

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

**DENEYSEL KORNEA  
NEOVASKÜLARİZASYONUNDA TOPIKAL VE  
İNTRAPERİTONEAL TACROLİMUS'UN  
KORNEADAKİ VASKÜLER ENDOTELYAL GROWTH  
FAKTÖR DÜZEYLERİNE ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Mete Güler**

**TEZ DANIŞMANI  
Yrd. Doç. Dr. Burak Turgut**

**ELAZIĞ – 2008**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. ....

**DEKAN**

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....

.....

.....**Anabilim Dalı Başkanı**

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

.....

\_\_\_\_\_

**Danışman**

**Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri**

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>1. ÖZET</b>	1
<b>2. ABSTRACT</b>	2
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	3
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	6
<b>4.1. Kornea anatomisi</b>	6
4.1.1. Makroskopik Anatomi	6
4.1.2. Mikroskopik Anatomi	6
4.1.2.1. Epitel ve Bazal Membran	7
4.1.2.2. Bowman Zarı	9
4.1.2.3. Stroma Tabakası	9
4.1.2.4. Descement Membranı	10
4.1.2.5. Endotel Tabakası	11
4.1.2.6. Limbus	12
<b>4.2. Kornea Yara İyileşmesi</b>	<b>12</b>
4.2.1. Epitel Yara İyileşmesi	13
4.2.1.1. Lag Fazı	13
4.2.1.2. Hücre Göçü	13
4.2.1.3. Hücre Çoğalması ve Farklılaşması	14
4.2.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi	14
4.2.3. Epitel ve Yüzeysel Stromal Defekt	16
4.2.4. Stroma Yara İyileşmesi	16
4.2.5. Endotel Yara İyileşmesi	17
<b>4.3. Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Mediatörler</b>	<b>18</b>
4.3.1. Büyüme Faktörleri	18
4.3.1.1. Epidermal Growth Faktör	18
4.3.1.2. Fibroblast Growth Faktör	19
4.3.1.3. Transforming Growth Faktör Alfa	20
4.3.1.4. Transforming Growth Faktör Beta	20

4.3.1.5. Keratinosit Growth Faktör	21
4.3.1.6. Hepatosit Growth Faktör	22
4.3.1.7. Platelet Derived Growth Faktör	23
4.3.1.8. Diğer Büyüme Faktörleri	23
4.3.2. Kornea Yara İyileşmesinde Enflamatuvar Sitokinlerin Rolü	24
<b>4.4. Kornea Neovaskülarizasyonu</b>	<b>24</b>
4.4.1. Erken Prevasküler Faz	26
4.4.2. Vasküler Tomurcuklanma Fazı	26
4.4.3. Vasküler Matürasyon Fazı	27
<b>4.5. Kornea neovaskülarizasyonunu Uyaran Faktörler</b>	<b>28</b>
4.5.1. Vasküler Endotelyal Growth Faktör	28
4.5.2. Fibroblast Growth Faktör	30
4.5.3. İnsülin Like Growth Faktör	30
4.5.4. Anjiopietin	30
4.5.5. Matriks Metalloproteinazlar	30
<b>4.6. Kornea Neovaskülarizasyonunu Engelleyen Faktörler</b>	<b>30</b>
4.6.1. Anjiostatin	30
4.6.2. Endostatin	30
4.6.3. Pigment Epiteli Derived Faktör	31
4.6.4. Trombospondin-1	31
<b>4.7. Tacrolimus</b>	<b>31</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>34</b>
<b>BULGULAR</b>	<b>39</b>
<b>TARTIŞMA</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>58</b>
<b>9.ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>73</b>

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo-1:</b> Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler.....	24
<b>Tablo 2:</b> Gruplardaki epitel VEGF immünohistokimyasal boyanmalarının minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri.....	39
<b>Tablo 3:</b> Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanmalarının minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri.....	40
<b>Tablo 4:</b> Gruplardaki endotel VEGF immünohistokimyasal boyanmalarının minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri.....	42
<b>Tablo 5:</b> Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdelilerinin minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri.....	43

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 1:</b> Tacrolimus'un kimyasal formülü.....	32
<b>Şekil 2:</b> Epitel ve stromada 1. derece boyanmanın şematize edilmesi .....	36
<b>Şekil 3:</b> Epitel ve stromada 2. derece boyanmanın şematize edilmesi.....	37
<b>Şekil 4:</b> Epitel ve stromada 3. derece boyanmanın şematize edilmesi.....	37
<b>Şekil 5:</b> Gruplardaki epitel VEGF immünohistokimyasal boyanma değerleri.....	40
<b>Şekil 6:</b> Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma değerleri.....	41
<b>Şekil 7:</b> Gruplardaki endotel VEGF immünohistokimyasal boyanma değerleri.....	43
<b>Şekil 8:</b> Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına olan yüzdeleri.....	44
<b>Şekil 9:</b> Kontrol grubundaki bir denekteki rat korneası.....	45
<b>Şekil 10:</b> Gümüş nitrat ile kimyasal yanık yapılan rat korneasının görünümü.....	45
<b>Şekil 11:</b> Sham 1 grubunda olan bir denekteki totale yakın kornea neovaskülarizasyonu.....	46
<b>Şekil 12:</b> Sham 2 grubunda olan bir denekteki santral kornea skarı ve total kornea neovaskülarizasyonu.....	46
<b>Şekil 13:</b> İntraperitoneal tedavi grubunda olan bir denekteki minimal kornea neovaskülarizasyonu ve santralde skar oluşumu.....	47
<b>Şekil 14:</b> Topikal tedavi grubunda olan bir denekteki kısmi kornea neovaskülarizasyonu.....	47
<b>Şekil 15:</b> Kontrol grubundaki rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması.....	48
<b>Şekil 16:</b> Sham 1 grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması.....	48
<b>Şekil 17:</b> Sham 2 grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması.....	49
<b>Şekil 18:</b> İntraperitoneal Tacrolimus tedavisi verilen bir rat korneasındaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının görünümü.....	49
<b>Şekil 19:</b> Topikal Tacrolimus tedavisi verilen bir rat korneasındaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının görünümü.....	50

## KISALTMALAR

Anjiopietin	Ang
Deoksi ribonükleik asit	DNA
Dioptri	D
Ekstraselüler matriks	ECM
Epidermal growth faktör	EGF
Fibroblast growth faktör	FGF
Granülosit makrofaj koloni stimülan faktör	GMCSF
Hepatosit growth faktör	HGF
Hipoksi ile indüklenebilen faktör	HIF
İnterlökin	İL
İnsülin like growth faktör	İGF
Keratinosit growth faktör	KGF
Matriks metalloproteinaz	MMP
Sodyum Potasyum ATPaz	Na <sup>+</sup> /K ATPaz
Neodymium: Yttrium Aluminium Garnet	Nd:YAG
Nitrik oksit	NO
Nükleer faktör kappa B	NF-κB
Platelet derived growth faktör	PDGF
Polimorfonükleer lökositler	PMNL
Prostoglandin E2	PGE2
Sinir büyüme faktörü	SBF
Transforming growth faktör	TGF
Tris buffer solüsyonu	TBS
Trombospondin	Tsp
Tümör nekrozis faktör	TNF
Vasküler endotelyal growth faktör	VEGF
Vasküler endotelyal growth faktör reseptörü	VEGF-R

## 1. ÖZET

Neovaskularizasyon normal büyüme fizyolojisi ve homeostatik mekanizmalar için gerekli olan, ancak saydam korneada görmeyi tehdit eden bir durumdur. Çalışmamızın amacı Tacrolimus'un deneysel kornea neovaskularizasyonundaki etkisini araştırmaktır.

Her biri yedi Wistar albino rat içeren beş grup oluşturuldu. Kornea neovaskularizasyonu oluşturulacak ratların kornealarından birinin santraline gümüş nitrat ile koterizasyon yapıldı. Grup 1'(kontrol) deki kornealara koterizasyon ve tedavi uygulanmadı. Grup 2'(sham 1) deki ratlara günde 1 defa intraperitoneal 1 ml salin, grup 3'(sham 2) dekilere ise günde 4 defa salin damla verildi. Grup 4'deki ratlara intraperitoneal olarak 0,3 mg/kg Tacrolimus uygulandı. Grup 5'deki koterize edilen kornealara 0,3 mg/ml Tacrolimus damla günde 4 defa uygulandı. Sekizinci günde korneal fotoğraflar alındı ve fotoğraflarda yeni damarlar ile örtülü kornea yüzeyinin tüm kornea alanına yüzdesi ölçüldü. Tüm hayvanlar 7 gün tedavi edildi ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alındı. Vasküler endotelial growth faktör (VEGF) immün boyanması korneanın epitel, stroma ve endotelinde semikantitatif olarak değerlendirildi.

Neovaskularizasyon alanlarının tüm korneaya yüzdesi Tacrolimus ile tedavi edilen gruplarda kontrollerden daha düşük olarak saptanırken topikal ve intraperitoneal olarak Tacrolimus ile tedavi edilen gruplar arasında benzer idi. Ortalama VEGF epitel ve endotel immün boyanmasının yoğunluğu tedavi gruplarında sham gruplarından daha düşük, ancak kontrol grubu ile benzer idi. İntraperitoneal tedavi grubundaki ortalama stromal VEGF immün boyanması sham 1 ile benzer idi. Topikal Tacrolimus ile tedavi edilen grup sham 2'den daha düşük stromal VEGF immün boyanması gösterdi. Stromal VEGF immün boyanması kontrol ve tedavi gruplarında benzerdi.

Sistemik ve topikal olarak Tacrolimus uygulanması kornea neovaskularizasyonunun önlenmesinde faydalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Kornea neovaskularizasyonu, Tacrolimus, VEGF



## 2. ABSTRACT

Neovascularization is a part of normal growth physiology and homeostatic mechanisms, but in the transparent cornea it may result in a sight-threatening condition. The aim of this study is to investigate the effects of Tacrolimus in experimental corneal neovascularization.

Five groups which were contained seven Wistar albino rats were formed. A silver nitrat pencil was applied on one of the central cornea of the rats and cauterized for corneal neovascularization. Corneas in group 1 (control) were not cauterized and not given any treatment. Rats in group 2 (sham 1) were received 1 ml saline intraperitoneally once a day and in group 3 (sham 2) were installed 4 drops saline four times a day. In group 4 rats were received intraperitoneally 0.3 mg/kg Tacrolimus per day. In group 5 cauterized corneas were administered 0,3 mg/ml Tacrolimus four times per day. Corneal photographs were taken at 8th day and the corneal surface covered with neovascular vessels was measured on the photographs as the percentage of the total area of the cornea. All the animals were treated for 7 days and sacrificed on the 8th day and corneas were excised. Vascular endothelial growth factor immunostaining was evaluated in epithelial, stromal and endothelial layers of corneas and staining intensivity was determined semicantitatively.

The percentage of neovascularization area to the total corneal surface in Tacrolimus treated groups were smaller than sham groups but similar in topically and intraperitoneally Tacrolimus treated groups. The mean VEGF immunostaining intensity of epithelial and endothelial layers of cornea in treatment groups were lesser than sham groups but similar to control group. Intraperitoneally Tacrolimus treated group stromal VEGF immunostaining is similar to sham 1. The stroma of the topically Tacrolimus treated group was showed lesser VEGF staining than sham 2. The stromal VEGF immunostaining were similar in control and treatment groups.

Systemic and topical administration of Tacrolimus is beneficial in prevention of the corneal neovascularization.

**Key words:** Corneal neovascularization, Tacrolimus, VEGF

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kornea göz küresinin ön kısmında yer alan şeffaf bir dokudur ve gözün en önemli refraktif kısmını oluşturur. Saydamlığı stromadaki kollojen lamellerinin düzenli dizilimine, damarsız olmasına ve kısmi dehidratasyonuna bağlıdır.

Daha önce mevcut olan damarlardan yenilerinin gelişimi anjiyogenez olarak adlandırılmaktadır. Fizyolojik anjiyogenez doku gelişimi, menstrüel döngü ve yara iyileşmesi gibi olaylarda önemli rol oynar. Gözde diabetik retinopati, eksudatif yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, prematüre retinopatisi, neovasküler glokom, çeşitli kornea hastalıklarında ise istenmeyen ve görmeyi tehdit eden patolojik bir süreçtir (1). Korneanın avasküler yapısının devamında anjiyogenik faktörlerin düşük, antianjiyogenik faktörlerin yüksek seviyelerde oluşunun önemi büyüktür. Bu dengenin bozulması korneada neovaskülarizasyonla sonuçlanabilir (2). Kimyasal yanık, enfeksiyon, travma, kontakt lens kullanımı, immünolojik (Stevens-Johnson sendromu, Skatrisyel pemfigoid) ve dejeneratif hastalıklar (pterjium, Terrien'in marjinal dejenerasyonu) nedeniyle korneada neovaskülarizasyon olabilmektedir (3).

Kornea neovaskülarizasyonunda rol oynayan birçok faktör tespit edilmiştir. Bunların bir kısmı kornea epitel, stroma ve endoteli tarafından üretilir (4). Gözyaşı ve aköz hümör de anjiyogenik faktörler için kaynak olabilmektedir (5,6). Bazı faktörler ise lokal ve sistemik dolaşımdan korneaya gelerek neovaskülarizasyona neden olmaktadır. Vasküler endotelial growth faktör proteolitik aktivite, endotel hücre çoğalması ve kapiller tüp oluşumu gibi anjiyogenezin birçok basamağında görev alır (2). Kornea neovaskülarizasyonunda VEGF'in önemli rol oynadığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur (7-10). Son zamanlarda enflame ve vaskülarize insan ve hayvan kornealarında VEGF'in artmış olduğu da gösterilmiştir (11,12).

Kornea neovaskularizasyonunun engellenebilmesi için birçok tedavi şekli denenmiştir. Argon ve Neodymium: Yttrium Aluminium Garnet (Nd:YAG) lazer fotokoagülasyonu kullanılarak yeni oluşan damarlarda oklüzyon ile vaskularizasyonu geriletme hedeflenmiştir (13,14). Kornea neovaskularizasyonunun engellenmesi için kullanılan diğer bir lazer uygulaması da fotodinamik tedavidir. Verteporfirin etkili bir fotosensitizördür ve uygulanan diod lazer enerjisi ile sitotoksik serbest oksijen radikalleri üretilir. Bu radikaller endotel hücrelerinde hasara ve trombus oluşumu ile damar oklüzyonuna neden olur (15). Bu yöntem pahalı ekipmanlar gerektirdiği için her klinikte uygulanamamaktadır.

Medikal tedavi yöntemlerinin başında kortikosteroidler gelmekte, ancak kortikosteroidlerin etkinliklerinin yetersiz olması ve yan etkilerinin çokluğu kullanımlarını sınırlamaktadır. Uzamış topikal ve sistemik steroid kullanımı mikrobiyal keratitlere, duyarlı bireylerde açık açılı glokoma ve katarakt oluşumuna da neden olabilmektedir (16-18). Bu yüzden neovaskularizasyonun geriletilmesi için siklosporin-A, somatostatin, somatostatin analogu oktreotid, anti-tümör necrosis factor- $\alpha$ , anti-intercellular adezyon molekülü, suleparoid (heparan sulfat), talidomid, suramin, genistein, rapamisin, anjiostatin, metotreksat, bevacizumab gibi doğal ve sentetik birçok madde denenmiştir (19-31). Ancak bütün bu çabalara rağmen kornea neovaskularizasyonunun önlenmesi halen önemli bir problem olarak karşımızda durmaktadır.

Tacrolimus, *Streptomyces tsukubensis*'den izole edilen makrolid grubu bir antibiyotiktir. Çok güçlü bir immünsupresif ajan olan Tacrolimus'un yüksek red riski bulunan korneal ve limbal greftlerin korunmasında etkili olduğu bulunmuştur (32,33). Siklosporin A ve Tacrolimus'un, sinovial fibroblastlarda temel ve

Transforming growth faktör (TGF) - $\beta$ 'nın indüklediği VEGF üretimini protein ve mRNA seviyesinde inhibe ettiği bulunmuştur (34).

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan kornea neovaskülarizasyonunda topikal ve intraperitoneal Tacrolimus'un etkinliği araştırıldı. Tacrolimus'un etkinliğinin daha ayrıntılı değerlendirilebilmesi için deney gruplarının kornea örneklerindeki VEGF düzeyleri ve neovaskülarizasyon alanları kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Kornea Anatomisi

#### 4.1.1. Makroskopik Anatomi

Kornea, avasküler ve saydam yapıda olup periferde kalınlaşarak sklera ile devamlılık gösterir. Sferik yapıda olmakla birlikte, periferi skleraya gömülmüş olduğu için öne doğru hafif eliptik özellik gösterir. Kornea gözün en önemli refraktif kısmını oluşturur ve daha arkadaki göz içi yapılarını korur. Refraktif güç önde +48.8 Dioptri (D), arka yüzde ise -5.8 D olup net kırma gücü +43 D'dir. Bu da gözün toplam refraktif gücünün % 70'ini oluşturmaktadır (35). Kornea, vertikal 10.5 milimetre, horizontal 11.5 milimetre çapında olup, santral 4 milimetrelik alanda hemen hemen sferiktir, ön-arka yüzler birbirine paraleldir ve kalınlığı 0.52 milimetre kadardır. Periferde ise arka yüzeyin eğrilik artışına paralel olarak 1.0 milimetre kalınlığa ulaşır. Kornea kurvatürü yeni doğanlarda ve çocuklarda erişkine oranla daha büyük olup, doğum sonrası ilk aylarda düzleşme gerçekleşmektedir. Düzleşme ilk birkaç ayda çok belirgindir ancak daha sonra yavaşça azalır. Yaklaşık 6 yaş civarında korneal gelişim tamamlanmıştır. Korneanın ön eğrilik çapı (konveks) 7.8 milimetre, arka eğrilik çapı (konkav) ise 6.2-6.8 milimetre kadardır. (36).

#### 4.1.2. Mikroskopik Anatomi

Kornea epitel, Bowman zarı, stroma, Descement membranı ve endotelten oluşan 5 katlı bir yapıya sahiptir, normal şartlarda kan ve lenf damarları içermez (36).

#### 4.1.2.1. Epitel ve Bazal membran

Bu çok katlı non-keratinize epitelyal yapı yüzey ektoderminden köken almaktadır. Yüzeyi 123 milimetrekare ve kalınlığı ortalama 50-80 mikrometre olup üç tabakadan meydana gelmektedir. Bunlar tek katlı bazal epitelyal, iki-üç katlı kanat ve iki katlı yüzeyel yassı hücre şeklinde sıralanmışlardır (36). Santralde 5-6 kat hücre varken hücre sayısı periferde doğru 8-10 kata kadar artar. Bazalde tek katlı silindirik hücre tabakası altındaki bazal membrana hemidesmozomlarla tutunmuştur. Bu yapılar hücre zarına geçince çapa fibrilleri olarak devam eder. Bazal membran gerçek bir membran yapısındadır ve PAS (+) boyanır. Yapısında tip IV kollajen, laminin, fibronektin ve fibrin bulunur. Lamina lucida denen gevşek ön ve Lamina densa olarak adlandırılan daha sıkı arka iki zondan oluşmuştur. Bazal membranın temel yapıtaşları olan Tip IV kollajen lamina densada, fibronektin ve laminin ise her iki tabakada bulunur. Rejenerasyon yeteneği olmayan bazal membran epitel için yapısal bir destek görevi görür ve epitel hücrelerini stromadan ayırır. Yokluğunda epitel hücreleri stromaya invaze olur. Normalde korneanın yüzeyel epitel hücreleri devamlı dökülmekte ve bu durum bazal epitel hücrelerinden mitozisle çoğalanların, dökülen hücrelerin yerine gelmesi ile dengelenmektedir. Göç aynı zamanda periferden kornea merkezine doğru olmaktadır. Bazal hücreler basit dizilimli olup oval nükleusludurlar ve mitotik aktiviteleri vardır. Mitoz gösteren bazal hücreler yüzeye doğru ilerlerken yavaş yavaş farklılaşır, çekirdekleri küçülür, organellerini yitirir ve nihayet dejenere olup kornea yüzeyinden dökülürler. Bu süreç her 7 günde tüm epitelin yenilenmesiyle sonuçlanır (37). Bazal kolumnar epitelden sonra 2-3 kat poligonal hücrelere rastlanır. Yanlara doğru kanatsız uzantıları olan bu hücreler kanat hücreleri olarak da anılır. Çekirdekleri yuvarlak-oval olup mitokondri sayıları

yüzey hücrelerine göre fazladır. Yüzeye yaklaştıkça hücreler inceliyor ve yassılaşıyor uzantılarını kaybeder ve yüzeyel yassı hücrelere dönüşür. Gözyaşıyla temasta olan bu hücrelerin apikal yüzleri, mikrovilli ve mikropalikalar ile girintili çıkıntılı bir yüzey oluşturur. Bu çıkıntılara gözyaşı mütin tabakasının glikokaliksleri tutunur. Bunun sonucunda düzgün dengeli bir optik yüzey ve bakteriyel olaylara karşı bir bariyer oluşur. Yüzey epitel hücreleri arasında zonula okludens, yüzey epitel hücreleri ile kanat hücreleri arasında makula okludens, bazal epitel hücreler ile bazal membran arasında ise hemidesmozom bağlantıları bulunmaktadır. Zonula okludenslerin yüzey hücrelerinin etrafını tamamen çevrelemesi sayesinde kornea yüzeyi suya ve elektrolitlere geçirgenliği çok az olan yarı geçirgen bir membran gibi davranır (37). 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 bulunur (36).

Epitel adezyon kompleksi bazal hücrelerde başlayıp yüzeyel stromada sonlanan bir yapıdır. Bu kompleksi bazal hücreler, çapa fibrilleri, bazal membran ve yüzeyel stromadaki çapa plakları oluşturur. Hemidesmozomlara komşu hücre zarından başlayan tip VII kollajen yapısındaki çapa fibrilleri, bazal membranı ve Bowman tabakasını geçip stroma içinde yaklaşık 2 mikrometre kadar ilerledikten sonra, Tip VII kollajenin globüler formu ile lamininden oluşmuş çapa plaklarında sonlanırlar. Temel fonksiyonu bazal membranı Bowman zarına bağlamak olan adezyon komplekslerinin korneadaki dağılımı homojen değildir. Göz kapaklarının ayırıcı kuvvetlerine ve dış travmaya daha çok maruz kalan santral korneada adezyon kompleksleri daha sık olarak yerleşmiştir (38).

#### **4.1.2.2. Bowman Zarı**

Bu tabaka hücre içermeyen, elastik ve kollajen fibrillerin yoğunlaşmasıyla oluşan bir yapıdır ve 8-14 mikrometre kalınlığındadır. Tip I ve V kollajen ile bunların arasını dolduran Tip VI kollajen filamanları ve proteoglikanlardan oluşmuştur. Epitele uzanan miyelinsiz sinir lifleri için kanallar içerir. Descement membranının aksine travmatize olduğunda rejenere olmaz ve skar dokusu ile iyileşir. Epitel ile stroma arasında önemli bir bariyer oluşturmaktadır. Bowman tabakasının yapısı ve kalınlığı yaşam boyu değişmez. (36).

#### **4.1.2.3. Stroma Tabakası**

Stroma kornea kalınlığının %90'ını oluşturur, yaklaşık 500 mikrometre kalınlığa sahiptir ve yaklaşık % 76 oranında su içermektedir. Kuru ağırlığın % 80'i kollajen fibrillerden, % 15'i matriksten, % 5'i hücreyel elementlerden oluşmaktadır (39). Kollajen lifler büyük oranda Tip I ve az miktarda Tip III, IV, V kollajenden oluşur. Kollajen lifler stromanın ön 1/3'ünde oblik, arka 2/3'ünde ise paralel lameller oluşturur. Lameller içindeki kollajen lifler aynı çapa sahiptir ve birbirlerine paralel olarak tüm kornea boyunca uzanımları mümkündür. Bu lifler lameller oluşturmuş halde stromanın her tarafında bulunur. Lameller içindeki kollajen lifler uniform yapıda olup 300 angström çapındadır. Glikozaminoglikan ve proteoglikan yapıda olan ara madde %60 oranda keratan-sülfat ve %40 oranda kondroitin-sülfattan oluşmuştur. Kollajen lameller arasında bulunan matriks, fibriller arası mesafeyi koruyarak düzenli bir yapının devamını ve korneanın saydamlığını sağlar. Korneanın fonksiyonel bütünlüğü, kalınlığı, şeffaflığı stromal elemanların yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasına bağlıdır. Ekstrasellüler matriks (ECM) yıkımı temel olarak matriks metalloproteinazlar



(MMP) ile olur. Endotelin disfonksiyonu nedeniyle stromaya su geçmesi durumunda glikozaminoglikanların su çekip şişmesi ile kornea kalınlığı artar ve kollajen fibrillerinin dizilimi düzensiz hal alarak stromal opaklaşma ortaya çıkar. (39). Embriyonik olarak nöral krestten köken alan stroma hücreleri keratositlerdir. Keratositler kollajen lameller arasında yerleşmişlerdir ve aynı lameller plandakiler birbirine doğru uzanan ince bağlantı noktaları sayesinde gevşek ağa benzeyen bir yapı oluştururlar. Bu bağlantıların, hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. 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 fibroblast haline gelebilirler. Stromada ayrıca az sayıda polimorfonükleer lökosit (PMNL), plazma hücresi ve makrofaj da bulunmaktadır. Yenidoğan ve çocuklarda stroma erişkinden daha fazla keratosit içerir (40). Periferik stromada yaşla birlikte kolesterol ve fosfolipid birikimi gerçekleşebilir (arcus senilis). Travma, enfeksiyon, distrofiler stromada ödem ve skar dokusu oluşumuna neden olabilir (41).

#### **4.1.2.4. Descement Membranı**

Endotel bazal membranı gerçek membran yapısındadır. Doğumda 3-4 mikrometre kalınlıktadır ve erişkinde 10-12 mikrometre kalınlığa ulaşır. İntrauterin gelişen anterior çizgili zon ve yaşam boyu endotel tarafından desteklenen posterior çizgisiz zon olmak üzere iki kısımdır. Çizgisiz zon başlıca bazal membran bileşenleri olan tip IV kollajen, laminin, fibronektinden oluşmuştur ve periferde Schwalbe çizgisi ile sonlanır. Descement membranı

proteolitik enzimlere karşı oldukça dirençlidir ve ağır keratitlerde bile sağlam kalabilir. Ancak stromaya gevşek olarak tutunduğu ve göz içi basıncının yardımıyla stromaya yapışık kaldığı gösterilmiştir. Travma nedeniyle bu membran stromadan kolaylıkla sıyrılabilir ve zedelenme durumunda endotel tarafından salgılanarak onarılmaktadır (39).

#### **4.1.2.5. Endotel tabakası**

Descemet membranının arkasında yer alan tek katlı heksagonal hücrelerden oluşmuştur. Nöral krestten orjin alan endotel hücrelerinin mitotik aktiviteleri doğum sonrası durur ve ölen hücrelerin yerini komşu hücreler genişleyerek doldurur. Endotel hücreleri doğumda 5000 hücre/milimetrekare iken erişkinde bu sayı 2500-3000 hücre/milimetrekare civarındadır. Endotel hücreleri metabolik olarak aktif hücrelerin karakteristik özelliklerini taşır. Büyüktürler, sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum ve ribozom bulundurulur. Daha genç hücrelerde nükleus daha büyük ve mitokondri daha fazladır. Bu organeller aktif transportta ve stromanın su içeriğinde önemli rol oynarlar. Endotel hücre sayısı 500 hücre/milimetrekare altına indiğinde korneal fonksiyonlar bozulmaya başlar. Bu durumda stromal hidrasyon artarak, ödem, kalınlık artışı ve opasifikasyon gelişmektedir (42). Endotel hücrelerinin yan yüzlerindeki girinti ve çıkıntılar (interdigitasyonlar), yan yüzlerin uzunluğunun, hücre boyundan yaklaşık 10 kat büyük olmasına neden olur. Endotel hücrelerinin apikal yüzlerine yakın yerleşmiş sıkı bağlantı noktaları bulunur. Bunlar epitel kadar olmasa da sıvı geçişine karşı bir bariyer görevi yapar. Yan yüzlerde bol miktarda bulunan gap junctionlar ise hücresel iletimde temel rol oynarlar. Sodyum Potasyum ATPaz ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz) enzim sistemi bazolateral membranlarda yerleşmiştir ve her hücrede yaklaşık 1.5 milyon pompa yer almaktadır. Endotelin

en önemli görevi korneanın dehidrate durumunu korumak ve dolayısıyla şeffaflığını sağlamaktır (36).

#### **4.1.2.6. Limbus**

Limbus kornea ile sklera arasındaki geçiş zonudur. Limbustaki yapılar konjonktiva, tenon kapsülü, episklera, korneoskleral stroma ve aköz dışı akım aparatı olarak sayılabilir. Anatomik olarak Bowman ve Descement tabakalarının sonlandığı yerlerden geçen düzlem ile arkada Schlemm kanalı ile sınırlanan 1-1.5 milimetrelik alanı kapsar ve korneoskleral bileşke olarak adlandırılır. Limbusta epitel 10-12 katlıdır ve burada melanosit, Langerhans hücreleri, kan damarları bulunur. Bazal epitel hücreleri kök hücrelerinin çok yavaş bölünmesiyle oluşur. Kornea epiteli kök hücrelerinin, limbal epitel hücrelerin bazal tabakasında bulunduğu bildirilmektedir. Bunların büyük nükleusları, çok sayıda desmozom ve hemidesmozomları vardır. Tüm bu bulgular, kök hücrelerinin aktif metabolizmalarının olduğunu düşündürmektedir. Konjunktivanın aksine goblet hücresine rastlanmaz. Limbal kök hücreler önemli miktarda hasarlanırsa kornea epitelinin yerini hızla konjonktiva ve kan damarları alır (43).

#### **4.2. Kornea Yara İyileşmesi**

Kornea gözün en önemli refraktif kısmı olduğu için mekanik, kimyasal, enflamatuar cevap korneanın optik performansını etkileyecektir. Bu nedenle herhangi bir travma sonrası kararlı görmeye ulaşmak amacıyla kornea yara iyileşmesinde bir takım mekanizmalar söz konusudur. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri, sitokinler ve ECM proteinleri etkileşim içerisindedirler. Korneada farklı tabakalarda farklı mekanizmalarla yara iyileşmesi gerçekleşir.

#### **4.2.1. Epitel Yara İyileşmesi**

Epitel yara iyileşmesinde birçok hücreyel yapının ve sinyal moleküllerinin karşılıklı etkileşimi söz konusudur. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi kornea epitel yapısının devamında önemli rol oynar. Kornea epitel yara iyileşmesi birbirinin üzerine binen üç faza bölünebilir (44). Birinci fazda hemidesmozomlar kaybolur ve “fokal temas” denen geçici yapışkanlık kompleksi gerçekleştirilir. Bu faz süresince epitel hücreleri düzleşir ve yara kenarını koruyan bir kalkan halini alır. Bu faz proliferasyondan bağımsızdır. İkinci fazda proliferasyon ve farklılaşma söz konusudur. Üçüncü fazda hemidesmozomlar oluşturulur ve ECM sentezi ve yeniden yapılanması gerçekleştirilir. Bu basamakları epitel hücrelerinin metabolizmalarını arttırdıkları lag fazını takip eder.

**4.2.1.1. Lag Fazı:** Yaralanmanın ardından hücre göçünün başlamasına kadar geçen süre lag fazı olarak adlandırılır. Bu faz büyük ölçüde 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 (45). Bu proteinler yara iyileşmesi tamamlandıktan sonra başlayan hemidesmozomların yeniden sentezine dek, epitelin bazal membrana tutunmasını sağlar. Bunların yanında hücre yüzey glioproteinleri ve glikolipitleri de sentezlenir.

**4.2.1.2 Hücre Göçü:** Lag fazı tamamlandığında oküler yüzey epitelini yeniden tesis etmek için yaraya komşu hücreler göçe başlar. Normalde limbal kök hücrelerden köken alan bazal hücrelerin santrale doğru göç hızı haftada 120 mikrometre kadardır. Ancak yaralanmadan yaklaşık 5 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 mitozla normal epitel kalınlığı sağlanır. Zedelenmeden 3 saat sonra rejeneren olan epitel uçlarında ve bazal laminada PMNL'ler belirir ve 36 saat kadar kalır, daha sonra giderek azalır ve kaybolurlar. Büyük defektlerde onarıma konjonktiva epitelide katılabilir. Kornea epitelide, abrazyonu 1-4 gün içinde örtülürken, konjonktiva epitelide iyileşme 1-2 hafta veya daha uzun zaman gerektirir (38).

**4.2.1.3. Hücre Çoğalması ve Farklılaşması:** Hücrelerin göçünden sonra hücre çoğalması gerçekleşir. Santral epitel defekti sırasında, periferik limbal hücreler santrale doğru göç ederek, kornea epitelinin devamlılığını sağlar. Bunlar 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 (46). Kornea epitelde debridman hücre çoğalmasını limbal hücrelerde 4.5, korneanın periferik hücrelerinde ise 3.2 kat artırır. (47).

#### **4.2.2. Bazal Membran Yara İyileşmesi:**

Debridman sonrası açığa çıkan bazal membrana enflamatuar hücreler (PMNL'ler) bağlanır. Bu durum bazal membranı sindirebilen proteazların salınmasına neden olur. Kornea yaralanmasından sonra proteaz içerdiği için gözyaşının da rolü vardır. Ek olarak kornea epitel hücreleri de bazal membranı sindirme yeteneğine sahip metalloproteinazlar salgılar (48,49). Bazal membranın

proteaz sindirimi sonrasında yapısı ve fonksiyonu değişir. Bazal membranın parçalanması, yeniden epitelizasyonu birkaç biçimde etkiler:

1- Stromal ECM ile epitel hücrelerinin etkileşime girebilmesi. Bu durum göç eden endotel hücrelerinde yeni integrin ifadesi ve aktivasyonunu indükler (50).

2-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 (51).

Bazal membran epitel morfolojisi, farklılaşması ve devamında dinamik bir role sahiptir. Bu nedenle kornea epitelinin iyileşmesinde önemli yer tutar. Fotoablasyondan 24 saat sonra göç eden epitel hücreleri, etraflarına laminin-1 sentez eder ve depolar (52). Laminin-1 bazal membranın esas bileşenlerindedir ve adezyon, proliferasyon, farklılaşma gibi birçok hücreyel olayı düzenler. Laminin-1, 5 ve  $\alpha\beta$ -4 integrin arasındaki etkileşim hücre göçünü düzenler. Laminin ile eş zamanlı olarak konneksin, desmoglein-1 ve -2 üretimi de artar. Bu proteinler yardımıyla bazal hücrelerle bazal membran arasında geçici adezyonlar oluşur. Bunlar, yara iyileşmesinin tamamlanmasından sonra başlayacak olan hemidesmozomların yeniden sentezine kadar, epitelin bazal membrana tutunmasını 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 1 yıl sürer (38).

### **4.2.3. Epitel ve Yüzeyel Stromal Defekt**

Epitel ve Bowman zarı ve ön stroma tabakasının kaybı sözkonusudur. Epitel iyileşmesi ile süre açısından farklılık gösterir ve daha uzundur (en az 6 hafta). Altındaki yüzey, yani stroma, yara iyileşmesi için ideal bir platform değildir. Bowman zarı ve normal stroma rejenerasyon olmayacağından defektin yerini kollajenöz skar dokusu alabilir veya defekt hiperplastik bir epitel ile doldurulabilir (53).

### **4.2.4. Stroma Yara İyileşmesi**

Stromal iyileşme yeni kollajen sentezi, bunların birbirine bağlanması, proteoglikan sentezi ve stromanın gerilme gücünün yeniden oluşmasını sağlayan yara yeri şekillenmesi aşamalarından oluşur. Zedelenmeden 1.5 saat sonra stromal yarada PMNL'ler görülür. Polimorfo nükleer lökositler 12 saatte pik yapar, 72 saat sonra giderek azalır ve fagositoza yardımcıdırlar. Hasar gören epitel tabakasının altındaki keratositlerde apoptozis gözlenir. Hasarlı epitel ve apoptozise uğrayan keratositlerden sitokinlerin salınmasıyla iyileşme kaskadı başlamaktadır. Keratositlerde kollajen sentezi zedelenmeden 1.5 saat sonra başlar ve 8. 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 son derece duyarlıdır. Epitel yaralanmalarında, yaralanmanın altındaki keratositler dejenerasyon olur ve hücresiz kalan stromaya bir süre sonra çevreden gelen yeni keratositler yerleşir. Stromal yaralanmalarda da keratositlerde bir dizi yapısal değişiklik izlenir. Bunlar birbirleriyle olan bağlantılarını kaybeder, büyür ve çoğalır. Ortaya çıkan bu hücreler fibroblastların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini taşır. Stromal iyileşme

sırasında keratositler, aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşmektedir (38). Kontraktil özellikte olan bu hücreler kollajenleri, glikozaminoglikanları ve diğer matriks proteinlerini üretmektedir. Normal stroma tip I kollajenden oluşurken korneal skar dokusu ise büyük oranda tip III kollajenden kuruludur. Skar dokusunun yeniden düzenlenmesi sonrasında tip III kollajen, stromanın normal yapısında olan tip I kollajen ile yer değiştirir. İlk hafta içerisinde stromada hiyaluronik asit üretimi görülür ve zamanla yerini kondrotin sülfat ve keratan sülfata bırakır. Ayrıca keratositlerden keratinosit growth faktör (KGF), hepatosit growth faktör (HGF) gibi büyüme faktörleri de salgılanmaktadır (39). Stromal iyileşmenin tam olarak gerçekleşmesi haftalar almasına rağmen keratositlerde hipertrofi ve çok sayıda nukleolus gelişimi gibi yapısal değişiklikler oldukça erken gözlenir.

Hasar sonrası ikinci haftada kontraktil faz başlamaktadır. Miyofibroblastlarda kas hücrelerindeki benzer şekilde aktin ve miyozin kontraktil ünitleri oluşur (53). Yara iyileşmesi ve korneanın gerilme gücünün yeniden oluşması erken dönemlerde duraklayabileceği gibi 4 yıl sonra bile hala devam edebilmektedir.

#### **4.2.5. Endotel Yara İyileşmesi**

İnsan endotel hücrelerinde doğumdan sonra neredeyse hiç mitoz görülmez. Yaşlılıkta olduğu gibi endotel hücreleri yavaşça kaybolursa, komşu hücrelerin genişlemesiyle boşluklar kapanır. Daha büyük ve çok sayıdaki hücreyi ilgilendiren defekt söz konusu olduğunda ise 250 mikrometre uzaktaki hücreler bile yara yerine doğru uzar ve 80-100 mikrometre/gün hızla yara yerini kapatmak üzere ilerler. Yayılma ve göçme sırasında hücreler birbirinden kopmazlar. Tek



katlı tabakanın oluşumu tamamlandığında bariyer ve pompa fonksiyonları tekrar devreye girer ve 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 Descement 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 (38).

### **4.3. Kornea Yara İyileşmesinde Etkili Mediatorler**

#### **4.3.1. Büyüme Faktörleri**

Büyüme faktörleri birçok hücre tarafından salgılanan, hücre çoğalmasını, göçünü ve hayatının devamını uyararak, bazı durumlarda ise bunları engelleyen peptidlerdir. Hareketlerini otokrin, jukstakrin veya en yaygın biçimde parakrin mekanizmalarla gerçekleştirirler. Karşılıklarına gelen hücre yüzey reseptörleri tirozin kinaz veya G proteiniyle eşleşen transmembran glikoproteinleridir. İlgili reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri deoksi ribonükleik asit (DNA) sentezinin sentez fazını uyarır ve ardından hücre çoğalması gerçekleşir (54). Göz, birçok growth faktör için hedef doku konumundadır: Epidermal growth faktör (EGF), Platelet-derived growth faktör (PDGF), İnsulin-like growth faktör (IGF), Transforming growth faktör (TGF) - $\alpha$  ve - $\beta$ , Fibroblast growth faktör (FGF) (55).

##### **4.3.1.1. Epidermal Growth Faktör**

Epidermal growth faktör epitel hücreleri için potent bir mitojen olan, 6 kilodalton ağırlığında kompakt bir polipeptittir. Epidermal growth faktör reseptörü 175.000 dalton ağırlığında bir membran glikoproteinidir, konjonktiva

epitelinde, kornea epitel ve endotelinde, irisin pigment tabakasında, lens epitelinde mevcuttur. Reseptörde EGF'nin yüksek ve düşük afinite ile bağlandığı bölgeler vardır. Epidermal growth faktörün reseptörüne bağlanması tirozin kinazı aktive eder, 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 (56). Hem yüksek hem de düşük afiniteli EGF reseptörleri özellikle limbal bölgede olmak üzere, kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Düşük afiniteli reseptörler daha az miktarda stroma keratositlerinde yer almaktadır (57). Lakrimal bezdeki ve gözyaşındaki EGF'nin de kornea epiteline etkileri olmaktadır (58). Bu bulgular EGF'nin, otokrin, parakrin ve jukstakrin mekanizmalarla kornea hücrelerini etkilediğini düşündürmektedir. Epidermal growth faktör korneal vaskülarizasyon ile de ilişkili bulunmuştur (59). Topikal EGF epitel iyileşmesini uyarmakta, özellikle limbal ve periferal kornea epitel rejenerasyonunda maksimum etki göstermektedir (60). Epidermal growth faktör normal kornea epitel kalınlığının devam ettirilmesinde de önemlidir. Stromada timidin alınmasını artırır, fibroblastlarda mitoz ve migrasyonu aktive eder, aktive fibroblastların insizyon yerinde çoğalmasını sağlayacak kemotaksisten sorumludur. Epitel ve stromal iyileşmeye olan etkileri ile gerginliğe karşı yara direncini artırır, ayrıca endotel proliferasyonuna da yol açar (57,61).

#### **4.3.1.2. Fibroblast Growth Faktör**

Fibroblast growth faktör ailesi ortalama 18 kilodalton ağırlığında olan, 20 kadar heparin bağlayan, birçok dokuda çoğalma, farklılaşma, göç, ECM

depolanması ve anjiogenez gibi olayları düzenleyen protein grubudur. Parçalanmadan korunmak için düşük afiniteli heparan sülfat proteoglikanlarına tutunurlar ve hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörlerine bağlanırlar (62). Asidik FGF, Bowman zarı ve Descemet membranlarında, endotel hücrelerinde, 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, endotel ve stroma hücrelerinde mitojeniktir (63). Bazik FGF, kornea fibroblastlarında DNA sentezini, yara gerginliğine direncini ve endotel hücrelerinde mitotik hızı artırır (55).

#### **4.3.1.3. Transforming Growth Faktör Alfa**

Fare embriyosunda TGF- $\alpha$  sentezi engellenerek yapılan deneylerde gözkapığı gelişim bozukluğu, mikroftalmi, yüzeyel opasiteler, göz kapığı ve ön segment disgenezisi, korneal enflamasyon ve skar oluşumu, lense ve retinaya ait defektler gözlenmiştir. Transforming growth faktör- $\alpha$ , EGF gibi gözyaşında bulunur ve olası kaynak yine lakrimal bezlerdir. Ek olarak kornea epitel hücreleri TGF- $\alpha$ , TGF $\alpha$  mRNA'sı ve proteinini içerirler. Bu durum EGF ve TGF- $\alpha$  üreten epitel hücrelerinin otokrin mekanizmayla normal epitel sikluslarını devam ettirdiklerini düşündürmektedir. Endotel hasarında aköz humörde TGF- $\alpha$  konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir (55).

#### **4.3.1.4. Transforming Growth Faktör Beta**

Transforming growth faktör- $\beta$  ailesi TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3'den oluşan yaklaşık 25 kilodalton ağırlığında ve birçok doku tarafından üretilen polipeptidlerdir. Transforming growth faktör- $\beta$  dimerik, inaktif biçimde salgılanır ve latent growth faktör havuzu oluşturmak üzere ECM'ye bağlanır, ekstraselüler

veya membrana bağlı enzimlerle aktif hale getirilir (64). Transforming growth faktör- $\beta$  aktivasyonu ECM üretimi, hücre büyüme ve farklılaşması gibi cevaplara neden olur (65). Transforming growth faktör- $\beta$ 'nın genel olarak epitel, endotel hücreleri, lökositlerin büyümesini engellediği ve fibroblast üretimini uyardığı kabul edilmektedir (66). Transforming growth faktörün epitelden stromaya salgılanması ve gözyaşında üretimi stromal hücrelerde çoğalma ve göçe neden olur. TGF- $\beta$ 'nın enflamasyon odağına fibroblast, monosit ve makrofajları çekme özelliği de vardır (67). Bunların dışında İnterlökin (İL)-1, İL-6, TNF- $\alpha$  epitel göçünde indirekt olarak etkili olabilmektedirler (64). Tavşanlarda korneal insizyonlarda gerilmeye karşı yara direncini arttırıcı etki gösterir. Bu etkisini insizyon yerinde kemotaksis ile fibroblast sayısını arttırarak gerçekleştirir. Ayrıca MMP sentezini azaltması ve metalloproteinaz doku inhibitörü sentezini arttırması da olasıdır (55).

#### **4.3.1.5. Keratinosit Growth Faktör**

Keratinosit growth faktör, FGF ailesinin üyelerinden biri olup, yaklaşık 28 kilodalton ağırlığında tek zincirli bir polipeptiddir ve keratinositler ile epitel hücreleri için mitojeniktir. Keratinosit growth faktörün EGF, TGF- $\alpha$ , FGF ile aynı sinyal yolağını paylaştığı düşünölmektedir. Keratinosit growth faktörün hedef hücrelere salınma ve depolanmanın yapıldığı stromada biriktirmek için heparine bağlanabileceği düşünölmektedir (68). Keratinosit growth faktör reseptörü mRNA'sının in vitro olarak kornea epitel hücrelerinde anlamlı miktarda bulunduğu ama stroma keratositlerinde çok düşük miktarda olduğu tespit edilmiştir (64). Aksine KGF'nin kültüre keratositlerde üretildiği, ancak epitel hücrelerinde üretilmediği tespit edilmiştir. Bu durum KGF'nin stromada üretilip,

epitel hücrelerinde parakrin bir mekanizma ile etkili olduğunu göstermektedir (69). Keratinosit growth faktör reseptörünün limbal fibroblastlarda ve epitel hücrelerinde, santral korneaya göre daha fazla bulunduğu görülmüştür. Bu durum KGF'nin tercihen kök hücrelerin fonksiyonunu düzenlediğini düşündürmektedir (70). Keratinosit growth faktörün sürekli olarak düşük miktarda salınmasının sağlıklı korneal epitel bütünlüğünün sağlanmasında rolünün olduğu düşünülmektedir (71). Son yapılan çalışmalarda İL- $\alpha$  ve İL- $\beta$  gibi sitokinlerin keratositlerden KGF salgılanmasında rol aldığı kabul edilmektedir (72).

#### **4.3.1.6. Hepatosit Growth Factor**

Hepatosit growth faktör yaklaşık 90 kilodalton ağırlığında bir glikoproteindir. Mezenşimal orjinli hücrelerden salgılanır, travma, enflamatuar uyarılar ve koagülasyon kaskadındaki proteazlarla aktif hale gelir. Keratinosit growth faktör gibi HGF de çeşitli ECM bileşenlerine bağlanabilir. Hepatosit growth faktör reseptörü tirozin kinaz özelliği taşır. Korneada HGF reseptörü en yoğun olarak epitel hücrelerinde bulunur; ancak HGF klasik parakrin etki ile fibroblastlardan üretilerek epitel hücrelerine etki eder (73). Keratinosit growth faktörün tersine, HGF üretimi ve reseptörü kornea santralinde daha yoğundur. Hepatosit growth faktör hücre göçünü uyarır, stroma fibroblastlarına etkisi minimaldir (70). Hepatosit growth faktör gözyaşında da bulunur ve kornea epitel katının bütünlüğünün sürdürülmesinde katkısının olduğu düşünülmektedir (74). Aköz hümörde bulunan HGF'nin endotel hücrelerine bağlanarak, bu hücrelerin bütünlüklerinin devamında otokrin mekanizma ile rol oynadığı sanılmaktadır (6).

#### **4.3.1.7. Platelet Derived Growth Faktör**

Platelet derived growth faktör sistein bağlı, 35 kilodalton ağırlığında, A ve B zincirlerinden oluşmuş dimer yapısındadır (54). Bu faktör'ün -AA, -AB, -BB izomerleri vardır ve reseptörü heterodimerik ve monomerik formlarda bulunur (64). Platelet derived growth faktör'ün reseptörüne bağlanması mitojenik etkileri indükler (54). Platelet derived growth faktör reseptörleri kornea fibroblastlarında ve endotel hücrelerinde bulunur. Platelet derived growth faktör-BB proteini epitel hücrelerinde üretilir ve en yüksek miktarda bazal membrana bağlanır (67). Endotel hücrelerinin ve fibroblastların göçü PDGF-BB ile uyarılır. Fibronektin varlığında PDGF-AA ve -BB epitel hücrelerinin kemotaksisini uyarmaktadır (64). Platelet derived growth faktör aköz hümörde eser miktarda bulunur ve fibroblastların TGF- $\beta$ 'ya olan çoğalma cevabını artırır (75).

#### **4.3.1.8. Diğer Büyüme Faktörleri**

Kanıtlar sinir büyüme faktörü (SBF), nörotropin-3, -4, glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör gibi nörotrofik faktörler ile reseptörlerinin korneada bulunduğunu ve bunların epitel hücre çoğalmasını uyardığını göstermektedir (76). Kornea epitel bütünlüğünün devamında kornea sinirlerinin önemli rolünün olduğu düşünölmektedir. Bu nedenle kornea sinirlerinden salınan nörotrofik faktörler de doku homeostazında rol oynayabilir (77). Kültürde stroma fibroblastlarının büyümeleri SBF ile artırılmaktadır (76).

İnsülin like growth faktörü ile reseptörleri kornea epiteli, stroma, trabeküler ağda bulunmaktadır ve hücre farklılaşması, çoğalmasında rol oynar (78).

### 4.3.2. Kornea Yara İyileşmesinde Enflamatuvar Sitokinlerin Rolü

Sitokinler kornea yara iyileşmesinde önemli rol oynarlar. Kornea epiteline olan travma sonrasında epiteldeki çeşitli sitokinlerin seviyesi artar. Bunların en önemlileri İL-1, İL-6 ve TNF- $\alpha$ 'dır (67). İnterlökin-1 ve İL-6'nın salınması travmanın ciddiyeti ile ilişkilidir (79). Bunların artması epitel yara iyileşmesi mekanizmalarını başlatır. İnterlökin-6 integrinleri düzenleyerek kornea epitelinde göçü uyarır (80). İnterlökin-1, EGF ile sinerjik biçimde in vitro epitel yara kapanmasını artırır (81). İnterlökin-1 ve TNF- $\alpha$  kollajenin yeniden şekillendirilmesinde önemli rol oynar. Bunlar kornea fibroblastlarında İL-8, monosit kemotaktik protein gibi bir takım kemokinlerin üretimini artırır ve ilginç bir biçimde sadece epitel yaralanmasında üretilir (82). Ancak bu sitokinlerin etkileri her zaman yararlı değildir. İnterlökin-1, İL-6 ve İL-8 kornea stromasında erimeyi uyarabilir (83).

### 4.4. Kornea Neovaskülarizasyonu

Neovaskülarizasyon (veya anjiogenez) ortamda var olan damarlardan bir takım faktörlerin aktivasyonu ile yeni damar oluşumudur (20). Organizmada bu durum anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin dengesi sağlanarak sıkı bir şekilde kontrol edilir (Tablo1).

**Tablo-1:** Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler

---

#### **Anjiogenik faktörler:**

Vasküler endotelyal growth faktör

Asidik and basik fibroblast growth faktör

Plasenta growth faktör

Platelet-derived epidermal growth faktör

Platelet-derived growth faktör

Transforming growth faktör  
Epidermal growth faktör  
Hepatosit growth faktör  
Platelet-activating faktör  
Tümör nekrozis faktör- $\alpha$   
İnsulin-like growth faktör  
Anjiogenin  
Anjiopoetin-1  
Granulosit-makrofaj coloni-stimulan faktör  
Granulosit coloni-stimulan faktör  
İnterlökin-1,2,6,8  
Prostaglandin E1, E2  
Vascular integrin  $\alpha v\beta 3$   
Matriks metalloproteinazlar  
Histamin

### **Antianjiogenic faktörler**

Thrombospondin  
Fibronektin  
Anjiostatin  
Endostatin  
İnterferon- $\alpha, \beta, \gamma$   
İnterlökin-12  
Matriks metalloproteinaz inhibitörleri  
Platelet factor 4  
Retinoik asit

---



Kornea neovaskularizasyonunda üç faz vardır:

#### **4.4.1. Erken Prevasküler Faz**

Enflamasyonla seyreden proteolizis dönemidir. Enflamasyona bağlı hasar ile damarlarda dilatasyon, geçirgenlik artışı ve ödem olur. Kısa süre içerisinde hücre elemanlarının konfigürasyonunda değişiklikler başlar. Kan akımı yavaşlaması ile eritrositler merkezde kümeleşirken PMNL'ler damar duvarına yerleşirler. 2-3 saat sonra PMNL'ler damar dışına çıkarak, kornea stromasına göç ederler. 24-48 saat sonra da PMNL infiltrasyonu pik yapar. Polimorfonükleer lökositler kemotaksisi başlatarak bazı sitokinlerin salınımına neden olur. Lökositlerden salınan proteolitik enzimler ile damarların bazal membranı parçalanır. Monosit ve makrofaj göçü ise 24 saat sonra başlar. Damar geçirgenliğinde artış ve ödem normalde sıkı bir dizilim gösteren kollajen fibrillerin birbirinden ayrılmasına neden olur. Ödemle beraber ekstravasküler dokuya geçen fibrinojen pıhtılaşarak vaskularizasyonda önemli rol oynar (84,85).

#### **4.4.2. Vasküler Tomurcuklanma Fazı**

Yeni damar oluşumunda endotel hücre göçünün rolü kesin olarak belirlenmiştir. Bazal membran devamlılığının bozulmasından sonra endotel hücreleri psödopodları ile 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. Anjiyogenezde gerekli olan MMP'ler enflamatuar hücrelerden ve endotel hücrelerinin kendilerinden kaynaklanabilir. Anjiyogenik

faktörler endotel hücrelerinde MMP'lerin salınmasını ve fonksiyonlarını arttırabilir (86). Göç olayı tek başına neovaskülarizasyon için yeterli olmakta, hücreyel proliferasyon olmasa bile endotel hücrelerinin yayılımı, göçü ve yeniden dağılımı ile yeni damar oluşumu gerçekleşebilmektedir (87). Bu nedenle endotel hücre göçünün vaskülarizasyondaki en önemli basamak olduğu söylenebilir. 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 (88).

#### **4.4.3.Vasküler Matürasyon Fazı**

Kapiller tomurcuklar, distal ucunda göç, proksimal ucunda ise proliferasyon gösteren endotel hücrelerinin bulunduğu solid oluşumlardır. Ortamda çoğalan endotel hücreleri zamanla lümen oluşturacak şekilde yan yana gelir ve primitif damar şeklini alır. Bu sırada endotel hücrelerinden anjiogenik uyarı ile ECM proteinleri ortaya çıkar. Ekstrasellüler matriks proteinleri perivasküler boşluğa ulaşarak, hücre proliferasyonunu gerçekleştirdiği gibi, damar çeperinin düzenli olmasını da sağlar. İntegrin bağlayan ECM proteinleri, endotel hücrelerinin sıkı bir şekilde yapışmalarına yardımcı olur. Zamanla yeni oluşan damarların bazal membranları devamlı hal alır ve perisitlerin endotel hücrelerini çevrelemesi ile ana damar oluşumu izlenir. Postkapiller venüllerden oluşan primitif damarlar zamanla birbirleriyle ilişkiye geçer ve kan akımı başlar. Anjiogenik uyarının yetersiz kaldığı durumlarda ise vasküler yapılarda daha fazla uzama gerçekleşmez ve regresyon gözlenir (84).

## **4.5. Kornea Neovaskülarizasyonunu Uyaran Faktörler**

### **4.5.1.Vasküler Endotelyal Growth Faktör**

Homodimerik yapıda, disülfit bağı ile bağlı, 34-42 kilodalton ağırlığında, heparin bağlayan, vaskulotropin olarak da bilinen, çok fonksiyonlu potent bir sitokindir ve esas olarak endotel hücrelerinden salgınmaktadır (89). Vasküler endotelyal growth faktör spesifik bir gen tarafından kodlanır ve yapılarındaki aminoasit sayısına göre belirlenmiş altı farklı izoformu vardır: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>. İnsanlarda en fazla VEGF<sub>165</sub> izoformu bulunur ve büyük oranda heparine bağlanarak salgınmaktadır (1).

Vasküler endotelyal growth faktör biyolojik aktivitesini temel olarak endotel hücreleri üzerindeki tirozin kinaz yapılı, VEGF reseptör (VEGF-R)-1 ve VEGF-R2 ile lenf damarları üzerindeki VEGF-R3 adlı üç reseptörü ile gerçekleştirir. Vasküler endotelyal growth faktör -R1 ve -R2 büyük ölçüde damar endotel hücrelerinden salınır ve anjiogenez ile damar geçirgenliğinde görev alır. Vasküler endotelyal growth faktör R-3'ün lenfanjiogenezin moleküler regülasyonundan sorumlu olduğu sanılmaktadır. Vasküler endotelyal growth faktörün ayrıca tümör metastazı ve lenfödem gibi patolojik olaylarda da rol aldığı bildirilmiştir (89). Vasküler endotelyal growth faktör reseptörlerinin aktivasyonu fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz, guanozin tri fosfataz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile eder ve DNA transkripsiyonu başlatılır (90).

Vasküler endotelyal growth faktör düzeyi başta Ras ve human epidermal growth faktör reseptör-2 onkogenleri olmak üzere, p53 gen mutasyonu, İL-1, İL-6, İL-10, İL-13, FGF, PDGF, TGF- $\beta$ , İGF-1, TNF- $\alpha$  ve nitrik oksit (NO) gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir (91). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif

stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hipoksi ile indüklenebilen faktör (HIF)-1 de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (92). Vasküler endotelyal growth faktörün salınımında en önemli iki faktör hipoksi ve enflamasyondur. Vasküler endotelyal growth faktöre maruz kalan damarlarda endotel hücrelerinde fenestrasyon, veziküler organel ve transselüler gap oluşumuyla permeabilite artmaktadır. Vasküler endotelyal growth faktörün neden olduğu vasküler permeabilite artışı kemotaksisin ve enflamasyonun devamında da önemlidir (93). Vasküler endotelyal 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 (94).

Vasküler endotelyal growth faktör, damar endoteli, düz kas hücreleri, arteriollerdeki fibroblastlar, böbrek glomerülleri, bronşlar, overler, adrenal bezler, dalak ve tonsillerde bulunmaktadır (95). Aort düz kas hücrelerinde üretilerek salınan VEGF büyük damarların intimal hasarı sonrasında intimal onarımı ve büyümeyi kolaylaştırırken, hasarın uzamasını sınırlayıcı etkiye sahiptir (96). İnsan koroner arterlerinde, aterosklerotik plak bölgesiyle aterosklerotik olmayan bölge karşılaştırıldığında aterosklerotik bölgede VEGF salınımında artış olduğu gösterilmiştir. Vasküler endotelyal growth faktörün, aterosklerotik 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 (97). Vasküler endotelyal growth faktör tümör büyümesini kolaylaştırmakta ve bu dokulardan fazla miktarda salınmaktadır (98).

#### **4.5.2. Fibroblast Growth Faktör**

Fibroblast growth faktör neovaskularizasyonun olduğu kornealarda vasküler bazal membrana bağlanmaktadır. Yeni damarların maturasyon derecelerine göre değişik yoğunlukta bağlanma söz konusudur (99).

#### **4.5.3.İnsülin Like Growth Faktör**

İnsülin like growth faktör-1'in hayvan modellerinde korneada anjiogenik etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (100).

#### **4.5.4.Anjiopoetin**

Bir çalışmada anjiopoetin (Ang)-1 ve -2'nin sistemik Tie-2 ile inhibisyonu kornea neovaskularizasyonunda gerilemeye neden olmuştur. Bu geriletmenin VEGF' den bağımsız olduğu düşünülmektedir (101). Ayrıca ratlarda Ang-2'nin inhibisyonunun kornea neovaskularizasyonunu engellediği bildirilmiştir (102).

#### **4.5.5.Matriks Metalloproteinazlar (MMP):**

MMP-2'nin kornea neovaskularizasyonunda üretiminin arttığı tespit edilmiştir (103).

### **4.6. Kornea Neovaskularizasyonunu engelleyen faktörler:**

#### **4.6.1. Anjiostatin:**

Anjiostatin 38 kilodalton ağırlığında, plazminojenin proteolitik parçalanma ürünlerinden olup güçlü bir antianjiogenik faktördür (104). Anjiostatin ve benzeri fragmanların implantasyonu korneada FGF ve anjiogeninin uyardığı neovaskularizasyonu engellemektedir (105). Plazminojenin karaciğer dışında üretimi ve korneada anjiostatin oluşumuna ait kanıtlar mevcuttur (106).

#### **4.6.2. 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 (107). Endostatin, implante edildiği kornealarda bFGF'nin uyardığı neovaskülarizasyonu engellemektedir (108).

#### **4.6.3. Pigment Epiteli Derived Faktör:**

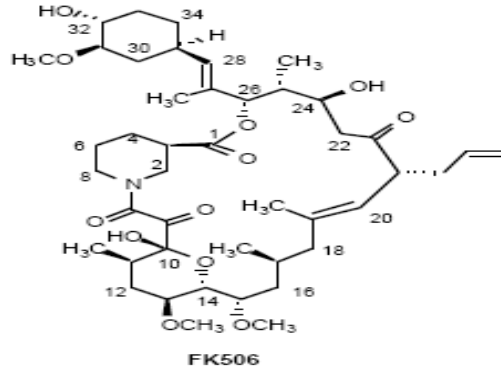
Pigment epiteli derived faktör güçlü bir antianjiogenik ve nörotrofik faktördür. Gözde retina, iris ve korneada bulunmuştur (109). Pigment epiteli derived faktörü bloke eden antikolar kornea stromasına yerleştirildiğinde vaskülarizasyonun uyarıldığı tespit edilmiştir (110).

#### **4.6.4. Trombospondin-1:**

Trombospondin (Tsp)-1 gözde kornea, iris, sklera ve retinada üretilir (111). Korneada Tsp-1 esas olarak kornea epitelinin bazal tabakasında üretilmektedir (112). Trombospondin-1 geninin deneysel olarak hasara uğratıldığı farelerde, korneada enflamasyonun indüklediği anjiogenezin olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında spontan anjiogenezin normal farelerde görülmemesi, Tsp-1'in kornea vaskülarizasyonunun düzenlenmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (113).

#### **4.7. Tacrolimus**

Tacrolimus (FK506, Prograf®) makrolid grubu bir laktondur. İlk defa 1984 yılında *Streptomyces tsukubaensis*'in fermantasyon ürünü olarak tespit edilmiştir. Siklosporin ve Tacrolimus kalsinörin inhibitörleri olarak adlandırılan güçlü immunosupresif ajanlardır. Tacrolimus'un kimyasal formülü  $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ 'dur (Şekil 1).



**Şekil 1:** Tacrolimus'un kimyasal formülü.

Siklosporin gibi Tacrolimus'un emilimi de büyük ölçüde değişken olduğundan kan konsantrasyonları çeşitlilik gösterebilir ve biyoyararlanımı %5-67 arasında (ortalama %29) değişir (114). Pediatrik hastalarda klirensi fazla olduğu için daha yüksek dozlar gerekebilir (115). Tacrolimus, barsaktan emilimi takiben kana geçtikten sonra öncelikli olarak albumin gibi plazma proteinlerine bağlanır, eritrositler ve lenfositlerde dağılır. Bu nedenle kan konsantrasyonu plazmadan 10-30 kat daha yüksektir. Tacrolimus atılmadan önce neredeyse tamamen metabolize edilir. Siklosporin gibi Tacrolimus da temel olarak CYP3A4 enzim sistemi tarafından metabolize edilir. Ana metabolizma yolları demetilasyon ve hidroksilasyondur (116). Ana metabolizma ürünü olan 31-O-demetil-Tacrolimus immunosupresif etkiye sahiptir. İlacın kan dozunun sadece % 1'i böbreklerden, büyük kısmı ve metabolitleri feçesle atılır (117).

Tacrolimus esas olarak T hücrelerinin aktivasyonu ile etkileşime girerek immünsupresif etkisini gösterir ve T hücrelerine girdikten sonra FK506 binding proteine bağlanır. Bu kompleks kalsinörin fosfatazı inhibe eder. Kalsinörin fosfataz T hücrelerinin nükleer faktörünün aktivasyonunda görev alır. T hücrelerinin nükleer faktörü, T hücrelerinden sitokin üretilmesi için gerekli transkripsiyon faktörüdür ve kalsinörin Tacrolimus tarafından bloke edilmesi İL-2,-3,-4,-5, İnterferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Granülosit makrofaj koloni stimülan faktör

(GMCSF), İL-2 ve -7 gibi T hücresi kaynaklı sitokinlerin üretimini tamamen durmasına neden olur (118).

Siklosporin ve Tacrolimus'un ilaç etkileşimleri benzerdir. CYP3A4 enzim sisteminin aktivitesini azaltan ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, eritromisin, diltiazem, verapamil, danazol, metilprednizolon Tacrolimus konsantrasyonunda artışa neden olur. Aksine CYP3A4 aktivitesini arttıran fenobarbital, alüminyum hidroksit, deksametazon, rifampin ve sodyum bikarbonat Tacrolimus konsantrasyonunu azaltır (119).

Tacrolimus tedavisi alanlarda nefrotoksisite, nörotoksisite, kardiyomiyopati, anemi, kronik diare, diabet, allerjik reaksiyonlar, lenfoproliferatif hastalıklar ve enfeksiyonlar bildirilmiştir. Siklosporine göre hiperkolesterolemi ve hipertansiyon daha az görülür; ancak gingival hiperplazi ve hirsutizm rapor edilmemiştir. (120).

Tacrolimus esas olarak karaciğer ve böbrek gibi solit organ transplantasyonlarında immünosüpresan ajan olarak kullanılmaktadır ve özellikle steroide dirençli red reaksiyonlarında etkilidir (121). Tacrolimus'un fokal ve yaygın iskemide nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (122). Tacrolimus'un tedaviye dirençli romatoid artritte de etkili olabileceğine dair kanıtlar vardır (123). Atopik dermatitte Tacrolimus kremin kullanımı onaylanmıştır (124).



## 5.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları ve Patoloji Anabilim Dalı'nın katkıları ile gerçekleştirildi. Ağırlıkları ortalama 250-300 gram olan 35 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat çalışmaya alındı. Çalışma süresince denekler Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ile çalışma gerçekleştirildi.

Ratlar her bir grupta 7 denek olacak şekilde randomize beş gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki ratların bir korneasında kimyasal yanık oluşturuldu. Topikal ve intraperitoneal tedaviye yanık işleminden 60 dakika sonra başlandı ve 7 gün devam edildi.

Gruplar:

1.grup (kontrol grubu): Yanık yapılmayan ve herhangi bir tedavi verilmeyen grup

2.grup (sham 1): Yanık yapılan deneklere hergün intraperitoneal serum fizyolojikten 1 mililitre enjekte edilen ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alınan grup.

3.grup (sham 2): Yanık yapılan deneklere hergün serum fizyolojikten 4 damla/gün damlatılan ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alınan grup.

4.grup: Yanık yapılan deneklere Tacrolimus solüsyonundan hergün 0,3 miligram/kilogram, 1 mililitre intraperitoneal olarak enjekte edilen ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alınan grup (125).

5.grup: Yanık yapılan deneklere 0,3 miligram/mililitre Tacrolimus solüsyonundan her gün 4 damla/gün damlatılan ve 8. günde dekapite edilerek korneaları alınan grup (125).

### **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 damla damlatıldı.

### **Cerrahi Teknik:**

Anestezi ve analjezi uygulanan kontrol grubunun dışındaki deneklerin kornealarından birinin sanraline % 100'lük gümüş nitrat kalemiyle 10 saniye süresince koter yapılarak 2 milimetre genişlikte kimyasal yanık oluşturuldu. Deney süresi tamamlanan ratlara anestezi altında dekapitasyon ve enükleasyon uygulandı.

### **Kornea Neovaskülarizasyonu Alanlarının Değerlendirilmesi**

Deneyin 8. gününde rat korneaları X40 büyütmede yarıklı lamba mikroskopuna monte edilmiş Sony dijital kamera (CCD- IRIS model DXC 107 AP) kullanılarak fotoğraflandı. Neovaskülarizasyon alanının tüm kornea alanına yüzdesi dijital bilgisayar imaj analizi kullanılarak hesaplandı (Topcon Image Net 2000, Itabashiku, Tokyo, Japonya) ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı (126).

### **Vasküler endotelial growth faktör immünohistokimyasal boyanması:**

İmmünohistokimyasal boyama için kornea santralinden geçen, limbustan limbusa uzanan, yanık alanını içeren, beş mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler deparafize ve rehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için 5 dakika % 3'lük hidrojen peroksitte tutuldu. Distile su ile yıkanan kesitler sitrat buffer solüsyonunda pH 6 (650 miliwatt mikrodalga)'da 5 dakika bekletildi. Tris buffer solüsyon (TBS)'unda 5 dakika tutulduktan sonra primer

antikor (VEGF, Neo Markers, United Kingdom) 28°C’de nemli ortamda uygulanarak 30 dakika bekletildi ve TBS ile yıkandı. Biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor 15 dakika uygulandı ve tekrar TBS ile yıkandı. Streptavidin peroksidaz konjugatında 10 dakika bekletildikten sonra yine TBS ile yıkandı. AEC kromojende 15 dakika bekletilen kesitler için zemin zıt boyası olarak Mayers hematoksilen kullanıldı. Preparatlar son olarak özel kapatma maddesi ile kapatılarak Olympus marka ışık mikroskopu ile randomize olarak incelendi. Aynı mikroskopun fotoğraf ataçmanı ile dokuların ve X40 büyütmede dijital fotoğrafları çekildi.

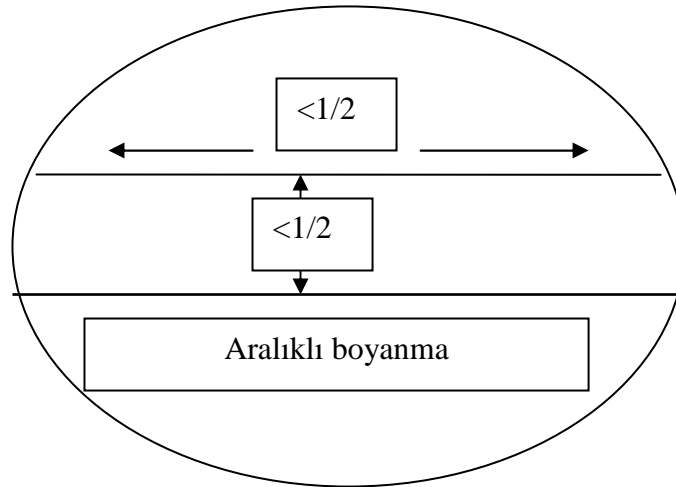
İmmünohistokimyasal boyamada, VEGF antikoruna ile boyanan kornea epitel hücreleri, stroma, endotel hücrelerinin, boyanma yaygınlık ve şiddetleri semikantitatif olarak değerlendirildi (12).

#### **Semikantitatif Değerlendirme:**

Her değerlendirme X40 büyütmede ve üç ayrı kesit alanında yapıldı.

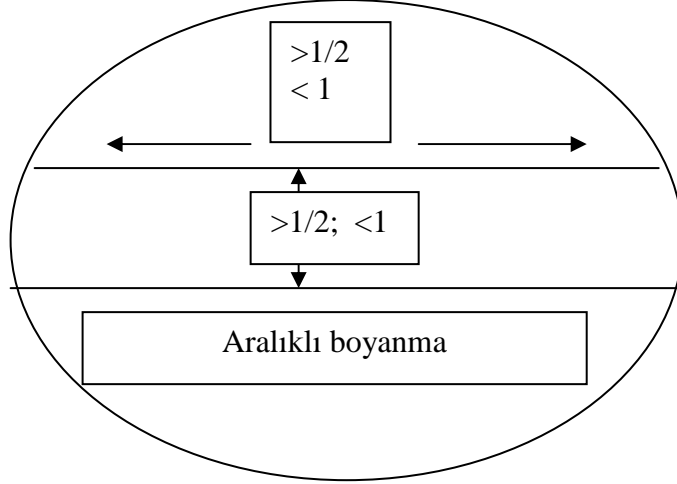
0. derece: Epitel, stroma ve endotel tabakalarında hiç boyanma olmaması

1. derece: Epitel ve stromanın hem kalınlığının hem de genişliğinin yarısından azında olan aralıklı boyanma.



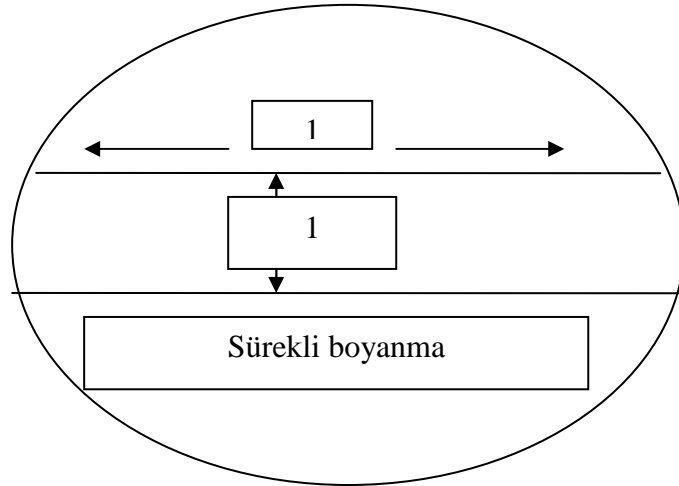
**Şekil 2:** Epitel ve stromada 1. derece boyanmanın şematize edilmesi

2. derece: Epitel ve stromanın hem kalınlığının hem de genişliğinin yarısından fazlasını tutan ancak, tam kat olmayan aralıklı boyanma.



**Şekil 3:** Epitel ve stromada 2. derece boyanmanın şematize edilmesi

3. derece: Epitel ve stromanın tüm kalınlığını ve tüm genişliğini kapsayan sürekli boyanma.



**Şekil 4:** Epitel ve stromada 3. derece boyanmanın şematize edilmesi.

Endotel tabakasında ise 0, 1, 2, 3 şeklindeki değerlendirme boyanmanın sürekliliği ve yoğunluğuna göre değerlendirildi.

Skorlamanın sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

### **İstatistiksel Analiz:**

Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları alındı. Çalışmanın istatistiksel analizini, Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi Sürüm 13 (SPSS for Windows versiyon 13) paket programı ile yapıldı. Çoklu karşılaştırma için Kruskal-Wallis varyans analizi ve gruplararası ikili karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 6. BULGULAR:

### Epitel VEGF İmmünohistokimyasal boyanması

Gruplardaki epitel VEGF immünohistokimyasal boyanma değerleri tablo 2’de belirtilmiştir.

**Tablo 2:** Gruplardaki epitel VEGF immünohistokimyasal boyanmalarının minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri.

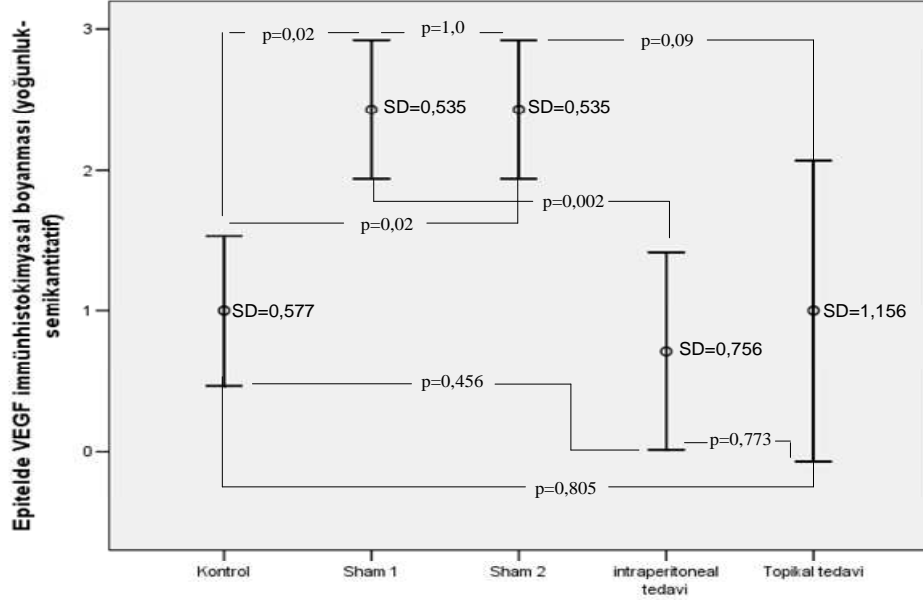
---

	Min	Maks	Ort	Stand. Sap
Kontrol	0.00	2.00	1.000	0.577
Sham 1	2.00	3.00	2.429	0.535
Sham 2	2.00	3.00	2.429	0.535
İntraperitoneal tedavi	0.00	2.00	0.714	0.756
Topikal tedavi	0.00	3.00	1.000	1.156

---

Tüm gruplar karşılaştırıldığında epiteldeki VEGF immünohistokimyasal boyanmaları birbirlerinden farklılık gösterdi ( $p=0,001$ ). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki korneaların epitel VEGF immünohistokimyasal boyanmasının sham 1 ( $p=0,02$ ) ve sham 2 ( $p=0,02$ ) gruplarından anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görüldü. Ancak sham 1 ve sham 2 grupları arasında epitel VEGF düzeyleri açısından fark saptanmadı ( $p=1,00$ ). İntraperitoneal tedavi grubundaki VEGF boyanma düzeyi sham 1 grubundan anlamlı ölçüde daha düşük bulundu ( $p=0,002$ ). Topikal tedavi grubunda da sham 2 grubundan daha düşük VEGF boyanma düzeyi tespit edildi ( $p=0,09$ ). Ancak topikal ve intraperitoneal tedavi gruplarında epitel VEGF boyanma düzeyleri arasında fark saptanmadı ( $p=0,733$ ). İntraperitoneal ( $p=0,456$ ) ve topikal

( $p=0,805$ ) tedavi gruplarındaki VEGF epitel boyanmaları kontrol grubundan farklı değildi.



**Şekil 5:** Gruplardaki epitel VEGF immünohistokimyasal boyanma değerleri

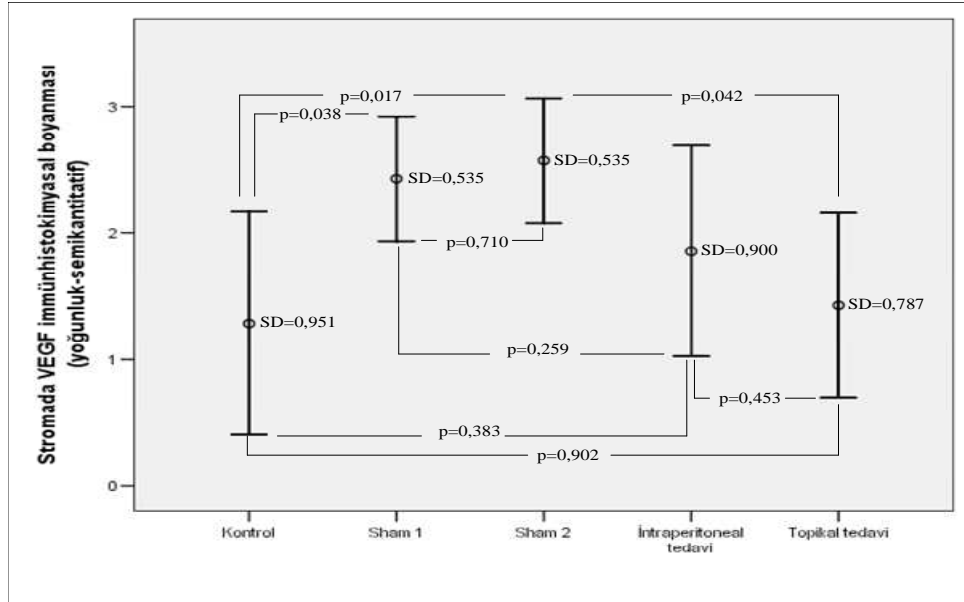
### Stromal VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması

Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma değerleri tabloda belirtilmiştir.

**Tablo 3:** Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanmalarının minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri.

	Min	Mak	Ort	Stand Sap
Kontrol	0.00	2.00	1.286	0.951
Sham 1	2.00	3.00	2.429	0.535
Sham 2	2.00	3.00	2.571	0.535
İntraperitoneal tedavi	1.00	3.00	1.857	0.900
Topikal tedavi	0.00	2.00	1.429	0.787

Tüm gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma yoğunlukları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ( $p=0,016$ ). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubundaki rat kornealarındaki stromal VEGF boyanma yoğunluğunun sham 1 ( $p=0,038$ ) ve sham 2 ( $p=0,017$ ) gruplarından anlamlı ölçüde daha düşük olduğu bulundu. Ancak sham 1 grubundaki stromal VEGF düzeyleri sham 2 grubundan farklı değildi ( $p=0,710$ ). İntraperitoneal tedavi grubundaki stromal VEGF boyanma düzeyi sham 1 grubundan farklı değildi ( $p=0,259$ ). Topikal tedavi grubunda sham 2 grubundan daha düşük stromal VEGF boyanma düzeyi tespit edildi ( $p=0,042$ ). Ancak topikal ve intraperitoneal tedavi gruplarında stromal VEGF boyanma düzeyleri arasında fark saptanmadı ( $p=0,453$ ). Kontrol grubundaki stromal VEGF boyanmaları intraperitoneal ( $p=0,383$ ) ve topikal tedavi gruplarından farklı değildi ( $p=0,902$ ).



**Şekil 6:** Gruplardaki stromal VEGF immünohistokimyasal boyanma değerleri



### Endotel VEGF İmmünohistokimyasal Boyanması:

Gruplardaki endotel VEGF immünohistokimyasal boyanma değerleri tabloda belirtilmiştir.

**Tablo 4:** Gruplardaki endotel VEGF immünohistokimyasal boyanmalarının minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri.

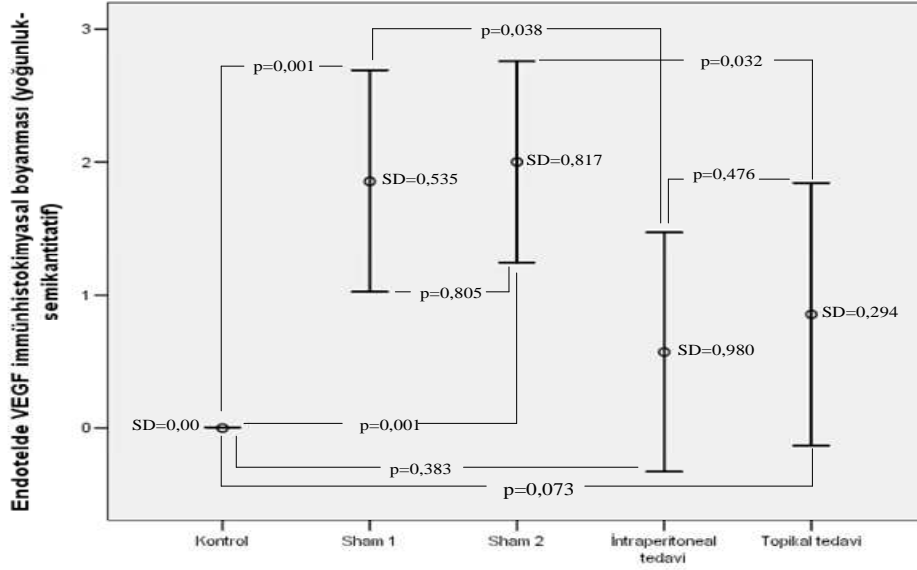
---

	Min	Mak	Ort	Stand. Sap
Kontrol	0.00	0.00	0.00	0.00
Sham 1	1.00	3.00	2.429	0.535
Sham 2	1.00	3.00	2.00	0.817
İntraperitoneal tedavi	0.00	2.00	0.571	0.980
Topikal tedavi	0.00	3.00	0.857	0.294

---

Tüm gruplardaki endotel VEGF immünohistokimyasal boyanma yoğunlukları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farkın olduğu görüldü ( $p=0,001$ ). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubunun kornealarındaki endotel VEGF boyanmasının sham 1 ( $p=0,001$ ) ve sham 2 ( $p=0,001$ ) gruplarından anlamlı ölçüde daha düşük olduğu bulundu. Ancak sham 1 ve sham 2 gruplarındaki endotel VEGF boyanma düzeyleri birbirinden farklı değildi ( $p=0,805$ ). İntraperitoneal tedavi grubundaki endotel VEGF boyanma yoğunluğunun sham 1 grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu bulundu ( $p=0,038$ ). Topikal tedavi grubunda sham 2 grubundan daha düşük endotel VEGF boyanma yoğunluğu tespit edildi ( $p=0,032$ ). Ancak topikal ve intraperitoneal tedavi gruplarında endotel VEGF boyanma düzeyleri arasında fark saptanmadı

( $p=0,476$ ). İnteraperitoneal ( $p=0,383$ ) ve topikal ( $p=0,073$ ) tedavi gruplarındaki endotel VEGF boyanma yoğunlukları kontrol grubundan farklı değildi



**Şekil 7:** Gruplardaki endotel VEGF immünhistokimyasal boyanma değerleri

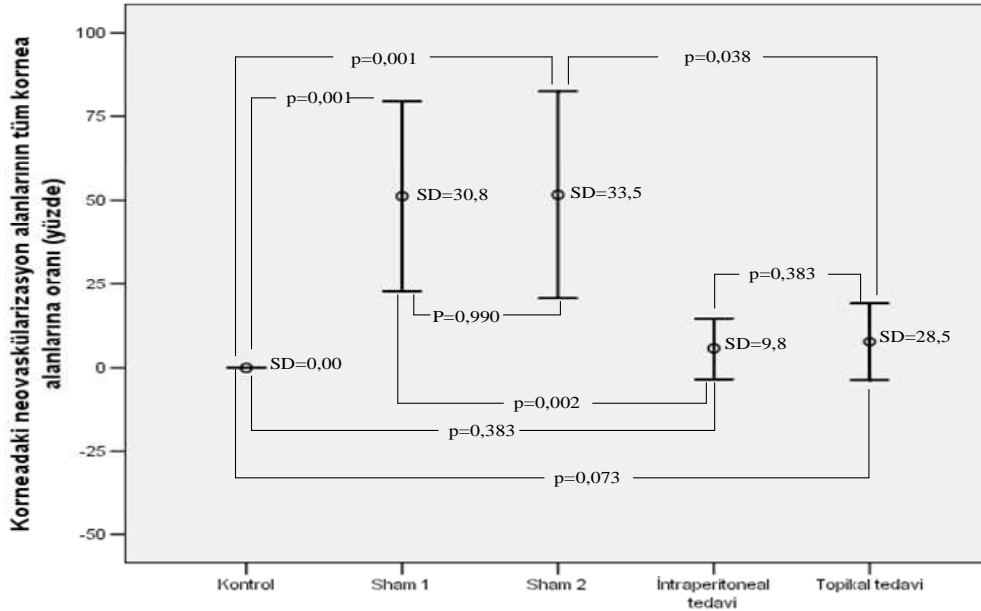
### Neovaskülarizasyon Alanlarının Karşılaştırılması:

Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdeleri tabloda belirtilmiştir.

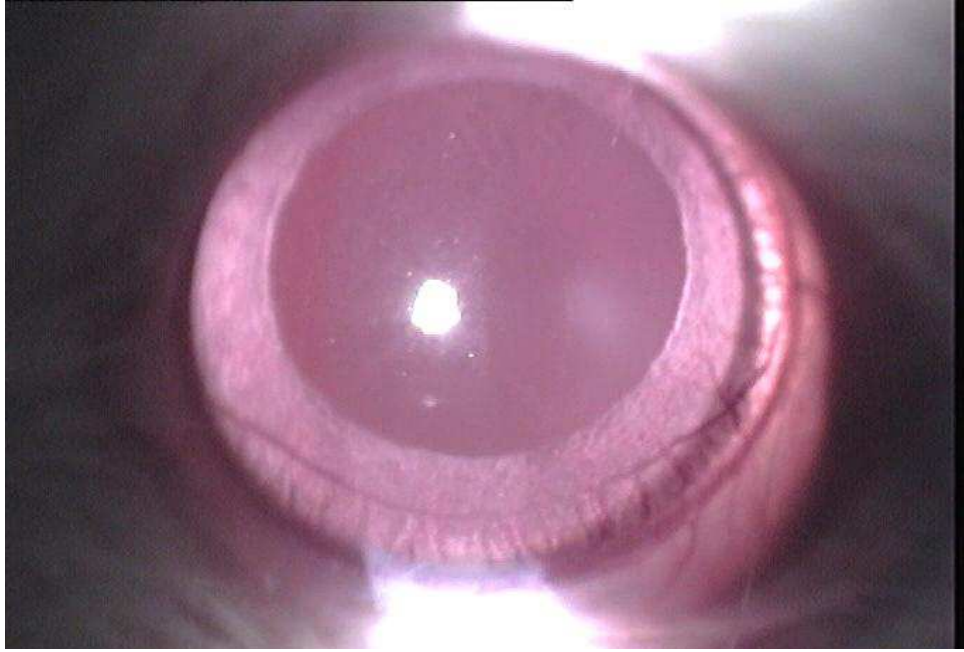
**Tablo 5:** Gruplardaki neovaskülarizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdelerinin minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri.

	Min	Maks	Ort	Stand. Sap
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00
Sham 1	11	100	51,2	30,8
Sham 2	27	100	51,7	33,5
İnteraperitoneal tedavi	0,00	21,5	5,7	9,8
Topikal tedavi	0,00	77,5	18,8	28,5

Kornealardaki neovaskularizasyon alanlarının tüm kornea alanına yüzdeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farkın olduğu görüldü ( $p<0,001$ ). Kontrol rat kornealarındaki neovaskularizasyon alanlarının tüm kornea alanına olan yüzdeleri sham 1 ( $p=0,001$ ) ve sham 2 ( $p=0,001$ ) gruplarından anlamlı ölçüde daha düşük olduğu bulundu. Ancak sham 1 ve sham 2 grubunun kornealarındaki neovaskularizasyon alanlarının tüm kornea alanına olan yüzdeleri birbirinden farklı değildi ( $p=0,990$ ). İntraperitoneal tedavi grubundaki neovaskularize alan yüzdeleri sham 1 grubundan anlamlı ölçüde daha düşük bulundu ( $p=0,002$ ). Topikal tedavi grubunda sham 2 grubundan daha düşük neovaskularize alan yüzdeleri tespit edildi ( $p=0,038$ ). Ancak topikal ve intraperitoneal tedavi gruplarındaki neovaskularize alan yüzdelerinde fark saptanmadı ( $p=0,383$ ). İntraperitoneal ( $p=0,383$ ) ve topikal ( $p=0,073$ ) tedavi gruplarındaki neovaskularize alan yüzdeleri kontrol grubundan farklı değildi.



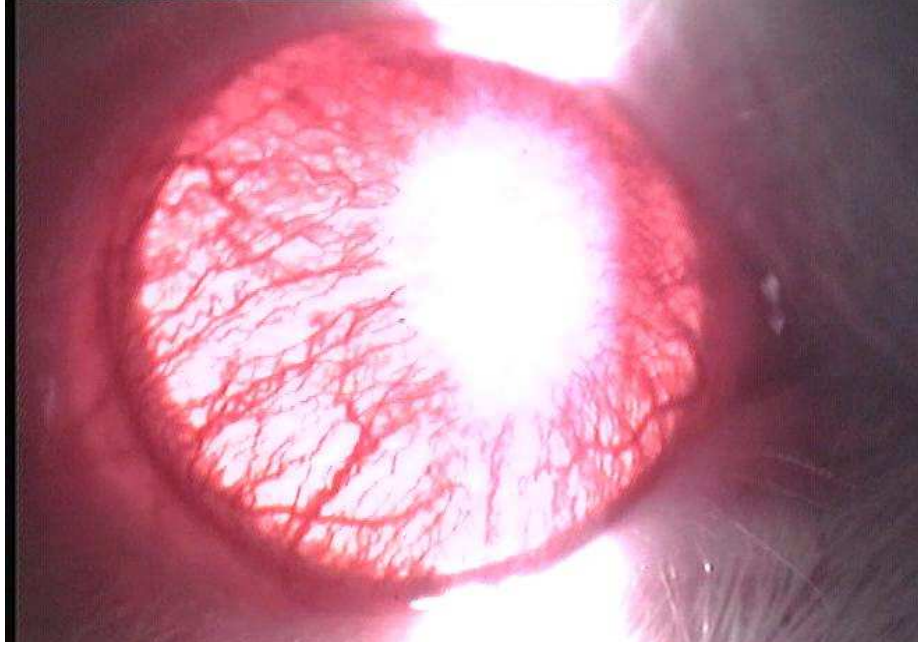
**Şekil 8:** Gruplardaki neovaskularizasyon alanlarının tüm kornea alanına olan yüzdeleri



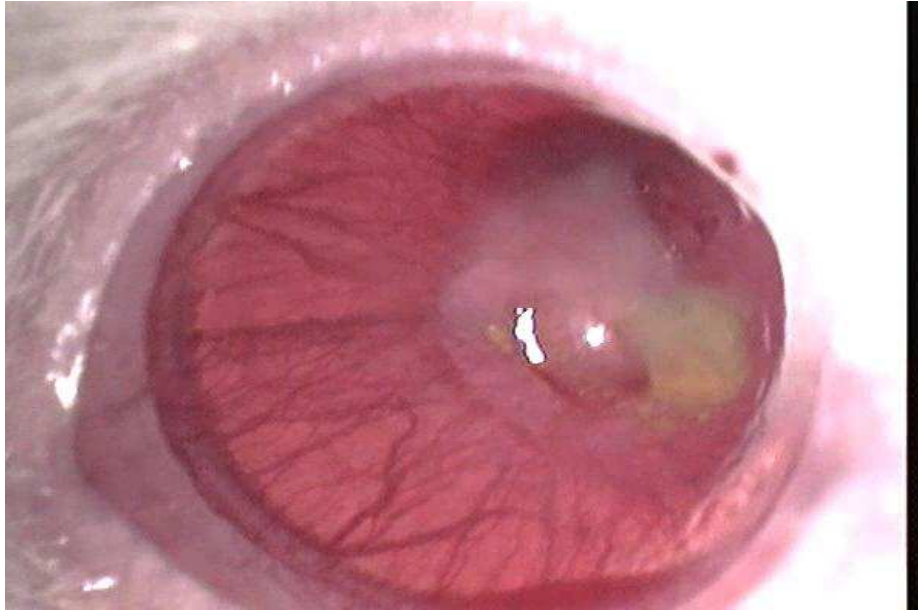
**Şekil 9:** Kontrol grubundaki bir denekteki rat korneası



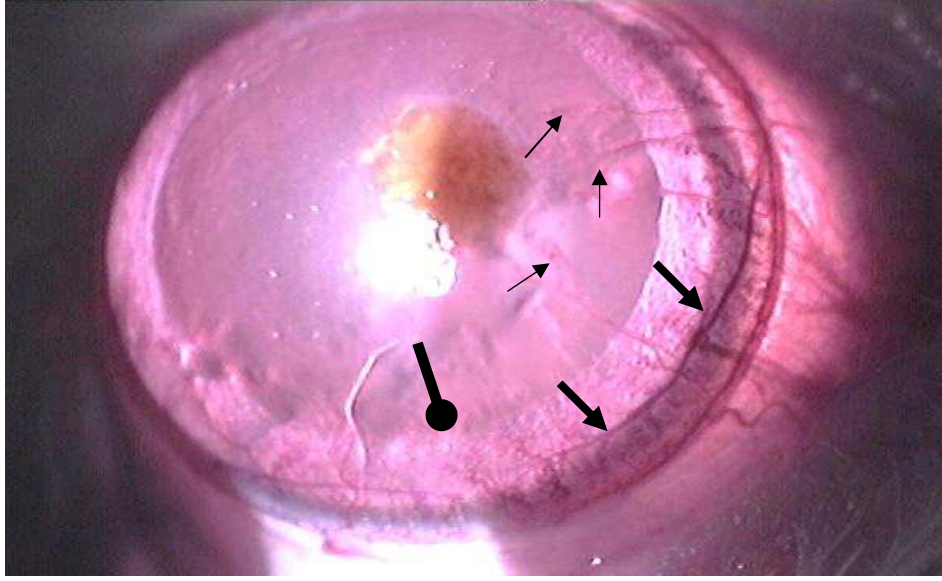
**Şekil 10:** Gümüş nitrat ile kimyasal yanık yapılan rat korneasının görünümü



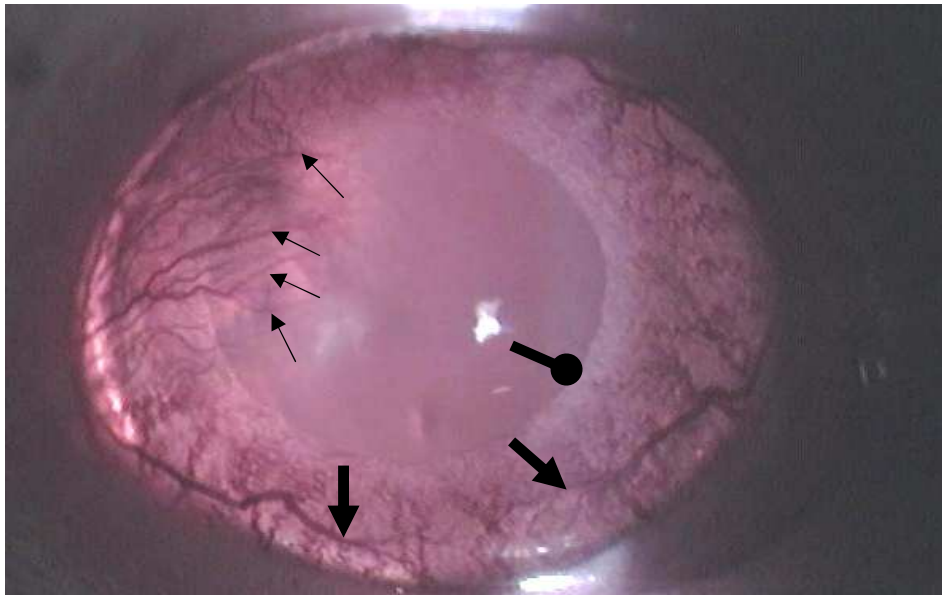
**Şekil 11:** Sham 1 grubunda olan bir denekteki totale yakın kornea neovaskülarizasyonu



**Şekil 12:** Sham 2 grubunda olan bir denekteki santral kornea skarı ve total kornea neovaskülarizasyonu

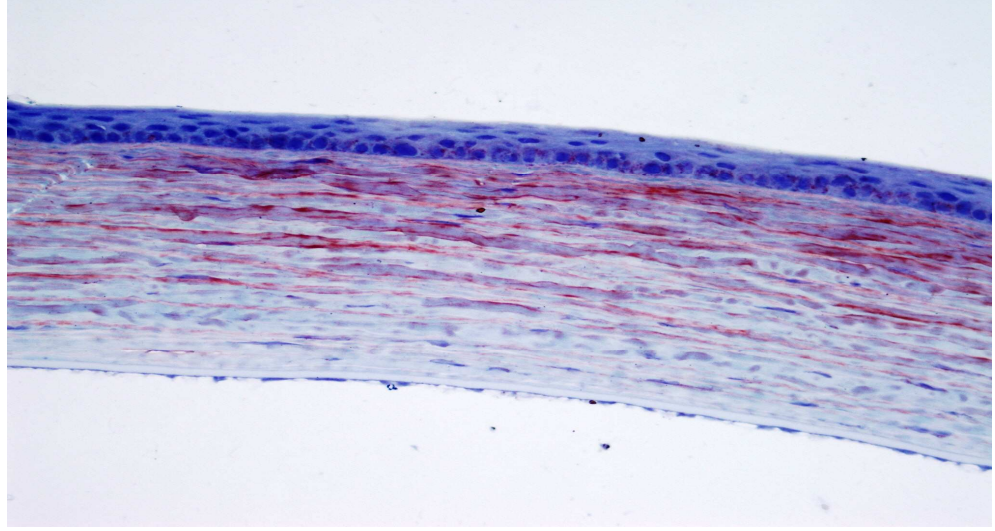


**Şekil 13:** İnterperitoneal tedavi grubunda olan bir denekteki minimal kornea neovaskülarizasyonu ve santralde skar oluşumu izlenmektedir. Küçük oklar neovaskülarizasyonları, büyük oklar albino ratın iris damarlarını, yuvarlak ok ise ratın iris kenarını göstermektedir.

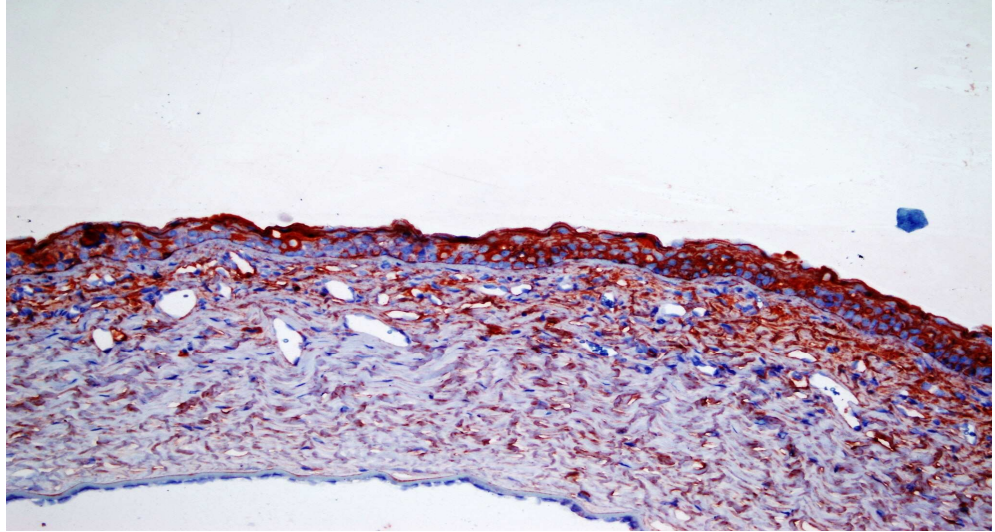


**Şekil 14:** Topikal tedavi grubunda olan bir denekteki kısmi kornea neovaskülarizasyonu. Küçük oklar neovaskülarizasyonları, büyük oklar albino ratın iris damarlarını, yuvarlak ok ise ratın iris kenarını göstermektedir.

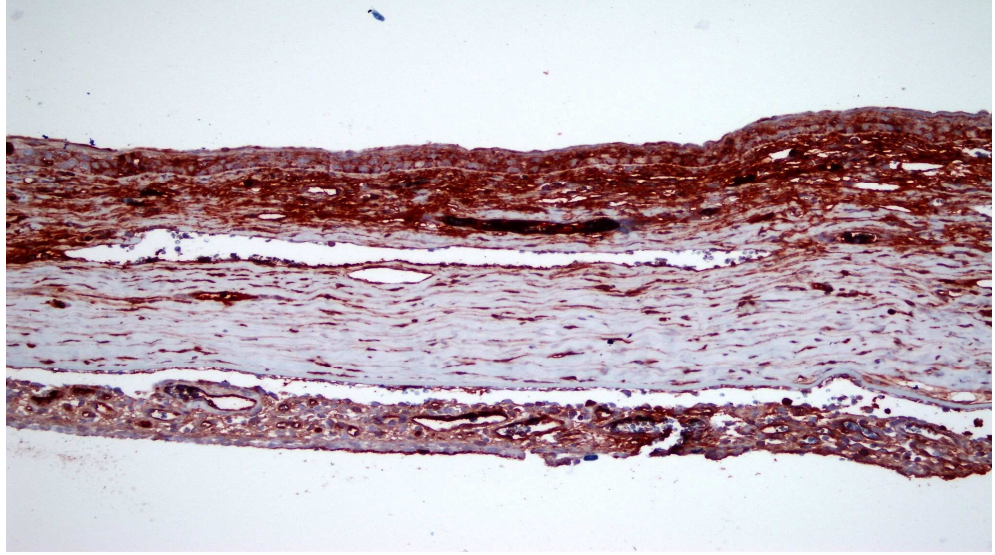




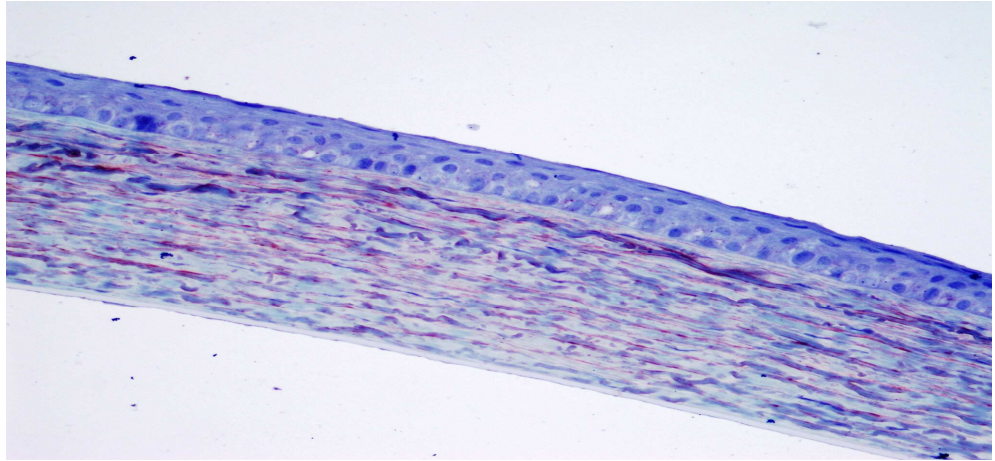
**Şekil 15:** Kontrol grubundaki rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Boyanma epitelde bazal, stromada ise üst yarıda yoğunlaşmıştır. Gradeler: Epitel:1, Stroma:2, Endotel:0



**Şekil 16:** Sham 1 grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Epiteldeki hücrelerin düzenli dizilimlerinin bozulduğu görülmektedir. Stromada kalınlaşma ve düzenli yapıda bozulma mevcuttur. Gradeler: Epitel:3, Stroma:3, Endotel:1

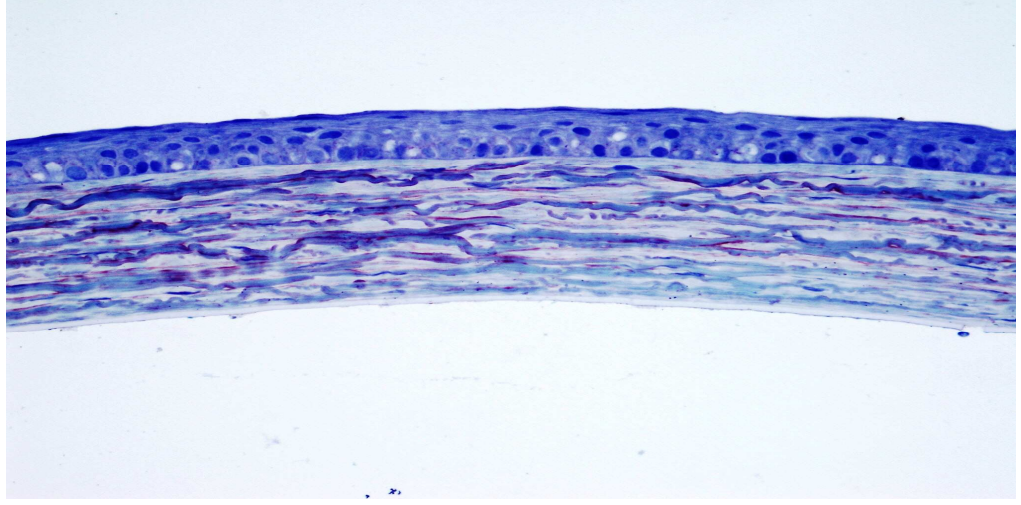


**Şekil 17:** Sham 2 grubunda yanık yapılan rat korneasının VEGF immünohistokimyasal boyanması. Epiteldeki hücrelerinin düzenli dizilimlerinin bozulduğu görülmektedir. Stromada kalınlaşma ve düzenli yapıda bozulma mevcuttur. Graderler: Epitel:3, Stroma:3, Endotel:3



**Şekil 18:** İntraperitoneal Tacrolimus tedavisi verilen bir rat korneasındaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının görünümü. Epitel ve stromanın düzenli yapısının korunduğu izleniyor. Graderler: Epitel:0, Stroma:2, Endotel:0





**Şekil 19:** Topikal Tacrolimus tedavisi verilen bir rat korneasındaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının görünümü. Epitel ve stromanın düzenli yapısının korunduğu izleniyor. Gradeler: Epitel:0, Stroma:1, Endotel:0

## 7.TARTIŞMA

Korneanın neovasküler ve enfeksiyöz hastalıkları büyük bir halk sağlığı problemidir. Enflamatuar, enfeksiyöz, dejeneratif veya travmatik durumlar korneada neovaskülarizasyonu tetikleyebilmektedir. Korneadaki neovaskülarizasyon mevcut görmeyi tehdit etmekte kalmayıp, ileride yapılabilecek keratoplastinin prognozunu da olumsuz olarak etkilemektedir (2).

Çalışmamızda Tacrolimus'un tedavi gruplarındaki kornea neovaskülarizasyonunu anlamlı biçimde azalttığı saptandı. Vasküler endotelial growth faktör kornea neovaskülarizasyonunda çok önemli bir mediatördür ve keratositlerde tespit edilmiştir (127). Deneysel hayvan modellerinde VEGF'in tek başına korneal anjiogenezi güçlü bir biçimde uyardığı bildirilmiştir (128). Ayrıca neovaskülarizasyonlu enflame kornealarda yüksek miktarda VEGF tespit edilmiş ve bu faktörün inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu güçlü biçimde azalttığı rapor edilmiştir (12,7). Neovaskülarizasyonun olduğu kornealarda VEGF damar endotel hücrelerinde, infiltre lökositlerde, kornea epitel ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır (12). Bu çalışmalar VEGF'in korneadaki anjiogeneizde merkezi bir rol oynadığını kuvvetle belirtmektedir (129).

Çalışmamızda Tacrolimus ile tedavi edilen gruplardaki VEGF immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun sham gruplarından daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi. Tacrolimus'un korneadaki neovaskülarizasyonu engelleme mekanizmalarından biri VEGF miktarını azaltmak olabilir. Tacrolimus'un VEGF salınımını nasıl engellediği bilinmemekle birlikte, sinovial fibroblastlarda temel ve TGF- $\beta$ 'nin indüklediği VEGF üretimini protein ve mRNA seviyesinde inhibe ettiği saptanmıştır (39).

Tacrolimus'un VEGF'in dışında anjiogeneze rol oynayan birçok anjiogenik faktörü de azalttığı bildirilmiştir. Fibroblast growth faktör önemli bir anjiogenik faktör olup anjiogeneze tüm basamakları uyarıcı etkiye sahiptir. (130). Kronik rejeksiyonda artan FGF'nin Tacrolimus tarafından baskılandığı bildirilmiştir (131). Fibroblastlar ve düz kas hücreleri için potent mitojen ve kemototaktik bir faktör olan EGF anjiogeneze görev alan önemli büyüme faktörü olup otokrin mekanizmalarla VEGF üretimini arttırmaktadır (132,133). Epidermal growth faktör reseptör sinyal iletiminin Tacrolimus tarafından bloke edildiği rapor edilmiştir (134). Bir diğer anjiogenik faktör olan GM-CSF çeşitli hematopoietik kök hücrelerinin yapımını uyarabilmektedir ve üretimi astımda Tacrolimus ile azaltılmıştır (135). Histamin VEGF üretimini direkt olarak arttırabilir, ayrıca arteriollerde dilatasyona ve geçirgenlik artışına neden olur. Histaminin kolon kanserinde roksatidin, simetidin ile antagonize edilmesinin anjiogenezi azalttığı bildirilmiştir (136,137). Tacrolimus'un bazofil ve mast hücrelerinde histamin salınımını ve sitokin üretimini engellediği bulunmuştur (138). Arter düz kaslarında çoğalmaya neden olan PDGF'i üreten tümör hücreleri, kendileri ve komşuları için tümör anjiogenezi uyarıcı büyüme faktörleri salgılamaktadır (139,140). Tacrolimus'un renal allograftlarda PDGF üretimini de engellediği bildirilmiştir (141). Vasküler endotelial growth faktör ile arasında pozitif feedback ilişkisi bulunan Prostaglandin E2 (PGE2) direkt olarak anjiogenezi uyarmaktadır (142). Tacrolimus'un sinovial fibroblastlarda PGE2 üretimini engellediği rapor edilmiştir (143). Tümör nekrozis faktör- $\alpha$ , anjiogenezin erken dönemlerindeki vazodilatasyona katkıda bulunan NO'nun sentezinde rol oynayan VEGF, FGF ve TGF üretimini arttırmaktadır (144,145). Tacrolimus, nuclear factor-kappa'nın direkt düzenlenmesi ile keratositlerdeki TNF- $\alpha$  üretimini

engellemektedir (146). Tacrolimus splanknik arter oklüzyonundan sonra TNF- $\alpha$  üretimini baskılamakta ve koruyucu özellik göstermektedir (147). Tacrolimus'un ratlardaki TNF- $\alpha$  ile düzenlenen hepatosit hücre ölümünü azalttığı tespit edilmiştir (148). Matriks metalloproteinazlar ECM bileşenlerini bozarak ve göç eden endotel hücreleri için gerekli olan yolu açarak angigonezde rol oynarlar (86). Tacrolimus'un hepatik uydu hücrelerinde MMP-9 ve sinoviyal fibroblastlarda MMP-13 üretimini baskıladığı saptanmıştır (149,150). Enflamasyonun önemli bir mediatörü olan İL-1 aynı zamanda düz kaslarda VEGF ve endotel hücrelerinde anjioprotein-1 üretimini artırarak anjiogeneze katkıda bulunmaktadır (151,152). Tacrolimus'un periferik kan mononükleer hücrelerindeki İL-1 üretimini anlamlı ölçüde baskıladığı gösterilmiştir (153). İnterlökin-6 da enflamasyonun önemli mediatörlerinden olup, aynı zamanda over foliküllerinin gelişimi ve embriyo implantasyonundan sonra desidual kapiller ağ oluşumundaki anjiogenez ile ilişkilidir (154). İnterlökin-6, VEGF'in sentezini ve anjiogenik aktivitesini dolaylı olarak düzenleyebilir (155). Kanser hastalarında VEGF ile İL-6 düzeyleri koreledir ve İL-6'nın VEGF üretimini uyardığı düşünülmektedir (156). Tacrolimus'un, T hücresi aktivasyonu ile düzenlenen İL-6 üretimini güçlü bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir (157). İnterlökin-8 mikrovasküler endotel hücrelerinden sızıntıyı arttırmakta ve üretimi hipoksi ile indüklenmektedir (158,159). İnterlökin-8 reseptörlerinin endotel hücrelerinde aktive edilmesi hücre çoğalmasını ve takiben anjiyogenezi indüklemektedir (160). Yapılan çalışmalarda Tacrolimus'un eozinofillerde ve keratositlerde İL-8 üretimini baskıladığı ifade edilmiştir (161,162). Proanjiogenik genlerin üretimini arttırarak tümörün yaşayabilmesine yardımcı olan HIF'in Siklosporin A ve Tacrolimus ile güçlü bir biçimde baskılandığı bulunmuştur (163).

Enflamasyon mikrobik enfeksiyon, kimyasal hasar veya travma sonrası ortaya çıkabilen fizyolojik bir cevaptır. Anjiogeneze benzer biçimde enflamasyon hücre kemotaksisi, migrasyonu ve proliferasyonunu düzenleyen proenflamatuar ve anti enflamatuar moleküller ile kontrollü bir şekilde ilerlemektedir(164). Enflamasyon ve anjiogenez birçok noktada birleşmektedir. Anjiogenez, enflamasyon bölgesindeki hücreler için gerekli olan besin ve oksijen desteğini sağlayarak enflamasyonu sürdürür. Enflamasyonun ilk basamaklarında üretilen NO damar dilatasyonu ve geçirgenliğini arttırarak immün hücrelerin damar dışına geçişini sağlar. İmmün hücrelerce üretilen mediatörler, fibroblastları ve damar endotel hücrelerini hedef alarak anjiogenik faktörleri salgılatır. Aynı zamanda enflamatuar hücrelerin kendileri de VEGF, Ang, bFGF, HGF, PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  gibi anjiogenik faktörler salgılar. Hipoksi hem enflamasyon hem de anjiogenez için önemli bir uyarandır ve HIF üretimine neden olur. Hipoksi ile indüklenebilen faktör artışı VEGF, Ang-2 gibi birçok anjiogenik faktör genini uyarır (165). Nükleer faktör kapa B (NF- $\kappa$ B) enflamasyondaki mediatörler için önemli bir transkripsiyon faktörüdür (165). Birçok çalışma bu faktörün enflamasyon ve anjiogenezle ilişkili olduğunu bildirmektedir (166,167). Tacrolimus'un NF- $\kappa$ B'yı direk olarak düzenlediği bildirilmiştir (146). Nükleer faktör kapa B aktivitesinin Tacrolimus ile düzenlenmesi ilacın immünesupesif etkisine katkıda bulunuyor olabilir (168,169). Tacrolimus İL-2,-3,-4,-5, İnterferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GMCSF, İL-2 ve -7 gibi T hücresi kaynaklı stokinlerin üretimini tamamen durmasına neden olur ve enflamasyonu kuvvetli biçimde baskılar (123). Ayrıca Tacrolimus in vitro olarak T lenfosit çoğalmasını engellemektedir (170). Tacrolimus'un in vitro olarak uyarılmış B hücrelerinin

aktivitesini ve B hücrelerinden immünoglobülin salgılanmasını baskıladığı bildirilmiştir (171).

Çalışmamızdaki korneal immünohistokimyasal boyanma özellikleri irdelendiğinde kontrol rat kornealarında da VEGF boyanmasının olduğu görüldü. Daha önce yapılan insan kornea çalışmalarında da enflamasyon olmaksızın VEGF boyanması izlenmiştir (12). VEGF varlığına karşın normal kornealarda vaskülarizasyon olmaması potent antianjiogenik faktörlerin, VEGF'in anjiogenik aktivitesini baskılamasına bağlı olabilir. Bu antianjiogenik faktörlerin kısmen korneal, daha yoğun bir biçimde limbal epitel hücreleri tarafından üretildiği düşünülmektedir. Normal korneal epitel hücrelerinden kaynaklanan VEGF'in fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Ancak fizyolojik konsantrasyondaki VEGF limbal kornea damarlarının fizyolojisi için gerekli olabilir (12).

VEGF immünohistokimyasal boyanması epitel katının bazal hücrelerinde daha yoğun idi. Yüzey epitel hücrelerinde VEGF sekresyonunun daha az olması, bu hücrelerin yüzeye doğru yaklaştıkça incelik yassılaşıp sitoplazmik organellerini ve/veya aktivitelerini kaybetmelerine bağlı olabilir. Stromadaki VEGF immünohistokimyasal boyanmasının daha çok üst yarıda yoğunlaşmış olduğu saptandı. Neovaskülarizasyon korneanın birçok tabakasında meydana gelebilse de vaskülarize kornealar incelendiğinde neovaskülarizasyonun esas yerleşiminin anterior stromanın üst ve orta kısmı olduğu gösterilmiştir (172). Ayrıca VEGF boyanmasının stromanın anterior bölgesinde yoğunlaştığı bildirilmiştir (12). Çalışmamızdaki sonuçlar bu bulgularla uyumludur. Dolayısıyla anterior stroma VEGF uyarısına ve neovaskülarizasyon gelişimine stromanın diğer katlarından daha duyarlı olabilir. Çalışmamızda kontrol grubundaki ratların

kornea endotellerinde ise herhangi bir VEGF immünohistokimyasal boyanması izlenmedi.

Sham gruplarındaki kornealarda VEGF immünohistokimyasal boyanması ve histolojik özellikler kontrol grubundakilerden farklılık gösterdi. Sham gruplarında epitel tabakasındaki hücre sayısının arttığı ve düzenli hücre yapısının bozulduğu görüldü. Stromada ise boyanmanın ön stromaya sınırlı olmayıp, tüm stroma katlarına ve kontrol grubundaki kornealardan daha homojen bir biçimde yayıldığı izlendi. Ayrıca sham gruplarındaki kornea stromalarının düzenli yapılarında bozulma ve stromalarında kalınlaşma mevcuttu. Sham gruplarındaki kornea endotel hücrelerinde de boyanma izlendi. Yanık enflamasyonu uyarıcı bir faktör olduğundan bu boyanma özellikleri beklenen sonuçlardır (12,165,173). Vasküler endotelial growth faktör enflamasyonda etkili olan lenfositler, monositler, lökositler tarafından da üretilebilmektedir (174,175).

Uzun etkili ve güçlü bir antiinflamatuvar ajan olan Tacrolimus hem VEGF ve yukarıda belirtilen anjiogenik faktörlerin üretimini azaltarak hem de enflamasyonu kuvvetli biçimde baskılayarak doğrudan ve/veya dolaylı olarak korneal anjiogenezi engellemiş olabilir. Bu çalışmada Tacrolimus'un neovaskülarizasyon oluşumunda görevli başlıca faktör olan VEGF seviyelerine ve neovaskülarizasyon üzerine etkileri araştırıldı. Neovaskülarizasyon ve enflamasyon sürecinde ortak görev alan ve Tacrolimus'un etki edebildiği birçok faktör ve sitokin vardır. Tacrolimus'un enflamasyonu düzenleyerek mi veya başka bir mekanizma ile mi neovaskülarizasyonu engellediği konusunda fikir sahibi olabilmek için bu ortak inflamatuvar ve anjiogenik faktörlerin seviyelerini de ölçmek gerekir.

Tacrolimus, karmaşık bir olay olan anjiogeneizde görev alan faktör ve sitokinlerin çoğunu inhibe ederek anjiogenezin önlenmesine katkıda bulunabilir. Ancak en önemli anjiogenik faktörlerden biri olan VEGF'in inhibisyonu tüm patolojik neovaskülarizasyon durumları için esas amaçtır. Çalışmamızda kimyasal yanık yapılan ratlarda topikal ve intraperitoneal Tacrolimus'un korneada hem VEGF immünohistokimyasal boyanmasını hem de neovaskülarizasyonu anlamlı ölçüde baskıladığı sonucuna varılmış, ancak kornea ve diğer oküler neovaskülarizasyonların önlenmesi ve tedavisinde rol alabilecek mekanizmaların irdeleneceği başka deneysel ve klinik çalışmalarla Tacrolimus'un antianjiogenik etkilerinin detaylandırılması gerektiği düşünülmüştür.



## 8. KAYNAKLAR

- 1- Drixler TA, Voest EE, von Vroonhoven TM, Borel Rinkes IH. Angiogenesis and surgery: from mice to man. *Eur J Surg* 2000; 166: 435-446.
- 2- Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 242-249
- 3- Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997; 41: 275-313.
- 4- 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.
- 5- Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2001; 45: 203-210.
- 6- Welge-Lüssen U, May CA, Neubauer AS, Priglinger S. Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 94-99.
- 7- Singh N, Amin S, Richter E, Rashid S, Scoglietti V, Jani PD, et al. Flt-1 intraceptors inhibit hypoxia-induced VEGF expression in vitro and corneal neovascularization in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 1647-1652.
- 8- 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.
- 9- Lai CM, Spilisbury K, Brankov M, Zaknich T, Rakoczy PE. Inhibition of corneal neovascularization by recombinant adenovirus mediated antisense VEGF RNA. *Exp Eye Res* 2002; 75: 625-34.
- 10- Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, Stechschulte SE, Kirchhof B, Dartt DA, et al. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 117-123.
- 11- Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol* 2001; 75: 9828-9835.

- 12- Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2514-2522.
- 13- Mendelsohn AD, Lo GG, Stock EL. Laser photocoagulation of feeder vessels in lipid keratopathy. *Ophthalmic Surg* 1986; 17: 502-508.
- 14- Goto S. Q-switched Nd:YAG laser treatment for corneal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol*. 1992; 36: 291-300.
- 15- Yoon KC, You IC, Kang IS, ImSK, Ahn JK, Park YG, Ahn KY. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 390-395.
- 16- BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Sharif NA, Clark AF. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1954-1962.
- 17- Baratz KH, Hattenhauer MG. Indiscriminate use of corticosteroid-containing eyedrops. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 362-366.
- 18- St Clair Roberts D. Steroids, the eye, and general practitioners. *Br Med J* 1986; 292: 1414-1415.
- 19- Benelli U, Ross J, Nardi M, Klinword GK. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery. Inhibition by cyclosporin A. *Invest Opht Vis Sci* 1997; 38: 274-282.
- 20- 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 Exp Ophthalmol* 2003; 241:63-69.
- 21- Demir T, Celiker UO, Kukner A, Mogulkoc R, Celebi S, Celiker H. Effect of Octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand*. 1999; 77: 386-390.
- 22- Qian Y, Dekaris I, Yamagami S, Dana MR. Topical soluble tumor necrosis factor receptor type I suppresses ocular chemokine gene expression and rejection of allogeneic corneal transplants. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 1666-1671.
- 23- Becker MD, Kruse FE, Azzam L, Nobiling R, Reichling J, Völcker HE. In vivo significance of ICAM-1 dependent leukocyte adhesion in early corneal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40: 612-618.

- 24- Benelli U, Bocci G, Danesi R, Lepri A, Bernardini N, Bianchi F, et al. The heparan sulfate sulfatase inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. *Exp Eye Res* 1998; 67: 133-142.
- 25- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4082-4085.
- 26- Bocci G, Danesi R, Benelli U, Innocenti F, Di Paolo A, Fogli S, Del Tacca M. Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43: 205-212.
- 27- Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2690-2694.
- 28- Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46: 454-460.
- 29- Ambati BK, Jousseaume AM, Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, et al. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 1063-1068.
- 30- Jousseaume AM, Kruse FE: Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237: 920-927.
- 31- Bahar Irit, Kaiserman I. Subconjunctival Bevacizumab Injection for Corneal Neovascularization. *Cornea* 2008; 27: 142-147.
- 32- Reis A, Reinhard T, Sundmacher R, Braunstein S, Godehardt E. A comparative investigation of FK506 and cyclosporin A in murine corneal transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1998; 236: 785-789.
- 33- Sloper CM, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus in the management of high risk corneal and limbal grafts. *Ophthalmology* 2001; 108: 1838-1844.
- 34- Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim SH, Lee SS, Kim WU, et al. Cyclosporine inhibition of vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1202-1209.
- 35- Gordon RA, Donzis PB. Refractive development of the human eye. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 785-789.

- 36- Arfa RC. Grayson's Disease of the Cornea. St. Louise: Mosby Year Book 1991; 2: 25-32.
- 37- Özçetin H. Klinik Göz Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri 2003; 4: 62-63.
- 38- Akyol N. Kontakt Lensler ve Uygulanması. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları 2005; 2: 7-25.
- 39- Robert L, Legeais JM, Robert AM, Regard G. Corneal collogens. Pathol Biol 2001; 49: 353-363.
- 40- Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. Prog Retin Eye 1999; 18: 529-551.
- 41- Özdemir Ö. Kornea transplantasyonu. Medical Network Oftalmoloji 1995; 2: 6-7.
- 42- 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.
- 43- Agarwal S. Textbook of Ophthalmology. Vol II. Jaypee Company 2002; 3: 942-943.
- 44- Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. Indian J Ophthalmol 2003; 51: 5-15.
- 45- Zeiske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986; 27: 1-7.
- 46- Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. Br J Ophthalmol 1994; 78: 401-408.
- 47- Chung EH, Hutcheon AE, Joyce NC, Zieske JD. Synchronization of the G1/S transition in response to corneal debridement. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 1952-1958.
- 48- Ye HQ, Azar DT. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs-1 and 2 during corneal wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39: 913-921.
- 49- Lu PC, Ye H, Maede M, Azar DT. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 20-27.
- 50- Sta Iglesia DD, Stepp MA. Disruption of basement after corneal debridement. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41: 1045-1053.

51- 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.

52- 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.

53- 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.

54- Jones, SM, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* 2000; 19: 5558-5567.

55- Schultz G, Khaw PT, Oxford K, MaCauley S, Van Setten G, Chegini N. Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 1994; 8: 184-187.

56- 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.

57- 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.

58- Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, et al. Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1879-1882.

59- Chung JH, Fagerholm P. Treatment of rabbit corneal alkali wounds with human epidermal growth factor. *Cornea* 1989; 8: 122-128.

60- Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, Manabe R. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human EGF. *Invest Ophthalmol Vis. Sci* 1990; 31: 1773-1778.

61- Singh G, Foster CS. Epidermal growth factor in alkali-burned corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1987; 103: 802-807.

62- Dinbergs ID, Brown L, Edelman ER. Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions. *J Biol Chem* 1996; 271: 29822-29829.

63- 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.

64- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 113-129.

65- 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.

66- 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.

67- 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.

68- 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.

69- 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.

70- 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.

71- 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.

72- Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retina Eye Res* 1999;18: 293-309.

73- 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.

74- 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.

75- 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.

76- You L, Kruse FE, Vileker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 692-702.

77- 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.

78- Saghizadeh M, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ, Ljubimov AV, Kenney MC. Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. *Exp Eye Res* 2001; 73: 179-189.

79- Sotozono C, He J, Matsimoto Y, Kita M, Imanishi J, Kinoshita S. Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Curr Eye Res* 1997; 16: 670-76.

80- Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1992; 153: 1-5.

81- 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.

82- 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 987-96.

83- Sotozono C. Second injury in the corneal. The role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. *Cornea* 2000; 19: 155-159.

84- Vailhe B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; 81: 439-452.

- 85- 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.
- 86- Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 267-285.
- 87- Zengin N, Okudan S, Gündüz K. Oküler neovaskularizasyonunda büyüme faktörlerinin rolü. *Oftalmoloji* 1993; 3: 385-389
- 88- Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK. Experimental corneal neovascularization: biomicroscopic, angiographic, and morphologic correlation. *Cornea* 1985; 4: 35-41
- 89- Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-270.
- 90- Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.
- 91- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447
- 92- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med* 1971; 285: 1182-1186.
- 93- 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.
- 94- Korpelainen EI, Alitalo K. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 159-164.
- 95- 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.
- 96- Reidy MA. Endothelial regeneration. Interaction of smooth muscle cells with endothelial regrowth. *Lab Invest* 1988; 59: 36-43.
- 97- 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.
- 98- Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005; 69: 11-16.



99- 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 323-333.

100- 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.

101- 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.

102- 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.

103- Kvant 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.

104- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.

105- 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.

106- Gabison E, Chang JH, Hernandez-Quintela E, Javier J, Lu PC, Ye H, et al. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Exp Eye Res* 2004; 78: 579-589.

107- Ohlmann AV, Ohlmann A, Welge-Lussen U, May CA. Localization of collagen XVIII and endostatin in the human eye. *Curr Eye Res* 2005; 30: 27-34.

108- 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.

109- 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.

- 110- 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.
- 111- Hiscott P, Paraoan L, Choudhary A, Ordonez JL, Al-Khaier A, Armstrong DJ. Thrombospondin 1, thrombospondin 2 and the eye. *Prog Retin Eye Res* 2006; 25: 1-18.
- 112- 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.
- 113- 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.
- 114- Venkataramanan R, Jain A, Warty VW, Abu-Elmaqd K, Furakawa H, Imventerza O, et al. Pharmacokinetics of FK 506 following oral administration: a comparison of FK 506 and cyclosporine. *Transplant Proc* 1991; 23: 931-933.
- 115- Jain AB, Fung JJ, Tzakis AG, Tzakis AG, Venkataramanan R, Abu Elmaqd K, et al. Comparative study of cyclosporine and FK 506 dosage requirements in adult and pediatric orthotopic liver transplant patients. *Transplant Proc* 1991; 23: 2763-2773.
- 116- Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29: 404-430.
- 117- Alak AM, Moy S. Biological activity of tacrolimus (FK506) and its metabolites from whole blood of kidney transplant patients. *Transplant Proc* 1997; 29: 2487-2490.
- 118- Miyata S, Ohkuba Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 2005; 54: 1-9.
- 119- Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 813-851.
- 120- Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1366-1380.
- 121- Jensik SC. Tacrolimus (FK 506) in kidney transplantation: three-year survival results of the US multicenter, randomized, comparative trial. FK 506 Kidney Transplant Study Group. *Transplant Proc* 1998; 30: 1216-1218.

122- Takamatsu H, Tsukada H, Noda A, Kakiuchi T, Nishiyama S, Nishimura S, Umemura K. FK506 attenuates early ischemic neuronal death in a monkey model of stroke. *J Nucl Med* 2001; 42: 1833-1840

123- Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 2005; 54: 1-9.

124- Beck LA. The efficacy and safety of tacrolimus ointment: a clinical review. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 165-170.

125- Hikita N, Lopez JS, Chan CC, Mochizuki M, Nussenblatt RB, de Smet MD. Use of topical FK506 in a corneal graft rejection model in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 901-909.

126- Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol*. 2007; 91: 804-807.

127- Cursiefen C, Rummelt C, Kuchle M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta1 in human corneas with neovascularization. *Cornea* 2000; 19: 526-533.

128- Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004; 113: 1040-1050.

129- Kvant A. Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84: 282-288.

130- Gospodarowicz D. Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth. *Prog Clin Biol Res* 1976; 9: 1-19.

131- Walgenbach KJ, Kalff JC, Sonmez Alpan E, Hirner A, Bauer AJ. Upregulation of basic fibroblast growth factor during chronic rejection of rat intestinal allografts and its downregulation by FK 506. *Transplant Proc* 1998; 30: 2587.

132- Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2890-2894.

133- Ongusaha PP, Kwak JC, Zwible AJ, Macip S, Higashiyama S, Taniguchi N, et al. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004; 64: 5283-5290.

134- Lopez-Illasaca M, Schiene C, Küllertz G, Tradler T, Fischer G, Wetzker R. Effects of FK506-binding protein 12 and FK506 on autophosphorylation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1998; 273: 9430-9434.

135- Sano T, Nakamura Y, Matsunaga Y, Takahashi T, Azuma M, Okano Y, et al. FK506 and cyclosporin A inhibit granulocyte/macrophage colony-stimulating factor production by mononuclear cells in asthma. *Eur Respir J* 1995; 8: 1473-1478.

136- Ghosh AK, Hirasawa N, Ohuchi K. Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H(2) receptors. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1419-1428.

137- Tomita K, Izumi K, Okabe S. Roxatidine- and cimetidine-induced angiogenesis inhibition suppresses growth of colon cancer implants in syngeneic mice. *J Pharmacol Sci*; 2003; 93: 321-330.

138- Sengoku T, Kishi S, Sakuma S, Ohkubo Y, Goto S. FK506 inhibition of histamine release and cytokine production by mast cells and basophils. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 189-201.

139- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974; 71: 1207-1210.

140- Shih AH, Holland EC. Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer Lett* 2006; 232: 139-147.

141- Savikko J, Taskinen E, Von Willebrand E. Tacrolimus inhibits platelet-derived growth factor ligand and receptor induction as well as rejection changes in rat renal allografts during long-term follow-up. *Transplant Proc* 2002; 34: 1382.

142- Tamura K, Sakurai T, Kogo H. Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 2006; 44: 411-416.

143- Sasakawa T, Sasakawa Y, Ohkuba Y, Mutoh S. FK506 inhibits prostaglandin E2 production from synovial cells by suppressing peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1291-1297.

144- 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.

145- Hayashi T, Matsuoko K, Saitoh M, Takeda S, Kimura M. Influence of alpha-tumor necrosis factor and beta-interleukin-1 on production of angiogenetic factors and thymidine phosphorylase activity in immortalized human decidual fibroblasts in vitro. *J Obst Gynaecol Res* 2006; 32: 15-22.

146- Lan CC, Yu HS, Wu CS, Kuo HY, Chai CY, Chen GS. FK506 inhibits tumour necrosis factor-alpha secretion in human keratinocytes via regulation of nuclear factor-kappa B. *Br J Dermatol* 2005; 153: 725-732.

147- Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Ferlito M, Campo GM, Arlotta M, et al. Tacrolimus suppresses tumour necrosis factor-alpha and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 498-504.

148- Kantrow SP, Gierman JL, Jaligam VR, Zhang P, Piantadosi CA, Summer WR, Lancaster JR. Regulation of tumor necrosis factor cytotoxicity by calcineurin. *FEBS Lett* 2000; 483: 119-124.

149- Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yokoyama T, et al. Immunosuppressant FK506 inhibits matrix metalloproteinase-9 induction in TNF-alpha-stimulated human hepatic stellate cells. *Life Sci*, 2006; 78: 2510-2515.

150- Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Aoyagi T, Kawabe Y, Nanamura M, et al. FK506 suppresses the stimulation of matrix metalloproteinase 13 synthesis by interleukin-1beta in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett* 2005; 98: 194-199.

151- Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 308-312.

152- Fan F, Stoeltzing O, Liu W, McCarty MF, Jung YD, Reinmuth, N, Ellis LM. Interleukin-1beta regulates angiopoietin-1 expression in human endothelial cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3186-3190.

153- Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Sasakawa T, Magari K, Miyata S, et al. FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF-alpha and IL-1beta production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1655-1663.

154- Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3092-3096.

155- Loeffler S, Fayard B, Weis J, Weissenberger J. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* 2005; 115: 202-213.

156- Salgado R, Vermeulen PB, Benoy I, Weytjens R, Huget P, Van Marck E, Dirix LY. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. *Br J Cancer*. 1999; 80: 892-897.

157- Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Goto T. Effects of FK506 and other immunosuppressive anti-rheumatic agents on T cell activation mediated IL-6 and IgM production in vitro. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 749-757.

158- Desbaillets I, Diserens AC, de Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma. *Oncogene* 1999; 18: 1447-1456.

159- Schraufstatter IU, Chung J, Burger M. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: 1094-1103.

160- Li A, Dubey S, Varney ML, Singh RK. Interleukin-8-induced proliferation, survival, and MMP production in CXCR1 and CXCR2 expressing human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 2002; 64: 476-481.

161- Kohyama T, Takizawa H, Kawasaki S, Akiyama N, Sato M, Ito K, Yamamoto K. A potent immunosuppressant FK506 inhibits IL-8 expression in human eosinophils. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999; 1: 72-77.

162- Schulz BS, Michel G, Wagner S, Süß R, Beetz A, Peter RU, et al. Increased expression of epidermal IL-8 receptor in psoriasis. Down-regulation by FK-506 in vitro. *J Immunol* 1993; 151: 4399-4406.

163- Kong X, Lin Z, Caro J. Immunophilin-ligands FK506 and CsA inhibit HIF1 $\alpha$  expression by a VHL- and ubiquitin-independent mechanism. *FEBS Lett* 2006; 580: 6182-6186.

164- Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 433-439.

- 165- Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007; 10: 149-166.
- 166- Pacifico F, Leonardi A. NF-kappaB in solid tumors. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1142-1152.
- 167- Nam NH. Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6: 945-951.
- 168- Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR, Herzenberg LA. The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J* 1990; 9: 4425-4433.
- 169- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 1997; 386: 855-858.
- 170- Kino T, Inamura N, Sakai F, Nakahara K, Goto T, Okuhara M, et al. Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transplant Proc.* 1987; 19: 36-39.
- 171- Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. The distinct effects of FK506 on the activation, proliferation, and differentiation of human B lymphocytes. *Transplantation* 1992; 54: 1025-1030.
- 172- Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17: 611-613.
- 173- Edelman J, Catro M, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 1112-1123.
- 174- Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4140-4145.
- 175- Gunsilius E, Petzer A, Stockhammer G, Nussbaumer W, Schumacher P, Clausen J, Gastl G. Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. *Oncology* 2000; 58: 169-174.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

18.05.1979 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Çankırı ve Malatya'da, lise öğrenimimi ise Elazığ'da tamamladım. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başladım. 2000 yılında Fırat Üniversitesi'ne geçiş yaptım, 2003 yılında bu üniversiteden mezun oldum ve aynı yıl Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak başladım. Halen bu görevime devam etmekteyim. Evliyim.