarda mevcuttur (102).

Üveitli hastaların intraoküler sıvılarında anlamlı derecede yüksek MIF olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç da vitreustaki MIF seviyelerinin vitreus inflamasyon aktivitesi ile ilişkili olduğunu ve MIF'in oküler inflamasyonun patofizyolojisinde önemli role sahip olduğunu göstermiştir (94). Fare korneasında MIF mRNA'sının hasar veya enfeksiyon sonrası erken dönemde artmış olduğu gösterilmiştir (103). Ratlarda korneal yara iyileşmesi esnasında MIF, korneal epitelyal hücrelerden ilk üç saatte salgılanmaya başlayarak 48 saat boyunca artmaya devam eder (101). MIF, neovaskülarize korneadan bol miktarda eksprese edilir. İnflamatuvar korneal neovaskülarizasyonda anjiogenik rolü vardır (104).

1. 3. 3. 3. Fibroblast Growth Faktör

Fibroblast growth faktör neovaskülarizasyonun olduğu kornealarda vasküler bazal membrana bağlanmaktadır. Böylelikle korneal anjiogenezi uyarmaktadır. Yeni damarların maturasyon derecelerine göre değişik yoğunlukta bağlanma söz konusudur (105).

1.3.3.4. İnsülin Like Growth Faktör

İnsülin like growth faktör-1'in hayvan modellerinde korneada anjiogenik etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (106).

1.3.3.5. Anjiopoetin

Bir çalışmada anjiopoetin (Ang)-1 ve -2'nin sistemik Tie-2 ile inhibisyonu kornea neovaskülarizasyonunda gerilemeye neden olmuştur. Bu geriletmenin VEGF' den bağımsız olduğu düşünülmektedir (107). Ayrıca ratlarda Ang-2'nin inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu engellediği bildirilmiştir (108).

1.3.3.6. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

MMP'lar çinko bağlayan proteolitik enzim grubudur. ECM yeniden şekillenmesi ve anjiogenezde rol oynamaktadır. 24 değişik MMP tipi bulunmuş, 7 tanesinin korneada varlığı gösterilebilmiştir. Bunlar; kollajenaz I ve III (MMP-1 ve 13), jelatinaz A ve B (MMP-2 ve 9), stromelisin (MMP-3), matrilisin (MMP-7), ve membran tipi MMP (MMP-14). Bu faktörlerin kornea anjiogenezinde arttığı gösterilmişse de anjiogenez regülasyonunda rolü tam olarak bilinmemektedir çünkü aynı molekül hem anjiogenik hem de antianjiogenik faktör olarak davranmaktadır (109,110).

MMP'lerin bu iki yönlü etkisi şöyle açıklanmaya çalışılmaktadır; ECM'i parçalayarak ve endotel hücre invazyonunu kolaylaştırarak anjiogenik etki gösterirler öte yandan anjiogenik özellikleri bulunmayan prekürsörleri parçalayarak antianjiogenik fragmanlar oluşturup antianjiogenik madde üretirler (111).

MMP-2'nin kornea neovaskülarizasyonunda üretiminin arttığı tespit edilmiştir (112).

1.3.3.7. Vasküler Endotelyal Growth Faktör

Homodimerik yapıda, 46 kilodalton ağırlığında olan Vasküler endotelyal growth faktör (VEGF) ilk defa 1983 yılında Senger ve arkadaşları tarafından yüksek düzeyde vaskülarize bir tümörde tanımlanmıştır (113).

VEGF-A; VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental growth faktör (PIGF)'ü içeren gen ailesinin bir üyesidir. Tüm memelilerde kodlanılan diğer peptitlerin aksine VEGF-E pox virüs tarafından kodlanmaktadır. VEGF-C ve VEGF-D lenfanjiogenezde rol oynarken VEGF-A hemanjiogenezde ana regülatör olarak rol oynamaktadır. Ancak son zamanlarda VEGF-A'nın da lenfanjiogenezde rolü olduğu gösterilmiştir.

Vasküler endotelyal growth faktör spesifik bir gen tarafından kodlanır ve yapılarındaki aminoasit sayısına göre belirlenmiş altı farklı izoformu vardır: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206. İnsanlarda en fazla VEGF165 izoformu bulunur ve büyük oranda heparine bağlanarak salınmaktadır (114).

Vasküler endotelyal growth faktör biyolojik aktivitesini temel olarak endotel hücreleri üzerindeki tirozin kinaz yapılı, VEGF reseptör-1 (VEGFR-1) ve VEGFR-2

ile lenf damarları üzerindeki VEGF-R3 adlı üç reseptörü ile gerçekleştirir. Vasküler endotelial growth faktör -R1 ve -R2 büyük ölçüde damar endotel hücrelerinden salınır ve anjiogenez ile damar geçirgenliğinde görev alır.

VEGFR-2 ana VEGF reseptör olarak nitelendirilmektedir ve vasküler endotelial hücreler üzerine VEGF'in proliferatif etkisine aracılık etmektedir. VEGF'in VEGFR-2'ye bağlanması dimerizasyonu ve takip eden reseptörlerin otofosforilasyonu mitojenik ve proliferatif sinyale yol açan intraselüler kinaz alanı aracılığıyla artırır.

Vasküler endotelial growth faktör R-3'ün lenfanjiogenezin moleküler regülasyonundan sorumlu olduğu sanılmaktadır. Vasküler endotelial growth faktörün ayrıca tümör metastazı ve lenfödem gibi patolojik olaylarda da rol aldığı bildirilmiştir (115). Vasküler endotelial growth faktör reseptörlerinin aktivasyonu fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz, guanozin trifosfataz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile eder ve DNA transkripsiyonu başlatılır (116).

Vasküler endotelial growth faktör düzeyi başta Ras ve human epidermal growth faktör reseptör-2 onkogenleri olmak üzere, p53 gen mutasyonu, IL-1, IL-6, IL-10, IL-13, FGF, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α ve nitrik oksit (NO) gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir. Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hipoksi ile indüklenebilen faktör (HIF)-1 de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (117). Vasküler endotelial growth faktörün salınımında en önemli iki faktör hipoksi ve enflamasyondur. Vasküler endotelial growth faktöre maruz kalan damarlarda endotel hücrelerinde fenestrasyon, veziküler organel ve transselüler gap oluşumuyla permeabilite artmaktadır. Vasküler endotelial growth faktörün neden olduğu vasküler permeabilite artışı kemotaksisin ve enflamasyonun devamında da önemlidir (118).

Vasküler endotelial growth faktör endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanında hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan MMP'ler, ürokinaz, doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını uyararak invazyon ve metastazı kolaylaştırır (119). Vasküler endotelial growth faktör, damar endoteli, düz kas hücreleri, arteriollerdeki fibroblastlar, böbrek glomerülleri, bronşlar, overler, adrenal bezler, dalak ve tonsillerde bulunmaktadır (120). Aort düz kas hücrelerinde üretilerek

salınan VEGF büyük damarların intimal hasarı sonrasında intimal onarımı ve büyümei kolaylaştırırken, hasarın uzamasını sınırlayıcı etkiye sahiptir (121). İnsan koroner arterlerinde, aterosklerotik plak bölgesiyle aterosklerotik olmayan bölge karşılaştırıldığında aterosklerotik bölgede VEGF salınımında artış olduğu gösterilmiştir. Vasküler endotelial growth faktörün, aterom plaklarının oluşumunda etkili olduğu düşünülmekte ancak iskemik kalp hastalığında kollateral oluşumunu arttırdığı da bilinmektedir. Bu etkisi dikkate alınarak VEGF'in kardiyovasküler hastalıklarda terapötik etkisi üzerinde durulmaktadır (122). Vasküler endotelial growth faktör tümör büyümesini kolaylaştırmakta ve bu dokulardan fazla miktarda salınmaktadır (120).

1.3.4. Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler

1.3.4.1. Anjiostatin

Anjiostatin 38 kiloDalton ağırlığında, plazminojenin proteolitik parçalanma ürünlerinden olup güçlü bir antianjiogenik faktördür. Esas etkisini VEGF ekspresyonunu azaltarak göstermektedir (123). Anjiostatin ve benzeri fragmanların implantasyonu korneada FGF ve anjiogeninin uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (124). Plazma membranındaki ATP bağlanan anjiostatin endotel yüzeyindeki ATP metabolizmasını baskılar. Böylece endotel hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu azaltır.

1.3.4.2. Endostatin

Endostatin 20 kiloDalton ağırlığında, kollajen XVIII'ün proteolitik parçalanma ürünüdür ve esas olarak damar epitel bazal membranında bulunur. Kollajen XVIII gözde esas olarak retina, lens kapsülü ve korneada bulunur. Etkisini VEGF'in indüklediği tirozin fosforilasyonun engelleyerek, VEGF'in direk endotel hücrelerine bağlanmasını engelleyerek ve VEGF'in indüklediği VEGFR-2/VEGFR-1 aracılı mitojenik olayları baskılayarak olmak üzere üç şekilde gösterir (125). Endostatin, implante edildiği kornealarda bFGF'nin uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (126).

1.3.4.3. Pigment Epiteli Derived Faktör

Pigment epiteli derive faktör (PEDF) güçlü bir antianjiogenik ve nörotrofik faktördür. Gözde retina, iris ve korneada bulunmuştur (127). Pigment epiteli derived faktörü bloke eden antikorlar kornea stromasına yerleştirildiğinde vaskülarizasyonun uyarıldığı tespit edilmiştir (128).

1.3.4.4. Trombospondin-1

Trombospondin (Tsp)-1 gözde kornea, iris, sklera ve retinada üretilir. Korneada Tsp-1 esas olarak kornea epitelinin bazal tabakasında üretilmektedir (129). Trombospondin-1 geninin deneysel olarak hasara uğratıldığı farelerde, korneada enflamasyonun indüklediği anjiogenezin oluştuğu gözlenmiştir (130).

1.4. Aflibercept

Aflibercept VEGFR-1'in ikinci parçası ve VEGFR-2'nin üçüncü parçasının insan IgG Fc kısmı ile kombinasyonu ile oluşturulan VEGF-TRAP bir ajandır. 96.9 kDa ağırlığında dimerik glikoproteindir. Aflibercept şu anda yapılan çalışmalar içinde en yüksek afiniteli VEGF blokörüdür ve VEGF-A'nın tüm izoformları için reseptör tuzağı olarak çalışmaktadır (131). Ranibizumab ve bevacizumaba göre VEGF-A'ya 100 kat fazla afinitesi mevcuttur. VEGF-A'ya yüksek afinitesinin yanısıra potansiyel olarak antianjiogenik etkiyi arttıran PIGF-1 ve PIGF-2'ye de bağlanmaktadır (19). VEGF TRAP'ın diğer bir önemli avantajı ise etkisinin uzun süreli olmasıdır. İntravitreal enjeksiyon sonrası afliberceptin VEGF bağlama kapasitesi 79 günken ranibizumab da bu süre 30 gündür (132). VEGF TRAP, enjeksiyon sonrası irritasyonu azaltıcı formülasyonu ile yaşa bağlı maküla dejenerasyonu ve diyabetik maküler ödem tedavisinde kullanımı güvenli ve tolere edilebilir bulunmuştur. FDA 2011 yılında neovasküler YBMD tedavisinde, 2014 Kasım ayında retinal ven oklüzyonlarına bağlı maküla ödemi tedavisinde, 2015 yılında ise diyabetik maküler ödem tedavisinde kullanımını onaylamıştır (21,133,134).

Ziv-aflibercept (Zaltrap; co-developed by Sanofi- Aventis and Regeneron Pharmaceuticals, Inc, Tarrytown, NY, USA) içindeki yardımcı maddeler ve osmolaritesi dışında aflibercepte benzer özelliktedir (19). Aflibercept 40mg/ml (2mg) iken ziv-aflibercept 100mg/4ml ve 200mg/8ml olan iki forma sahiptir. Aflibercept

isoosmolar iken ziv-aflibercept hiperosmolar özelliktedir (135). Ancak hiperosmolar özellikte olmasına rağmen intravitreal enjeksiyon sonrası intraoküler ve serum osmolaritesini değiştirmemektedir (136). Ziv-aflibercept kullanımı 2012'de oksiplatin bazlı tedavilere dirençli metastatik kolon kanseri tedavisinde FDA tarafından onaylanmıştır (135).

Mansour ve arkadaşların 4 YBMD hastası ve 2 DMÖ hastasıyla yaptığı çalışmada 25 mg/ml (1.25mg) ziv-aflibercept uygulanmıştır. Çalışmada enjeksiyon sonrası görme keskinliğinde artış ve santral foveal kalınlıkta anlamlı azalma izlenirken; inflamasyon, katarakt, retinal toksisite gibi herhangi bir komplikasyon izlenmemiştir (137). Chhablani ve arkadaşlarının santral ven oklüzyonuna saakonder maküler ödemi olan hastalara 1.25 mg aflibercept uygulanmıştır. Bir aylık takip sonrası görme keskinliğinde artış izlenmiş ve herhangi bir komplikasyona rastlanmamıştır (138). Gal-Or ve arkadaşları ile Sella ve arkadaşları tarafından korneal neovaskülarizasyon tedavisinde yapılan çalışmalarda da ziv-aflibercept etkili bulunmuştur (139, 140).

1.5. Adropin

Adropin lipid metabolizmasının regülasyonunda görev alan yeni bir metabolik hormondur. İlk olarak 2008 yılında Kumar ve arkadaşları tarafından beyin ve karaciğer dokusunda izole edilmiştir. Dolaşımda adropin miktarının yükselmesi metabolik strese yanıt olarak meydana gelen glikoz intoleransı ve insülin rezistansını arttırır (141).

Adropin yaklaşık 4.50 kDa molekül ağırlığında ve 76 aminoasitten oluşan bir hormondur. Kanda normal adropin konsantrasyonu 3 ile 10 ng/ml arasında değişiklik göstermektedir.

Kumar ve arkadaşları tarafından yapılan hayvan çalışmalarında adropinin lipid ve glikoz metabolizmasını regüle ederek obezite ilişkili hiperinsülinemi ve hepatosteatoza karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (141).

Diğer bir çalışmada ise streptozosin ile yapılan deneysel diyabetli ratlarda adropin düzeylerinin özellikle pankreas, karaciğer ve böbreklerde belirgin yükseldiği gösterilmiştir (142). Gebelerde yapılan bir çalışmada ise gestasyonel diyabeti olan

gebelerde adropin seviyeleri kord kanında düşük olarak saptanmıştır. Bu da adropinin diyabete karşı koruyucu olduğunu düşündürmektedir (143).

Lovren ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada adropinin metabolik etkilerinin yanısıra endotel fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi non-metabolik olaylarda da rolü olduğu gösterilmiştir (12). Bu çalışmada adropin ile tedavi edilen endotel hücrelerinde proliferasyon, migrasyon, kapiller tüp formasyonunu belirgin olarak arttırdığı, damar permeabilitesi ve TNF'nın indüklediği apoptozisi azalttığı görülmüştür. Ayrıca adropinin endotel için koruyucu etkisi olduğu da belirtilmiştir. Adropin bu etkisini VEGFR-2 fosfotidilinositol 3kinaz AKt ve VEGFR-2 hücre dışı sinyal düzenleyen kinaz yollarını upregüle edip endotelial NO sentezini artırarak göstermektedir. Ayrıca adropin indüklenmiş mürin arka bacak iskemisini takiben kapiller dansiteyi artırmış ve bacak reperfüzyonunu geliştirmiştir (12).

Henüz VEGFR-2 ve adropinin korneal neovaskülarizasyon etyopatogenezindeki etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi desteği ile Göz Hastalıkları, Histoloji ve Embriyoloji, Patoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı'nın katkıları ile gerçekleştirildi. Ağırlıkları ortalama 250-300 gram olan 42 adet Sprague - Dawley cinsi erkek rat çalışmaya alındı. Çalışma süresince denekler Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nde uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Ratlar her bir grupta yedi denek olacak şekilde randomize altı gruba ayrıldı. Ratların beslenmelerini sürdürebilmeleri için sadece sağ göz korneaları %75 gümüş nitratla ve %25 potasyum nitrat ile 10 sn süresince kimyasal koterizasyon yapılarak 2 mm kimyasal yanık oluşturuldu. Yanık sonrası denek kornea ve forniksleri 5 cc serum fizyolojik ile yıkanarak kimyasallar uzaklaştırıldı. Topikal tedaviye yanık işleminden 60 dakika sonra başlandı ve 10 gün devam edildi. Yanık oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan sonra dördüncü, yedinci, onuncu günde denek korneaları fotoğraflanarak değerlendirildi. 11. günde anestezi altında denekler dekapite edilerek korneaları alındı.

Grup I (Kontrol grubu) (n=7); Deney süresi olan 10 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmayan grup.

Grup II (Vaskülarizasyon grubu) (n=7); Yanık sonrası herhangi bir tedavi uygulanmayan grup.

Grup III (Vaskülarizasyon + topikal SF grubu) (n=7); Yanık sonrası 10 gün boyunca her gün 2x1 serum fizyolojik (%0.9 NaCl) damla tedavisi başlatılan grup.

Grup IV (Vaskülarizasyon + Subkonjonktival SF grubu) (n=7); Yanık sonrası 60.dakikada limbusun 1mm gerisinden tek doz 0,08ml subkonjonktival serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan grup.

Grup V (Vaskülarizasyon + topikal Aflibercept grubu) (n=7); Yanık sonrası 10 gün boyunca her gün 2x1 Aflibercept damla (25mg/ml) tedavisi başlatılan grup.

Grup VI (Vaskülarizasyon + subkonjonktival Aflibercept grubu) n=7); Yanık sonrası 60.dakikada limbusun 1mm gerisinden tek doz 0,08ml subkonjonktival 25mg/ml Aflibercept enjeksiyonu yapılan grup.

2.1. Anestezi Tekniği

Anestezi ve analjezi uygulamasında intramusküler 50 miligram/kilogram ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile 5 miligram/kilogram ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu kullanıldı. İşlem öncesi deneklerin kornealarına % 0.5'lik proparakain hidroklorid (Alcaine, Alcon, Fort Worth, Texas, ABD) damlatıldı.

2.2. Cerrahi Teknik

Mahoney ve Waterbury tarafından tarif edilen gümüş nitrat ile koterizasyon tekniği uygulanarak korneal yanık ve neovaskülarizasyon oluşturuldu. Anestezi ve analjezi uygulanan kontrol grubunun dışındaki deneklerin sağ kornea santraline %75 gümüş nitrat ve %25 potasyum nitrat içeren (Nitrate D'argent; Botafarma, Ankara, Türkiye) kalemle 10 saniye süresince koter yapılarak 2 milimetre genişlikte kimyasal yanık oluşturuldu. Yanık sonrası denek kornea ve forniksleri 5 cc SF ile yıkanarak artık kimyasallar uzaklaştırıldı.

Yanık skorları; oluşan yanığın kabarıklığına göre 0 (kornea yüzeyinde kabarma yok), +1 (kornea yüzeyinden hafif kabaran küçük yanık), +2 (kornea yüzeyinden orta derecede kabarmış yanık), +3 (kornea yüzeyinde büyük kabarıklık) şeklinde derecelendirildi. +2 ve üstü yanık skoru oluşan ratlar deneye dahil edildi. Deney süresi tamamlanan ratlara anestezi altında dekapitasyon ve enükleasyon uygulandı.

2.3. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Değerlendirilmesi

Rat korneaları X40 büyütmede yarıklı lamba mikroskopuna monte edilmiş Sony dijital kamera (CCD-IRIS model DXC 107 AP) kullanılarak yanık öncesi, yanık sonrası dördüncü, yedinci ve onuncu günde fotoğraflandı. Fotoğraf üzerinde neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Elektrik Elektronik Bölümü'nün katkılarıyla MATLAB R2015 version b (MathWorks, Natick, Massachusetts, ABD) programı kullanılarak hesaplandı.

Girdi imgesi Hough dönüşümü yardımı ile iris bölgesi belirlendi. Belirlenen bölgeye ilişkin damar bilgileri bulundu. Sırasıyla bulunan damar bilgilerine aşındırma ve genleştirme uygulanarak bölgenin toplam alanı hesaplandı. Hesaplanan damarlı bölge alanı irisin(çemberin) toplam alanına oranlanarak damarlanma yüzdesi elde edildi.

2.4. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop-Wash Bufferda 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. TUNEL Boyama Prosedürü.

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.

2.5. VEGF, VEGFR-2 ve Adropin İmmünohistokimyasal Boyanması

Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block , TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA). PBS ile 3x5 dakika yıkanana dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA–125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilüe edilen adropin ve VEGF primer antikolar (rabbit polyclonal anti-adropin antibody, ab12800; Abcam, Cambridge, UK., vascular endothelial growth factor, E2611, Spring Bioscience, USA) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent [anti-mouse / rabbit IgG], TP–125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, Sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS–125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Negatif kontrol için Rabbit IgG kullanıldı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295).

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6:%51-75, 0.9:%76-100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1:az, +2: orta, +3:şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor= yaygınlık x şiddet

2.6. VEGF, VEGFR-2 ve Adropin ELISA Yöntemi İle Protein Düzeyi Ölçümü

Donmuş kornea doku örnekleri tartıldı ve proteaz ve fosfataz inhibitör içeren Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) lizis buffer içinde çözdürüldü. Dokuların gramı başına 3 ml RIPA lizis buffer kullanıldı. Proteaz ve fosfataz inhibitörü olarak dokunun gramı başına 10 mg/ml fenilmetil sülfonil florit (PMSF) stokundan 10 µl, sodyum ortovanadattan 10 µl, proteaz inhibitör kokteylinden 10 µl olacak şekilde eklendi. Tüm prosedürler +40C'de sürdürüldü ve ardından üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde Bullet Blender doku Homojenizatörü (Next Advanced Inc, Averill Park, NY) kullanılarak homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Homojenize örnekler +40C'de 10000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki süpernatantı alındı ve tekrar santrifüj edilerek temiz bir lizat oluşturuldu. Kornea doku supernatantlarında VEGF ve VEGFR-2 düzeyleri, (Rat VEGF ve VEGFR-2 Elisa kit Cusabio Biotech Co., Ltd. Code: CSB – E04757r Wuhan, CHINA) kataloglarında belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı. Kitin Intra-Assay: CV değeri < 8 % iken, Inter-Assay: CV değeri < 10 % idi. Ölçüm aralığı 3,9-250 pg/ mL, sensitivitesi 0,97 pg/mL idi. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı, absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazı (Awareness Technology Instruments, USA) kullanıldı. Test sonuçları pg /mL olarak belirtildi.

Kornea doku supernatantlarında adropin düzeyleri, (Rat Adropin Elisa kit Yehua Biological Technology Co., Ltd. Katalog no: YHB0047Ra Shanghai, CHINA) kataloglarında belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı. Kitin Intra-Assay: CV değeri <10% iken, Inter-Assay: CV değeri <12% idi. Ölçüm aralığı 10-3000 ng/L, sensitivitesi 5,01 ng/L idi. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı, absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazı (Awareness Technology Instruments, USA) kullanıldı. Test sonuçları ng/L olarak belirtildi.

2.7. Total Antioksidan-Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi

Kornea doku supernatantlarında TAS düzeyleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında otoanalizörle (Siemens Advia 1800 Chemistry System, Siemens, Tokyo, Japonya) Rel Assay Total Antioxidant Status Test Kiti,

REF: RL0017 (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak Prof. Dr. Özcan EREL tarafından tanımlanan yöntemle ölçüldü.

Kornea doku supernatantlarında TOS düzeyleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında otoanalizörle (Siemens Advia 1800 Chemistry System, Siemens, Tokyo, Japonya) Rel Assay Total Oxidant Status Test Kiti, REF:RL0024 (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak Prof. Dr. Özcan EREL tarafından tanımlanan yöntemle ölçüldü.

2.8. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc tukey testi ile yapıldı. $p<0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Korneal Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması

Gruplar arasında korneal neovaskülarizasyon alanı karşılaştırıldığında aflibercept kullanan grupta anlamlı oranda vaskülarizasyonda azalma olduğu izlendi. Günler arasında karşılaştırıldığında ise neovaskülarizasyonun dördüncü günde maksimum olduğu yedinci günde ise anlamlı düzeyde tedaviye yanıt vererek azaldığı görüldü (Tablo 4).

Tablo 4. Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdelерinin ortalama ve standart sapma değeri

Grup	Neovaskülarizasyon (%) (Ort.± SD)	Alanı
Kontrol	0,00±0,00	
Vaskülarizasyon	64,6667±17,55 ^{a*}	
Vaskülarizasyon+topikal SF	62,0000±23,64 ^{a*}	
Vaskülarizasyon+SC SF	63,3333±21,73 ^{a*}	
Vaskülarizasyon+topikal aflibercept	54,6667,2871±5,50 ^{a*b*c*d*}	
Vaskülarizasyon+SC aflibercept	44,33337443±4,04 ^{a*b*c*d*e*}	

a Kontrol grubuna göre,

b Vaskülarizasyon grubuna göre,

c Vaskülarizasyon+topikal SF grubuna göre,

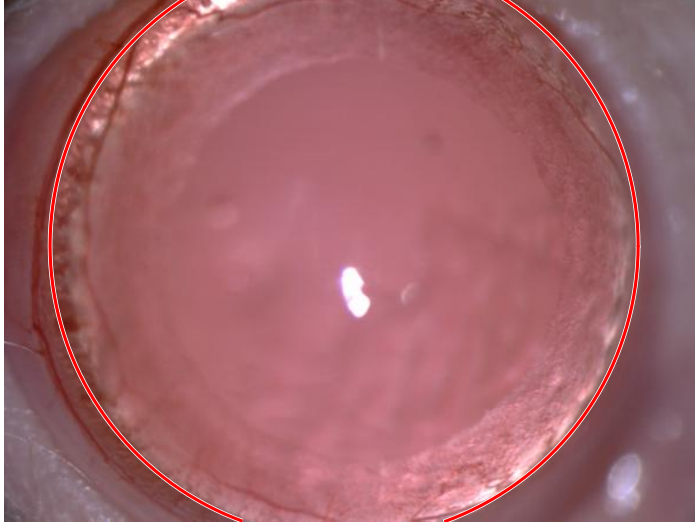
d Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubuna göre,

e Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubuna göre,

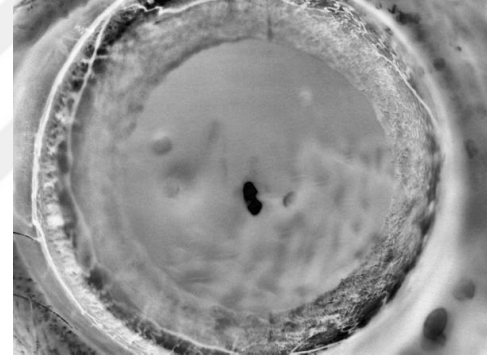
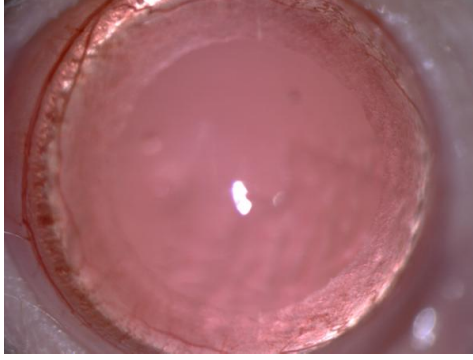
f Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

(*p<0.05)

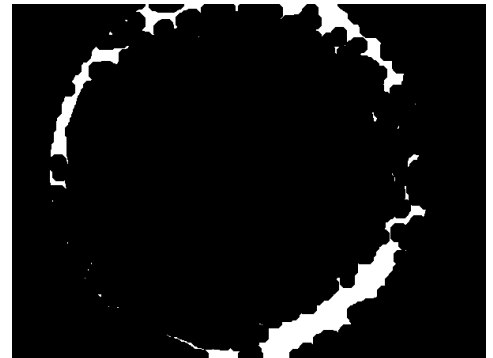
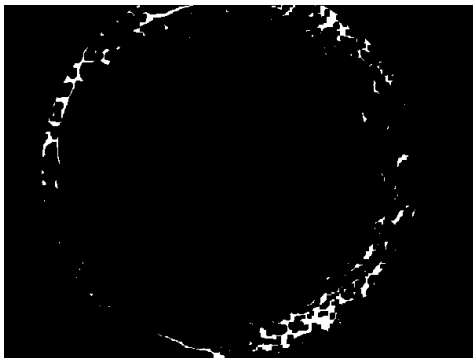
Gruplardaki neovaskülarizasyon hesaplanması aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 4,5,6,7,8).



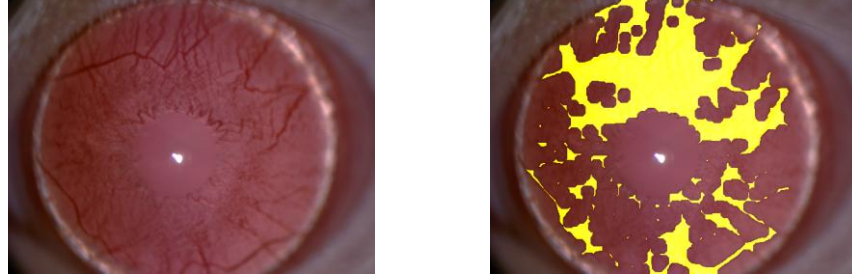
Şekil 4. Vaskülarizasyon grubundaki ratın kornea neovaskülarizasyonu



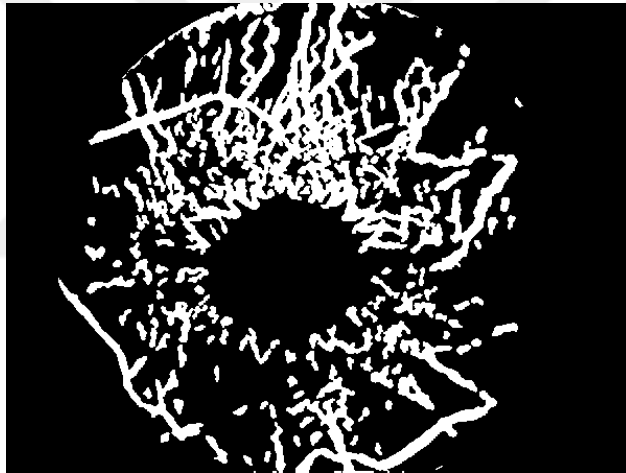
Şekil 5. Vaskülarizasyon grubu 4.gün Girdi İmgesi ve Histogramı eşitlenmiş çıktı imgesi



Şekil 6. Vaskülarizasyon grubu 4.gün damar bilgileri ve genişletilmiş çıktı ve MATLAB R2015 b versionuna göre neovaskülarizasyon alanı hesaplanması



Şekil 7. Vaskülarizasyon 10.gün damar girdi ve damar oranı hesaplanmış çıktı



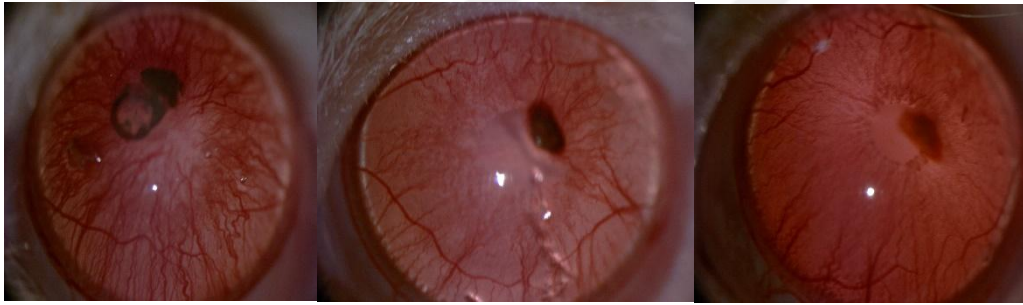
Şekil 8. Vaskülarizasyon grubu 10.gün damar bilgileri ve genişletilmiş çıktı ve MATLAB R2015 b versionuna göre neovaskülarizasyon alanı hesaplanması

Kontrol grubundaki neovaskülarizasyon alanının, vaskülarizasyon ve tedavi gruplarına göre anlamlı düşük olduğu görülürken ($p < 0.01$), aflibercept ile tedavi edilen grupların tümünde vaskülarizasyon grubundan ve SF ile tedavi edilen gruplardan anlamlı ölçüde düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). (Şekil 9,10). Tedavi grupları arasında 10. günde beşinci ve altıncı gruptaki (G5 ve G6) neovaskülarizasyon alanları karşılaştırıldığında subkonjonktival aflibercept yapılan altıncı grupta neovaskülarizasyonun daha belirgin gerilediği gözlenmiştir. Üçüncü ve

dördüncü gruplar (G3 ve G4) arasında neovaskülarizasyon alanları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).



Şekil 9. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF yapılan ratın sırasıyla 4.gün,7.gün ve 10.gün neovaskülarizasyon alanı



Şekil 10. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept yapılan ratın sırasıyla 4.gün,7.gün ve 10.gün neovaskülarizasyon alanı

3.2. TUNEL Boyama

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği birinci grup (G1) ile karşılaştırıldığında ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($p<0.05$). İkinci, üçüncü ve dördüncü gruplar arasında TUNEL pozitifliği açısından anlamlı bir fark yoktu. İkinci grup ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitifliği beşinci ve altıncı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ve kontrole benzerdi ($p<0.05$) (Tablo 5, şekil 11).

Tablo 5. Apoptotik indeks (%)

Grup	Apoptotik indeks (%)
Kontrol	3,50±1,29
Vaskülarizasyon	13,75±2,75 ^{a*}
Vaskülarizasyon+topikal SF	15,75±2,87 ^{a*}
Vaskülarizasyon+SC SF	13,50±1,73 ^{a*}
Vaskülarizasyon+topikal aflibercept	4,25±2,06 ^{b*}
Vaskülarizasyon+SC aflibercept	3,75±0,95 ^{b*}

(Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.)

a Kontrol grubuna göre,

b Vaskülarizasyon grubuna göre,

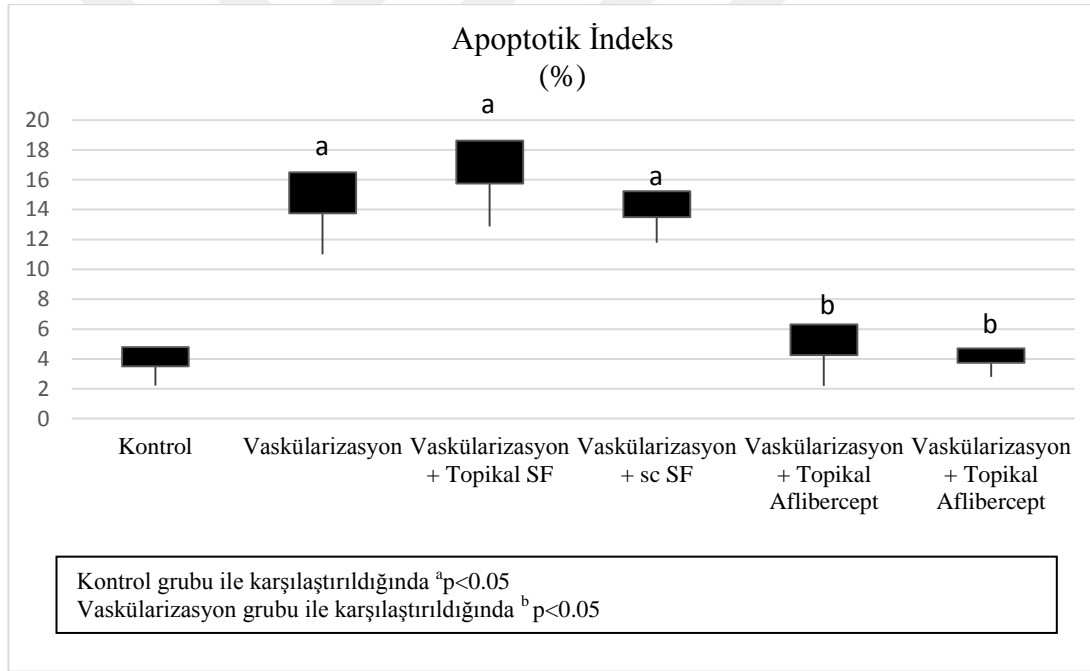
c Vaskülarizasyon+topikal SF grubuna göre,

d Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubuna göre,

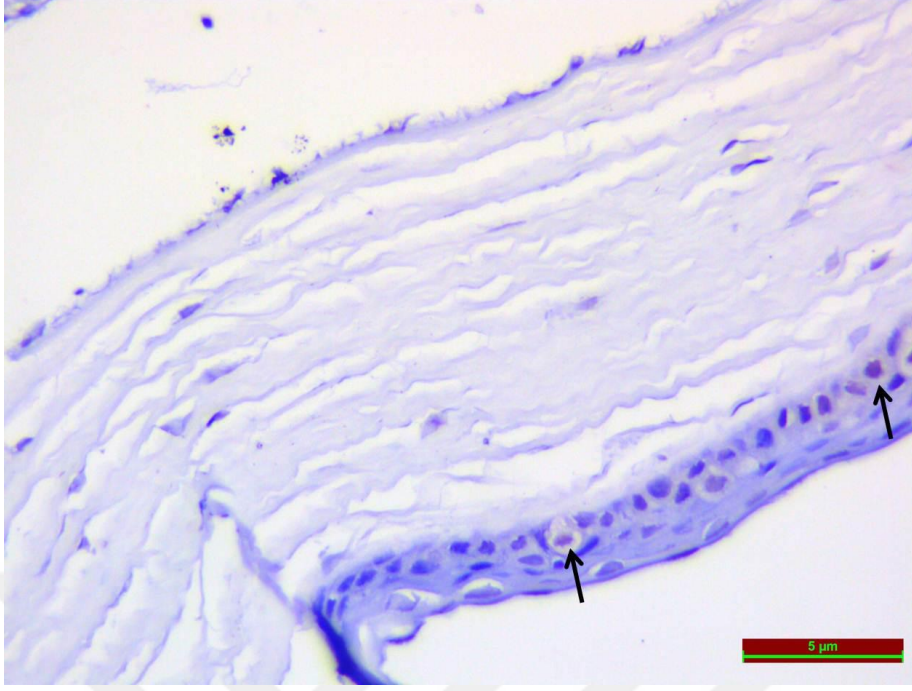
e Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubuna göre,

f Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

(*p<0.05)



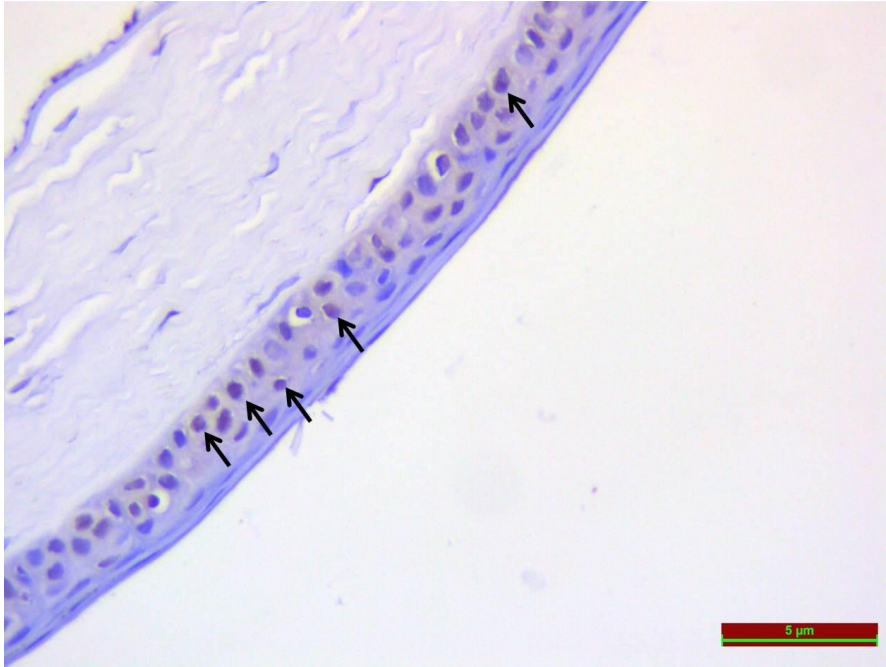
Şekil 11. Apoptotik indeks grafiği



Şekil 12. Kontrol grubunun TUNEL ile boyanması

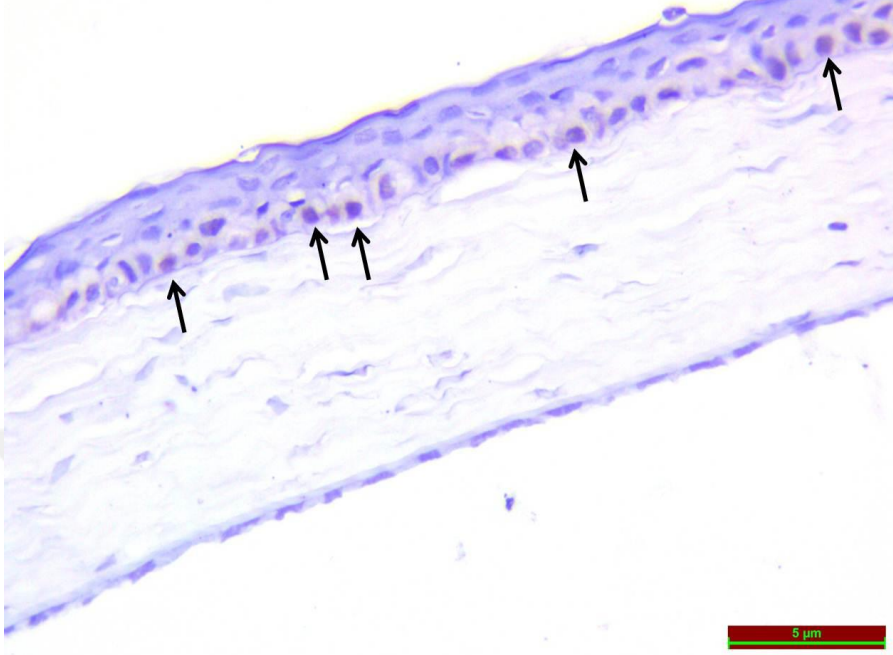
Şekil 12, 13, 14, 15, 16, 17'deki oklar apoptotik hücreleri göstermektedir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ikinci grupta apoptoziste belirgin bir artış vardı. (Şekil13)

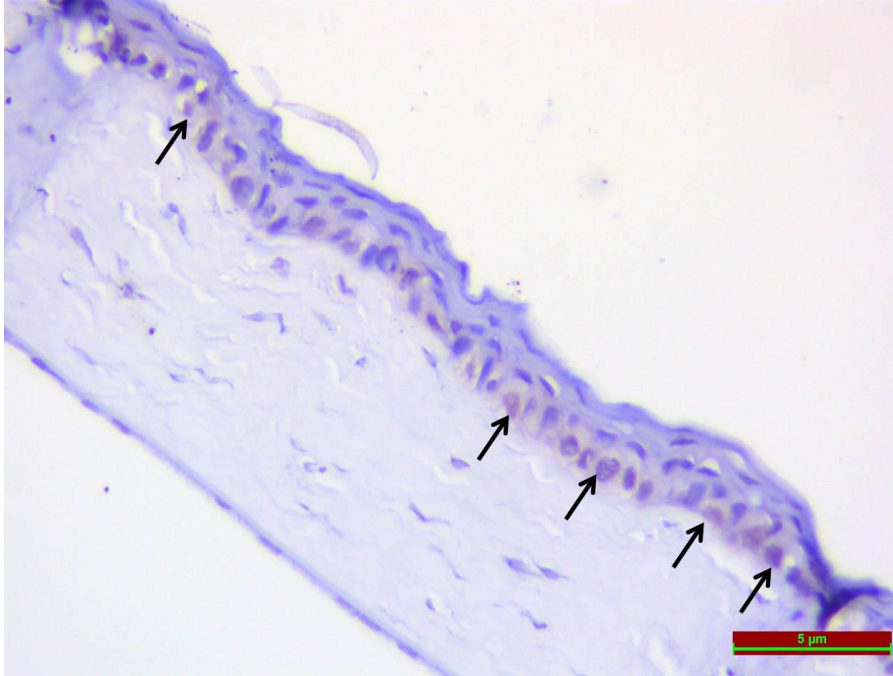


Şekil 13. Vaskülarizasyon grubunun TUNEL ile boyanması

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında üçüncü ve dördüncü grupta yaygınlık ikinci grup ile benzerdi. (Şekil 14-15).

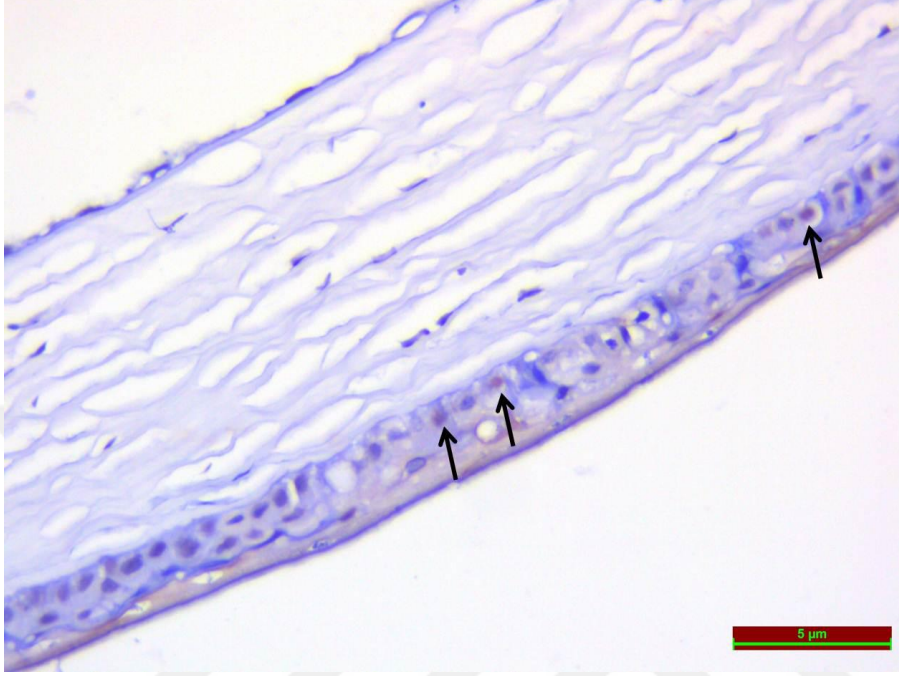


Şekil 14. Vaskülarizasyon + topikal SF grubunun TUNEL ile boyanması

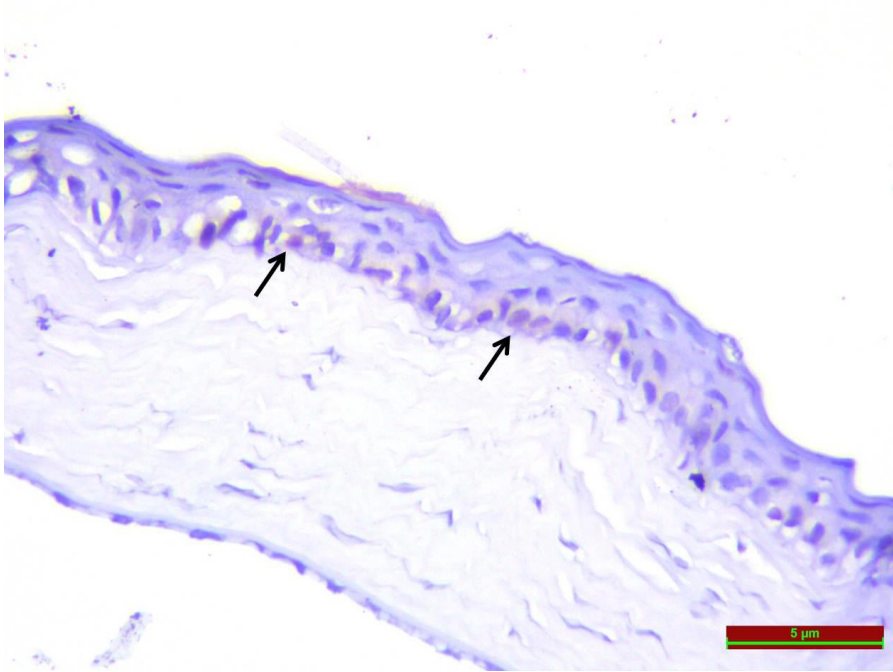


Şekil 15. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubunun TUNEL ile boyanması

Aflibercept verilen tedavi gruplarında ise diğer gruplara göre apoptozisin belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi (Şekil 16 ve 17).



Şekil 16. Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubunun TUNEL ile boyanması

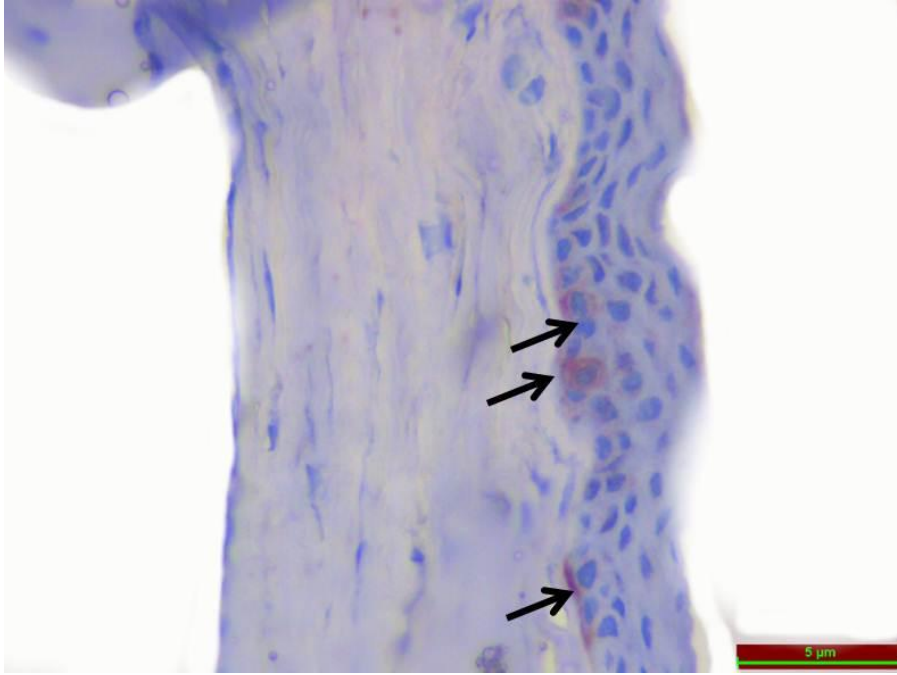


Şekil 17. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubunun TUNEL ile boyanması

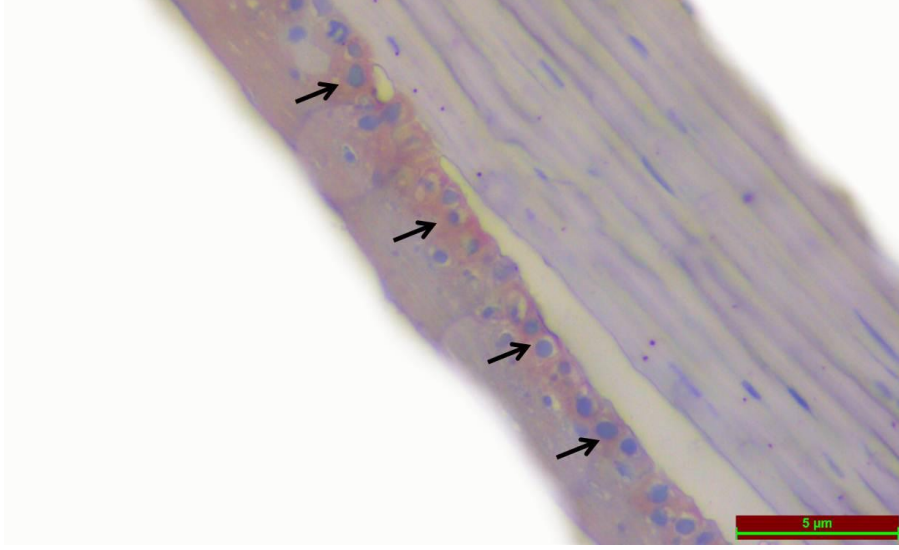
3.3. Korneal VEGF İmmunohistokimyasal Boyanması

VEGF immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında değerlendirilmesi sonucu; birinci grup (şekil 18) ile karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesi ikinci, üçüncü ve dördüncü grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($p<0.05$). (şekil 19,20,21) . İkinci, üçüncü ve dördüncü grup arasında ise VEGF immünreaktivitesi açısından anlamlı bir fark yoktu. İkinci grup ile karşılaştırıldığında VEGF immünreaktivitesi beşinci ve altıncı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ve kontrole benzerdi ($p<0.05$) (şekil 22,23).

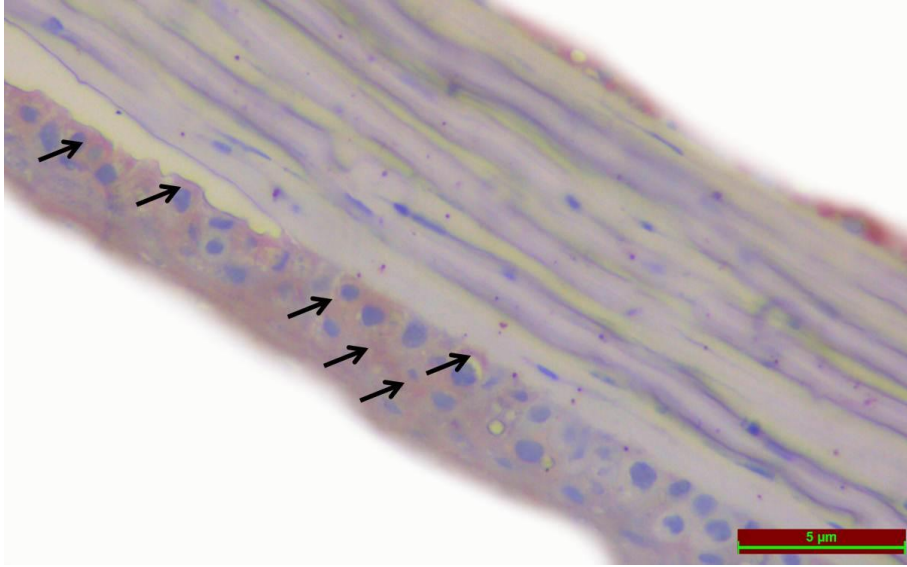
Gruplardaki kornea vasküler endotelin VEGF immünohistokimyasal boya ile boyanması aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



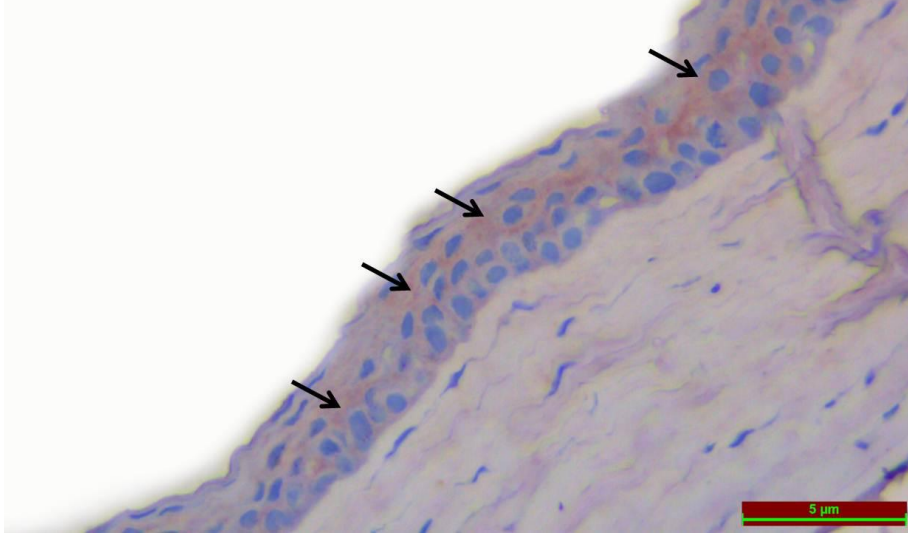
Şekil 18. Kontrol grubundaki rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması.



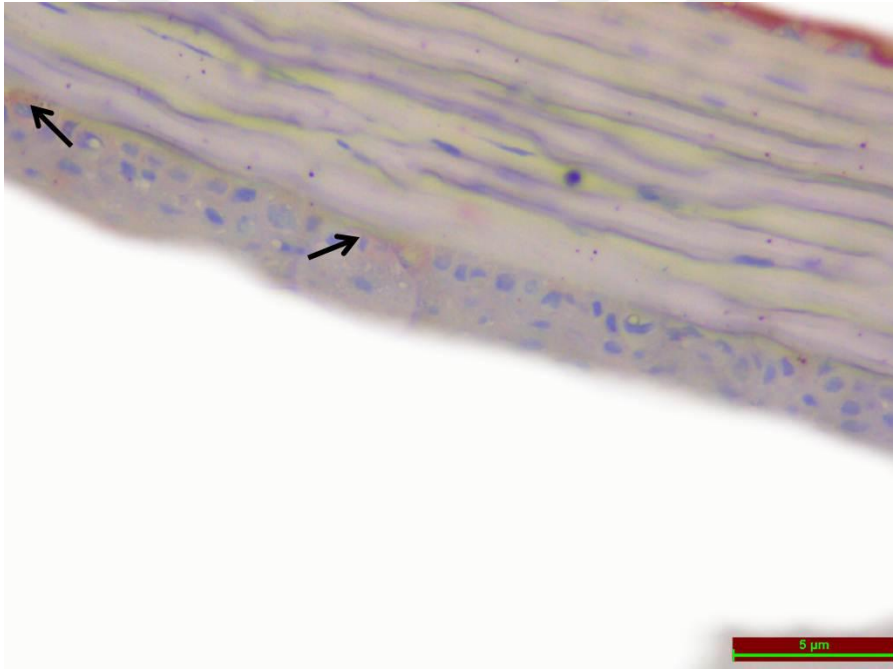
Şekil 19. Vaskülarizasyon grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



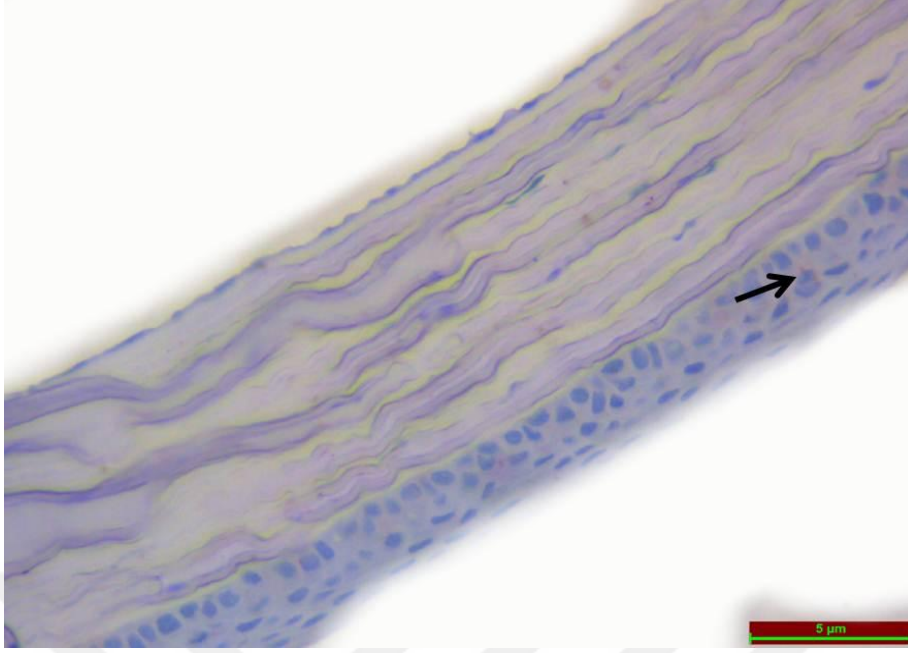
Şekil 20. Vaskülarizasyon + topikal SF grubundaki bir rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 21. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubundaki bir rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



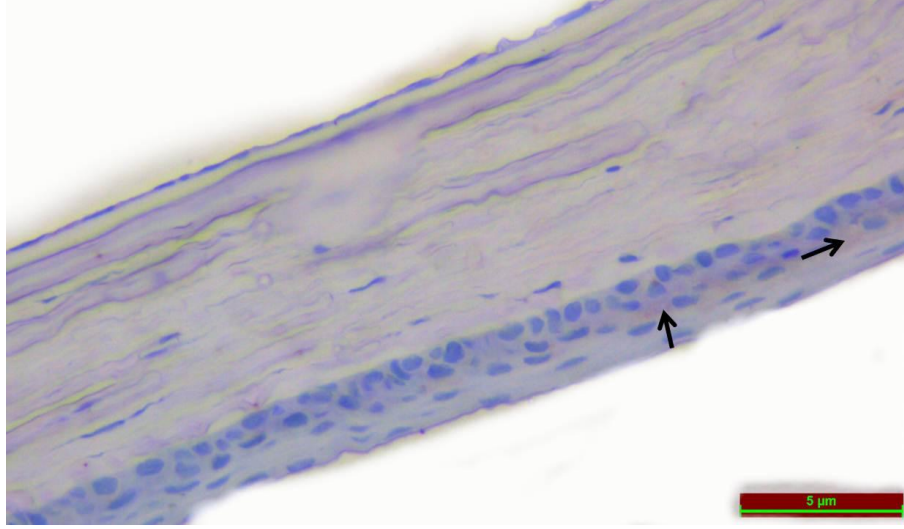
Şekil 22. Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubundaki bir rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



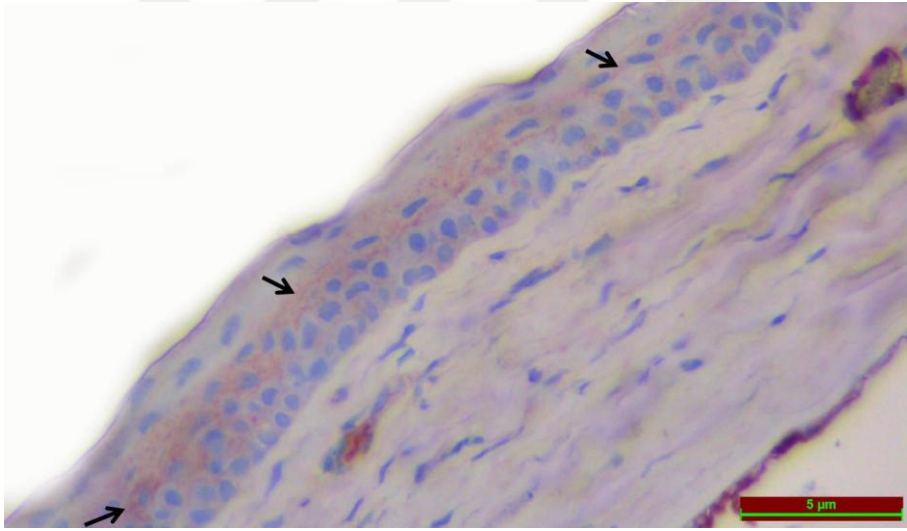
Şekil 23. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubundaki bir rat korneasının VEGF immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGF immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.

3.4. Korneal Adropin İmmünreaktivitesi

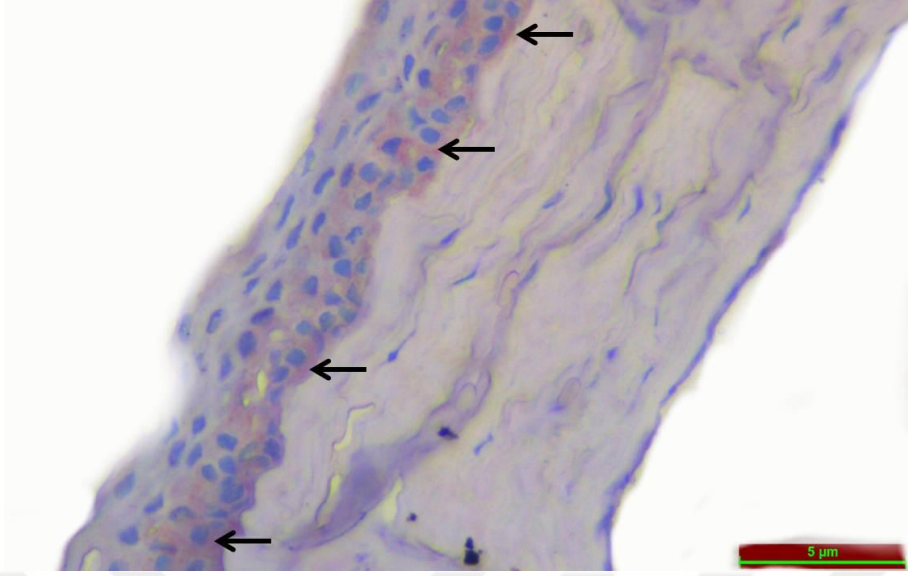
Adropin immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında değerlendirilmesi sonucu; birinci grup (şekil 24) ile karşılaştırıldığında adropin immünreaktivitesi ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($p<0.05$) (şekil 25, 26, 27). İkinci, üçüncü ve dördüncü gruplar arasında adropin immünreaktivitesi açısından anlamlı bir fark yoktu. İkinci grup ile karşılaştırıldığında adropin immünreaktivitesi beşinci ve altıncı grupta (şekil 28,29) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ve kontrole benzerdi ($p<0.05$). Gruplardaki kornea vasküler endotelin adropinin immunohistokimyasal boya ile boyanması aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



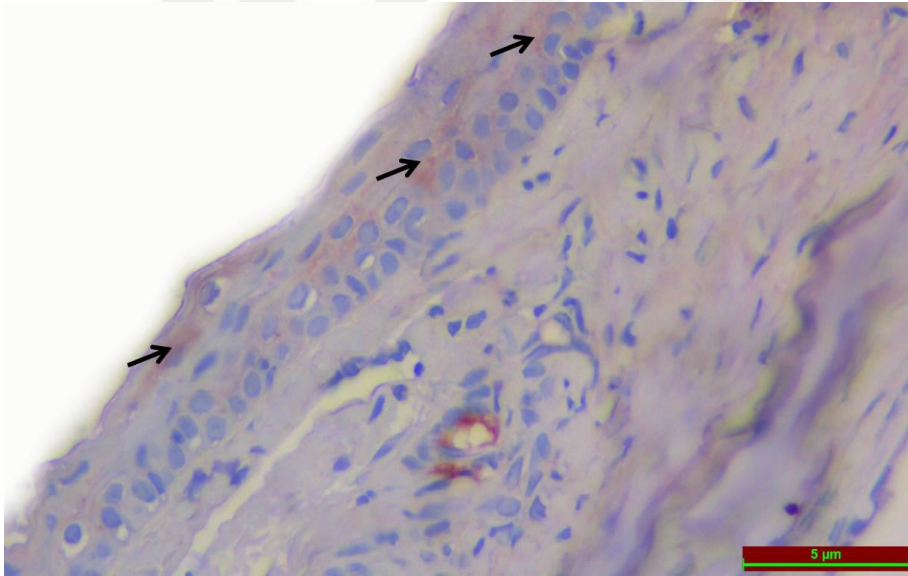
Şekil 24. Kontrol grubundaki rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması.



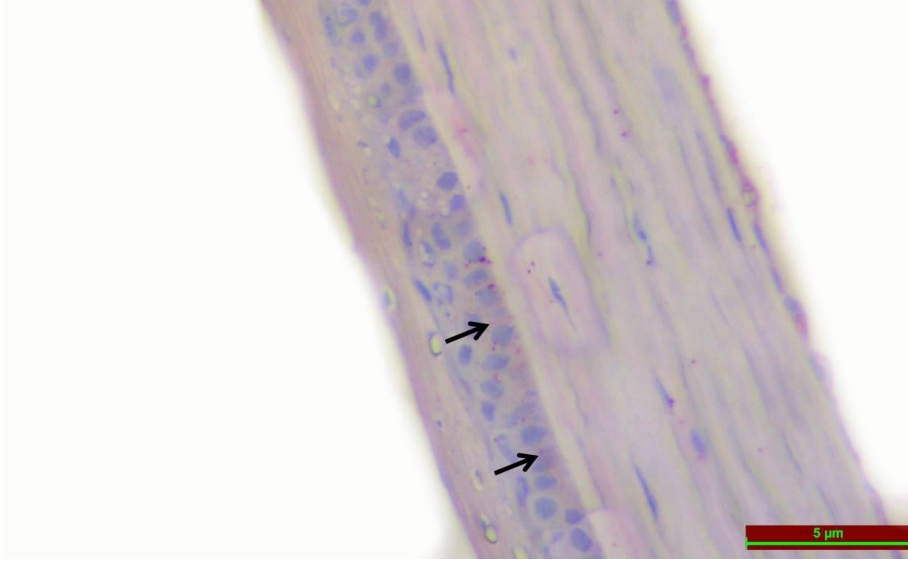
Şekil 25. Vaskülarizasyon grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin adropin immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



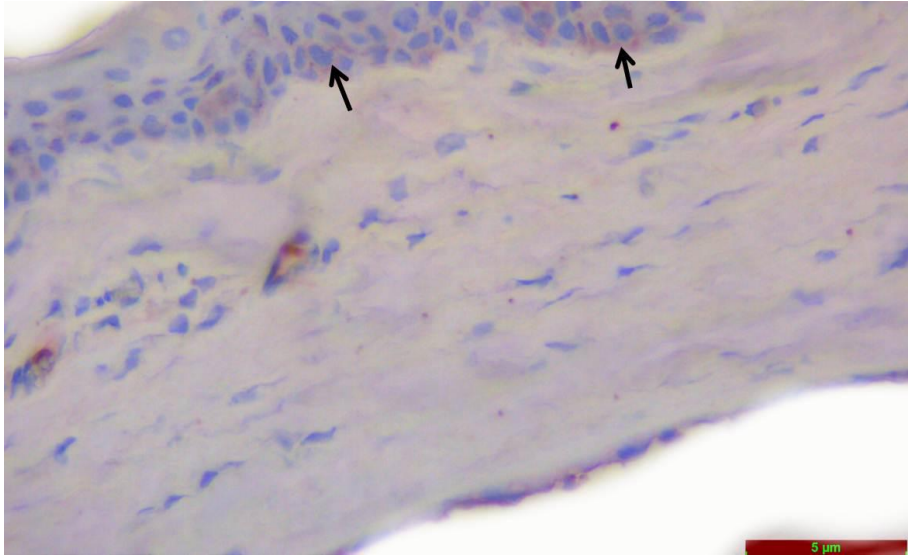
Şekil 26. Vaskülarizasyon+topikal SF grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin adropin immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 27. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin adropin immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 28. Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin adropin immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 29. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubundaki bir rat korneasının adropin immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin adropin immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.

VEGF ve Adropin İmmünreaktivitesi için yapılan boyamanın gruplar arası karşılaştırılması tablo 6'da grafiği şekil 30, 31'de verilmiştir.

Tablo 6. VEGF ve Adropin İmmünreaktivitesi

GRUP	VEGF	ADROPİN
Kontrol	0,46±0,12	0,50±0,14
Vaskülarizasyon	2,47±0,45 ^{a*}	2,25±0,51 ^{a*}
Vaskülarizasyon+topikal SF	2,25±0,52 ^{a*}	2,10±0,73 ^{a*}
Vaskülarizasyon+SC SF	2,40±0,51 ^{a*}	2,32±0,75 ^{a*}
Vaskülarizasyon+topikal aflibercept	0,50±0,08 ^{b*}	0,45±0,15 ^{b*}
Vaskülarizasyon+SC aflibercept	0,45±0,12 ^{b*}	0,37±0,09 ^{b*}

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

a Kontrol grubuna göre,

b Vaskülarizasyon grubuna göre,

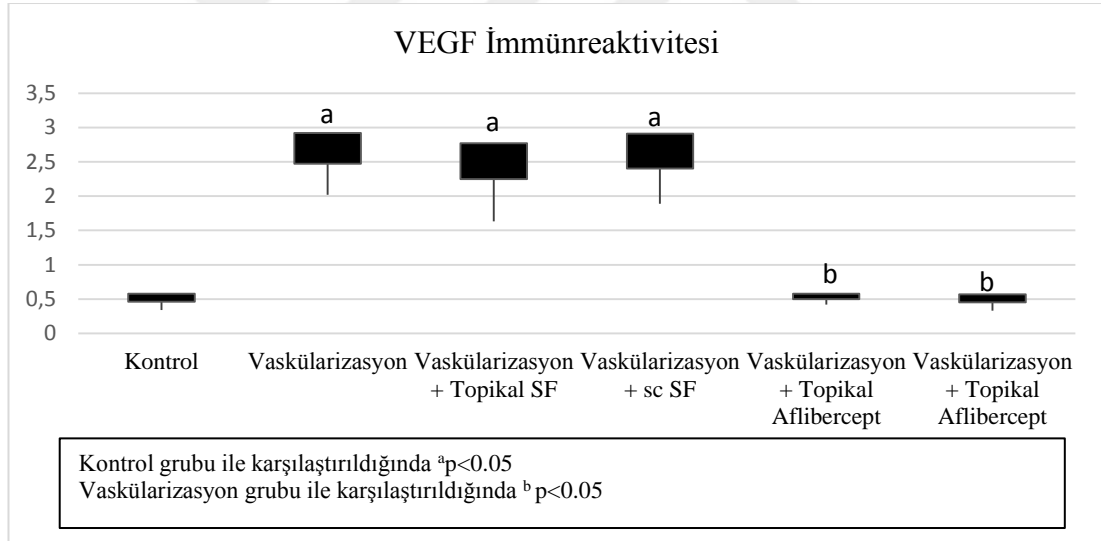
c Vaskülarizasyon+topikal SF grubuna göre,

d Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubuna göre,

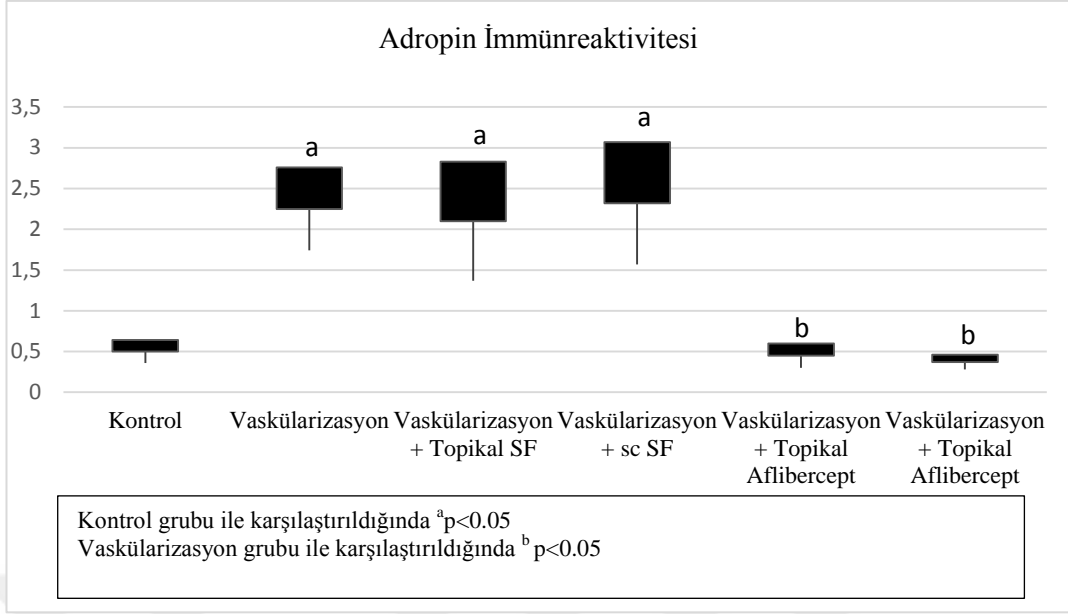
e Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubuna göre,

f Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

(*p<0.05)



Şekil 30. VEGF immünreaktivite grafiği



Şekil 31. Adropin immünreaktivite grafiği

3.5. Korneal VEGFR-2 İmmunohistokimyasal Boyanması

VEGFR-2 reseptör immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında değerlendirilmesi sonucu; birinci grup (şekil 33) ile karşılaştırıldığında VEGFR-2 reseptör immünreaktivitesi ikinci, üçüncü ve dördüncü grupta (şekil 34,35,36) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($p<0.05$). İkinci, üçüncü ve dördüncü gruplar arasında VEGFR-2 reseptör İmmünreaktivitesi açısından anlamlı bir fark yoktu. İkinci ile karşılaştırıldığında VEGFR-2 reseptör immünreaktivitesi beşinci ve altıncı gruplarda (şekil 37,38) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı ve kontrole benzerdi ($p<0.05$).

VEGFR-2 İmmünreaktivitesi için yapılan boyamanın gruplar arası karşılaştırılması tablo 7'de grafiği şekil 32'de verilmiştir.

Tablo 7. Gruplardaki VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanma skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri.

GRUP	VEGFR-2 reseptör
Kontrol	0,53±0,21
Vaskülarizasyon	1,75±0,79 ^{a*}
Vaskülarizasyon+topikal SF	1,80±0,56 ^{a*}
Vaskülarizasyon+SC SF	1,78±0,82 ^{a*}
Vaskülarizasyon+topikal aflibercept	0,42±0,19 ^{b*}
Vaskülarizasyon+SC aflibercept	0,37±0,11 ^{b*}

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

a Kontrol grubuna göre,

b Vaskülarizasyon grubuna göre,

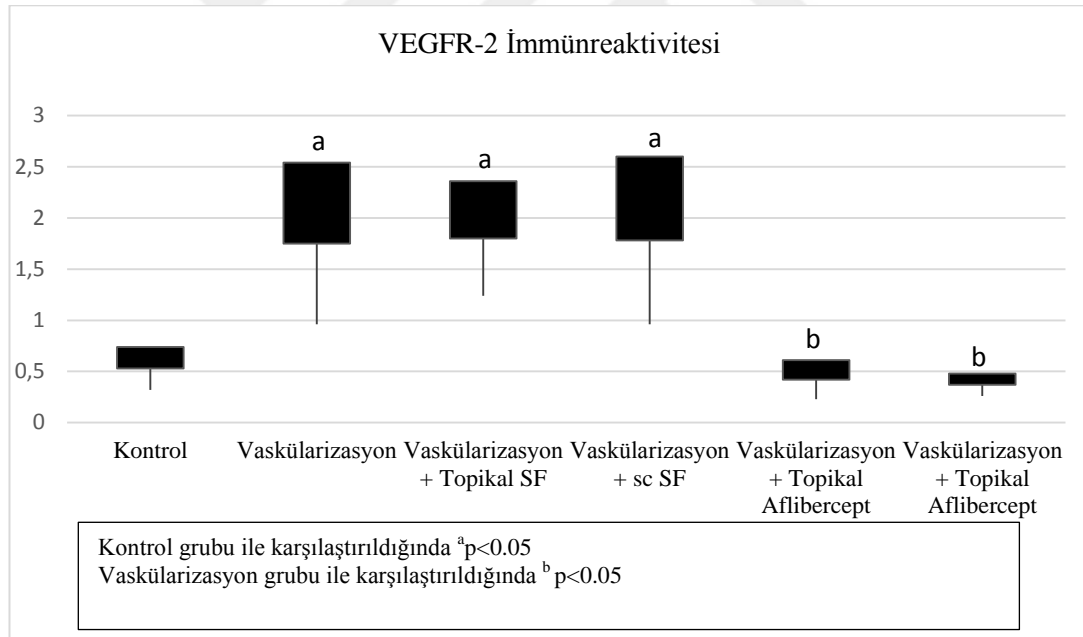
c Vaskülarizasyon+topikal SF grubuna göre,

d Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubuna göre,

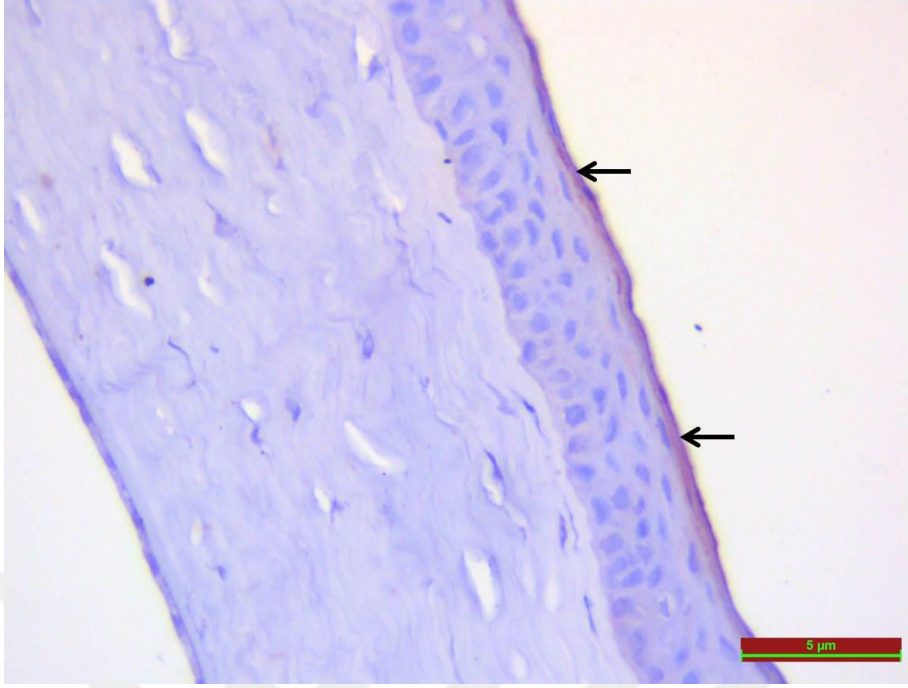
e Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubuna göre,

f Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

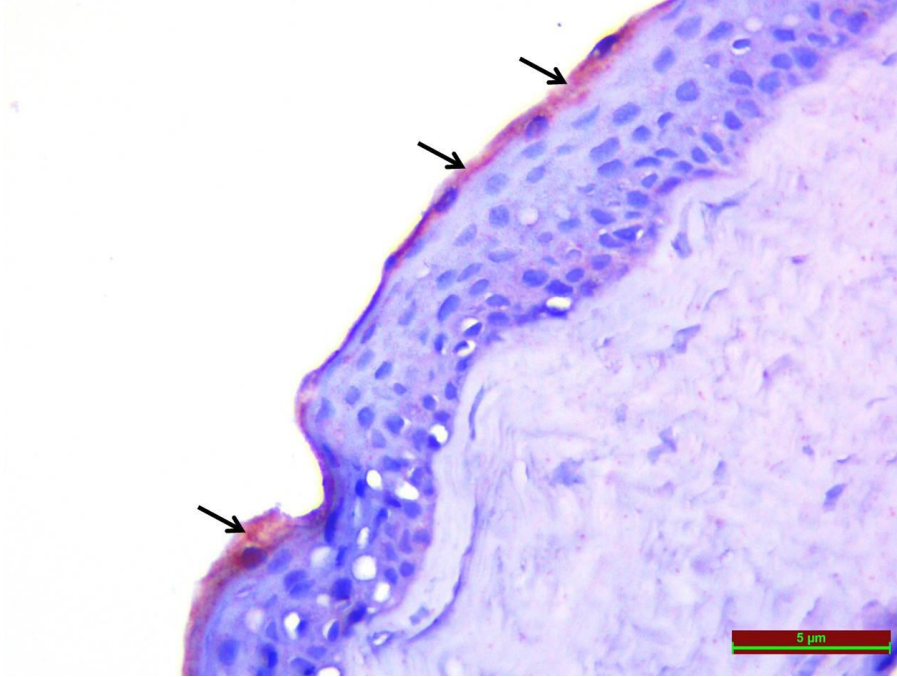
(*p<0.05)



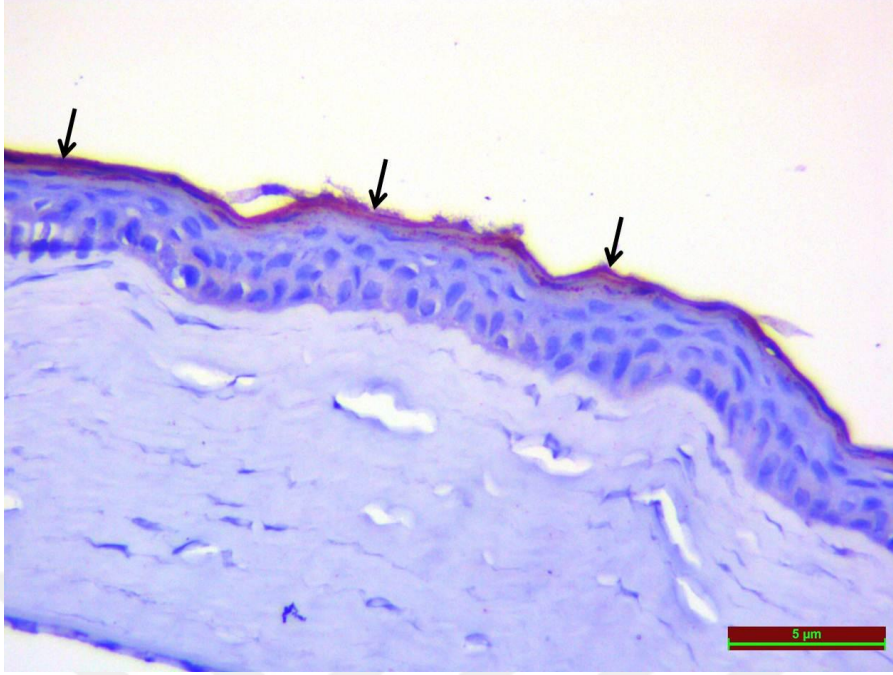
Şekil 32. VEGFR-2 immünreaktivite grafiği



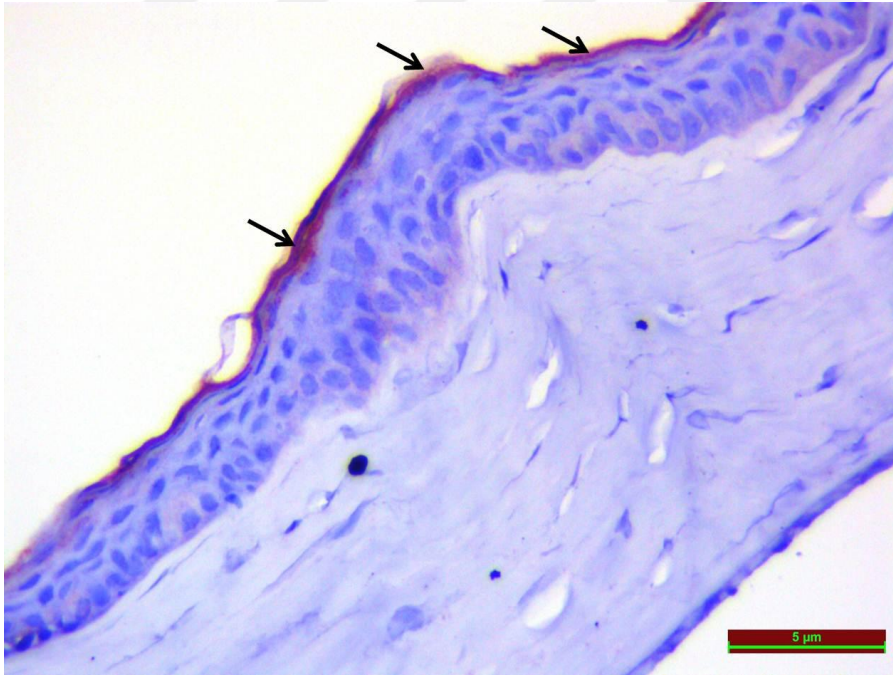
Şekil 33. Kontrol grubundaki rat koronmasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması.



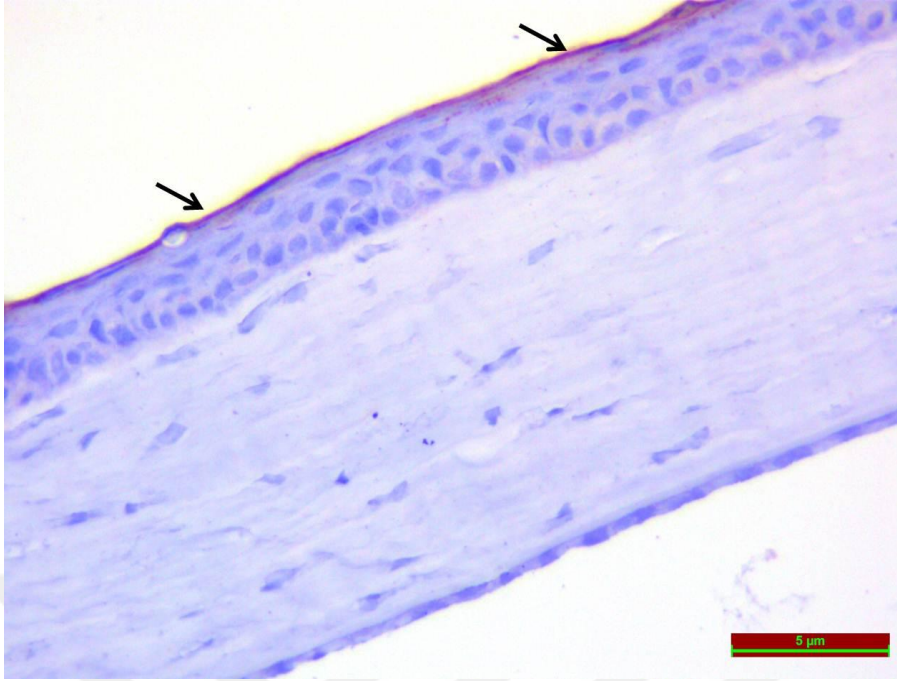
Şekil 34. Vaskülarizasyon grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGFR-2 immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



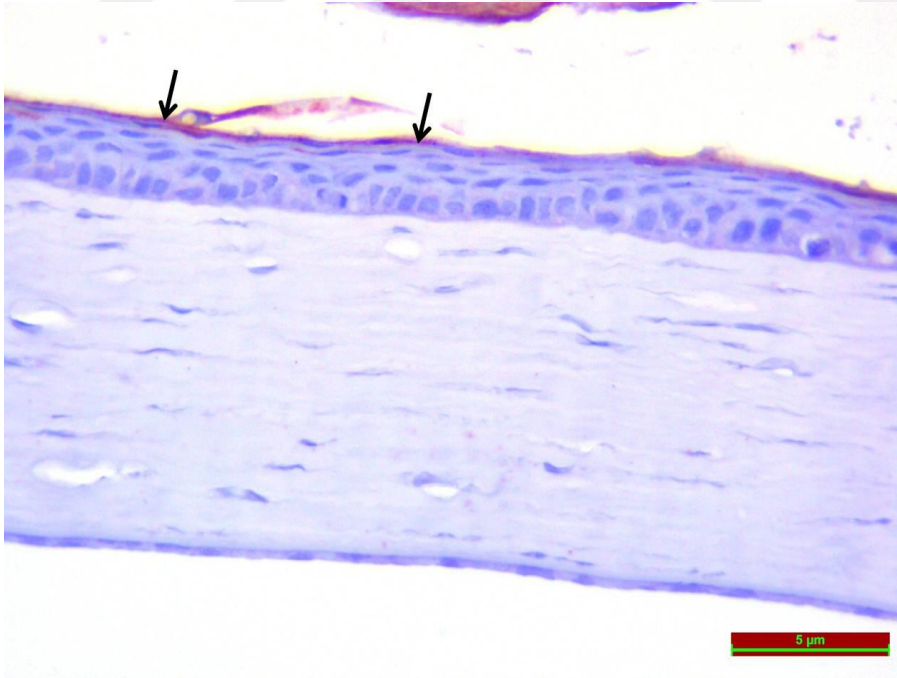
Şekil 35. Vaskülarizasyon+topikal SF grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGFR-2 immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 36. Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGFR-2 immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 37. Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGFR-2 immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 38. Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubundaki bir rat korneasının VEGFR-2 immunohistokimyasal boyanması. Neovaskülarizasyon olan alanda vasküler endotelin VEGFR-2 immunohistokimyasal boya ile boyandığı gözlemlenmiştir.

3.6. Korneal VEGF ELİSA Düzeyleri

Sabit büyüklükteki kornealarda ELİSA yöntemi ile ölçülen VEGF düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo 8, Şekil 39).

Tablo 8. Gruplardaki korneal VEGF ELİSA düzeyleri ve standart sapma değerleri

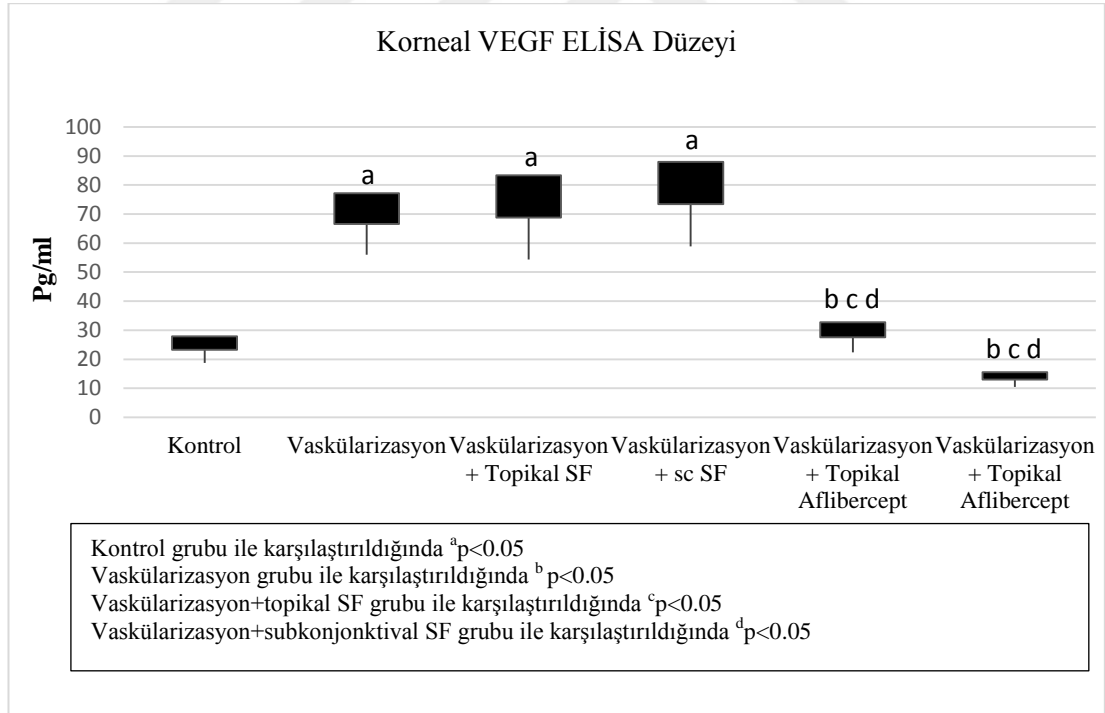
Grup	VEGF Düzeyleri Pg/ml(Ort.±SD)	ELİSA
Kontrol	23,30±4,58	
Vaskülarizasyon	66,59±10,58 a*	
Vaskülarizasyon+topikal SF	68,84±14,53 a*	
Vaskülarizasyon+SC SF	73,45±14,55 a*	
Vaskülarizasyon+topikal aflibercept	27,56±5,15 b* c* d*	
Vaskülarizasyon+SC aflibercept	13,02±2,53 b* c* d*	

a Kontrol grubuna göre,

b Vaskülarizasyon grubuna göre,

c Vaskülarizasyon+topikal SF grubuna göre,

d Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (*p<0.05)



Şekil 39. Korneal VEGF ELİSA düzey grafiği

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında grup 1'deki korneaların VEGF

ELİSA düzeyleri grup 2'den anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü ($p < 0.05$). Grup 3 ve 4'teki VEGF ELİSA düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı ölçüde daha yüksek bulunurken ($p < 0.05$) vaskülarizasyon grubu ile benzer izlendi. Yine Grup 5 ve 6'daki VEGF ELİSA düzeyleri, grup 2, 3 ve 4'ten anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken ($p < 0.05$) grup 1 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Ayrıca grup 5 ve 6 kendi aralarında kıyaslandığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p > 0.05$).

3.7. Korneal VEGFR-2 ELİSA Düzeyleri

Sabit büyüklükteki kornealarda ELİSA yöntemi ile ölçülen VEGFR-2 düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Tablo 9, Şekil 40).

Tablo 9. Gruplardaki korneal VEGFR-2 ELİSA düzeyleri ve standart sapma değerleri

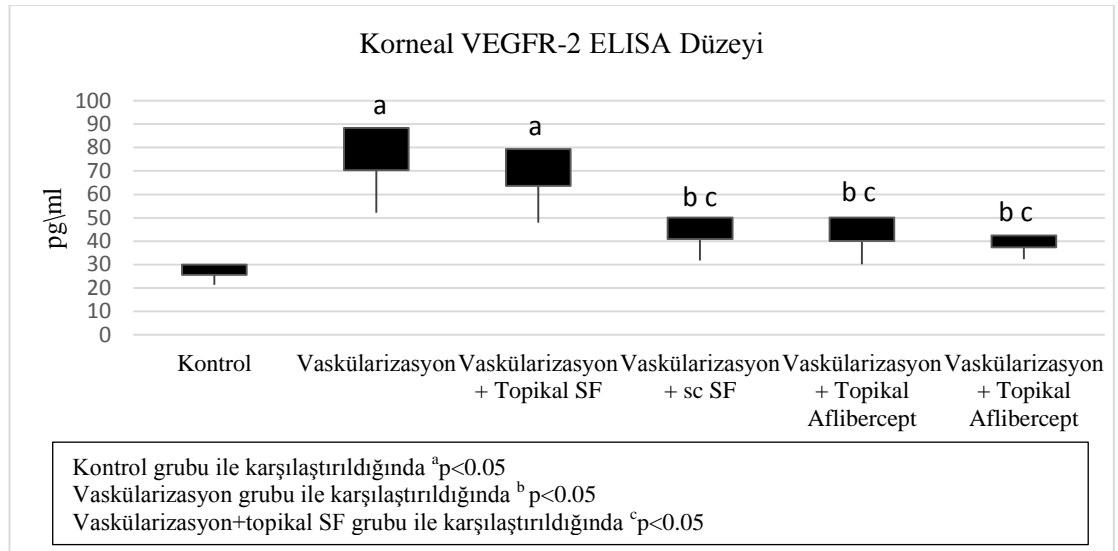
Grup	VEGFR-2 ELİSA Düzeyleri Pg/ml (Ort.± SD)
Kontrol	25,66±4,33
Vaskülarizasyon	70,31±18,11 a*
Vaskülarizasyon+topikal SF	63,67±15,75 a*
Vaskülarizasyon+SC SF	40,88±9,18 b* c*
Vaskülarizasyon+topikal aflibercept	40,09±10,00 b* c*
Vaskülarizasyon+SC aflibercept	37,35±5,11 b* c*

a Kontrol grubuna göre,

b Vaskülarizasyon grubuna göre,

c Vaskülarizasyon+topikal SF grubuna göre,

d Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (* $p < 0.05$)



Şekil 40. Korneal VEGFR-2 ELİSA düzey grafiği

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında G1'deki korneaların VEGFR-2 ELİSA düzeyleri grup 2'den anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). G3'deki VEGFR-2 ELİSA düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı ölçüde daha yüksek bulunurken ($p<0.05$) vaskülarizasyon grubu ile benzer izlendi. Yine G5 ve G6'daki VEGFR-2 ELİSA düzeyleri, G2, G3'ten anlamlı ölçüde daha düşük bulunurken ($p<0.05$) G1 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Ayrıca grup 5 ve 6 kendi aralarında kıyaslandığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$).

3.8. Korneal Adropin ELİSA Düzeyleri

Sabit büyüklükteki kornealarda ELİSA yöntemi ile ölçülen adropin düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo 10).

Tablo 10. Gruplardaki korneal adropin ELİSA düzeyleri ve standart sapma değerleri

Grup	Adropin ELİSA Düzeyleri Ng/L (Ort.± SD)
Kontrol	751,1471±98,7882
Vaskülarizasyon	843,7629±100,1640
Vaskülarizasyon+topikal SF	861,3286±122,5744
Vaskülarizasyon+SC SF	815,3800±56,8180
Vaskülarizasyon+topikal aflibercept	683,6114±128,2752
Vaskülarizasyon+SC aflibercept	808,4343±99,7920

a Kontrol grubuna göre,

b Vaskülarizasyon grubuna göre,

c Vaskülarizasyon+topikal SF grubuna göre,

d Vaskülarizasyon+subkonjonktival SF grubuna göre,

e Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubuna göre,

f Vaskülarizasyon+subkonjonktival aflibercept grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (* $p<0.05$)

3.9. Korneal TAS TOS Düzeyleri

Sabit büyüklükteki kornealarda bakılan TAS düzeyleri 6. grupta, 5. grup hariç diğer tüm gruplara göre anlamlı düşük olduğu görülürken ($p<0,05$), TOS düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo 11).

Tablo 11. Gruplardaki korneal TAS ve TOS düzeyleri ve standart sapma değerleri

Grup	TAS Düzeyleri Pg/Protein (Ort.± SD)	TOS Düzeyleri
Kontrol	2,8386±0,4182	4,5586±2,6440
Vaskülarizasyon	2,1043±1,1576	2,2000±2,1671
Vaskülarizasyon+topikal SF	2,9243±1,0940	2,8614±1,0146
Vaskülarizasyon+SC SF	2,1271±1,1449	2,5143±2,8483
Vaskülarizasyon+topikal aflibercept	1,6314±0,9833	3,3329±1,6087
Vaskülarizasyon+SC aflibercept	0,3529±0,1848	3,4757±2,6982

a Kontrol grubuna göre,

b Vaskülarizasyon grubuna göre,

c Vaskülarizasyon+topikal SF grubuna göre,

d Vaskülarizasyon+subkonjunktival SF grubuna göre,

e Vaskülarizasyon+topikal aflibercept grubuna göre,

f Vaskülarizasyon+subkonjunktival aflibercept grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.
(*p<0.05)

4. TARTIŞMA

Kornea avasküler ve transparan özellikte bir dokudur. Korneal neovaskülarizasyon ciddi patolojik koşullarda ortaya çıkar ve sonuçta korneanın normal yapısını bozarak çeşitli istenmeyen sonuçlara neden olur. Birçok korneal hastalığın patogeneğinde de korneal vaskülarizasyon önemli bir yer tutmaktadır. Prekorneal plexustan korneaya doğru ilerleyen venüller ve kapillerler görme keskinliğini tehdit edebilir, keratoplasti sonrası grefon ömrünü azaltabilir. Ayrıca inflamasyon, korneal ödem ve skara neden olmaktadır (144).

Korneal neovaskülarizasyon iskemi, travma, kimyasal yanıklar ve inflamasyona sekonder oluşmaktadır ve yaklaşık her yıl 1,4 milyon insanı etkileyerek dünyadaki en önemli körlük nedenlerinden birini oluşturmaktadır (89). Bu kadar geniş popülasyonda sağlık problemi oluşturması korneal neovaskülarizasyon tedavisini oldukça önemli bir konuma taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda, korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde kortikosteroidler, nonsteroid antiinflamatuvarlar, siklosporin A, somatostatin analogları, askorbik asit, talidomid, rapamisin ve metotreksatin kullanıldığı bildirilmektedir (17,145-148). Ayrıca laser fotokoagülasyon, diatermi ve fotodinamik tedavi gibi yöntemler de korneal neovaskülarizasyonun tedavisinde kullanılmaktadır (13,149,150). Ancak bu yöntemlerin tedavide kullanımları çeşitli komplikasyonlar, maliyet yüksekliği ve başarısızlık gibi nedenlerden dolayı kısıtlanmıştır. Daha da önemlisi bu tedavilerin önemli bir kısmı anjiogenezde etkili moleküler medyatörlere etkili değildir.

Son dönemlerde yapılan çalışmalarda antianjiogenik tedavinin ileride umut vaat edici olduğunu göstermektedir. Özellikle anti-VEGF ajanların kullanımı başarılı sonuçlar vermektedir.

Hipoksik ortamda, endotel hücrelerinden oldukça fazla düzeyde salgılanan VEGF, sadece pro-anjiogenik faktör olarak değil aynı zamanda güçlü bir trofik faktör, yani damar endotel ve bazal membranlarını uyararak hasarlı ve/veya sağlıklı konumdaki normal hücre fonksiyonlarının yenilenmesini de sağlamaktadır (151). Bazı araştırmacılar, alkali yanıklarında humör aközde VEGF düzeylerinde artış bulmuşlardır (152). Alkali yanıklarında görülen ve altta yatan endotelial harabiyetin asıl nedeninin, iskemiden kaynaklanan büyüme faktörünün enflamatuvar sitokinleri

aşırı arttırarak NO düzeyini değiştirip damarsal enflamasyona yol açması olarak ifade edilmiştir. Keza, neovaskularizasyon esnasında anjiogenik faktörlerde artış anti anjiogenik faktörlerde ise azalış görülür (144). Biz de çalışmamızda korneal yanık oluşturmak için gümüş nitrat ile koterizasyon tekniğini kullanarak alkali yanık meydana getirdik. Böylelikle yüksek VEGF düzeyleri oluşturarak anti-VEGF tedavinin etkinliğini belirgin olarak gösterebilmeyi amaçladık.

Vasküler endotelyal growth faktörün salınımında en güçlü uyaranlar enflamasyon ve hipoksidir. VEGF, tavşanlarda kornea neovaskularizasyonunu tetikleyen önemli bir etken olarak tespit edilmiştir (9). Yapılan çalışmalarda neovaskularize insan kornealarında hem VEGF hem de reseptörleri normalden daha fazla konsantrasyonda bulunmuştur. Deneysel hayvan çalışmalarında VEGF antagonistlerinin hem kornea neovaskularizasyonunda azalmaya hem de kornea greft ömründe azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (153).

Korneada anjiogenik-antianjiogenik dengenin anjiogenik yönde bozulması özellikle de anjiogenik özellikte olan büyüme faktörlerinin düzeylerinin artması korneal yeni damar oluşumunda önemli rol oynamaktadır (154). Bu büyüme faktörlerinden VEGF, doğrudan damar endoteli üzerinde etkili olduğu için büyük öneme sahiptir. VEGF; makrofajlar, T hücreleri, retina pigment epitel hücreleri, düz kas hücreleri, tümör hücrelerinde ve özellikle korneal epitel ve korneal endotelyal hücrelerden başta hipoksi olmak üzere, çeşitli çevresel faktörlerin uyarısı ile salgılanır (155). Korneanın enflamatuar hastalıkları, kontakt lens kullanımı, hipoksi, kimyasal travmalar ve keratitler gibi gözle ilgili birçok klinik durumda VEGF salınımının arttığı gösterilmiştir (156). VEGF165, gözdeki neovaskularizasyonla en çok ilişkili olan VEGF-A'nın bilinen altı izoformundan birisidir ve etkisini özellikle VEGFR-2 üzerinden göstermektedir.

Aflibercept VEGFR-1'in ikinci parçası ve VEGFR-2'nin üçüncü parçasının insan IgG Fc kısmı ile kombinasyonu ile oluşturulan VEGF-TRAP bir ajandır. Aflibercept şu anda yapılan çalışmalar içinde en yüksek afiniteli VEGF blokörüdür ve VEGF-A'nın tüm izoformları için reseptör tuzağı olarak çalışmaktadır (131). VEGF-A'ya yüksek afinitesinin yanı sıra potansiyel olarak antianjiogenik etkiyi artıran PIGF-1 ve PIGF-2'ye de bağlanmaktadır. VEGF TRAP'ın diğer bir önemli avantajı ise etkisinin uzun süreli olmasıdır. Ziv-aflibercept içindeki yardımcı

maddeler ve osmolaritesi dışında aflibercepte benzer özelliktedir. Ancak maliyet bakımından daha ucuzdur. Hem aflibercept hem de ziv-afliberceptle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Ruti Sella ve arkadaşları tarafından 44 adet Sprague Dawley cinsi ratlarda gümüş nitrat ve potasyum nitrat ile oluşturulan korneal neovaskülarizasyon modelinde topikal ziv-aflibercept ve bevacizumabın etkisini karşılaştırmak amacıyla 3 adet grup oluşturulmuştur. Tüm gruplara koterizasyon sonrası yedi gün boyunca günde iki kez topikal tedavi uygulanmış; gruplar birinci, yedinci ve onuncu günde fotoğraflanarak neovaskülarizasyon oranı, kornea epitelinin durumuna bakılmış; 10. Günde ise gözler enükle edilerek immunohistokimyasal boyanma özellikleri, CD-31 ve CD-68 düzeyleri değerlendirilmiştir (140). Neovaskülarizasyon alanı ziv-aflibercept kullanılan grupta dördüncü gün 7.38 ± 2.23 , yedinci gün 21.73 ± 14.59 , 10.günde ise 31 ± 23.61 olarak bulunurken bevacizumab kullanan hastalarda bu oran sırayla 21 , 51 ± 15.50 ve 54.4 ± 11.33 olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 7. ve 10.günde ziv-aflibercept kullanılan grupta kontrol ve bevacizumab grubuna göre neovaskülarizasyonda anlamlı azalma izlenirken bevacizumab ve kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda topikal ziv-afliberceptle tedavi edilen grubun SF ile tedavi edilen kontrol gruplarına göre neovaskülarizasyon alanında anlamlı düzeyde azalma olduğu tespit edilmiştir. ($p < 0.05$) Çalışmamızda neovaskülarizasyon alanı yedinci güne kadar belirgin azalmaya devam ederken yedinci günden sonra neovaskülarizasyonda serum fizyolojik verilen gruplardan daha az olmakla birlikte hafif artış izlenmiştir. Bu sonuç bize tedavinin özellikle ilk bir hafta içerisinde daha etkili ve hızlı sonuç verdiğini daha sonra etkisinin hafif azalarak belli düzeye sabitlendiğini göstermektedir. Ancak bu sonucun teyit edilebilmesi için daha uzun dönemli çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir.

Orly Gal-Or ve arkadaşlarının 31 adet Sprague Dawley cinsi ratlarda yaptığı bir çalışmada ise gümüş nitrat ve potasyum nitrat ile korneal neovaskülarizasyon modeli oluşturularak subkonjonktival ziv-aflibercept ve bevacizumabın etkisini karşılaştırmak amacıyla ratlar üç eşit gruba ayrılmıştır (139). Neovaskülarizasyonun üçüncü günde başladığı, yedi ile dokuzuncu günlerde ise maksimum seviyeye ulaştığı görülmüştür. Ziv-aflibercept ile tedavi edilen grupta kontrol ve bevacizumab

ile tedavi edilen gruba göre anlamlı azalma izlenirken bevacizumab grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma izlenmemiştir. Bizim çalışmamızda neovaskularizasyonun benzer olarak 7. ve 10. günlerde maksimum seviyeye ulaşmıştır. Ancak çalışmaya üç hafta boyunca devam edilmediği için 10.günden sonraki değişimler izlenememiştir. Yine bu çalışmaya benzer olarak subkonjonktival aflibercept ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür. Bu çalışmadaki immunohistokimyasal boyama sonuçları aflibercept ve bevacizumab tedavisi alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise VEGF ve VEGFR-2 immünreaktivite düzeyleri değerlendirilmiş aflibercept tedavi alan grupta bu çalışma ile benzer olarak anlamlı düzeyde azalma izlenmiştir.

Çalışmamızda VEGFR-2 düzeyi immünohistokimyasal boyamada korneal neovaskularizasyon oluşturulan grupta belirgin olarak artmış, tedavi verilen gruplarda ise anlamlı düzeyde azalma izlenmiştir. Bu sonuç kornea neovaskularizasyon etyolojisinde VEGFR-2'nin rolü olduğunu göstermiştir. Ayrıca çalışmamızda yer alan adropinin, etkisini VEGFR-2 üzerinden göstermesi bu sonucu önemli kılmaktadır.

Yi-Ryeong Park ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise 12 tavşanın 24 gözünde ipek sütür ile korneal neovaskularizasyon oluşturulmuştur (157). Dört tane grup oluşturularak birinci gruba topikal %0,1 aflibercept, ikinci gruba topikal %0.01 aflibercept, üçüncü gruba topikal %0,1 bevacizumab, dördüncü gruba ise topikal serum fizyolojik uygulandıktan sonra karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anti-VEGF tedavi alan tüm gruplarda neovaskularizasyonda anlamlı azalma izlenmiştir. %0,1 aflibercept ile %0,1 bevacizumab karşılaştırıldığında neovaskularizasyon alanında anlamlı değişiklik izlenmezken, %0.01 afliberceptle tedavi edilen grupta %0,1 afliberceptle tedavi edilen gruba göre daha az azalma görülmüştür.

Aflibercept ile ilgili yapılan çalışmalarda subkonjonktival ve topikal uygulamanın etkinliği ile ilgili karşılaştırılmalı bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda bu iki yöntemi karşılaştırılarak hangi uygulamanın daha etkili olabileceği saptanmaya çalışılmıştır. Her iki yöntemde de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında neovaskularizasyon alanında anlamlı azalma yaptığı görülmüştür.

Subkonjonktival aflibercept uygulaması topikal tedavi ile karşılaştırıldığında ise kornea neovaskülarizasyon alanında anlamlı düzeyde azalma yaptığı izlendi.

Kim ve arkadaşlarının tavşanlarda yaptığı korneal neovaskülarizasyonda bevacizumabın etkinliği çalışmasında topikal ve subkonjonktival bevacizumab etkinliği kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve korneadaki VEGF düzeyleri ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre hem subkonjonktival hem de topikal bevacizumab uygulanan gruplarda VEGF düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü tespit edilmiştir. Ancak topikal ve subkonjonktival bevacizumab uygulamaları arasında VEGF düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (158). Ancak aflibercept ile yapılan çalışmalarda ELISA yöntemi ile VEGF düzeylerini ölçen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu alanda yapılan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda immünohistokimyasal olan değerlendirilen korneal VEGF ve VEGFR-2 düzeyleri ve Tunel metoduyla yapılan apoptotik indeks düzeylerinde serum fizyolojik verilen üçüncü ve dördüncü gruplarla karşılaştırıldığında aflibercept verilen grupta anlamlı düzeyde azalma izlendi. Tedavi verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise subkonjonktival ve topikal tedavi arasında anlamlı fark izlenmedi. Bu durumda veriliş yolunun korneal VEGF ve VEGFR-2 düzeyinde farklılık oluşturmadığını her iki yöntemin de hasta özellikleri göz önünde bulundurularak kullanılabilmesi görülmüştür. Ancak korneal neovaskülarizasyon alanına ve ELISA yöntemiyle değerlendirilen VEGF düzeylerine bakıldığında subkonjonktival aflibercept tedavisi kullanılan ratlarda anlamlı düzeyde azalma yaptığı gözlenmiştir. Bu sonuç da klinik olarak daha iyi yanıt veren subkonjonktival tedavi etkinliğinin immünohistokimyasal sonuçlara yansımadağını göstermektedir. Bu konuda bevacizumabla ilgili yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuş ve etkin yöntem belirlenememiştir. Bu sonuçlara rağmen subkonjonktival uygulamanın tek doz uygulanması ve topikale göre daha düşük düzeylerde kullanılabilmesi bir avantaj olarak görülmekle birlikte daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Adropin lipid metabolizmasının regülasyonunda rol alan yeni bir metabolik hormondur. Lovren ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada adropinin metabolik etkilerinin yanı sıra endotel fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi non-metabolik

olaylarda da rolü olduğu gösterilmiştir (12). Bu çalışmada adropin ile tedavi edilen endotel hücrelerinde proliferasyon, migrasyon, kapiller tüp formasyonunun belirgin arttığı, damar permabilitesi ve TNF'nin indüklediği apoptozisi azalttığı görülmüştür. Örnek ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yaşa bağlı maküla dejenerasyonunda adropin düzeyleri ve ELISA yöntemi ile VEGFR-2 düzeyleri değerlendirilmiştir (159). Bu çalışmada yaşa bağlı maküla dejenerasyonu olan hastalarda adropin düzeyleri yüksek olarak izlenmiş ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Serum VEGFR-2 düzeylerine bakıldığında ise yaşa bağlı maküla dejenerasyonu olan hastalarda anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (159). Mevcut çalışmamızda korneal neovaskülarizasyonda korneal adropin ve VEGFR-2 düzeyleri değerlendirildi. İmmünohistokimyasal skorlamada korneal neovaskülarizasyon gelişen deneklerde korneal adropin düzeyi olarak kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak izlendi. Tedavi edilen gruplarda ise bu skorlamada anlamlı düzeyde azalma izlendi. ELISA yöntemiyle bakılan korneal adropin düzeylerinde ise anlamlı fark görülmedi. Sonuçlar her ne kadar ELISA ile bakılan kornea adropin düzeylerine yansımamış olsa da immünohistokimyasal olarak adropinin tedavi gruplarında anlamlı derecede farklı bulunması korneal neovaskülarizasyon patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bunun için daha ileri araştırmalara gerek duyulmaktadır.

Organizmada endojen ve eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller oksidatif strese neden olur. Kan, antioksidanların serbest radikallerin uzaklaştırmak için vücuda taşınmasında önemlidir (160). Serbest demiri toplayan transferin ve seruloplazmin gibi zincir kırıcı antioksidanlar da plazmada bulunmaktadır. Ürik asit, albümin ve askorbik asit plazmadaki total antioksidan seviyenin % 85'inden fazlasını oluşturur. Antioksidanlar plazmada kendi aralarında etkileşim içindedirler. Bu şekilde tek başlarına gösterdikleri etkiden daha fazla etki gösterebilmektedirler. Glutasyonun askorbatı, askorbatın da α - tokoferolü yeniden aktifleştirmesi buna örnektir. Total antioksidan durumun (TAS) belirlenmesi antioksidanların tek tek ölçülerek belirlenmesinden daha değerlidir (161,162). Ancak vücuttaki tüm antioksidanları yansıtmamaktadır. Oksidan ve antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulmasına oksidatif stres denir. Oksidatif stresin total değeri Total Oksidatif Stres (TOS) olarak ifade edilir. Bu durum aşırı oluşan reaktif oksijen radikalleri veya

antioksidan tampon sisteminin yetersizliği sonucu oluşur. Reaktif oksijen radikalleri hücrenin DNA, lipit ve protein benzeri moleküllerine zarar verir (161,162).

Çalışmamızda korneal neovaskülarizasyonda total antioksidan düzeyinin subkonjonktival aflibercept tedavisinde anlamlı oranda azaldığı izlenirken ($p<0,05$) diğer gruplar arasında fark görülmedi ($p>0,05$). Ayrıca biyokimyasal olarak korneal oksidatif stres düzeyinde (TOS) de anlamlı artış izlenmedi ($p>0,05$). Bu sonuç TAS değerinin vücuttaki antioksidanların hepsini yansıtmamasına bağlı olabilir. Ayrıca oksidatif hasarın akut evresinde vücuttaki antioksidanlar devreye girerek oksidatif hasar hızlıca giderilmeye çalışılır. TOS düzeylerinin artış göstermemesi, bu akut etkiye bağlı olarak deney süresinin kısa olmasına bağlı olabilir. Başka bir anti-VEGF ajan olan bevacizumab ile yapılan bir çalışmada TAS düzeyinde anlamlı artış izlenmemiştir (163)

TUNEL boyama sonuçlarımızda korneal neovaskülarizasyon yapılan ve SF ile tedavi edilen gruplarda apoptozisin anlamlı düzeyde arttığı; aflibercept ile tedavi edilen gruplarda ise anlamlı düzeyde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu bulgulardan afliberceptin apoptozisi azaltmada etkili olduğu, toksisiteye neden olmadığı, uzun dönemde de oksidatif stres düzeyini de azaltabileceği sonucu çıkarılabilir. Ancak mekanizma ve serum düzeyleri için daha geniş ve uzun dönem çalışmalara ihtiyaç vardır. Daha önce korneal neovaskülarizasyonda apoptozisin değerlendirildiği bir çalışmada kornea neovaskülarizasyon sonrasında rapamisin tedavisi alan grupta apoptozisin azaldığı izlenmiştir (164).

Sonuç olarak aflibercept korneal neovaskülarizasyon tedavisinde her iki uygulama şekliyle de etkili bulunmuş, fakat klinik olarak subkonjonktival uygulamanın daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Afliberceptin farklı konsantrasyonlarda etkinliğinin değerlendirilmemesi, diğer antianjiogenik diğer ajanlarla kıyaslama yapılmaması ve uzun dönem sonuçlarının olmaması çalışmamızın eksik yönleridir. Buna rağmen subkonjonktival uygulamanın tek doz uygulanması ve topikale göre daha düşük düzeylerde kullanılabilmesi bir avantaj olarak görülebilir ancak daha geniş çaplı çalışmalarla bu veriler desteklenmelidir.

5. KAYNAKLAR

1. Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26: 1-37.
2. Streilein JW. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 879–889.
3. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine *J Intern Med* 255: 538-561.
4. Heil M, Eitenmuller I, Schmitz – Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: Similarities and differences. *J Cell Mola Med* 2006; 10: 45-55.
5. Li WW, Hutnik M, Gehr G. Antiangiogenesis in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2008; 143(5): 622-631.
6. Klenkler B, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 2004; 79: 677-688.
7. Wilson SE, Liang Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *IOVS* 1999; 40: 2185-2190.
8. Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2001; 45: 203-210.
9. Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004; 82: 557-563.
10. Wolfgang P, Speicher L, and Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *IOVS* 2000; 41 (9): 2514-2522.
11. Azar, Dimitri T. "Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis)." *Transactions of the American Ophthalmological Society* 2006; 104: 264-302.
12. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, et al Adropin is a novel regulator of endothelial function. *Circulation* 2010; 122(11): 185-192.

13. Goto S. Q-switched Nd: YAG laser treatment for corneal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 1992; 36: 291-300.
14. Haynes WL, Proia AD, Klintworth GK. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1588-1593.
15. Yoon KC, You IC, Kang IS, Im SK, Ahn JK, Park YG, Ahn KY. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 390-395.
16. Papathanassiou, Miltiadis, et al. Vascular endothelial growth factor inhibitors for treatment of corneal neovascularization: a meta-analysis. *Cornea* 2013; 32(4): 435-444.
17. Wu PC, Liu CC, Chen C, Kou HK, Shen SC, Lu CY, et al. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. *Graefe's Arch Clin Expo Ophthalmol* 2003; 241: 63-69.
18. Bahar I, Kaiserman I. Subconjunctival Bevacizumab Injection for Corneal Neovascularization. *Cornea* 2008; 27: 142-147.
19. Chang, Jin-Hong, et al. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Survey of Opht* 2012; 57 (5): 415-429.
20. Schmid MK, Bachmann LM, Fäs L, et al. Efficacy and adverse events of aflibercept, ranibizumab and bevacizumab in age-related macular degeneration: a trade-off analysis. *Br J Ophthalmol* 2014. Published Online First 11 June 2014.
21. Schmidt-Erfurth U, Kaiser PK, Korobelnik JF, et al. Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology* 2014; 121: 193-201.
22. Korobelnik JF, Do DV, Schmidt-Erfurth U, et al. Intravitreal aflibercept for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2014; 121: 2247-2254.
23. Gordon RA, Donzis PB. Refractive development of the Human eye. *Arca Ophthalmol* 1985; 103: 785-789.
24. Bron AB, Tripathi RC, Tripathi BJ. *Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit*, 8th edition. London: Chapman and Hall Medical, 1997.

25. Arfa RC. Grayson's Disease of the Cornea. St. Louise: Mosby Year Book 1991; 2: 25-32.
26. Standring, Susan, ed. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. Elsevier Health Sciences, 2015.
27. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985; 4: 671-677.
28. Akyol N. Kontakt Lensler ve Uygulanması. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları 2005; 2: 7-25.
29. Yanoff & Duker. *Ophthalmology*. 3. baskı, Elsevier, 2008.
30. Ruberti JW, Roy AS, Roberts CJ. Corneal Biomechanics and Biomaterials. *Reva Biomed Eng* 2011; 13: 269-295.
31. Robert L, Legeais JM, Robert AM, Regard G. Corneal collagens. *Pathol Bull* 2001; 49: 353-363.
32. Agarwal S. *Textbook of Ophthalmology*. 1. Baskı. New Delhi: Jaypee Company 2002; 3: 942-943.
33. Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1998; 86: 178-207.
34. Easty DL, Sparrow JM. *Oxford Textbook of Ophthalmology*. Oxford: Oxford University Press, 1999.
35. İrkeç MK. Gözyaşı tabakasının yapısı, biyokimyası, immünolojisi ve kontakt lensler. *Oftalmoloji* 1994; 1: 18-20.
36. Efron N, Carney LG Oxygen levels beneath the closed eyelid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979; 18: 93-100.
37. Newell FW. Anatomy of the cornea. *Ophthalmology, Principles and Concepts* 1992; 13: 8-13.
38. Bazan HE, King WD, Rossowska M. Metabolism of phosphoinositides and inositol polyphosphates in rabbit corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1985; 4: 793-801.
39. Luo Lu, Peter S. Remach, Winston W.Y. Kao. Corneal Epithelial Wound Healing *Exp Biol Med Vol.* 2001; 226(7): 653-664.

40. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22: 69-94.
41. Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol* 2003; 51: 5-15.
42. Zeiske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 1-7.
43. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1994; 78: 401-408.
44. Lu PC, Ye H, Maede M, Azar DT. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *IOVS* 1999; 40: 20-27.
45. Dowd CJ, Cooney CL, Nugent MA. Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. *J Biol Chem* 1999; 74: 5236-5244.
46. Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, Nishida T. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2495-2500.
47. Jester JV, Petrol WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retina Eye Res* 1999; 18: 311-356.
48. Dua HS, Forrester JV. Clinical patterns of corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1987; 104: 481-489.
49. Philipp W, Göttinger W. Leukocyte adhesion molecules in diseased corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2449-2459.
50. Kaufman HE, Barron AB, McDonald MB, Waltman SR. Corneal trauma. *The Cornea* 1991; 22: 599-642.
51. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: A review. *Pharmacol Ther* 1994; 63: 265-280.
52. Petroustos G, Guimaraes R, Giraud J, Poliques Y. Antibiotics and corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 1775-1778.

53. Burka, Jenna M., et al. The effect of fourth-generation fluoroquinolones gatifloxacin and moxifloxacin on epithelial healing following photorefractive keratectomy. *Am J Ophthalmol* 2005; 140 (1): 83-87.
54. Sala A, Zarini S, Bolla M. Leukotrienes: lipid bioeffectors of inflammatory reactions. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63: 84-92.
55. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose, Miller D, Kublin C, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration and neovascularisation. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 640-643.
56. Peyman GA, Sanders DR, Goldberg MF. Wound healing. Principles and practice of ophthalmology 1980; 381-386.
57. Watanabe K, Frangieh G, Reddy CV, Kenyon KR. Effect of fibronectin on corneal epithelial wound healing in the vitamin A-deficient rat. *IOVS* 1991; 32: 2159-2162.
58. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol* 1983; 97: 1653-1657.
59. Frangieh G, Hayashi K, Teekhasaene C, Wolf G, Colvin RB, Gibson HK, Kenyon KR. Fibronectin and corneal epithelial wound healing in the vitamin-A deficient rat. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 567-571.
60. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Differential modes of action of fibronectin and EGF on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol* 1990; 145: 549-554.
61. Nishida T, Nakamura M, Mishima M, Otori T, Hikida M. Interleukin-6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Arch. Ophthalmol* 1992; 110: 1292-1294.
62. Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH. Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol* 1983; 95: 353-358.
63. Jones SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor stimulated cells. *Oncogene* 2000; 19: 5558-5567.
64. Schultz G, Khaw PT, Oxford K, MaCauley S, Van Setten G, Chegini N. Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 1994; 8: 184-187.

65. Chung JH, Fagerholm P. Treatment of rabbit corneal alkali wounds with human epidermal growth factor. *Cornea* 1989; 8: 122-128.
66. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis. *Exp Eye Res* 2001; 72: 511-517.
67. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003; 284: 31-53.
68. Li D, Tseng SC. Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1997; 172: 361-372.
69. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1989; 86: 802-806.
70. Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res* 1997; 65: 391-396.
71. Song QH, Klepeis VE, Nugent MA, Trinkaus-Randall. TGF-beta1 regulates TGF-beta1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *Mol Pathol* 2002; 55: 164-176.
72. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio RJr, Hong JW, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 625-637.
73. Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, Basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 1994; 59: 63-72.
74. Sotozono C, Kinoshita S, Kita M, Imanishi J. Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth. *Exp Eye Res* 1994; 59: 385-392.

75. Wilson SE, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor Messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res* 1999; 68: 377-397.
76. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retina Eye Res* 1999; 18: 293-309.
77. Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, Hogg P, Briggs M, Hagan S. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 779-802.
78. Tervo T, Vesaluoma M, Bennett GL, Schwall R, Helena M, Liang Q, Wilson SE. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. *Exp Eye Res* 1997; 64: 501-504.
79. Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGF beta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF beta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res* 2002; 75: 645-657.
80. You L, Kruse FE, Vilcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *IOVS* 2000; 41: 692-702.
81. Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 1988; 338: 1174-1180.
82. Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salesse C, Giasson M, Joly MC. Effects of EGF, IL-1 and their combination on in vitro corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res* 1993; 57: 293-300.
83. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1992; 153: 1-5.
84. Tran MT, Tellaetxe-Isusi M, Elnor V, Strieter RM, Lausch RN, Oakes JE. Proinflammatory cytokines induce RANTES and MCP-1 synthesis in human corneal keratocytes but not corneal epithelial cells. Beta-chemokine synthesis in corneal cells. *IOVS* 1996; 37: 987-996.
85. Sotozono C. Second injury in the corneal. The role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. *Cornea* 2000; 19: 155-159.
86. Denekamp J. Vasculature as a target for tumor therapy. In: Hammerson F, Hudlicka O, eds. *Progress in Applied Microcirculation*. Basel: Karger, 1984.

87. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
88. Burger PC, Chandler DB. Experimental corneal neovascularization; biomicroscopic, angiographic and morphologic correlation. *Cornea* 1985; 4: 35-41.
89. Cogan DG. Corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962; 1: 253-261.
90. Erdurmus M, Yagci R, Yilmaz B, Hepsen IF, Turkmen C, Aydin B, Karadag R. Inhibitory effects of topical thymoquinone on corneal neovascularization. *Cornea* 2007; 26: 715-719.
91. Vailhe B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; 81: 439-452.
92. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57: 673-686.
93. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 267-285.
94. Taguchi C, Sugita S, Tagawa Y, Nishihira J, Mochizuki M. Macrophage migration inhibitory factor in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 1367-1371.
95. Zengin N, Okudan S, Gündüz K. Oküler neovaskularizasyonunda büyüme faktörlerinin rolü. *Oftalmoloji* 1993; 3: 385-389.
96. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 237-268.
97. Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. *Cornea*. 2007; 26: 70-74.
98. Hayahi T, Matsuoko K, Saitoh M, Takeda S, Kimura M. Influence of α -tumor necrosis factor and β -interleukin-1 on production of angiogenetic factors and thymidine phosphorylase activity in immortalized human decidual fibroblasts in vitro. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32: 15-22.

99. Asare Y, Schmitt M, Bernhagen J. The vascular biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF) Expression and effects in inflammation, atherogenesis and angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis* 2013; 109 (3): 391-398.
100. Matsumoto K, Maruyama N, Maruyama T, Ohnishi Y, Nonaka S, Inoshita A et al. Elevated macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels in the urine of patients with focal glomerular sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 338-347.
101. Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats. *IOVS* 1997; 38: 1555-1562.
102. Javeed A, Zhao Y, Zhao Y. Macrophage-migration inhibitory factor: role in inflammatory diseases and graft rejection. *Inflamm Res.* 2008; 57: 45-50.
103. Thakur A, Xue ML, Wang W, Lloyd A, Wakefield D, Willcox MD. Expression of macrophage migration inhibitory factor during *Pseudomonas* keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001; 29: 179-182.
104. Usui T, Yamagami S, Kishimoto S, Seiich Y, Nakayama T, Amano S. Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 3545-3550.
105. Soubrane G, Jerdan J, Karpouzas I, Fayein NA, Glaser B, Coscas G, et al. Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *IOVS* 1990, 31: 323-333.
106. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Aboufrikha M, Guy J. Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* 1993; 36: 282-291.
107. Singh N, Macnamara E, Rashid S, Ambati J, Kontos CD, Higgins E, Ambati BK. Systemic soluble Tie-2 expression inhibits and regresses corneal neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332: 194-199.
108. White RR, Shan S, Rusconi CP, Shetty G, Dewhirst MW, Kontos CD, Sullenger A. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5028-5033.
109. Yaylali V, Ohta T, Kaufman SC, Maitchouk DY, Beuerman RW. In vivo confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea* 1998; 17: 646-653.

110. Chang Jh, Azar DT. Characterization of angiostatin in the Mouse cornea. *IOVS* 2000; 41: 832.
111. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 346-355.
112. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2000; 70: 419-428.
113. Senger, Donald R., et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587): 983-985.
114. Drixler TA, Voest EE, von Vroonhoven TM, Borel Rinkes IH. Angiogenesis and surgery: from mice to man. *Eur J Surg* 2000; 166: 435-446.
115. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-270.
116. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Antiangiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.
117. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
118. Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak H, Brown LF. Correlation of vascular permeability factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 1210-1217.
119. Korpelainen EI, Alitalo K. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 159-164.
120. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1999; 13: 18-32.
121. Reidy MA. Endothelial regeneration. Interaction of smooth muscle cells with endothelial regrowth. *Lab Invest* 1988; 59: 36-43.

122. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1512-1520.
123. Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, et al. The antitumoural effect of endostatin and angiostatin is associated with a down regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumour cells. *FASEB J*. 2002; 16: 1802–1804.
124. Shin SH, Kim JC, Chang SI, Lee H, Chung SI. Recombinant kringle 1-3 of plasminogen inhibits rabbit corneal angiogenesis induced by angiogenin. *Cornea* 2000; 19: 212-217
125. Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor mediated signalling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem*. 2002; 277: 27872–27879.
126. Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, et al. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2517-2524.
127. Ortego J, Escribano J, Becerra SP, Coca-Prados M. Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2759-2767.
128. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999; 285: 245-248.
129. Sekiyama E, Nakamura T, Cooper LJ, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood NJ, Kinoshita S. Unique distribution of thrombospondin-1 in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1352-1358.
130. Cursiefen C, Masli S, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, Streilein JW. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1117-1124.
131. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. VEGF-trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 11393-11398.

132. Stewart MW, Rosenfeld PJ. Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap. *Br J Ophthalmol.* 2008; 92: 667-668.
133. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis.* 2012; 15: 171-185.
134. Campochiaro PA, Clark WL, Boyer DS, Heier JS, Brown DM, Vitti R, et al. Intravitreal aflibercept for macular edema following branch retinal vein occlusion: the 24-week results of the VIBRANT study. *Ophthalmology* 2015; 122(3): 538-544.
135. Sharma T, Dhingra R, Singh S, et al. Aflibercept: a novel VEGF targeted for agent to explore the future perspectives of anti-angiogenic therapy for the treatment of multiple tumors. *Mini Rev Med Chem* 2013; 13 (4): 530-540.
136. De Oliveira Dias JR, Badaró E, Novais EA, Colicchio D, Chiarantin GM, Matioli M. Preclinical investigations of intravitreal ziv-aflibercept. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* 2014; 45: 577-584.
137. Mansour AM, Al-Ghadban SI, Yunis MH, El-Sabban ME. Ziv-aflibercept in macular disease. *Br J Ophthalmol.* 2015; 99(8): 1055-1059.
138. Chhablani J. Intravitreal ziv-aflibercept for recurrent macular edema secondary to central retinal venous occlusion. *Indian J Ophthalmol* 2015; 63(5): 469-470.
139. Gal-Or O, Livny E, Sella R, Nisgav Y, Weinberger D, Livnat T, Bahar I. Efficacy of subconjunctival aflibercept versus bevacizumab for prevention of corneal neovascularization in a rat model. *Cornea* 2016; 35(7): 991-996.
140. Sella R, Gal-Or O, Livny E, Dachbash M, Nisgav Y, Weinberger D, Bahar I. Efficacy of topical aflibercept versus topical bevacizumab for the prevention of corneal neovascularization in a rat model. *Experimental eye research* 2016; 146: 224-232.
141. Kumar KG, Trevaskis JL, Lam DD, Sutton GM, Koza RA, Chouljenko VN, et al. Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism. *Cell Metab* 2008; 8: 468-481.
142. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Yilmaz M, Kalayci M, et al. Expression of adropin in rat brain, cerebellum, kidneys, heart, liver, and pancreas in streptozotocin-induced diabetes. *Mol Cell Biochem* 2013; 380: 73-81.

143. Celik E, Yilmaz E, Celik O, Ulas M, Turkcuoglu I, Karaer A, et al. Maternal and fetal adropin levels in gestational diabetes mellitus. *J Perinat Med* 2013; 41: 375-380.
144. Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 242-249.
145. Jousseaume AM, Kruse FE: Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 37: 920-927.
146. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O, Durukan HA. Effect of Subconjunctival Bevacizumab (Avastin) on Experimental Corneal Neovascularization in Guinea Pigs. *Cornea* 2008; 27: 357-362.
147. Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S, et al: Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 2008; 86: 322-328.
148. Jousseaume AM, Germann T, Kirchhof B. Effect of thalidomide and structurally related compounds on corneal angiogenesis is comparable to their teratological potency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 37: 952-961.
149. Nirankari VS, Baer JC. Corneal argon laser photocoagulation for neovascularization in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1986; 93: 1304-1309.
150. Pillai CT, Dua HS, Hossain P: Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2148-2153.
151. Tripathi RC, Li J, Tripathi BJ, Chalam KV, Adamis AP. Increased level of VEGF in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmology* 1998; 105: 232-237.
152. Bashkaran K, Zunaina E, Bakiah S, Sulaiman SA, Sirajudeen K, Naik V. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Tualang honey in alkali injury on the eyes of rabbits: Experimental animal study *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2011; 11: 90-101.
153. Cursiefen C, Cao J, Chen L. Inhibition of lymphangiogenesis and hemangiogenesis after normal risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2666-2673.

154. Gohto Y, Obana A, Kaneda K, Miki T. Photodynamic effect of a new photosensitizer ATX-S10 on corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 1998; 67: 313-322.
155. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, Harris DM. Corneal neovascularization. Pathogenesis and inhibition. *Cornea* 1987; 6: 250-257.
156. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65: 671-678.
157. Park YR, and Chung SK. Inhibitory effect of topical aflibercept on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea* 2015; 34 (10): 1303-1307.
158. Kim WJ, Jeong HO, Chung SK. The effect of bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. *Korean J Ophthalmol* 2010; 24: 230-236.
159. Örnek N, Örnek K, Aydın S, Yılmaz M, Ölmez Y. Serum vascular endothelial growth factor receptor-2 and adropin levels in age-related macular degeneration. *IJO* 2016; 9 (4): 556-560.
160. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG. Reduced status of plazma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res* 1998; 32: 1-8.
161. Erel O. A noval automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112-119.
162. Ghiselli A, Serafini M, Natella F. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106-1114.
163. Akal A, Ulas T, Goncu T, Guldur ME, Kocarslan S, Taskin A, et al. Evaluating the safety of intracameral bevacizumab application using oxidative stress and apoptotic parameters in corneal tissue. *IJO* 2015; 8(4): 697-702.
164. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005; 46(2): 454-460.

6. ÖZGEÇMİŞ

19.01.1986 yılında Konya’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Konya ilinde tamamladım. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi’nden mezun oldum. 2 yıl Aksaray Devlet Hastanesinde pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2013 yılında Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.

