

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

KORNEAL EPİTELİYAL YARALANMALARDA
İNŞAN AMNİYOTİK MEMBRAN EKSTREZİNE NİŞ DEFEKT
YARALI MESNETEKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emrah KAN

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Peykan TÜRKÇÜOĞLU

ELAZIĞI -2007

TE EKKÜR

Uzmanlık e itimim boyunca e itimime katkıda bulunan ba ta sayın Prof. Dr. Ülkü Çeliker olmak üzere tüm de erli Göz Hastalıkları hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma, bu tezi hazırlamamda katkılarından dolayı öncelikle tez hocam Yrd. Doç. Dr. Peykan Türkçüo lu ve sayın Prof. Dr. Nuray Akyol'a, Doç. Dr. Tamer Demir'e, Yrd. Doç. Dr. Orhan Aydemir'e, Yrd. Doç. Dr. Burak Turgut'a ükranlarımı sunarım. Ayrıca fedakârlıklarından dolayı de erli e im Elif Kılıç Kan ve karde im Burak Kan'a te ekkür ederim.

Ç NDEK LER

Sayfa

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. G R	5
3.1. Kornea Anatomisi:	5
3.1.1. Prekorneal gözya ı film tabakası:	5
3.1.2. Epitel ve Bazal membran:	5
3.1.3. Bowman tabakası:	6
3.1.4. Stroma tabakası:	6
3.1.5. Descement membran:	7
3.1.6. Endotel tabakası:	7
3.1.7. Limbus:	8
3.1.8 Kornea embriyolojisi:	8
3.2. Kornea fizyolojisi	9
3.2.1. Gözya ı fizyolojisi:	9
3.2.2. Epitel fizyolojisi:	10
3.2.3. Endotel fizyolojisi:	10
3.3. Kornea Yara yile mesi:	11
3.3.1. Epitel Defekti:	12
3.3.2. Epitel ve Yüzeyel stromal Defekt:	15
3.3.3. Derin stromal defekt:	15
3.3.4. Endotelyal yara iyile mesi:	16
3.3.5. Tam Kalınlıkta defekt:	16
3.4. Kornea Yara yile mesini Etkileyen Faktörler	17
3.4.1. Ya :	17
3.4.2. Beslenme:	17
3.4.3. Travma:	17
3.4.4. Yara apozisyonu:	17
3.4.5. nfeksiyon:	18
3.4.6. Enflamasyon:	18
3.4.7. Vaskülarizasyon:	18
3.4.8. Duyusal inervasyon:	19

3.4.9. İntraoküler basınç:	19
3.4.10. Gözya mının etkisi:	19
3.4.11. İlaçlar:	20
3.4.11.1 Antibiyotikler:	20
3.4.11.2. Kortikosteroidler:	20
3.4.11.3. Lokal anestezipler:	21
3.4.11.4. Benzalconium Cl (% 0.01):	21
3.4.11.5. Asetil kolin:	21
3.4.11.6. Epinefrin:	21
3.4.11.7. Antiviral ilaçlar :	21
3.4.11.8. Kanüllerde kalan deterjan solüsyonlar :	21
3.4.12. Bandaj lens:	22
3.4.13. Fibronektin (Fn) :	22
3.4.14. İnterlökin - 6 :	23
3.4.15. Retinoik Asit :	23
3.5. Büyüme Faktörleri :	24
3.5.1. Epidermal Growth Factor (EGF) :	24
3.5.1.1. Epitelyal iyile meye etkisi:	25
3.5.1.2. Stromal iyile meye etkisi:	26
3.5.1.3 Endotelyal iyile meye etkisi:	26
3.5.1.4. EGF etkinli ini de i tiren farmakolojik parametreler:	27
3.5.2. Fibroblast Growth Factor (FGF):	27
3.5.3. Transforming Growth Factor (TGF-):	28
3.5.4. Transforming Growth Factor (TGF) :	28
3.5.5. Mesodermal Growth Factor (MGF):	28
3.5.6. Keratosit Growth Factor (KGF):	29
3.5.7. Hepatosit Growth Factor (HGF):	29
3.5.8. Platelet Derived Growth Factor (PDGF):	29
3.6. Alkali Yanıklar:	29
3.7. Amniyotik Membran	32
3.7.1. Amniyotik Membran kullanım alan ları:	33
3.7.2. Amniyon Membranın Etkileri	33
3.7.2.1. Epitelizasyonu kolayla tırıcı (ilerletici) etki:	33
3.7.2.2. Fibrozis nhibitörü:	34

3.7.3. Amniyon Membranın ana karakteristikleri:	35
3.7.4. Amniyon Membranın Hazırlanması:	35
3.7.5. Amniyon Membranın Oftalmolojide Kullanımı:	36
3.7.5.1. Kornea :	36
3.7.5.2. Konjonktiva :	36
3.7.6. Amniyon membran transplantasyon teknikleri	36
3.7.7. Amniyotik Membran Transplantasyonunun Komplikasyonları:	40
3.7.8. Amniyotik Membran Güvenirli mi:	40
3.8. Otolog Serum	40
4. GEREÇ VE YÖNTEM:	43
4.1. Anestezi Teknikleri:	43
4.2. Gruplar:	43
4.3. Amniyotik Membran Ekstresinin hazırlanması:	44
4.4. Otolog Serum Hazırlanması:	44
4.5. Cerrahi Teknik:	44
4.6. Histopatolojik ve biyokimyasal çalışmaları için dokuların temini:	45
4.7. Histopatolojik Değerlendirme:	48
4.8. Biyokimyasal Değerlendirme:	48
4.9. Statistiksel Analiz:	48
5. BULGULAR	49
5.1. Biyokimyasal Değerlendirme	49
5.2. Histopatolojik Değerlendirme:	51
6. TARTIŞMA	59
7. KAYNAKLAR	77
8. ÖZGEÇMİŞ	92

TABLO L STES

Sayfa

Tablo-1. Yüzeyel ve intrastromal greftleme tekniklerinin uygulandı ı durumlar	39
Tablo-2. Ekstre ile otolog serumdaki EGF (pg/ml) de erleri	49
Tablo-3. Gruplardaki kornea lizat EGF düzeylerinin (pg/ml) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum de erleri.....	50
Tablo-4. Neovaskularizasyon skor ortalaması, standart sapma, minimum ve maksimum de erleri	51
Tablo-5. PMNL skor ortalaması, standart sapma, minimum ve maksimum de erleri ...	53
Tablo-6. Santral kornea kalınlık de erleri, standart sapma, minimum ve maksimum de erleri.....	54
Tablo-7. Gruplarda epitelyal defekt ortalama alan de erlerinin 2, 6 ve 8. günlerdeki de erleri.....	56
Tablo-8. Epitelyal hasar sonrası olu an iyile me kaskadı	61

EK L L STES

Sayfa

ekil-1. Cerrahi i lem öncesi deneklerin steril bir ekilde hazırlanması	46
ekil-2. Üçüncü ve yedinci gruptaki deneklere uygulanan amniyon membran transplantasyonu.....	46
ekil-3. Amniyon membran ekstresi uygulanan grupta rast gele seçilen bir denekteki epitel defektinin floresein boya ile boyanma sı sonrası iki, altı ve sekizinci günlerdeki görünümü	47
ekil-4. Otolog serum uygulanan grupta rastgele seçilen bir denekteki epitel defektinin floresein boya ile boyanması sonrası iki, altı ve sekizinci günlerdeki görünümü	47
ekil-5. Herhangi bir tedavi uygulanmayan dördüncü grupta rastgele seçilen bir denekteki epitel defektinin floresein boya ile boyanması sonrası iki, altı ve sekizinci günlerdeki görünümü	47
ekil-6. Gruplardaki EGF miktarlarının kar ıla tırılması	50
ekil-7. Birinci gruba ait korneada, çok sayıda olu an damarlanma	57
ekil-8. Üçüncü gruba ait korneada az sayıda olu an damarlanma ve PMNL infiltrasyonu	57
ekil-9. Neovaskülarizasyon sayıları (adet) ve gruplar arası kar ıla tırılması	52
ekil-10. Dördüncü gruba ait korneada yo un PMNL infiltrasyonu	58
ekil-11. PMNL sayıları (adet) ve gruplar arası kar ıla tırılması	53
ekil-12. kinci gruptaki santral kornea görüntüsü	58
ekil 13. Santral korneal kalınlıkları ve gruplar arası kar ıla tırması	55
ekil 14. ki, altı ve sekizinci günlerde Grup 1,2 ve 4'teki ortalama alan de erleri	56

KISALTMALAR

Amniyotik membran	AM
Amniyotik membran ekstresi	AE
Amniyotik membran transplantasyonu	AMT
Büllöz pemfigoid antijen	BPA
Epitel defekti	ED
Epidermal growth factor	EGF
Fibroblast growth factor	FGF
Fibronektin	Fn
Fibrinojen	Fg
Fosfotidilinositol 3-kinaz	PI 3-kinaz
Growth factor	GF
Hemotoksilen-eosin	H-E
Human EGF	h-EGF
nsulin like growth factor	IGF
Limbal kök hücre kaybı	LKHK
Matriks metalloproteinaz	MMP
Mezodermal growth factor	MGF
Mononükleer lökosit	MNL
Mouse EGF	m-EGF
Otolog serum	OS
Persistan epitel defekti	PED
Platelet-derived growth factor	PDGF
Polimorfonükleer lökosit	PMNL
Prostaglandin	PG
Stevens Johnson Sendromu	SJS
Transforming growth factor	TGF-
Transforming growth factor	TGF-
Toksik epidermal nekroliz	TEN

1. ÖZET

Bu çalı ma Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları ABD tarafından gerçekte tirilmi tir.

Bu çalı manın amacı alkali yanık olu turulan tav an kornealarında amniyon membran transplantasyonu, amniyon membran ekstresi, otolog serumun tedavi edici rollerini ara tırmaktır.

Çalı mada a ırılıkları 2500-3000 gram arasında de i en 24 tav an, her biri rastgele seçilen ve 3 tav andan olu an 8 gruba ayrıldı. Deneklerin korneasına 8 mm çapında 1N sodyum hidroksit (1 N NaOH) ile emdirilmi filtre ka ıdı 30 saniye bekletilerek epitelyal defekt olu turuldu. Epitelyal defekt olu turulan (grup1, 2, 3, 4) ve olu turulmayan gruplara aynı tedavi uygulandı. Grup 1 ve 5'e topikal amniyotik membran ekstresi, grup 2 ve 6'ya topikal serum tedavisi, grup 3 ve 7'e amniyotik membran transplantasyonu ve grup 4 ve 8'e herhangi bir tedavi uygulanmadı. Bu uygulamayı takiben 2, 6 ve 8. günlerde, epitel defektlerinin boyutunun ölçülmesi i lemi için kornea floresein ka ıt ile boyandıktan sonra klinik görünümünün foto rafları çekildi. Elde edilen tüm veriler fundus kameraya ba lı bilgisayar ortamına aktarılarak foto raflar IMAGE net sistem ile de erlendirildi (Topcon, Itabashiku, Tokyo, Japan).

Çalı ma sonrası hayvanlar dekapite edilere k korneaları alındı. Her gruptaki korneaların yarısı biyokimyasal di er yarısı ise histopatolojik de erlendirme için ayrıldı. EGF seviyesi amniyotik ekstre ve otolog serum içerisinde ve her gruptaki kornea lizat için biyokimyasal olarak de erlendirildi. H-E boyama ile her gruptaki korneal neovaskülarizasyon ve PMNL'ler sayıldı ve santral korneal epitelyal kalınlık de erleri ölçüldü.

Dördüncü gruptaki (tedavi almayan grup) 2, 6 ve 8.günlerde de erlendirilen reepitelizasyon hızının epitelyal defekt olu turulmu di er gruplara göre (grup1, 2, 3) anlamlı yüksek oldu u izlendi. Grup 1, 2 ve 3'teki reepitelizasyon oranının daha dü ük olması, aslında heterolog uygulama olan bu tedavi rejimlerinin antijenik yapısına ba landı.

Histopatolojik incelemede amniyon membran transplantasyonu uygulanmı grup, serum ve amniyotik ekstre grupları ile kar ıla tırıldı nda korneal damar ve PMNL sayısının anlamlı olarak daha dü ük, santral korneal epitelin ise anlamlı olarak daha kalın oldu u gözlemlendi.

Biyokimyasal incelemede çalı mamızda oldu u gibi cerrahi i lem gibi okül er yüzeyde travma olu turulması EGFR'de upregülasyona ba lı EGF düzeylerini yükseltmektedir. Fakat ekzojen uygulama sonucu art tım miktardaki EGF düzeyleri ile EGFR' lerinde downregülasyon olu abilmektedir, bu nedenle grup 1'de (amniyon ekstre) kornea lizat EGF düzeyleri di er gruplara göre anlamlı olarak dü ük seviyelerde izlendi.

Çalı ma sonuçlarımız göstermektedir ki alkali yanık sonrası amniyon membran transplantasyonu korneal enflamasyon ve neovaskülarizasyonu önlemede serum ve amniyotik ekstre tedavilerine göre daha ba arılıdır. Bununla beraber tedavi almayan gruptaki reepitelizasyon hızı di er heterolog tedavilere göre daha iyi olmaktadır. Ayrıca yüksek doz EGF uygulamaları enflamasyona ve EGFR'de downregülasyon neden olarak daha kötü iyile me sonuçları do urmaktadır. Bu nedenle amniyon membran transplantasyonu persistant kornea epitel defekti iyile me sürecinde hızı artırmaya dahi iyile meyi daha iyi modüle etmesi nedeni ile tercih edilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel alkali yaralanmalar, amniyon membran transplantasyonu, otolog serum tedavisi, EGF

2. ABSTRACT

Effect of amnion membrane extract in corneal epithelial wound healing

This study was performed in the Firat University Medical School Department of Ophthalmology. The purpose of this study was to determine the therapeutic effect of topical administration of amniotic membrane extract, serum and amniotic membrane transplantation in rabbit cornea that was exposed to alkali burn.

Twentyfour rabbit weighing 2500- 3000 g were enrolled in the study and they were randomly distributed into 8 groups. A central corneal epithelial wound extending into the stroma was produced by using 1 N NaOH soaked filter-paper disc (8 mm diameter) applied to the corneal surface for 30 seconds in group 1, 2, 3, 4. In group 1 and 5 topical amniotic membrane extract, in group II and VI topical serum, in group III and VII amniotic membrane transplantation and in group IV and VIII no treatment was administered with the same protocol. The wound size was photographed by staining the cornea with fluorescein at 2, 6 and 8. days. By using computer imaging analysis the area of the wound was measured from the photographs (Topcon, Itabashiku, Tokyo, Japan).

At the 8 th day, the animals were sacrificed and corneas were excised. Half of the corneas were reserved for histopathological evaluation, the other half for biochemical analysis in each group. The EGF levels were determined by EL SA in amniotic extracts and serum and in corneal lysates. The corneas were stained by H&E and corneal neovascularization, PMNL numbers were counted and central cornea epithelial thickness was measured by light microscope. The results were compared statistically.

In group 4 reepithelialization was statistically faster than the other epithelial defect performed groups (group 1, 2, 3). The low rate of reepithelialization in group 1, 2 and 3 was due to antigenic properties of heterologous treatment. In histopathologic analysis of each group indicated that the number of PMNL s and neovascularization were statistically lower and central corneal epithelium was thicker in amnion membrane transplant treatment group (group 3) than amniotic extract, serum and no treatment groups. Biochemical analysis of each group indicated that ocular surface trauma such as surgery, increased the EGF levels due to upregulation of EGFR. But excess EGF levels due to exogenous administration caused EGFR

downregulation and degradation so this is the possible explanation of the lower values of EGF levels in group 1 (amniotic extract) than the other s.

Our results suggested that that amniotic membrane transplantation is more successful in preventing corneal inflammation, neovascularization than amniotic extract and serum treatment in experimental alkali wound. In no treatment group, corneal reepithelialization rate was better than the heterologous treatment groups.

We concluded that high dose of EGF may delay reepithelialization by triggering inflammation and EGFR downregulation. We advise amniotic membrane transplantation in persistent epithelial defect treatment because of its remodeling effect although it does not fasten the reepithelialization rate.

Key Words: Experimental alkali wound, amniotic membrane transplantation, autologous serum treatment, EGF

3. G R

3.1. Kornea Anatomisi:

Kornea, avasküler ve saydam yapıda olup periferde kalınlık artarak sklera ile devamlılık gösteren gözün kırıcı ortamlarından biridir. Kornea, vertikal 10.5 mm, horizontal 11.5 mm çapındadır. Santral 4 mm' lik alanda hemen hemen sferiktir ve ön-arka yüzler birbirine paraleldir, kalınlık 0.52 mm kadardır. Periferde ise arka yüzeyin eğrilik artışıyla paralel olarak 1.0 mm kalınlıkta ulaşırken ön yüzde düzleşme gözlenir. Düzleşme her alanda simetrik değildir; nazalde ve üstte, temporale ve altta oranla daha belirgindir. Keratometre ile sadece santral sferik alan değerlendirildiği için bu topografi kontakt lens uygulanmasında önemle anımsanmalıdır. Korneanın ön eğrilik çapı (konveks) 7.8 mm, arka eğrilik çapı (konkav) 6.2 - 6.8 mm kadardır. Yeni doğanlarda ve çocuklarda bu kıvrım oranla daha büyüktür, ilk birkaç ayda düzleşme çok belirgindir daha sonra yavaş biçimde azalmaya devam eder. Yaklaşık 6 yaş civarında korneal gelişim tamamlanmıştır. Kornea önden arkaya sırayla epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endotel olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır (1).

3.1.1. Prekorneal gözyaşı film tabakası:

Kornea yüzeyi üç tabakadan oluşan gözyaşı filmi ile kaplıdır:

1. Meibomian, Zeis (sebace yapıda) ve Moll (ter bezi yapısında) bezlerince salgılanan hidrofobik ön lipid tabaka.
2. Aksesuar lakrimal bezler (Krause, Wolfring ve Manz bezleri) ve ana lakrimal bez tarafından salgılanan hidrofilik aköz tabaka.
3. Başıca Goblet hücrelerince ve Manz bezlerince salgılanan müsin tabaka.

3.1.2. Epitel ve Bazal membran:

Bu çok katlı non-keratinize epitelyal yapı, yüzey ektoderminden köken almaktadır. Kalınlık ortalama 50-80 µm olup üç tabakadan oluşmaktadır. Kornea yüzeyi 123 mm² genişlikle tartımsız en özellemiş vücut yüzeyidir (2). Kornea epiteli çok katlı non-keratinize yapıdadır ve yüzey ektoderminden köken alır. Bazal

hücre (1 kat), Wing (kanatlı) hücre (2-3 kat) ve yüzeysel yassı hücre (5-6 kat) tabakalarından oluşur. Santralde 5-6, periferde 8-10 kat hücre yoğunluğu ile 50-90 µm kalınlığındadır. Bazalde tek katlı silindirik hücre tabakası altındaki bazal membrana hemidesmozomlarla tutunmuştur. Rekürren korneal erozyonda hemidesmozom kaybından dolayı epitel tabakası sıkı ve sürekli bir yapı olamaz. Bazal membran gerçek bir membran yapısındadır ve PAS (+) boyanır. Laminin, büllöz pemfigoid antijen (BPA), fibronektin (Fn), fibrinojen (Fg) ve fibrin içeren lamina lucida ve tip IV kollajen içeren lamina densa olarak ön ve arka iki zondan oluşur, rejenerasyon olmaz. Epitelde bir bazal hücrenin yüzeyden dökülmesi yaklaşık 7-10 günde gerçekleşir. Yaşla birlikte epitelde herhangi bir değişiklik gözlenmez. Bazal kolumnar epitelden başlayarak 2-3 kat poligonal hücrelere rastlanır. Yanlarında kanatsız uzantıları olan bu hücreler “wing cells” olarak anılır. Yüzeye yaklaştıkça hücreler incelip yassılaşıp uzantılarını kaybederler. Gözyağıyla temasta olan apikal yüz, mikrovilli ve mikropikalar nedeniyle oldukça irregülerdir. Bütün epitel hücreleri birbirlerine çok sayıda desmozomlarla sıkıca tutunmuş durumdadırlar. Yüzeyde zonula okludens, yüzey epiteli ile kanat hücreleri arasında maküla okludens, bazal tabaka ile membran arasında ise hemidesmozom yapıları gözlenir (3).

3.1.3. Bowman tabakası:

Bir membran yapıda olmayıp gelişigüzel dağılımı Tip I yapıda elastik kollajen fibrillerden oluşur ve 8-14 µm kalınlığındadır. Epitele uzanan myelinizasyon sinir lifleri için kanallar içerir. Descemet membranının aksine travmatize olduğunda rejenerasyon olmaz, skar dokusu ile iyileşir. Yaşam boyu yapısı ve kalınlığı değişmez ancak perifer kısımlarında bazofilik lökositler ve kalsifik depozitler görülebilir. Epitel ile stroma arasında önemli bir bariyer teşkil etmektedir. Bowman tabakasının yapısı ve kalınlığı yaşam boyu değişmez (4).

3.1.4. Stroma tabakası:

Kornea kalınlığının %90'ını oluşturur (500 µm). Stroma yaklaşık % 76 oranında su içermektedir. Kuru ağırlığının % 80'i kollajen fibrillerden, % 15'i matriksten, % 5'i hücresel elementlerden oluşmaktadır (5). Büyük oranda Tip I, az miktarda Tip III ve Tip V kollajen ve ara madde üreten fibroblastlar (keratositler), ara madde ve

kollajen yapıda lamellerden kuruludur. Lameller içindeki kollajen lifler aynı çapta olup $300\mu\text{m}$ 'dir. Keratositler ince yassı hücrelerdir ve uzantıları ile aynı düzlemdeki diğer hücrelerle ilişki içindedir. Kollajen lifler stromanın ön 1/3'ünde oblik, arka 2/3'ünde ise paralel lameller oluştururlar, lameller içindeki kollajen lifler aynı çap sahiptirler birbirlerine paralel olarak tüm kornea boyunca uzanımları mümkündür. Komulük gösteren lameller ise birbirlerine dik yerleşimlidir. Glikozaminoglikan ve proteoglikan yapıda olan ara madde, % 60 oranda keratan-sülfat ve % 40 oranda kondroitin-sülfattan kuruludur. Kollajen lameller arasında bulunan matriks, fibriller arası mesafeyi koruyarak düzenli bir yapının devamını ve korneanın saydamlığını sağlar (6). Yenidogan ve çocuklarda stroma erikinden daha fazla keratosit içerir, periferal korneal stromada yağla birlikte kolesterol ve fosfolipid birikimi gerçekleşebilir (arcus senilis).

3.1.5. Descement membran:

Endotel bazal membranı gerçek membran yapısıdır, tip IV kollajen içerir ve PAS (+) boyanır. Doğumda 3-4 μm kalınlıktadır, erikinde 10-12 μm kalınlık ulaşır. İntrauterin gelişen ön çizgili zon ve yağam boyu endotel tarafından desteklenen arka çizgisiz zon olmak üzere iki kısımdır. Periferde Schwalbe çizgisi ile sonlanır. Rejenere olabilir. Travma sırasında bu membran, stromadan kolaylıkla sıyrılabilir ve endotel tarafından tekrar salgılanarak yenilenebilmektedir (5). Yağla birlikte Descement membranda kalınlık artışı dışında dehidratasyon olmaz. Bazen yağlı popülasyonda periferal korneada Descement membran artışı olduğu düşünülen Hassall-Henle Warts cisimciklerine rastlanır. Bu depozitler otozomal geçiş gösteren ve artıkların santral korneada yoğunlaşması Cornea Guttatada ve Fuchs endotelial distrofinde çok sayıda gözlenir.

3.1.6. Endotel tabakası:

Nöroektodermal kökenlidir. Az sayıda mikrovilli içeren hegzagonal hücrelerden kurulu tek katlı tabaka halindedir, tipik olarak daha genç hücrelerde büyük bir nükleusa ve çok sayıda mitokondriye rastlanır. Bu organeller aktif transportta ve stromanın su kapsamında önemli rol oynarlar. Endotel hücre sayısı yağla birlikte azalır, mitoz nadiren rastlanır. Fonksiyonlarını yitirmeleri durumunda, stromal hidrasyon artarak, ödem, kalınlık artışı ve opasifikasyon gelişmektedir (7). Doğumda 5000 hücre/ mm^2 iken erikinde bu sayı 2500 hücre/ mm^2 civarında olup,

800 hücre/mm² altına indi inde korneal fonksiyonlar bozulmaya başlar. Komu endotel hücreleri birbirlerine stoplazma yoğunluğunu arttıran ince ağırsı fibrillerin rol oynadığı pinositotik vezikül veya terminal web gibi sıkı bağlarla tutunmuşlardır ancak desmozom normal hücreler arasında asla görülmez. Stres altında veya stabil olmayan kornea endotel hücrelerinde büyüme ve ekileme ikili olan polimegatizm gözlenmektedir.

3.1.7. Limbus:

Kornea ile konjonktiva arasındaki geçi zonudur. Limbustaki anatomik yapılar konjonktiva, Tenon kapsülü, episklera, korneoskleral stroma ve aköz dış akım aparatıdır. Anatomik olarak Bowman ve Descement tabakalarının sonlandığı yerlerden geçen düzlem ile arkada Schlemm kanalı ile sınırlanan 1 -1.5 mm'lik alan korneoskleral bileke olarak adlandırılır. Patoloğlara göre ise Bowman membranının bitim yerinden geriye doğru 1.5 mm'lik alandır. Cerrahi limbus ise 2 mm kadardır. Ön mavimsi zon Bowman membranının bitim yerinde başlar, arka beyaz zon ise skleral mahmuz hizasında biter (8). Geçi zonu olan limbusta epitel, 10 -12 katlıdır ve melanosit, Langerhans hücreleri ve damar ağını içerir. Konjonktivanın aksine goblet hücresine rastlanmaz. Limbal stroma, üzerindeki epitle birlikte radial fibrovasküler yükselti biçiminde düzenlenmiştir, bu yapıya Vogt'un limbal palisadları (Vogt çitleri) adı verilir. Korneada bu çitlere çepeçevre rastlanır, özellikle alt ve üst limbusta daha belirgindir. Bazal hücre yoğunluğu bu çit bölgelerinde maksimaldir (2).

Korneanın duyuşal innervasyonu trigeminal sinirin oftalmik dallarıyla gerçekleşir. Limbusta myelinli iken korneada myelinlerini kaybeden sinir lifleri özellikle ön stromada Bowman tabakası altında yoğunlaşırlar ve epitele dallar gönderirler. Bu sinir liflerinin aksonları uzun silier sinir aracılığıyla önce silier ganglionu sonra semilunar ganglionu ulaşırlar. Descement membranı ve endotelin ise innervasyonu yoktur (8).

3.1.8. Kornea embriyolojisi:

intrauterin dönemin beşinci haftasında; epitel ve endotel hücreleri nöral krest orjinli olup yüzey ektoderminden gelişirken, 13. haftasında; Descement membranı yassılaştıran endotel hücrelerinden gelişir. Mezodermden gelişen stroma, intrauterin

altıncı haftanın sonunda olu maya ba lar ve dördüncü ayda epitel altında yo unla arak Bowman tabakasını olu turur.

Kornea ve ön kamara 6. hafta sonunda (embryo yakla ık 17 -18 mm iken) geli meye ba lar. 6. haftaya kadar yüzey epiteli ile lens ön yüzü arasındaki bo luk iyi organize olmamı mezenkimal doku ile doludur. 6. hafta sonunda mezoderim içinde dar bir erit halinde beliren bo luk geni lemeye ba lar ve mezodermi, korneal stromayı olu turacak olan ön tabaka ve iris stromasını olu turacak olan arka tabaka olmak üzere ikiye ayırır. Aradaki bo luk ise ön kamarayı olu turur. Descement endoteli, ön kamara belirildikten hemen sonra ekillenmeye ba lar. Korneoskleral açıdan itibaren iç yüzey boyunca geli en nöroektodermal kökenli hücreler, arka yüzeyi örten yassı endotel hücrelerine dönü ürler ve endotel ön yüzüne hyalen membran salgırlar. Endotelium, embryo 30 mm iken tamamen ekillenmi tir. Descement membranı kalınlı nı giderek artar ve embryo 60 -70 mm iken histolojik kesitlerde tanınır hale gelir (9).

3.2. Kornea fizyolojisi

3.2.1. Gözya ı fizyolojisi:

Normal korneal fonksiyonlar için gözya ı ya amsal önem ta ır. Normal salınım 0.9-2.2 μ l /dak kadardır. Lipid tabaka; % 35 mum esteri, % 30 kolesterol esteri, % 16 fosfolipid, % 4 trigliserit, % 2 serbest ya asiti, % 2 serbest sterolden kuruludur. Hidrofobik yapısıyla evaporasyonu önler, lubri kan özellik ta ır, gözya ı menisküsünün kapak dı ma ta ımını önler. Aköz orta tabakanın %98 'ini su olu turur, %2'si ise solid kısımdır. ı erdi i Na^+ ve HCO_3^- miktarı serum ile aynı, K^+ ve Cl^- ise daha yüksektir. Glukoz içeri i çok dü üktür buna kar ılık yüksek miktarda protein içerir (7 mg/ml). Ya la birlikte protein konsantrasyonu azalır. Sal gısal Ig A, Ig G ve Ig E gibi immünglobülinler μ m ile beraber içeri indeki muramidaz etkisi gösteren lizozimler ile lizis etkisi yaratan laktoferrin (Fe^{++} ba lar) sayesinde Fe^{++} ba ımlı B.subtilis, S.aureus ve epidermidis, P.aeurogenosa gibi mikroorganizmalar için bakteriyostatik etki gösterir. Aköz tabaka avasküler korneanın oksijen ve besin gereksiniminden sorumludur. Müsinöz tabaka ise yüzey gerilimini dü üre k aköz tabakanın kornea ve konjonktiva üzerinde üniform yayılımını sa lar (10).

3.2.2. Epitel fizyolojisi:

Kornea aköz humor ile birlikte yaklaşık +43 D'lik bir kırma gücüne sahiptir ve gözün ana refraktif elemanıdır. 365-2500 nm dalga boyundaki elektromanyetik radyasyonu geçirici özelliktedir. Geçtiği 400 nm'de % 80, 500-1200 nm'de % 100'dür. Kornea epitel hücreleri lipid geçirgen özelliktedir. Epitel ve endotel hücreleri gerek mekanik bariyer, gerekse sıvı ve iyon dengesinin sağlanmasıyla, korneanın korunmasında önemli görevlere sahiptirler. Korneada keratosit, endotel ve epitel hücreleri metabolik olarak aktif olup, canlılıklarını devam ettirmek için enerjiye ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Kornea epitel hücreleri metabolik olarak en aktif hücrelerdir. Epitel tabakasına oksijen, gözyaşı yoluyla difüzyonla sağlanırken, göz kapalı durumda iken limbal ve tarsal konjonktiva damarları aracılığıyla sağlanır (11). Aminoasit ve vitamin desteği, aköz humörden sağlanır. Epitel hücrelerinde, glikoz ve glikojen başlıca enerji kaynağını oluştururlar. Glikoz çoğunlukla aköz humörden elde edilmekle beraber, % 10 veya daha azı limbal damarlar veya gözyaşından da sağlanabilir. Glikojen depolama özelliğine sahip olan epitel hücreleri, hipoksi ve travma gibi durumlarda bu kaynağı kullanabilmektedirler. Korneal hücrelerce kullanılan metabolik yollar; aerobik ve anaerobik glikoliz (% 65 oranında bu yol kullanılır), pentoz-fosfat sentezi ve özellikle epitelde TCA siklusudur. Metabolik aktivitenin en yoğun olduğu tabaka epitelidir. Epitel tabakası yarıda çözünür, stroma ve endotel ise suda çözünür. Aköz humorda pO_2 artışı, stroma ve bazal epitel hücrelerinde pO_2 artışı ile sonuçlanır ancak yüzey epitelde de değişiklik görülmez. Bunda aköz humorun kornea epitelinin oksijen gereksinimini karşılamadığını gösterir. *In vivo* olarak endotel, normal pompa fonksiyonu için yeterli O_2 desteğini aköz humörden alır (8). Epitel hücreleri, aralarında bulunan sıkı bağlantılar nedeniyle, iyon geçirgenliğine en fazla direnç gösteren hücrelerdir. Bu özellikle riyle, stromanın su dengesine katkıda bulunurlar (12).

3.2.3. Endotel fizyolojisi:

Endotel hücrelerinin ana enerji kaynağı aköz humörden sağlanan glikozdur. Aktiviteleri için anaerobik, daha az olarak da aerobik yolları kullanırlar. Endotel hücrelerinin en önemli görevi, korneanın effaf ve saydam kalmasını sağlamaktır. Bunu yaparken hem aktif bir pompa gibi çalışır, hem de mekanik bir bariyer teşkil ederler. Endotel hücreleri normal pompa fonksiyonu için gerekli oksijeni aköz humörden sağlarlar. Kornea endoteli dehidratasyon görevini yaptığı sürece,

stromanın su içeri i % 78 ve kalınlı ı 550 μm civarında kalarak normal fonksiyonlarını sürdürür. Endotel hücreleri arasındaki sıkı ba lantılar bariyer görevi görürler. Endotel tabakası metabolik aktivitesini stromadan aköz humore su pompalamak üzere gerçekte tirir. Aköz humor (-) yüklüdür. Korneal pompanın dört ana komponenti vardır:

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

Net su akımı için Na^+ , K^+ veya H^+ konsantrasyon gradientinin gerçekte mesi gereklidir. Bu pompalarla gerekli gradient sa lanır. Endotel hücrelerin dı kenarlarına lokalize olan sodyum-potasyum-adenozintrifosfataz pompa sistemi ile su ve elektrolitler dengelenerek, aynı seviyede tutulur. Bu pompa, enerji harcayarak sodyumun hücre dı na çıkmasını sa lar, bunu suyun hücreyi terk etmesi izler. Böylece kornea stromasından ön kamaraya do ru devamlı sıvı geç i i olurken, korneanın effaflı ı korunur. Korneadan ön kamaraya geçen sıvının geri dönmesi, endotel hücreleri arasındaki sıkı ba lantılar ile önlenmektedir. Hekzagonal yapıda olan endotel hücreleri, sıvı regülasyonu için ideal dizilimi olu turmaktadır. Bu geometrik düzen maksimum sayıda hücre ve maksimum sayıda pompa yo unlu unu temin etmektedir. Korneanın effaflı ının korunması, endotel hücrelerinin etkin fonksiyonlarının yanı sıra, korneada damarsal yapıların bulunmamasına, sinir liflerinin miyelinsiz olmasına ve stroma tabakasındaki kollajen lamellerin düzenli dizilimine de ba lıdır (13).

3.3. Kornea Yara yile mesi:

Kornea sürekli olarak fiziksel ve kimyasal etkenlerle travmalara u rar. Yara iyile mesinde büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstrasell üler matriks proteinleri

organize edilmiş haldedirler. Korneal travmalarda sıklıkla dört temel lezyon ortaya çıkar:

1. Epitelyal defekt
2. Epitelyal ve ön stromal defekt
3. Derin stromal defekt
4. Tam kalınlıkta defekt

Her lezyonda farklı bir iyileşme süreci gözlenir:

3.3.1. Epitel Defekti:

Epitel iyileşme süreci korneal iyileşme sürecinin ilk basamağıdır ve 3 fazda gerçekleşir (14). Bunlar; ilk saatlerde görülen latent faz, epitel migrasyon ve proliferasyon fazı ve kalıcı hücre adhezyon fazıdır.

Normalde epitel bazal hücre mitoz bölünmesiyle her 7 günde bir yenilenir. Defekte bu süre daha da kısalmaktadır. Korneal abrazyonlar epitelin tamamının veya bir kısmının Bowman tabakasını açıkta bırakarak kayıpla sonuçlanır. Epitelden tamamen yoksun kornea 4-7 gün içinde kendini yenileyebilir. iyileşme sürecinde başlangıçta bir mitotik paralizi, ardından defekti kapatmak üzere epitel hücrelerinin yaraya göçü (sliding) ve mitozla normal kalınlığa ulaşma basamakları gözlenir. Yaralanmanın hemen ardından bazal hücrelerde DNA sentezi ve mitozunda duraklama gözlenir. Yaklaşık 1 saatlik sessiz dönemden sonra zedelenmemiş komşu epitel hücreleri birbirlerinden ayrılıp iyileşmeye başlarlar ve fibrinle sarılırlar. Küçük yaralarda epitel motilitesi dakikalar içinde başlar. Özellikle bazal tabakada hücreler, filopodia ve lamellopodia gibi uzantılarla motilite kazanarak bazal lamina üzerinde defektif alana göç ederler (15. saatte). Defekt tamamen kapanıncaya kadar motilite sürer. Migrasyon, intrastoplazmik aktin-myozin kontraksiyonu ile gerçekleşir. Hücre hareketinin aktif fazı süresince mitotik aktivite 96-120 saat kadar inhibisyona uğrar. Zedelenmeden 3 saat sonra rejenerasyon olan epitel uçlarında ve bazal laminada PMNL (Polimorfonükleer lökosit)ler belirir ve 36 saat kadar kalırlar. Daha sonra giderek azalır ve kaybolurlar. Büyük defektlerde onarıma konjonktiva epiteli de katılabilir. Abrazyonu kornea epiteli 1-4 gün içinde örtürken konjonktiva epiteliyle iyileşme 1-2 hafta veya daha uzun zaman gerektirir.

Epitel bazal membranında üç de i ik komponent ayırdedilebilir:

1. Bazal hücre membranının hemen altında yer alan lamina lucida içinde 220.000 D'luk bir glikoprotein olan BPA
2. Lamina lucida da yer alan nonkollajenöz bir protein olan laminin
3. Stromaya en yakın yerle imli Tip IV kollajen yapıda olan lamina densa.

Epitelin minör travmalarda veya nazikçe soyulmasında hemen daima BPA ile laminin arasından ayrılıyor olması, bazal membranın travmaya en duyarlı yerinin bu kısım oldu unu gösterir. Bazal membranın tamamen ka ybında iyile me yakla ık 6 hafta sürer. Sa lam bir bazal membran üzerine göç eden epitel hücreleri 6 saat içinde buraya sıkıca yapı ırlar. Latent fazda bütün abrazyonlar epitle örtülmeden önce bir di er glikoprotein olan Fn ile kaplanır. Serumda bulunan ve karaci er hücreleri, damar endoteli, makrofaj ve fibroblastlarca üretilebilen Fn, korneal abrazyonlarda muhtemelen serumdan köken alır. Üretimi epitel defektinin kapandı ı travma sonrası 2.-4. günlerde gerçekleşir. Fn abrazyona kom u epitel hücre göçü için gerekli matriks görevini görür. Normal kornea epitelinde intrastoplazmik aktin filamentleri yüzey epitel hücrelerinin mikropikalları altında en yo un iken abrazyonda, abrazyona kom u kenarda yerle im gösterirler. Defekt iyile mesinde Fn depolanması ve aktin filamentlerinin reorganizasyonu epitel iyile mesinde ana faktörlerdir. Bunların ardından yeni BPA ve laminin üretilir (15). Bu sonucu destekleyen Fujikawa ve ark.nın yaptı ı bir çalı mayla lamininin korundu u ve lamina densanın açıkta kaldı ı BPA kaybıyla karakterize epitelyal yaralanmalarda ve kornea bazal membranının tamamen kaybıyla karakterize yüzeysel keratektomilerde epitel migrasyonu için BPA, laminin ve Tip IV kollajenin gerekmedi ini ; Fn, Fg ve fibrinin yarada kalıcı komponentler geli ene dek matriks görevi gördü ü, epitel migrasyonunu destekledikleri ortaya konulmu tur (16). Abrazyon alanındaki stromada keratositler metabolik olarak aktif duruma gelirler ancak epitel iyile mesine nasıl katkıda buldukları belli de ildir. nfeksiyon veya il açlar Fn hasarına neden veya üretimine engel olarak, aktin filamentlerinin i levini ve epitel hücre mitozunu inhibe ederek yara iyile mesini geciktirirler. Dikkati çeken di er bir nokta ise yaralanma nedeni ne olursa olsun tüm abrazyonların reepitelizasyon sürecinde aynı kapanma paterni gösterdikleridir. Üç-altı koldan konveks biçimde migrasyon

gösteren öncü epitel hücreleri defekt boyunca geli mekte, merkeze do ru ilerlemektedir. Kar ıla an uçlar sonuçta de i ik geometrik ekiller yaratmakta ve epitel tamamen kapanmadan önceki dönemde tek veya çift Y biçiminde çizgisel defekt halini almaktadırlar (17).

Korneal epitel iyile mesinde limbal kök hücreleri de önemli rol oynarlar. Bunlar en yüksek mitoz hızına sahip hücrelerdir. Epitel iyile mesi sırasında baza l hücrelerle limbal kök hücreler arasında bir denge bulunmaktadır. Korneosklral limbusun epitel iyile mesine olan katkısı üzerine yapılan çalı malar i lginç sonuçlar ortaya koymu tur; Dua ve ark. korneosklral limbusun epitel yenilenmesi için olası hücre kayna mını olu turdu unu öne sürmü ler, limbal korneal hücrelerin di er hücrelere göre en yüksek mitoz hızı ve en kısa ikiye katlanma zamanına sahip oldu unu göstermi lerdir. Yine aynı ara tırmacılar çalı malarında kornea epitel devamlılı ının sürekli proliferasyon ve periferdeki daha genç hücrelerin santrale do ru migrasyonu ve sonrasında da yüzeyden eksfoliye oldukları biçiminde gerçekle ti ini savunmu lardır (18). Santral epitel defekti sırasında, periferik limbal hücreler santrale do ru göç ederek, kornea l epitelin devamlılı ını sa larlar. Bu görü ‘X,Y,Z’ hipotezi ‘ile ortaya konmu tur. X; bazal epitel hücre ço alımını, Y; limbal hücre ço alım ve santrale göçünü, Z ; yüzeyden epitel hücre kaybını yansıtmak üzere denge konumunda $X+Y=Z$ olmalıdır (2).

Epitel defekti limbal Vogt palisadlarını içine aldı nda persistan epitel defekti ve konjonktivalizasyon insidansı artar. Konjonktiva epitelinin kornea epiteline transformasyonu anatomik ve biyokimyasal de i iklikler gerektirir. Konjonktiva epiteli goblet hücreden zengin, birkaç desmozom içeren 2-4 katlı yapıdan desmozom ve hemidesmozomlarla birbirine sıkıca tutunmu , goblet hücresi içermeyen 5-6 katlı yapıya dönü mek zorundadır. Aynı zamanda glikolitik, TCA sikluslu solunum zincirinden hekzos monofosfat antına dönü ümü içeren biyokimyasal dönü üm sözkonusudur. Kornea epitel iyile mesinde sinir lifi rejenerasyonu da gerçekle ir. Tav an korneasında bu prosesi destekleyen ENF (epitelyal neuronotrofik faktör) adı verilen bir mediatörün varlı ı saptanmı tır (19).

3.3.2. Epitel ve Yüzeysel stromal Defekt:

Epitelle birlikte Bowman ve ön stroma tabakası kaybı sözkonusudur. Epitelyal iyileme ile süre açısından farklılık gösterir ve daha uzundur (en az 6 hafta). Altta yatan yüzey yani stroma yara iyilemesi için ideal bir platform değildir. Bowman tabakası ve normal stroma rejenerasyon olmayacağından defektin yerini kollajenöz skar dokusu alabilir veya defekt hiperplastik bir epitle doldurulabilir (15).

3.3.3. Derin stromal defekt:

Bu defektler de benzer biçimde onarılır ancak farklı olarak kollajen skar dokusu oluşumunun temel parçasıdır. Zedelenmeden 1.5 saat sonra stromal yarada PMNL'ler görülür. 12 saatte pik yaparlar, 72 saat sonra giderek azalır, fagositoza yardımcıdırlar. Hasar gören epitel tabakanın alt tarafındaki keratositlerde apoptozis gözlenir. Hasarlı epitel ve apoptozise uğrayan keratositlerden sitokinlerin salınmasıyla, iyileme kaskadı başlanmaktadır. Keratositlerde kollajen sentezi zedelenmeden 1.5 saat sonra başlar, 8. günde sonlanır. Yara gerginliğine olan direnç stromal iyilemeyle yakından ilişkilidir. Tavşanlarda yapılan çalışmalarda ilk haftada gerginliğe direnç saptanamazken 10-40 gün arasında % 8-36, 40-100 günde % 36-50 oranında direnç gelişimi sözkonusudur, insanlarda ise 2-3 yılda bile % 50 direnç düzeyine erişilememektedir. Stromal iyileme sırasında keratositler, aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlara dönüşmektedirler (5). Kontraktil özellikte olan bu hücreler kollajenleri, glikozaminoglikanları ve diğer matriks proteinlerini üretmektedirler. Ekstrasellüler matriks, yara kontraksiyonundan sorumludur ve esas olarak bir skar proteini olan tip III kollajen üretmektedir. Skar remodelizasyonu 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 kondroitin sülfat ve keratin sülfata bırakır. Ayrıca keratositlerden KGF, HGF gibi büyüme faktörleri de salgılanmaktadır (5). Stromal iyilemenin tam olarak gerçekleşmesi haftalar almasına rağmen keratositlerde hipertrofi, çok sayıda nükleolus gelişimi gibi yapısal değişiklikler oldukça erken gözlenir (15). Normal stroma tip I kollajenden oluşurken korneal skar dokusu ise büyük oranda tip III kollajenden kuruludur. Hasar sonrası ikinci haftada kontraktil faz başlanmaktadır. Kas

hücrelerindeki benzer şekilde, miyofibroblastlarda aktin ve miyozin kontraktil ünitleri olur (20).

Sütüre edilen, epitelden yoksun korneal insizyonlarda gerginli e dirençte % 66 oranında azalma gözlenir. Yara yerinde a ırı epitel birikimi ve direnç göstermesi plak olu umuna yol açarak yara iyile mesini geciktirir. Topikal steroidler stromal iyile meyi geciktirirler (15).

3.3.4. Endotelyal yara iyile mesi:

Kornea endotel hasarı sonrasında, sıvı tra nsport mekanizmasında bozulma ile ödem olu maktadır. Endotel hücreleri mitotik aktiviteye sahip olmadıklarından ölü endotel hücrelerin yerlerini doldurmak için, kom u e ndotel hücreleri geni lemekte ve hasar yerine göç etmektedirler. iyile me fazında, yara yerine en yakın olan hücreler, 100 µm/gün hızla hareket ederken, kalınlıkları azalıp geni leyerek hegzagonal ekil almaktadırlar (21).

3.3.5. Tam Kalınlıkta defekt:

iyile me yine benzer biçimde olur. Posterior kornea travmalarında Descement membranının serbest kalan uçları önde stromaya do ru kıvrılmaya yüz tutarlar. Kaufman kornea perforan yara iyile mesinde altı dönem tanımlar :

1. Zedelenmeden hemen sonra önde ve arkada yara dudakları arasında buradaki kollajen doku retraksiyonu sonucu gap (yarık) lar ol u ur. Aköz humordeki Fg stroma ile etkile erek fibrine dönü ür ve bir fibrin pla ı geli ir ve stromada ödem ba lar.
2. Zedelenmeden 30 dakika sonra lökosit fazı ba lar. Limbal damarlar, aköz humor ve gözya ı yoluyla PMNL göçü gerçekle ir. Bu hücreler fazla fagositik de illerdir ve çe itli enzimler salgırlar. 12-24 saat sonra MNL (mononükleer lökosit) ler limbusta yo unla ırlar özellikle yara limbusa yakın ise yaraya geçedebilirler. Stroma içlerine olan göçleri ise son derece yava tır, fonksiyonları tartı malıdır ancak fagositozu destekledikleri kabul görmektedir.
3. Epitelyal yara iyile mesi fazı gerçekle ir.

4. Fibroblastik faz; zedelenmeden 12 saat sonra ba lar ve sa lıklı epitel iyile mesi ile ba ntılıdır. Lasere dokuya kom u stromal keratositler aktiv e olarak fibroblastlara benzer biçimde Tip III kollajen ve tipik skar glikozaminoglikanları üretirler. Zedelenme limbusa yakın ise monositler metaplazik de i ime u rayarak fibroblastik faza katkıda bulunurlar.

5. Endotelyal faz; 24. saatte ba lar ve endotel hücre göçünü içerir (15). Zedelenen ancak canlılığını sürdüren endotel hücrelerinin birbirleriyle birle erek büyük endotelyal hücreler olu turabildikleri gösterilmiştir. Birkaç hafta sonra zede alanını kaplayan endotel, yeni Descemet membranını salgılamaya ba lar (8).

6. Geç faz zedelenmeden 1 hafta sonra ba lar. Yaradaki hücre yo unlu u giderek azalırken salgılanan geli ğüzel da ılımı kollajen lifler Tip I kollajen yönünde daha iyi organize olurlar, skar dokusu kontrakte olur ve yara appozisyonu iyiy se bu olay zedelenmeden hemen sonra geli ebilir (15).

3.4. Kornea Yara yile mesini Etkileyen Faktörler

3.4.1. Ya :

Genç popülasyonda iyile me daha hızlıdır (birkaç gün -hafta), ya lılarda aynı natürde bir yaranın iyile mesi aylar alabilir (17).

3.4.2. Beslenme:

Malnutrisyon iyile meyi belirgin ekilde geriletir. Protein, vitamin A ve vitamin C gereklidir. iddetli vitamin A eksikli inde korneal ülserasyon sıktır (17).

3.4.3. Travma:

3.4.4. Yara apozisyonu:

Kötü apozisyon yara iyile mesini geciktirir, ön ve/veya arka yara duda nda gap olu umuna yol açabilir, infeksiyon, inkarserasyon veya yabancı doku adhezyonu olasılı mını artırır, retrokorneal membran ile sonuçlanabilen epitelial ve stromal ingrowth geli imine zemin hazırlar (17).

3.4.5. nfeksiyon:

ndirekt olarak (inflamatuvar yanıtı artırarak a ırı kollajen yıkımı ve hücre ölümüyle) ve direkt olarak (salgıladıkları enzimlerle glikozaminoglikan ve/veya kollajen yıkımını artırmak yoluyla) mikroorganizmalar yara iyilemesini geciktirir veya engellerler (17).

3.4.6. Enflamasyon:

De i ik travma tipleri de i ik inflamatuvar yanıt do urur. Örnek olarak, yabancı cismin yerinde kaldı ı laserasyonlar dev hücre reaksiyonu ve a ırı skar dokusu ile sonuçlanır. Topikal steroidle baskılanan erken inflamatuvar yanıt, belirgin biçimde iyilemeyi geriletir. Yaralanma sonrası, korneaya do ru olan inflamatuvar hücre akımı dokuyu onarıma hazırlar ancak iyilemeyi bozabilecek etkiye de sahiptir. Dokudan serbestle en lokal faktörler (lökotrienler, C5a, C3a..) PMNL aktivitesi için tetikleme görevi görürler. Fazla sayıda PMNL birikimi persistan epitel defekti, hatta ülser oluşumuna yol açar. PMNL'ler epitel migrasyonunu inhibe ederek iyilemeyi geciktirirler. Steroidler PMNL'ler için çarırıcı rol oynayan mediatör salınımını lizozomal veya di er membranların stabilizasyonunu sağlayarak önlerler. Bu da inflamatuvar yanıtı azaltır. Steroidler fagositozu, superoksit radikal oluşumunu etkilemez. Uzun süre kullanımında ise epitel migrasyonunu inhibe eder. PMNL'lerin kollajenaz aktivasyonu etkisini potansiyalize ederek ülserasyon riskini artırır. Bu yüzden steroidlerin kullanımı dikkatli monitorize edilmelidir. PMNL inhibisyonu için topikal sitrat kullanımı gündemdedir, Na sitrat PMNL birikimini, fagositozunu, degradasyona yol açan enzim salınımını ve serbest O₂ radikal oluşumunu önler. Bu etkilerini PMNL aktivasyonu için gerekli olan Ca⁺⁺ iyonuna elasyon yaparak gerçekleştirir (22).

3.4.7. Vaskülarizasyon:

Korneal vaskülarizasyon gelişiminde çok sayıda faktörün rol oynadığı görülür. Bu faktörler;

1. Normal korneada vaskülarizasyonu önleyen inhibitör madde varlığı önemsürülüyor, ancak henüz kanıtlanmamıştır.

2. Prostaglandin (PG) E1 ve PMNL, akut enflamasyonu ve vaskülarizasyonu deneysel olarak olu turabilme yetene ind edirler.

3. Limbusa yakın travmalar sıklıkla vaskülarizasyona yol açar.

4. Korneal nekroz, zayıf yara apozisyonu, yaraya iris adezyonu vaskülarizasyona predispozisyon olu turur (23).

3.4.8. Duyusal inervasyon:

Duyusal inervasyon yoklu unda hücre göç ü ve adhezyonu bilinmeyen bir mekanizmayla büyük ölçüde azalır (15). Korneada myelinsiz olarak sonlanan A - delta ve C sinir lifleri, substance P ve CGRP (calcitonin gene -related factor) içerirler ve bunlar nörojenik enflamasyon olu turabilme yetene ind edirl er. Retrobulber ve/veya lokal olarak kullanılan nörotoksin yapıdaki Capsaicin, korneal a rı ve kimyasal irritasyonu ortadan kaldırır. Capsaicin ile tav anlarda yapılan çalı mada olu turulan santral korneal epitel defektlerinde nörojenik enflamasyon blokuna ko ut olarak iyile me hızının belirgin biçimde geriledi i gözlenmi tir. Bu da normal epitel iyile mesinde sinirsel uyarımın da gerekli oldu unu göstermekte, patogenezi olarak ise korneal denervasyonun epitelin metabolik aktivitesini azalttı ı dü ünülmektedir (24).

3.4.9. ntraoküler basınç:

Yükselmesi durumunda stromal yara iyile mesinde skar dokusunun kontraksiyonunu önler (15).

3.4.10. Gözya mın etkisi:

Gözya mın niceli i epitelin sa lıklı olu u ve bütünlü ü için kritik önem ta ır. Orta aköz tabaka göz açıkta kaldı nda buharla ma ve nazolakrimal drenaj nedeniyle incilir ve yüzeyel lipid tabaka müsün tabakaya ula ır. Gözkapa ı hareketiyle aköz komponent yenilenmezse müsün tabakanın lipidle kontaminasyonu lokalize hidrofobik epitelyal alanlar yaratır. Aköz tabaka eksikli inde yüzeyel kuruluk, punktat epitelyal boyanma, mukus plak, iyile meyen epitel defektleri gözlenir. Lipid tabaka eksikli inde ise oküler yüzey keratinizasyonu, yüzey mikroplika kaybı, epitel defekti, korneal ülserasyon, keratomalazi gözlenir. Gözkapakları gözya mın devamlı

ve yeterli miktarda da ılımını sa lar. Kapak skatrizasyonu, malpozisyonu veya nörojenik fonksiyon bozuklu unda hidrofobik epitelyal yüzeyler olu ur (10).

3.4.11. laçlar:

3.4.11.1. Antibiyotikler:

Dü ük dozda basitrasinin (500u/ml), gentamisin (3 mg/ml), neomisin (3.5 mg/ml) ve kloramfenikolün (4 mg/ml) korneal epitelizasyona etkileri yoktur. Ancak artmış doza ba ımlı olarak kloramfenikol dı nda basitrasinin (10.000 u/ml), gentamisin (10 mg /ml) ve neomisin (8 mg/ml) epitelizasyonu belirgin biçimde inhibe ederler (25). Tav an kornealarında yapılan bir çalı mada ise %5'lik cefazolin-Na ve neosporin (neomisin sulfat, polimixin -B ve gramisidin karı ımı) in epitel iyile me hızına ve kalitesine en az etkide bulu ndu u, %10'luk sülfasetamid-Na ve suni gözya ı preparatlarının orta etkide, tobramisin, gentamisin sulfat ve kloramfenikolün en toksik oldu u saptanmış tır. Gentamisin ve tobramisin ile bunların fortifiye dozları arasında toksik açıdan farklılık belirlenememi tir (26).

3.4.11.2. Kortikosteroidler:

Korneal epitel, stroma ve endotel yara iyile mesini inhibe ederler. Dü ük dozda metilprednizolonla domuz kornea endotelinin organ kültüründe etkile imi ile yaygın hücre disintegrasyonu ve intraselüler vakuol olu umu gözlenirken, yüksek dozda belirgin endotel hücre hasarı geli ti i belirlenmi tir (27). 5-iodo-2' deoxyuridine (IDU) ve deksametazonun tav an korneasında etkisinin ara tırıldı ı bir çalı mada IDU ile doz ba ımlı olarak epitel ve stromal rejenerasyonda g ecikme gözlenmi , bu etki deksametazon ile belirginle mi tir (yalnız IDU ile iyile me 5 gün gecikirken IDU ve deksametazon ile 10 güne çıkmış tır) (28). Ba ka bir çalı mada OH-metil progesteron % 0.5-1, prednizolon % 0.1, deksametazon % 0.1 dozda ve 6x1 sıklıkta uygulandıklarında epitelyal iyile meyi geciktirdikleri belirlenmi tir (29). Epidermal growth faktor (EGF) ün gerginli e kar ı yara direncini artırıcı etkisini kanıtlayan di er bir çalı mada EGF (0.5 mg/ml) ile deksametazon (1 mg/ml) kombinasyonunun EGF nin bu yöndeki etkisini azalttı ı gösterilmi tir (30).

Deneyisel olarak oluşturulan lineer perforan insizyonda gerginlik ve kornea yaralarının medroksiprogesteron ile % 20, prednizolon ile % 11 oranında azaldığı gösterilmiştir. Skar dokusunda kollajen formasyonunu prednizolon % 43 azaltırken, medroksiprogesteron ise % 39 azaltmaktadır. Yine aynı çalışmada termal yanıkta ülserasyon gelişimini azalttıkları gösterilmiştir (kontrol grubunda % 85 ülserasyon gelişirken prednizolon ile % 0, medroksiprogesteron ile % 17 oranında olduğu gözlenmiştir) (31).

3.4.11.3. Lokal anestezi:

Epitel iyileşmesi için temel olan aktin etkileşimini bozarlar. Kronik topikal tedavi persistan epitel defektine neden olabilir (32).

3.4.11.4. Benzalkonyum Cl (% 0.01):

Koruyucu olarak bu kimyasal maddeyi içeren topikal ilaçların kullanımında rejener epitel üzerinde adheransta zayıflama, membran aktivite kaybı, olumsuz epitel tabakanın yerinden ayrılması gibi etkiler gözlenmiştir. Koruyucular içerisinde en toksik olanıdır, petrolatum ve mineral yağın ise epitele toksik etkisi saptanmamıştır (32).

3.4.11.5. Asetil kolin:

Endotel hücre hasarını arttırdığı saptanmıştır (32).

3.4.11.6. Epinefrin:

1/1000'lik konsantrasyonda irreversible kornea ödemi yol açabileceği bilinmektedir. 1/5000'lik konsantrasyonunun kullanılması önerilmektedir (32).

3.4.11.7. Antiviral ilaçlar :

Epitel iyileşmesini inhibe ederler (32).

3.4.11.8. Kanüllerde kalan deterjan solüsyonlar :

Korneal ödem oluşturabilirler (32).

3.4.12. Bandaj lens:

Koruyucu etkisi ile altında iyile en epitelin daha hızlı farklılaşması, yine aynı etkiyle veya hidrofilik yapısına bağlı olarak stromal ödemde azalma, koruma etkisiyle yara yerinde keratosit birikiminin sağlanması, konjonktivadan korneaya PMNL göçünün inhibisyonu gibi yararlı etkileri vardır (33).

3.4.13. Fibronektin (Fn) :

Fibronektin (Fn), hücre adhezyonu ve migrasyonunda rol oynadığı düşünülen multifonksiyonel bir ekstraselüler matriks proteindir. Kollajen, fibrin, heparin , glikozaminoglikanlar ve Fn hücre reseptörüne (Integrin) bağlanabilir. Hücre -hücre ve hücre-substrat bağlanmasında etkili görür, ayrıca hücre yüzeyine bağlandığında hücre iskelet yapısını değiştirerek motilitesini artırır (34). Korneal Fn iyile en epitel yara yüzeyinde gözlenir, epitelizasyon tamamlanınca ortadan kaybolur (35). Tav anlarda yapılan bazı ara tırmada keratektomi modelinde Fn ve Aprotinin (proteaz inhibitörü) in tek başına veya kombine tedavilerinin primer iyilemeye katkısı veya rekürren kornea epitel defektini önleyici etkisi görülmediği gözlenmiştir. EGF ile kombine kullanıldığında ise yine yara iyilemesinde hızlanmayı arttırmadığı, epitel migrasyonu gibi bir etkisinin de olmadığı, sadece adhezyonda rol aldığı savunulmuştur (36). Organ kültüründe tav an korneası üzerinde epitel migrasyonunun araştırıldığı Nishida ve ark.nın bir çalışmasında epitel hücrelerinin gösterdiği migrasyon aktivitesinin ortama eklenen Fn ile belirgin olarak arttığı, etkinin eklenen Fn miktarı ile doğru orantılı olduğu, ortama Ig G-anti tav an plazma Fn antikoru eklendiğinde ise anlamlı migrasyon inhibisyonu olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada korneanın defekt lezyonlarında (insizyon, deneysel büllöz keratopati, termal yanık...) yapılan immunohistokimyasal analizlerle Fn'in stromal keratositlerce sentezlenebildiği, sadece gözyağı kaynaklı olmadığı, eksojen Fn'in stromal kollajenlere bağlanarak kemotaktik aktivite yaratabildiği de bildirilmiştir (37). Bilindiği gibi yaralanmadan 8-36 saat sonra yüzeyel epitel defektlerinde Fn gözyağından veya limbal vasküler yapılardan köken almaktadır. Stromal yaralarda ise Fn, keratositlerce üretilir (38). Fn'in yüzeyel defektlerde asıl ve en olası kaynağının gözyağı olduğunu doğrular niteliktedir (38). Nishida ve ark. blok halinde kültür ortamına konulan tav an kornealarında EGF ve Fn'in epitel migrasyonuna etkisini de ara tırmışlardır. Her iki ajanın da doz bağımlı olarak 24 saat içinde epitel

migrasyonunu belirgin biçimde arttırdıkları, EGF için 12 saatlik sessiz bir zaman dilimi olurken Fn de bunun olmadığı görülmüştür. Fn için maksimum etki ortamda sürekli bulunmasına bağlı bulunurken EGF için ortamda 9 saat bulunmasının yeterli olduğu gözlenmiştir. Anti-Fn antikor, Fn ve EGF stimülasyonunu bloke ederken anti-EGF antikor sadece EGF inhibisyonuna yol açmıştır. Sonuçlar Fn'in aksine epitel hücrelerinin bir kez uyarı sinyali aldıktan sonra EGF'nin varlığına gereksinim duymadığını, EGF stimülasyonunun Fn bağımlı bir yanıt ve Fn in EGF den bağımsız olduğunu, EGF'nin epitel migrasyonuna etkisinin Fn tarafından düzenlendiğini ortaya koymaktadır (39).Fn, kornea epitel hücrelerinde Integrin adlı reseptörüne bağlanarak intraselüler iskelette (örn. aktin) reorganizasyona yol açıp hücreleri migrasyonun aktif fazına hazırlar. Bu hücre reseptör aktivitesinin sadece rejenerasyon olan epitel hücrelerinde görüldüğü Nishida ve Nakagawa tarafından (1989) gösterilmiştir. EGF ise korneaya epitel hücre proliferasyonunu, Fn sentezini, Fn reseptör aktivitesini artırmak gibi birtakım ortak mekanizmalarla etkileyebilir (39).

3.4.14. Interlökin - 6 :

Tavanda korneasında integrin reseptörlerini uyarak epitel hücre migrasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Persistan epitel defektinde (PED) topikal kullanımı deneysel amaçlıdır (40).

3.4.15. Retinoik Asit :

Tavandalar kornea epitel defektlerinde topikal retinoidlerin etkisinin araştırıldı bir çalışmada % 0.1'lik all-trans-retinoik asit 3x1/gün kullanımı ile iyileme hızında % 21, 5x1/gün dozunda ise % 35 oranında artış olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar all-trans-retinoik asitin cerrahi sonrasında ve PED de iyilemeyi hızlandırıcı olarak kullanılabilirliğini göstermektedir (41).

Retinoik asitin etkinliği tam olarak bilinmemekle beraber epitel iyileme sürecinde hücre yüzey glikoprotein sentezini artırıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ancak diğer önemli bulgu, retinoik asitin kornea epitel hücre yüzeyindeki EGF reseptörü olumsuzunu stimüle etmesidir. Böylece iki basamaklı bir sistemle iyilemeyi artırması da olasıdır. Ayrıca retinoidlerin defektif korneayı

normal kalınlıkta ulaşamadıkları da gözlenmiştir fakat mekanizması bilinmemektedir (41).

3.5. Büyüme Faktörleri :

Göz, birçok growth faktör için hedef doku konumundadır: Epidermal Growth Faktör (EGF), Platelet-derived Growth Faktör (PDGF), Insulin-like Growth Faktör (IGF), Transforming Growth Faktör ve (TGF- β , TGF- α), Mezodermal Growth Faktör (MGF), Fibroblast Growth Faktör (FGF). Bunlardan EGF ve TGF- β yo un biçimde ara tırılmı tır (42).

3.5.1. Epidermal Growth Factor (EGF) :

EGF ilk kez 1960'lı yılların ba nda fare submaksillar bezlerinden izole edilmiştir. Mouse EGF (mEGF), 53 amino asitten olu an 6045 D molekül a ırlıklı monomerik bir polipeptiddir. Ektodermal hücrelerde DNA, RNA ve protein prekürsör sentezini stimule etti i, organ kültürlerinde epidermal hücre proliferasyonunu ve keratinizasyonu artırdı ı gösterilmiştir. Cohen, erkek fare submandibuler tükürük bezinde sinir büyüme faktörü (NGF) izole etmeye çalı rken, bu bezlerden elde etti i ekstrenin yeni do an farelere enjekte edildi inde erken göz kapa ı açılı na ve erken di sürmesine neden oldu unu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve epidermis gelişimini hızlandırıcı etkisi nedeni ile bu maddeye Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme' Faktörü -EGF) adını vermiştir (43).

EGF, fare submandibuler tükürük bezinde sentezlenerek tübüler kanal hücrelerinde depo edilmektedir. Ancak farelerde submandibular tükürük bezinin çıkarılması sonrasında plazma EGF düzeyinde herhangi bir de i ikli in olmaması EGF 'nin organizmada ba ka bir yerde de sentezlendi ini dü ündürmektedir (44).

Human EGF (hEGF) ilk kez 1975'te izole edilmiştir, yine 53 amino asitten olu ur, mEGF den 16. pozisyonunda amino asit de i ikli i gösterir, aynı biyolojik aktiviteye sahiptir ve aynı hücre reseptörüne ba lanır. drar, tükürük, plazma ve insan sütünden izole edilmesine kar ılık kornea epitel ve konjonktivada bulunamamıştır (45). RIA yöntemiyle hEGF gözya nda da saptanmıştır ve büyük olasılıkla lakrimal gland hücreleri tarafından salgılandı ı dü ünülmektedir (29,46). Rekombinant DNA tekni iyle hEGF sentez edilebilmektedir (45).

EGF reseptörü 175.000 Da'rlı nda bir membran glikoproteinidir, konjonktiva epitelinde, kornea epitel ve endotelinde, irisin posterior pigment tabakasında ve lens epitelinde mevcuttur. EGF reseptörleri insan vücudunda idrar ve tükürü e ek olarak mide, pankreas sıvısı, serebrospinal sıvı, seminal sıvı, prostat sıvısı, süt ve kanda bulunmaktadır. EGF ayrıca birçok dokuda, özellikle karaci er ve plasenta hücrelerinde bulunmakta ve epitelyal ve mezotelyal kökenli hücrelerde mitojenik özelli e sahiptir (47). EGF ba landı nda 250 aminoasitlik kısmı intrinsik tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Fosforile olan ilk kısım reseptörün hücre içi yerle im gösteren tirozin rezidüleridir. Bundan sonra geli en aktiviteler: ornitin karboksilaz aktivitesinde artı , lipokortin inhibisyonu, poliamin birikimi, Fn sentez artı ı, DNA sentez stimülasyonudur. Aktive olan EGF -reseptör kompleksi endositozla hücre içine internalize olur ve hücre nükleusunda ikinci kez ba lanır (48).

3.5.1.1. Epitelyal iyile meye etkisi:

Topikal hEGF epitelyal iyile meyi stimüle etmekte, özellikle limbal ve periferel kornea epitel rejenerasyonunda maksimum etki göstermektedir (46). EGF ve kol isinin birlikte kullanımında epitel motilitesinde de imenin olmayı ı, EGF etkisinin motiliteden çok hücre yo unlu unda artı a yönelik oldu u sonucunu dü ündürmektedir (48). EGF oküler yüzeysel yaralarda veya korneal ülserlerde % 30 - 45 oranında iyile meyi artırır. Ancak penetran keratoplasti sonrası hastalara topikal olarak uygulanan EGF ve FGF ise etkisiz bulunmu ve bu sonuç kullanılan immunosupresif ilaçlar sayesinde etkilerinin körelmi olmasına ba lanmı tır (42).

Alkali yanıklarda EGF tedavisi epitel rejenerasyonunu hızlandırır ancak yo un enflamasyon ve hemidesmozom olu umunda defekt ve EGF'nin sıkı ba lantıya katkısı olmaması nedeniyle rekürren korneal erozyonu önleyici etkisi yoktur. EGF tedavisiyle olu an hiperplastik epitel, minör travma ile kolaylıkla kaybedilir. Fn ve steroidle kombinasyonu, terapötik lensle hemidesmozom olu umu için gereken sürenin sa lanması iyile meye yardımcı bulunmu tur (49). Yapılan bir çalı mada tav an korneasında alkali yanık sonrası ülserasyonu bloke etmede ve epitel kapanmasını hızlandırmada EGF, Fn, aprotinin ve galardin (matriks metalloproteinazın sentetik inhibitörü) kombinasyonunun oldukça etkili oldu u görülmü tür (42).

Lipokortin bir fosfolipaz A inhibitörüdür. Bu enzim aradığı asit, tromboksanlar, lökotrienler ve PG'lerin sentezi için gereklidir. EGF tarafından oluşturulan lipokortin inhibisyonu artmış PG sentezi ve iltihaplı enflamasyonla sonuçlanır. Öte yandan steroidler ise lipokortin sentezini artırır. Böylece PG sentezi ve enflamasyon azalır. EGF'nin yol açtığı siklooksijenaz aktivasyonu ve lökotrien sentezi hızlanması ile stromal lökosit infiltrasyonundaki artış steroidlerle engellenir. Bir çalışmada topikal kullanılan EGF'nin steroidlerle kombine kullanımı ile elde edilen iyileşme hızı, yalnız EGF ile olandan daha düşük olmasına karşın kontrol grubundaki iyileşme hızı çok daha hızlı bulunmuştur. (48).

3.5.1.2. Stromal iyileşme etkisi:

EGF; stromada timidin uptake ini artırır, fibroblastlarda mitoz ve migrasyonu aktive eder, aktive fibroblastların insizyon yerinde çoğalmasını sağlayacak kemotaksisten sorumludur.

Epitel ve stromal iyileşme olan etkilerin toplamı ile EGF gerginliği karşılayarak yara direncini artırır (48). Tav an deneylerinde EGF ile desteklenen stromal yaralarda ayrılmaya karşı yara direnci 54 ± 4 g/mm iken kontrol grubunda 3 ± 1 g/mm bulunmuştur. Bu bulgu daha sonra organ kültürleriyle de desteklenmiştir (30). Optimum etki $10 \mu\text{g/ml}$ dozda sağlanır. 0.001 mg/ml dozda etkisi yoktur ve 1 mg/ml dozda ise aksine gerginliği karşılayarak yara direncini azaltır (48).

3.5.1.3. Endotelial iyileşme etkisi:

EGF, endotel proliferasyonuna yol açar. 10 ng/ml dozda mitotik hızı % 70 oranında artırır (48). Tav an kornea endotel hücreleri in vivo ve in vitro olarak poligonal biçimlerini korurlar, hücre kültür ortamına EGF eklendiğinde hücrelerin iğsi biçim alarak fibroblastik görünüme kavuştuğları gösterilmiştir. Aynı etki 1 mikromol indometazin ile de sağlanmıştır, kombine kullanımlarında etki potansiyelize olmuştur, ortama katılan PGE_2 ile bu etkiler geri döndürülmüştür. Endotel hücrelerinin poligonal biçimlerinin korunmasında PGE_2 sorumlu tutulmuştur, hücrelerin iğsi biçimleri ise migrasyonla ilgili bulunmuştur (50). Topikal uygulamadan 2 saat sonra bile EGF'nin ön kamarada görülemediği endotel lezyonları için en iyi verimli yolunun intrakameral enjeksiyon olduğunu göstermiştir (48). Hücre düzeyinde EGF etkisi

görülmesi için yaklaşık 6 saat süre gerekir. Tav anlarda intrakameral enjekte edilen EGF 0.6 saatlik yarı ömürle hızla aköz humordan temizlenmi , proliferatif etki gözlenememi tir. Na-hyaluronate ile verildi inde ise proliferatif etki sa lanmı tir. Sonuçta EGF endotel hücreleri üzerindeki etkisini gösterecek kadar ön kamarada kalabildi inde etkili olabilir sonucuna varılmı tir (42).

3.5.1.4. EGF etkinli ini de i tiren farmakolojik parametreler:

EGF-reseptör kompleksi internalize olduktan sonra yıkıma u rar ve tekrar sentez edilir, 20 dakika yarı ömrü vardır. Hücrelerin DNA sentezi ve proliferasyonu için EGF ile yaklaşık 6 saat temasta olması gerekir. Metil selüloz içeren EGF göz damlasının % 90'ı 10 dakika içinde gözya ıyla kaybedilir. Geri kalanı ise konjonktival doku ile etkile ir. Sık damlatılması mikrotravmayı artırarak EGF'nin iyile tirici etkisini ortadan kaldırır. Kontakt lens veya epikeratofaki lensi yardımıyla anlamlı miktarda EGF (50 µg) epitel düzeyinde sa lanabilir ve yaklaşık 4 saatlik bir yarı ömür elde edilebilir (48).

EGF'nin benzalkonium-Cl, polyquad ve gentamisin pomad içinde bulunan propil paraben ile deaktive olması olasıdır (51). Böylece ikiye katlanmı epitel iyile me hızı, az sayıda komplikasyona sebep olu u, yara gerinli ine olan direnci belirgin biçimde artırması, endotel proliferasyonuna yol açması gibi avantajları ile korneal abrazyon, termal, asit, alkali yanıklar, hafif stromal tutulumlu septik ülser tedavisinde umut vermektedir. EGF bu özellikleriyle keratoplasti için kullanılacak donör korneada endotel hücre sayısını artırmak veya keratoplasti, katarakt ve travma ile hasarlanmı kornealarda endotel desteklenmesi için kullanılabilir görünmekte dir (48).

3.5.2. Fibroblast Growth Factor (FGF):

Epitel hücreleri, keratositler ve lakrimal bez tarafından salınan bu faktörün, epitel hücrelerde hem parakrin hem de otokrin etkileri vardır. Memelilerde dokuz farklı subtipi tariflenmi tir. FGF-2 olan ve -FGF diye isimlendirilen tip, kornea yara iyile mesinde önemli rol oynamaktadır. Kornea ve lens epitel hücrelerinde proliferatif yanıt do urur. Korneal fibroblastlarda DNA sentezini ve yara gerinli ine direnci artırır. Endotel hücrelerinde mitotik hızı % 20 oranında artırır (EGF ile kombine edildi inde % 100'e ula ır). PG sentezinde azalma yaratarak

enflamasyonu azaltır (42). Asidik FGF ve IL-1 'nin epitel ve endotel hücrelerinde bulunup stromal fibroblastlarda saptanmadı ı, bazik FGF' nin her üç tabaka hücrelerinde yer aldı ı immunohistokimyasal ç alı malarla gösterilmi tir (52).

3.5.3. Transforming Growth Factor (TGF-):

Fare embryosunda TGF- sentezi engellenerek yapılan deneylerde gözkapa ı geli im bozuklu u, mikroftalmi, yüzeyel opasiteler, hist olojik incelemelerde ise göz kapa ı ve ön segment disgenezisi, korneal enflamasyon ve skar olu umu, lense ait ve retinal defektler gözlenmi tir. TGF- , EGF gibi gözya nda bulunur, olası kaynak yine lakrimal bezlerdir. Ek olarak kornea epitel hücreleri TGF - mRNA ve proteinini içerirler. Bu otokrin mekanizmayla EGF ve TGF - üreten epitel hücrelerinin normal epitel siklusunu devam ettirdikleri dü ündürmektedir. Kuru gözün ve PED'nin gözya nda EGF, TGF- gibi growth faktör eksikli ine ba lı oldu u dü ünülmektedir. Endotel hasarında aköz humörde TGF- konsantrasyonunun arttı ı belirlenmi tir (42).

3.5.4. Transforming Growth Factor (TGF):

TGF- , 25-kDa a ırlı nda ve protein yapıda olup, tüm nükleer hücrelerden sekrete edilmektedir. Üç subtipinden, sa dece TGF- -2 kornea yara iyile mesinde rol almaktadır. Bunların dı nda IL-I- , IL-6, TNF- epitel göçünde indirekt olarak etkili olabilmektedirler. Yine kornea epitel hücrelerinden salınan fosfolipit growth faktör de kornea iyile mesinde rol almaktadır (53). Tav anlarda korneal insizyonlarda gerilmeye kar ı yara direncini arttırıcı etki gösterir. Bu etkisini insizyon yerinde kemotaksisle fibroblast sayısını arttırmak yoluyla gerçekleştirir. Ayrıca matris metalloproteinaz sentezini azaltması ve metallopro teinaz doku inhibitörü sentezini arttırması da olasıdır (42).

3.5.5. Mesodermal Growth Factor (MGF):

Kedi endotelial yara iyile mesini hızlandırdı ı gösterilmi tir (54). nsülin gerginli e kar ı yara direncini (EGF ye oranla daha dü ük) ar ttırır (30).

3.5.6. Keratosit Growth Factor (KGF):

Klasik parakrin etkiye sahip olan sitokinlerden olup, stroma keratositlerinden, lakrimal bezlerden ve hasar görmü epitel hücrelerinden sekrete edilmektedir. KGF, kornea epitel hücrelerinde proliferasyona neden olmakta iken aynı etkiyi, keratosit hücrelerinde göstermemektedir. Tav anlarda yapılan çalı malarda topikal uygulanan KGF'nin epitel yara iyile mesini hızlandırdı ı görülmü tür. Son yapılan çalı malarda, IL- ve IL- gibi sitokinlerin, keratositler tarafın dan KGF salınımında rol aldı ı kabul edilmektedir (55).

3.5.7. Hepatosit Growth Factor (HGF):

HGF, 90 k-Da a ırlı ında, protein yapıda bir faktördür. Vücutta fibroblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreleri, glia hücreleri, makrofajlar ve aktive T lenfositler tarafından üretilmektedir. Gözde ba lıca kayna ı stromal keratositlerdir. HGF'nin gözde temel hedefi kornea epitel hücreleri olup, reseptörleri yüksek oranda bulunmaktadır. Epitel hasarında artmı oranda salınmakta ve HGF'nin epitel hücre proliferasyonunu ve hücre göçünü arttırıcı etkisi bilinmektedir (55).

3.5.8. Platelet Derived Growth Factor (PDGF):

Dimerik yapıda 30-kDa a ırlı ında bir polipeptid zincirden olu maktadır. Tav anlarda epitel hücre göçünü arttırdı ı gösterilmi tir ancak, insan kornea epitelinde yara iyile mesine etkisi net olarak bilinmemektedir (53). nsan korneasında endotelyal iyile meyi hızlandırdı ı gösterilmi tir (56).

3.6. Alkali Yanıklar:

Alkali yanı a neden olan kimyasal maddeler; genellikle amonyum hidroksit (NH_4OH), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH), magnezyum hidroksit (MgOH_2) ve kalsiyum hidroksittir (CaOH_2) (57). Bunlardan magnezyum hidroksit havai fi eklerin, di erleri temizlik malzemelerinin yapısında bulunmaktadır (58). Kimyasal kazadan sonra gözde ekilenen hasarın iddeti; temasın olduğu bölgeye, etkime süresine, etkileyen kimyasal ajana ve penetrasyonun derecesine ba lıdır. Alkaliler artı yüklü bir katyon ve hidroksil gruplarının birle iminden oluşur. Hidroksil molekülü (OH), hücre membranlarının ya asitli bölümlerinde sabunla ma yaparak hücre yıkıl ması ve hücre ölümüne neden olur . Katyonlar alkalinin penetrasyonunda etkilidir. Bunlar, stromal kollajen ve

glikozaminoglikanların karboksil gruplarıyla (COOH) tepkimeye girer. Glikozaminoglikanların hidrasyonu, stromada bulanıklığa yol açar. Kollajen fibrillerin hidrasyonu da, bu yapılarda kalınlaşma ve kısalmaya neden olur (57). Penetrasyonun derecesine bağlı olarak, kornea ve konjonktiva epiteli, bazal membran, stroma keratositleri, stromadaki sinir uçları, endotelium, lens epiteli, konjonktiva, episklera, iris ve korpus siliare'nin vasküler epiteli hasara uğrayabilir (59). Bulbar konjonktivanın nekrozu sonucu, lökositlerin bölgeye infiltre olması, oküler yüzey enflamasyonunun sürmesine neden olur. Limbusta vasküler dokuların hasar görmesinden kaynaklanan iskemik nekroz ve buna bağlı olarak vasküler kollajenaz inhibitörlerinin azalması, kornea ülseri ve perforasyon olumunda etkilidir.

Alkali hasarın goblet hücre popülasyonu üzerine etkisi belirsizdir. Bazı çalışmalarda goblet hücre popülasyonunda azalma gözlenirken, bazılarında goblet hücre popülasyonunda beklenmedik şekilde artma saptanmıştır (60). Alkali hasardan sonra, genellikle stromada ülser gelişmektedir. Kalıcı epitelial defektler, gözyağı eksikliği, oküler enflamasyon, proteolitik enzimlerin salgılanması, antioksidan eksikliği, hipoestezi, kollajen sentezinin sekteye uğraması gibi pek çok faktör, stromal ülser olumunda etkilidir. Kimyasal yaralanmadan 12-24 saat sonra, bulbar ve tarsal konjonktivadaki hasarlı dokular ve üveadan kaynaklanan PMNL infiltrasyonu limbus ve hasarlı kornea bölgesinde olur (61). Yaralanmadan sonraki birinci günde PMNL'ler limbustaki damarlardan ayrılır ve yara çevresinde düşük konsantrasyonlarda olacak şekilde birikmeye başlar. Çalışmalarda yara bölgesine invaze olan lökositlerin kaynağının limbus olduğu tespit edilmiştir. Alkali yanık ile etkilenen kornea dokusu tarafından salınan kemotaktik ajanlar lökositlerin göçünü stimüle ederler (62). Bu hücreler epitel tarafından sentezlenen kemotaktik faktörlerle stromada birikir ve stromal adhezyon molekülü olan ICAM-1 ile infiltrasyonları kolaylaştırır. PMNL'ler çoğalma kabiliyeti olmayan kısa ömürlü farklılaşmış hücrelerdir. İnflamatuvar hücrelerden nötrofiller büyüme uyarıcı materyal, fibroblast uyarıcı trefon isimli madde taşımaktadır (63). Yara iyileşmesi esnasında infiltre hücreler etkilerini sitokinler üzerinden gösterir. Koruyucu fonksiyon görmek için ortamda bulunan inflamatuvar hücreler bazen hücre çoğalması ve skar formasyonunu tetikleyebilir. Epitelial hücrelerden, lökositlerden, keratositlerden normalde yara iyileşmesinde remodeling görevi gören fakat alerji salgılanmasında korneada erime ile sonuçlanan hasara yol açan matriks metalloproteinaz (MMP)

isimli proteinazlar sentezlenir. MMP'ler korneanın kendi hücreleri tarafından salgılanabilece i gibi, alkali hasar sonrası korneaya yerle en enflamatuvar hücreler (makrofajlar ve PMN lökositler) tarafından da üretilebilir. Bu enzimler stromal kollajenaz, jelatinaz ve kollajenazdır. Yanıktan sonra 8 saat içinde gözlenmeye başlayan MMP aktivitesi, 14-21. günler arasında maksimum düzeyde aktivite gösterir (60). MMP'ler epitel hücreleri ya da stromal keratositler tarafından sentezlenirse stromal ülserasyon progresyonu yavaş ve sınırlayıcıdır fakat bu enzimler lökosit ve PMNL tarafından sentezlenir ise korneanın perforasyonuna kadar gidebilen ülserasyonlar olur. Erken kimyasal hasar şiddetli ise 7. günde ikinci bir enflamasyon dalgası başlar ve korneal tamirin maksimum olduğu 14-21. günlere kadar devam eder. Epitel hücreleri defekti kapamaya çalışır, defekt yüzeyel ise epitelial iyileşme ile, derin ise stromal kollajen sentezi ile kapatılır. Yoğun enflamasyonla seyreden yanıklarda, akut fazda kornea vaskülarizasyonu başlanmaktadır. Yara çok büyük ise ve iyileşme prosesi uzarsa yaklaşık 3 gün içerisinde günde 1 mm kadar büyüyen ve yara iyileştikten sonrada sebat eden korneal vaskülarizasyon olur. Stromal enflamasyon, konjonktivadaki nekrotik enflamasyon odağından epitel defekti kapanana kadar devam eder. Epitel defektinde ki düzelmeyen persistan enflamasyon ile gecikmesi, PMNL hücrelerinden enzimatik degranülasyonun devamına, mononükleer sitokinler ile keratositlerden kollajenaz stimülasyonuna, hasardan sonraki 2-3. haftada korneal stromanın steril enzimatik sindirimine katkıda bulunur. Stromal ülserasyonu önlemek için PMNL ve monositleri stromadan uzak tutmak gerekmektedir. Kullanılan medikasyonlar ile ilk dalga olarak oluşan erken dönem enflamasyonun baskılanması sayesinde geç dönemde oluşan ikinci enflamasyon dalgası da engellenmektedir. Bu nedenle alkali yanıklarda sağlam epitel oluşturulması çok önemlidir. Sağlam epitel TGF β salgılaması ile stromal keratositlerden kollajenaz salınımını inhibe ederken, rejenerasyon olan epitel ise keratositlerden kollajenaz salınımını aktive eden sitokin salgılamaktadır (64). Yaralanmadan sonra enflamatuvar prosesin önemli bir görevi de vasküler endotel hücre adezyonudur. Lökosit tarafından enflamatuvar mediyatörlerin salınmasıyla yara bölgesindeki lökositlerden selektin sentezlenir. Bu olay lökositlerin kan damar endotel hücrelerine bağlanmasını sağlayan birtakım olayları başlatır (65).

Kimyasal kazaların medikal sağıtımında, 4 temel amaç vardır (60). Bunlar; kimyasal ajanın uzaklaştırılması, reepitelizasyonun sağlanması, keratositler aracılığıyla kollajen dokunun yeniden oluşturulması, yıkıcı özellikteki MMP'lerin

baskılanması ve enflamasyonun kontrolüdür. Alkali yanıkların akut fazındaki (ilk 1 hafta) en önemli amaç reepitelizasyonu sağlamaktır. Böylece stroma, korneada erimeye neden olan gözyaşı kaynaklı enzimlerden korunmuş olur. Bu engellendikten sonra enflamasyon ile mücadele ikinci amaçtır. Epitelizasyonu geciktiren şiddetli enflamasyon mevcudiyetinde topikal steroidler kullanılır (66). Bunlardan MMP enzimlerinin baskılanması da tedavide önemli bir yer tutmaktadır ve ara tırcıların ilgisini çekmiştir. MMP'lerin etkisi; askorbat, sitrat, tetrasiklinler, sentetik peptitler, Na-EDTA, asetilsistein gibi pek çok ilaç tarafından de i ik oranlarda inhibe edilir (60).

3.7. Amniyotik Membran (AM):

Memeli embriyosu ekstra embriyonik dokulardan köken alan içi sıvı dolu kese içinde bulunur. Miyadında hamilelikte fetal membranlar 2 ana tabakadan oluşmaktadır: Dışta koryon laeveye ait trofoblastik doku ve mezenşim yer alırken iç tarafta amniyon sıvısı ile temas eden 5 kattan oluşan amniyon membran yer alır. AM, epitel, aselüler bazal membran, kompakt kat, mezenşimal hücre katı ve süngersi katlardan oluşur. AM damarsız bir dokudur ve büyük miktarlarda kollajen içeren mezenşimin altında uzanan tabakaya sıkıca yapışmış olan ektodermden derivate tek katlı kolumnar hücre tabakasından oluşur. AM, amniyon mayisiyle temastadır (67). Epitelinin prezervasyondan sonra 70 güne kadar canlılığını sürdürdüğü bildirilmektedir (68). Dondurma sonrası AM epitel hücreleri, -70°C de 6 ay ile 1 yıl süreyle çok vakuollü görülür ve alttaki bazal membran ve mezenşime yapıyı kalmaktadır (69). Tabanda hücre çıkıntıları podosit ekinde bazal membranın içine uzanmaktadır. Bazal hücre çıkıntıları tonoflamanlarla bazal membrana hemidesmozomlarla yapışmıştır, bazal membran substansı kısmen amorf kısmen mikrofibrillerdir. Stoplazma çok sayıda pinositik veziküller, sisternal endoplazmik retikulum içeren bol sayıda organeller ve golgi aparatından oluşur. Nükleusta, nükleer membranın yaptığı çentiklerle çok düzensiz bir konfigürasyonu vardır. Nükleolus çok geniştir ve nükleoler aktiviteyi destekleyen homojenitededir. Bu epitel; örtü, sekretuar ve intraselüler ve transselüler transport için özellemiştir. Kompakt kat, retiküler fibrillerden oluşur, aselülerdir ve AM'nin gerilim kuvvetini sağlar. Amniyotik hücrelerin apikal yüzeyi çok sayıda mikrovillus içerir. Aralarında sıkı bağlantı noktaları olmamasına rağmen alttaki bazal membrana hemidesmozomlarla bağlıdır (67).

3.7.1. Amniyotik Membran kullanım alanları:

1900 lu yıllarda ülsere yüzeylede ve deri tranplantasyonlarında fetal membranlar kullanılmı tır. Amniyon membran ilk kez 1910'da Davis tarafından yanıklarda yanık yüzeyinin kapatılmasında biyolojik örtü olarak kullanılmı tır (71). Daha sonraları ise kronik bacak ülselerinde epitelizasyonu sa lamak, a rıyı azaltmak ve enfeksiyonları önlemek için kullanılmı tır (72). Jinekolojide yapay vajina olu turulmasında (73), pediatrik cerrahide omfalosel onarımında (74), karın -ba -pelvis cerrahi i lemlerinde ise doku adezyonunun önlenmesinde kullanılmı tır (75). Akci erlerden postoperatif hava kaçaklarının önlenmesinde AM'nin konvansiyonel fibrin yapı tırcılarından daha et kili oldu u bildirilmi tir. AM'nin otolaringolojik ba ve boyun cerrahisinde de kullanımı rapor edilmi tir (76).

Literatürde oküler yüzey hastalıkların tedavisinde AMT ba arılı bir ekilde kullanılmaktadır. Tarihsel olarak 1920' de Denig (77) yanıklı dok udan salgılanan zararlı ajanların sa lam konjonktivaya yayılımını engellemek için erken dönemde hasarlı konjonktivanın ekzisyonu, 1941'de Brown (78) akut yanık bölgesine tav an peritonunu geçici yama olarak örtülmesi, 1912-1944 yılları arasında hasarlı konjonktival yüzeyin çıkarılması ve o bölgeye oral mukozanın örtülmesi ve en son ise 1946-1947 yıllarında Sorsby (79) akut kimyasal yanıkları AMT ile tedavi etmi ve buna amniyoplasti demi tir. Akut dönemde olu an yanıklarda uygulanan AMT'deki amaç epitelizasyonu arttırmak, enflamasyonu azaltmak ve doku erimesindeki progresyonu azaltarak iddetli görme kaybı ve skarlaşma gibi komplikasyonları engellemektir (80).

3.7.2. Amniyon Membranın Etkileri

3.7.2.1. Epitelizasyonu kolayla tırıcı (ilerletici) etk i:

Salgıladı ı büyüme faktörlerinin (b FGF, HGF, TGF , EGF, KGF) etkisiyle reepitelizasyonu uyarır fakat uzun süre saklama ile bu faktörlerin miktarında azalma olur (81). Çevreden üzerine epitelyal göçü kolayla tıran iyi bir zemin olma özelli i vardır (82). Amniyotik bazal membran epitelyal hücrelerinin adezyonunu güçlendirir.(83). Epitelyal hücrelerin proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu kolayla tırır, orijinal epitelyal fenotipin devamına destek olur ve goblet hücrelerinin de diferansiyasyonunu kolayla tırır (84). AM enflamatuvar hücrelerin apoptopik ölümünü uyarırken, epitelyal hücrelerin apoptozisini önler, sınırların yeniden

büyümesini kolaylaştırır (85). AM, transplante edilmiş bazal membran özelliği taşıması ile epitel hücrelerinin adezyonunu, migrasyonunu ve diferansiyasyonunu destekler. Ayrıca bazal membranın epitelial progenitör hücrelerin büyümesi ve çoğalması için ideal zemindir ve sahip olduğu birçok kimyasal mediatörlerin etkisiyle yara iyileşmesine katkı sağlar (86). Bu özelliği AMT'nin neden stromal ülser ile birlikte olan PED'de epitelizasyonunu kolaylaştırıyorlarını açıklar. Hasarlı korneayı rekonstrüktör etmek için kültüre edilmiş korneal hücreler AM vasıtasıyla taşınabilir. AM bunun için uygun bir taşıyıcı vasıftır. (84). AM aynı zamanda konjonktiva epitelinin goblet olmayan hücrelerinin farklılaşmasını artırır. Bu veriler *invivo* AMT sonrası goblet hücre yoğunluğunda artışın nedenini açıklar. Bazı örneklerde amniyon örtüsü altında epitelizasyona izin veren bandaj kontakt lens gibi etki gösteren bir madde sağlandı ve bu da gösterilmiştir (69).

3.7.2.2. Fibrozis inhibitörü:

AM'nin antifibrotik etkisi ile ilgili birkaç faktör bulunmaktadır (87). Çerdiği matriks metalloprotein-3 ile proteaz aktivitesini inhibe eder (88). Antianjiyogenik ve antiinflamatuar etkileri amniyon membranın epitelial ve mezenkimal hücreleri tarafından salgılanan proteinlerle (interlökin-1 reseptör antagonisti, doku metalloproteinaz inhibitörü 1-2-3-4, interlökin-10, Trombospondin-1) olur (89). Yara iyileşmesinde fibroblastik aktivasyonundan sorumlu olan TGF- β sinyalinin azalmasını indüklediği gösterilmiştir (87). Böylece kornea myofibroblastlarının, limbal-konjonktiva-epitelial fibroblastlarının proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu önlemiş olur. Bu özellik nedeniyle AM, fototerapötik keratektomi ve fotorefraktif keratektomi sonrası oluşan korneal bulanıklığı da giderir (88). AM stromal matriksi IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8, INF γ , TNF, FGF, PDGF gibi oküler yüzey epitelinden köken alan inflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılar; bu baskılanma konjonktival skar oluşumu, neovaskülarizasyon ve fibrozisin önlenmesinde anahtar rol oynar (90). AM potansiyel adheziv yüzeyleri koruyan anatomik bir bariyer gibi de fonksiyon görebilir, AM'nin stroması normalde avaskülerdir ve yeni damar oluşumunu önlediğine inanılmaktadır (69).

3.7.3. Amniyon Membranın ana karakteristikleri:

AM, kolaylıkla elde edilebilir. Kullanımı için sınır yoktur. Doku, cerrahinin planlanması veya diğer seçeneklerin değerlendirilmesi için yeterli zamanı sağlayacak olan birkaç ay süresince -80°C de saklanabilir. Membran, HLA-A, HLA-B veya HLA-DR antijenleri içermediğinden transplantasyon sonrası immunolojik rejeksiyon ortaya çıkmaz (91). Dokunun postoperatif enfeksiyon riskini azaltan antimikrobiyal özelliklere sahip olduğuna inanılmaktadır (92).

3.7.4. Amniyon Membranın Hazırlanması:

Amniyon membranı sifiliz, HIV, hepatit B ve C testleri negatif gebelerden sekiyo sırasında steril olarak alınır. ki metod ile AM hazırlanabilir. Bu metodların birincisinde lameller bir akım altında plasenta içinde penisilin (50 µg/ml), neomisin (100µg/ml), amfoterisin B (2,5µg/ml) bulunan steril dengeli salin solüsyonuyla üzerindeki kan pıhtılarından ve fetal artıklarından temizlenmesi için yıkanır. Amniyon ve koryon basit künt diseksiyonla birbirinden ayrılır, koryon kısmı atılır (69). Amniyon membran daha sonra steril nitroselüloz kağıt üzerine epitelyal yüzeyi yukarıda, stromal matriks ise kağıt yüzeye yapılmış olacak şekilde yayılır. Daha sonra bu nitroselüloz kağıt kullanılacak alana göre birkaç cm'lik disklere veya kare parçalara bölünür. Düzenli epitelyal yüzeyde kalacak şekilde 8/0 ipek sütür atılır. Bu şekilde epitelyal yüzeyin hangi tarafta olduğunu karıştırılmamalıdır. Amniyon membran taze olarak kullanılabilen iğneleri dondurularak aylar sonra kullanılabilir. Gliserinle 1:1 oranında karıştırılmış kornea saklama solüsyonlarıyla dondurularak saklanabilir. -20 °C de bir aydan daha kısa süre, -80°C de ise bir aydan daha uzun süre saklanabilir. Membran kullanımdan hemen önce 10 dk.süreyle oda sıcaklığında ılıtılarak buz çözülmüştür.(93). Taze kullanımda allogreft rejeksiyonu dondurulmaya göre biraz daha sık meydana gelir (85). Dondurulma ve çözülme işlemlerinde epitel hücreleri ölür, sitokinler aktif olarak kalır ama miktarlarında azalma olur (81).

AM hazırlamak için kullanılan ikinci metodda plasenta önce serum fizyolojikle veya 100 mg dibekasin sülfat içeren 0.01 M fosfatla zenginleştirilmiş salin ile yıkandıktan sonra künt diseksiyonla amniyon membran koryondan ayrılır ve 0.01 M fosfatla zenginleştirilmiş salin içinde çözündürülmüş 0,5 -1-1,5 M dimetil sülfoksit içinde -80' C de dondurulur. Çözündürülmüşünde kullanmadan önce yine 3 kez salin ile yıkanır, 100 mg dibekasin sülfat içeren solüsyonda bekletilir (69).

3.7.5. Amniyon Membranın Oftalmolojide Kullanımı:

3.7.5.1. Kornea :

AM nin erken erimesini engellemek için korneaya tespit esnasında erimeyen sütürler kullanılır. Sütür alınırken AM 'ye çekinti olu turmaması için atılmı sütürlerin uçları gömülmeyebilir. Periferik kornea defektlerinde AM uygulanmasında görme aksının kapanmamasına özen gösterilmelidir. İyileşim sonrası hasta konforu için bandaj kontakt lens uygulanabilir. Defekt veya perforasyonda tıkaç amaçlı lezyonu doldurmak için kullanılırsa çok tabakalı yaklaşı m tercih edilmelidir. Tıkaçtan sonra üzerine perilymal korneaya uzanan tek kat AM örtülebilir.

3.7.5.2. Konjonktiva :

Absorbable sütürler kullanılmalıdır (8-0 vikril,10-0 vikril). Düşük gerilimli olmamasına özen gösterilmeli ve endikasyona göre geniş yanıklarda f ornikse kadar geniş AM örtülmelidir.

3.7.6. Amniyon membran transplantasyon teknikleri

3.7.6.1. Yüzey Greftleme (overlay greft) :

AM, etkilenmiş defektli kapsamak amacıyla konjonktival yüzeye ve kapak kenarına absorbable sütürlerle yerleştirilir.

3.7.6.2. İntrastromal Greftleme (Inlay greft) :

Stromal bir defekte tıkaç yapmak amacıyla kullanılır. Üzerine sonradan tek kat AM overlay tekniği ile örtülebilir.

Yüzeyel ve intrastromal greftleme kullanılma teknikleri mevcut oküler yüzey hastalıklarına göre değişmektedir (Tablo 1).

3.7.6.3. Patch tekniği :

Reepitelizasyon, AM altında gerçekleştirilir ve AM zamanla düşer. Bazal membran yüzeyi a a 1 olacak şekilde ekilde olan örtme yöntemidir böylece AM epiteli ile kornea epiteli birbirine temas eden yüzler olur.

3.7.6.4. Greft tekniği :

Reepitelizasyon, AM üzerinden gerçekleştirilir ve epitel AM ile birleşir. Kornea epiteli ile temas eden kısım AM stromasıdır. AM'nin bazal membranı hasarlı

konjonktiva bazal membranının yerine geçer. AM'nin bazal membranı kornea ve konjonktivaya benzeyecek şekilde migrasyonu ve oküler yüzey epiteline bağlanmayı arttırır. Tabakacı tabaka ile temas eden yüzey stroma, dışa bakan yüzey epitelidir. AM, korneal epitelin membran altından büyümesine izin verebilir (69). Rejenere olan epitel iyileşir.

AM'nin ilerleyici olarak oküler yüzeyden ayrılmasına neden olur. Rejenere epitel AM üzerinden olur. Bu ise AM korneal stroma ile birleşir ve 13 ay sonra bile ortamda AM parçaları bulunabilir (94).

PED, limbal kök hücre kaybı (LKHK) ile giden alkali yanıklar, SJS, oküler pemfigoid, keratokonjunktivitis sika, nörotrofik keratit gibi hastalıklar oküler yüzeyin uzamı enflamasyonu, kök hücre ve bazal membranın hasarı sonucu oluşan hastalıklardır ve keratoplasti için kötü adaylardır. LKHK ile giden alkali yanıklarda geniş yüzey yanıkları, ön segment iskemisi ve kapak deformiteleri, korneada damarlanma, konjonktivalizasyon olur ve konjonktivada skarlaşma ve sembleferon oluşumu engellenmelidir. AM epitelial yara iyileşmesini kolaylaştırır ve normal konjonktiva hücrelerinin düzenli bir şekilde büyümesine izin verir ayrıca enflamasyon olmayan bir perilimbal stromal mikro çevre oluşturarak limbal kök hücrelerini destekler. Bu nedenle tek başına kısmi LKHK ile beraber olan alkali yanıkların AMT ile tedavisinin yeterli olduğu düşünülmektedir (95).

Matriks metalloproteinazlar ve epitel ve nötrofillerden salgılanan proteazlarla perforeasyona kadar gidebilen defektler gözlenir. Kim ve ark iyileşme esnasında gözyaşındaki enflamatuvar mediyatörlerden korumak ve geçici yama amacıyla kullanılan AMT'den faydalı sonuçlar almışlardır (96).

AMT, tıbbi tedaviye cevapsız persistan epitel defektlerinin tedavisinde de başarıyla kullanılmaktadır (69). Konjonktiva tümörü, yanık, pemfigoidde eksize edilen konjonktiva alanını kapatmak için kullanılabilir (93). AMT, konjonktival yüzey iyileşme döneminde fibrozisi azaltır. Bu etki membranın stromal yüzünün içerdiği TGF- β 'yi inhibe eden matriks komponentlerine bağlanmıştır (87). Böylece limbal, korneal, konjonktival ve pterijyum fibroblastları inhibe olmaktadır. Bu yüzden rekürren pterijyum olgularında alternatif yöntemlerden birisidir. Pterijyum eksizyonu sırasında konjonktival otogreft iyi bir alternatif olarak kullanılabilir, bu dokuyla başarı oranının otolog konjonktival greft göre daha düşük, ancak skleranın açıkta bırakıldığı tekniğe göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir ayrıca diffuz konjonktival tutulumlu hastalıklı olanlarda veya ilerideki muhtemel bir glökom

filtrasyon cerrahisi geçirme olasılığı yüksek kişilerde bulbar konjonktivanın saklanması mümkün vermektedir (97). AM iddetli sembleferon ve rekürren pterijyum tedavisinde başarıyla kullanılmıdır. Fibrozisi azaltarak etki eder. Bu etki membranın stromal yüzünün içerdiği TGF- β 'yı inhibe eden matriks komponentlere başarılanmıştır (87). Böylece limbal, korneal, konjonktival ve pterijyum fibroblastları inhibe olmaktadır. Bu yüzden rekürren pterijyum olgularında alternatif yöntemlerden birisidir.

Sembleferonda bulbar ve palpebral konjonktivalar eksize edilerek amniyon membran ile yeni bir forniks oluşturulabilir. Geni konjonktival cerrahi eksizyon sırasında oluşan konjonktival defektlerin rekonstruksiyonunda da membranın başarıyla kullanımı bildirilmektedir (93). Kuru gözde punktumlar amniyon membran ile kapatılabilir (85). AM yüksek miyopide PRK sonrası korneal opasiteyle birlikte miyopik regresyonun tedavisi için başarıyla kullanılmıdır (98). Bu uygulama ile anterior korneal haze ve miyopik regresyon ile birlikte gösteren anterior iyileme cevabı engellenebilir.

Çalışmalarda ise excimer laser fotoablasyonda kullanılan AMT'nin tav anlarda erken postoperatif periyotta ablasyon bölgesindeki keratositlerin kaybı ve enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu azalttığı ve korneal yara iyilemesi sırasında ortaya çıkan korneal haze ve keratosit proliferasyonunu azalttığı da rapor edilmektedir (99). Deneysel bir çalışmada ise iddetli hasar gören tav an kornealarında AM transplantasyonu sonrası kornea vaskülarizasyonuna AM'nin etkisi araştırılmış ve oküler yüzey rekonstruksiyonunda prosedürün klinik olarak yararlı olabileceği bildirilmiştir (100).

Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada semptomatik büllöz keratopati ve kötü görme potansiyeli olan hastalarda kozmetik görünümü sağlamak, epitelyal iyileşmeyi ilerletmek, başarıyı azaltmak için AM'nin konjonktival fleblere iyi bir alternatif olabileceği bildirilmiştir (101).

Glokom filtrasyon cerrahisinden sonraki bleb kaçakların tamirinde prezerve AM uygulanması, sızıntının yönetiminde konjonktival ilerletmeye göre alternatif bir tedavi yöntemi olabileceği bildirilmektedir. Budenz ve arkadaşları, sızdıran glokom blebinin onarılmasında AM'yi başarıyla kullanmışlar ve alternatif bir tedavi yöntemi olarak önermişlerdir (102). Aynı çalışmanın yaptığı başarıyla bir çalışmada ise bleb onarımında AMT ile konjonktiva ilerletmesini karşılaştırmışlar AMT uygulanan tüm olgularda başarıyla sonuç alınmış ve AMT'nin bleb onarımında konjonktival

ilerletmeye iyi bir alternatif oldu u sonucuna varmı lardır (103). Ayrıca kontrolsüz glokomda mitomisin C ile birlikte subkonjunktival fibrozisi inhibe etmek için skleral fleb altına ba arıyla uygulanmı tır (104).

Tablo-1. Yüzeysel ve intrastromal greftleme tekniklerinin uygulandı ı durumlar.

Yüzeysel greftleme yöntemi

Korneal Endikasyonlar

- Persistan epitel defekt
- Kimyasal veya termal yanıkların akut dönemi
- Toksik epidermal nekroliz (TEN), Stevens Johnson Sendromu (SJS)
- PRK veya PTK sonrası skar olu umunu önleme
- Bant keratopatide kalsifik depozitlerin ekzizyonu sonrası
- Parsiyel ve total kök hücre kaybı

Konjunktival Endikasyonlar

- Sembleferon lizisi
- Konjunktivo elazis ekzizyonunundan sonra rekonstrüksiyon amaçlı
- Bulbar konjunktivada geni lezyon veya skarların ekzizyonunundan sonra rekonstrüksiyon amaçlı
- Retinal cerrahi sonrası ya fitıklı ma sendromu

Korneal ve Konjunktival Endikasyonlar

- Pterijyum
- Kornea ve konjunktivayı içeren limbal tümör

Kapak Endikasyonları

- Kimyasal veya termal yanıkların akut dönemi
- TEN, SJS

intrastromal greftleme yöntemi

Korneal Endikasyonlar

- Korneal ülserasyon
- Perforasyon
- Desmatosel

Skleral Endikasyonlar

- Skleral incelme
- ntraoküler yapıların prolapsusu olmadan olu mu skleral perforasyon

Kombine Yüzeysel ve intrastromal greftleme yöntemi

- Korneal ülserasyon ve perforasyon
 - Desmatosel
-
-

3.7.7. Amniyotik Membran Transplantasyonunun Komplikasyonları:

AMT'nin önemli bir komplikasyonu olmamakla birlikte birkaç problem ortaya çıkabilir. Cerrahi öncesi enflamasyon ve kuru göz hali iyi tedavi edilmezse ilk 2 haftada erime meydana gelebilir. A ır enflamasyonlu gözlerde (Stevens-Johnson sendromu, oküler skatrisyel pemfigoid gibi) yetersiz medikal tedavi yapılırsa kollajenazlara ba lı 2. haftadan sonra zar nekrozu meydana gelebilir. Total kornea limbal disfonksiyonu veya otoimmün hastalıklarda tek ba ına AM T etkili olmadı ı için, kombine giri ime ihtiyaç oldu u rapor edilmektedir (105).

E er membranın mezenkimal yüzeyi alıcı yüzeye yüzle mezse, AM oküler yüzeye yapı ık kalabilir. 3mm üzeri korneal perforasyonlar, total LKHK, kuru göz (106) hastalı ında AMT önerilmemektedir. Epitel defekti (ED) üzerine örtülmesi enfeksiyona yatkınlı ı artırır ayrıca S.aures, AM'ye adhezyon olu turabildi i için (107), AMT sonrası S. aures enfeksiyonu olu abilir. AM'nin antibakteriyel oldu u iddia edilmesine ra men AM üzerinde ki bakteriyi derin korneal katlara yaymamak için AMT sonrası antibiyotik kullanılmalıdır (108).

3.7.8. Amniyotik Membran Güvenirli i:

Öncelikle donör materyali temiz ve aseptik artlar altında alınmalı ve saklanmalıdır. Enfeksiyon ajanlarının geçi i insan organ ve dokularının transplantasyonu ile birliktelik gösteren risklerden biridir. Bu nedenle organ transplantasyonuna uygulanan güvenlik kriterleri AM transplantasyonu için de uygulanmalıdır. Potansiyel donörün saptanmasından sonra HIV, HBV, HCV ve Creutzfeldt-Jacob Virüsü alma riskleri ara tırılmalıdır. Tüm donörlerden serum örnekleri alınıp HIV-1 ve HIV-2, HbsAg, Anti-HCV açısından test edilmelidir. Ayrıca sifiliz testi de uygulanmalıdır. HIV-1 ve HIV-2, HCV, HBV veya sifilizle enfekte donörler donör listesinden çıkarılmalıdır. CMV ve toksoplazma testleri AM dahil ço u doku transplantasyonu için uygun de ildir.

3.8. Otolog Serum (OS):

Otolog serum (OS), kornea epitelinde defekt ile sonuçlanan bir takım hastalıkların tedavisinde içerisinde bulundurdu u ço alma, göç ve farklıla ma üzerinde etkisi olan büyüme faktörleri sayesinde faydalıdır. Literatürde kuru göz, PED, süperior limbik keratokonjonktivit ve greft versus host hastalı ına ba lı olu an oküler yüzey problemleri, Mooren ülseri, fazla filtre eden glokom bleblerinde,

pterijyum cerrahisi sonrası rekürrensi engellemek için ve bant keratopati tedavisinde kullanılmaktadır (109). Nörotrofik keratopati tedavisinde de otolog serumun içinde barındırdığı nörotrofik faktörler ile gerek epitelyal iyilemede gerekse korneal duyarlılıkta artmada yararlı olduğu gözlenmiştir (110). Gözyaı içerisinde migrasyon, farklılaşma ve çoğalma ile görevli büyüme faktörlerinin eksikliği ile giden kuru göz hastalığında, bu faktörlerin oküler yüzeydeki konsantrasyonlarının da eksilmesi sonucu PED gibi iddetli oküler yüzey problemleri oluşmakta ve son zamanlarda benzeri oküler yüzey problemlerinin tedavisinde OS kullanılmaktadır. Bu komponentler limbal ya da korneal epitel hücrelerinde trofik etki gösterir ve buna bağlı olarak epitelyal dinamikleri de etkiler (111). Rekürren korneal erozyon hastalığının tedavisinde de OS yararlı sonuçlar doğurmaktadır. Bir çalışmada konvansiyonel olarak suni gözyaı ile tedavi edilemeyen rekürren erozyon sendromu olan hastaların %87.5'inin OS ile tedavi edildiği bildirilmektedir (112). OS, korneal epitelyal stabiliteyi devam ettirmek için AMT veya LKHT sonrası da uygulanabilir (113).

Otolog serum içerisinde bulunan bazı komponentler, EGF, IGF-1, TGF- β , vitamin A, Fn, albumin, α 2 makroglobulin, PDGF ve substans-P gibi nöropeptitlerdir. TGF- β , epitelyal ve stromal iyilemede rol almakta ve serum konsantrasyonu gözyaıdan 3 kat fazla miktarda bulunmaktadır (114). Vitamin-A epitelin skuamoz metaplazisini engellemekte ve serum konsantrasyonu gözyaıdan daha fazla oranda bulunmaktadır (115). EGF serum konsantrasyonu ise gözyaıdaki miktarından önemsenmeyecek kadar düşük bir orandadır (116). α 2 makroglobulinin antipapillöz aktivitesi bulunurken (117), α 2 makroglobulinin antikollejenaz etkisi ön plandadır. Fn ise hücrel göç safhasında önemli rol oynayan molekül olarak serumda yerini almaktadır (118). α 2 makroglobulinin içerisinde bulunan substans-P ve IGF-1 ise korneal epitelinin göç ve adezyon safhasında rol oynarlar (119).

Otolog serum IgG, lizozim gibi faktörleri içermesi ile bakteriosidal ve bakteriostatik etki gösterir. Aynı zamanda konjonktiva epiteli üzerinden münin salgısını artırıcı etkisi bulunmaktadır (115). Gözyaı ile benzer pH ve osmolariteye sahiptir. OS uygulamasının etkisi geçicidir ve epitelyal yüzey üzerindeki etkisi, uygulanması sonlandırıldığında kaybolur (120). PED'de yararlı etkisi ikinci haftada oluşuyor olsada hastalardaki subjektif semptomlardaki düzelme ikinci gün başlamaktadır (121). OS hastanın kendi kanından elde edildiğinden dolayı alerjen değildir ve biyokimyasal yapısı ile viskozitesi gözyaı ile benzerlik gösterir (122). n

vitro çalı ma sonuçlarında epitel hücrelerinin morfoloji ve fonksiyonlarının suni gözya ları ile tedavi edilince OS'ye göre daha kötü oldu u gözlenmi tir.

Elde edilebilirli nin kolay olması, ucuz olması ve hastalar tarafından iyi tolere edilmesi avantajları olmasına ra men (122), anemi ile sonuçlanabilecek düzeyde sık aralıklarla kan alınması ve kan yoluyla geçen enfeksiyöz hastalıkla rını bula sıklı nda artı olması gibi olumsuz yanları da bulunmaktadır (120). Bazı hastalarda tedavi ile birlikte korneada immüoglobulin depozitleri olu tu u görülmü sede bunların zararsız oldu u ve iyi tolere edildi i tespit edilmi tir (123).

Antekübital venden kan 50 ml lik enjektör ile laminar akımın oldu u bir ortamda steril artlarda alınmalıdır. 100 cc lik kandan 30 -35 ml kadar serum elde edilmektedir. Alınan kandaki hücresel elemanların daha hızlı çökmesi için oda sıcaklı nda 2 saat kadar bekletildikten sonra 15 dakika 3000 r.p.m de santrifüj edilmeli ve elde edilen süpernatant 1:5 oranında BSS sıvısı salin solüsyonu ile karı tırılmalıdır. Böylece % 20 oranında OS elde edilmektedir. Elde edilen karı m 2 ml lik dozlar ile damlalıklara konularak her d amlalı n üzerine hasta adı, do um tarihi, hazırlanı tarihi not edilmelidir. deal olanı 4 °C de muhafaza edilen damlaların günlük kullanımıdır. Fakat fazla hazırlanmı OS damlalık içerisinde – 20°C de 3 ay kadar muhafaza edilebilir. Bu i lemlerin uygulanm ası için hastada herhangi bir kardiyovasküler, serebrovasküler hastalık ve anemi (Hb< 11 g/dl) olmamasına dikkat edilmelidir. OS hazırlanması konusunda, literatürde farklı yakla ımlar bulunmaktadır. Bazı otörler kanın alınır alınmaz, bazıları ise oda sıcaklı nda veya 22 C° de bekletildikten sonra santrifüj edilmesi gerekti ini savunmu lardır. Oda sıcaklı nda bekletme süresi konusunda da farklı görü ler olmasına ra men santrifüj öncesi kanın en az 2 saat bekletilmesi ile serumun epiteldeki ço alma ve farklıla ma yapıtıcı etkisinin maksimum oldu u yönünde görü ler bulunmaktadır (124).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada alkali yanık tedavisinde kullanılanımız AM, amniyon membran ekstresi (AE) ve insan serumunun tedavi edici özelliklerinin çeşitli parametreler yardımıyla kararlaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca tedaviler sonunda sağlam ve hasarlı kornealardan hazırlanan korneal lisizatlardaki EGF miktarlarını ölçerek bu değişimlerin iyileşme üzerindeki indirekt etkilerini de değerlendirmeye çalıştık.

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun izni ile Biyokimya Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı'nın katkıları ile gerçekleştirildi. Deneylerde sağlıklı 2500-3000 gr ağırlığında 24 adet Yeni Zelanda tavşanının her iki gözü kullanıldı. Çalışma süresince denekler, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (FÜTDAM) uygun besleme ortamlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Her gruba aynı hazırlık, anestezi ve cerrahi teknik uygulandı.

4.1. Anestezi Tekniği:

Deneklerin tümüne 33 mg/kg Ketamin Hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul-Türkiye) ve 6 mg/kg Ksilazin Hidroklorid (Rompun, Bayer, İstanbul-Türkiye) kombinasyonunun intramusküler uygulanmasıyla anestezi ve deneklerin cerrahi uygulanacak gözlerine % 0.04'lük Oksibuprokain Hidroklorid (Benoxinate, Alcon) damlatılarak analjezi sağlandı. Deneklerin hiçbirine solunum ve kan basıncı desteği sağlanmadı.

4.2. Gruplar:

Tavşanlar, her bir grupta 3 denek olacak şekilde randomize sekiz gruba ayrıldı. Her bir grupta yapılan işlemler her iki göze uygulandı.

Grup I: Epitel defekti yapılarak amniyon membran ekstresi ve topikal antibiyotik uygulanan grup.

Grup II: Epitel defekti yapılarak serum ve topikal antibiyotik uygulanan grup.

Grup III: Epitel defekti yapılarak amniyon membran transplantasyonu ve topikal antibiyotik uygulanan grup.

Grup IV: Epitel defekti yapılarak topikal antibiyotik uygulanan grup.

Grup V: Epitel defekti oluşturulmadan amniyon membran ekstresi ve topikal antibiyotik uygulanan grup.

Grup VI: Epitel defekti olu turulmadan serum ve topikal antibiyotik uygulanan grup.
Grup VII: Epitel defekti olu turulmadan amniyon membran transplantasyonu ve topikal antibiyotik uygulanan grup.
Grup VIII: Epitel defekti olu turulmadan topikal antibiyotik uygulanan grup.

4.3. Amniyotik Membran Ekstresinin hazırlanması:

Önceden sezeryan sırasında alınan amniyon membranı 2 dakika homojenizatör yardımıyla homojenizasyon ve 3 dakika sonikatör yardımıyla sonikasyon i lemlerinden geçirildi. Elde edilen homojinat 15,000 r.p.m de 10 dakika kadar santrifüj edildi. Süpernatant, buz üzerinde 8 Molar üre ile 1 saat kadar yıkandı ve içerisindeki EGF düzeyleri sandwich enzyme immunoassay (ELISA) tekni i ile EGF kiti (Biosource International, Camarillo, CA PHG0063) kullanılarak kit içeri ine uygun olarak çalı ıldı (126).

4.4. Serum Hazırlanması:

Amniyon membranı alınan hastanın onamı alındıktan sonra steril ko ullaarda enjektör ile kübital veninden 10 cc/gün olacak ekilde alınan kan steril tüpe konuldu. Oda sıcaklı nda iki saat bekletildikten sonra 4000 r.p.m de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilmi materyalden 2 cc serum alındıktan sonra üzerine 8 cc prezervan içermeyen suni gözya ı (hydroxypropyl methylcell ulose) ilave edilerek dilüe edildi ve elde edilen karı ım ba ka bir tüpte toplandı. Bu ekilde elde edilen % 20'lik serum derin dondurucuda -20 C°'de muhafaza edildi (126).

4.5. Cerrahi Teknik:

Alkali yanık olu turalacak denekler, anestezi uygulandıktan sonra ameliyat masasına alındı ve yüzü cerrahi masasına gelecek ekilde yan olarak yatırıldı. Göz çevresi % 10'luk batikonla silinerek ve üzeri steril örtü ile örtülerek steril ortam sa landı (ekil-1). Deneklerin gözüne uygun bleferostat yerle tirilmesinden sonra 8 mm çapında 1 normal sodyum hidroksit (1 N NaOH) ile emdirilmi filtre ka ıdı atu man eklinde 30 saniye kornea üzerinde bekletildikten sonra künt uçlu pamuk aplikatör yardımıyla epitel defekti olu turuldu. Alkali hasar ile epitel defektini olu turuldu u gün 0. gün olarak kabul edildi (127).

Grup III ve VII'te kullanılmak üzere mikrobiyolojik güvenli i kontrol edilmi ,

-80°C’de dimetil sülfoksitte saklanan sterilize AM buzu çözülüp yıkandı. Daha sonra 10x10 mm boyutlarındaki membran tüm korneayı kapsayacak şekilde, içerisindeki büyüme faktörlerinden yararlanmak için greft tekniği ile kornea üzerine yerleştirildi (ekil-2). Membran sütürasyonunda 10/0 naylon sütür kullanıldı.

Grup I ve V için Biyokimya bölümü tarafından önceden hazırlanmış ve -20 °C de saklanan amniyon membran ekstresi 4x1 topikal damla olarak cerrahiden sonra 7 gün süreyle uygulandı.

Grup II ve VI için amniyon membran alınan hastanın kanından hazırlanmış ve -20 °C de saklanan serum 4x1 topikal damla olarak cerrahiden sonra 7 gün süreyle uygulandı.

Tüm gruplara; % 0.3 Tobramycin (Tobradex®, Bilim) topikal damla 4x1 olacak şekilde uygulandı. Bu uygulamayı takiben 2, 6 ve 8. günlerde, epitel defektlerinin boyutunun ölçülmesi için kornea floresein kağıdı ile boyandıktan sonra klinik görünümünün foto rafları çekildi (ekil-3,4,5). İkinci ve altıncı gruplara implante edilen membranlar deney sonuna kadar rezorbe olmadıkları için bu gruplardaki epitel defekt ölçümü sadece sekizinci gün yapıldı. Elde edilen tüm veriler bilgisayar görüntüleme analizi için fundus kameraya bağlı bilgisayar ortamına aktarılarak foto raflar IMAGE net sistem ile değerlendirildi (Topcon, Itabashiku, Tokyo, Japan).

Elde edilen verilerin tüm gruplarda standart olabilmesi için, epitel defekt alanının tüm kornea alanına oranı (mm²) bilgisayar ortamında ölçülerek kaydedildi. Farklı günlerde yapılan ölçüm sonuçları her grup içinde ve gruplar arasında olacak şekilde karşılaştırıldı.

4.6. Histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için dokuların temini:

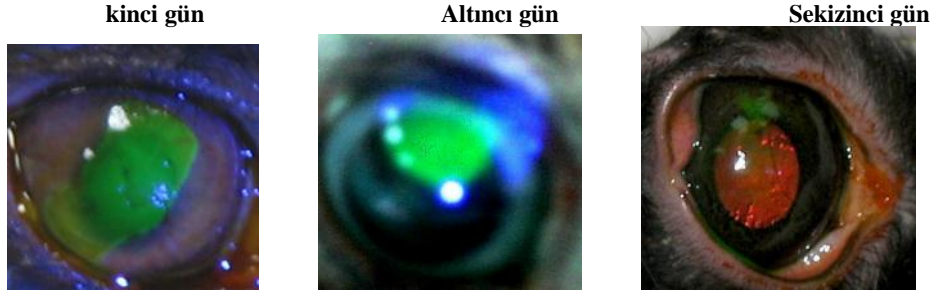
Her gruptaki deney süresi tamamlanan tav anlarına 8. gün sonunda intramüsküler 100 mg/kg tiopental sodyum enjeksiyonu sonrası her iki gözlerine enükleasyon yapıldı. Kornealar dikkatlice diseksiyonla alınarak alındı. Her grup için elde edilen korneaların herbiri iki eşit parçaya bölünerek parçalardan biri histopatolojik inceleme, diğeri ise biyokimyasal inceleme için ayrıldı.



ekil-1. Cerrahi i lem öncesi deneklerin steril bir ekilde hazırlanması



ekil-2. Üçüncü ve yedinci gruptaki deneklere uygulanan amniyon membran transplantasyonu



ekil-3. Amniyon membran ekstresi uygulanan grupta rastgele seçilen bir denekteki epitel defektinin floresein boya ile boyanması sonrası iki, altı ve sekizinci günlerdeki görünümü



ekil-4. Otolog serum uygulanan grupta rastgele seçilen bir denekteki epitel defektinin floresein boya ile boyanması sonrası iki, altı ve sekizinci günlerdeki görünümü



ekil-5. Herhangi bir tedavi uygulanmayan dördüncü grupta rastgele seçilen bir denekteki epitel defektinin floresein boya ile boyanması sonrası iki, altı ve sekizinci günlerdeki görünümü

4.7. Histopatolojik De erlendirme:

Histopatolojik incelemeye alınan gözler % 10'luk formalin solüsyonun da tesbit edildikten sonra rutin doku takibine alındı. Takip sonrası parafine gömülen doku örneklerinden 4 µm kalınlı ında kesitler alınarak Hemotoksilen -eosin (H-E) boyası ile boyandı. Kesitler Olympus marka ı ık mikroskopu ile randomize olarak incelendi. Aynı mikroskopun foto raf ataçmanı ile dokuların 400X ve 200X büyütmede foto rafları çekildi.

Elde edilen kesitlerde, herbir gruptaki santral korneal epithelyal kalınlı ı oküler mikrometre ile mikrometre (µm) cinsinden ölçüldü.

H-E ile boyanan kesitlerde, korneada damar sayısına ve PMNL infiltrasyon sayısına bakıldı. Bu sayılara bakılırken her kesitte, limbustan öteki limbusa do ru kornea alanındaki bütün damarlar ve PMNL'ler sayıldı. Gruplarda elde edilen damar ve PMNL sayısı istatistiksel olarak de erlendirildi (128).

4.8. Biyokimyasal De erlendirme:

Alınan tav an korneaları kısa süre içerisinde, aliminyum folyo ka ıda sarılarak, inceleme yapılançaya kadar -80 C° de bekletildi. Kornealar 1/10 (w/v) oranında fosfat buffer solüsyonu (PBS) içerisinde cam-cam homojenize edildi. Homojenize dokular 3000 r.p.m de 30 dk süreyle santrifüj edildi (129). Doku EGF düzeyleri sandwich enzyme immunassay (EL SA) tekni i ile EGF kiti (Biosource International, Camarillo, CA PHG0063) kullanılarak kit içeri ine uygun olarak çalı ıldı. Tespit edilen EGF, EGFR' ye ba lanan hücre içi sentezlenmi serbest EGF' yi yansıtmaktadır.

4.9. statistiksel Analiz:

Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları (\pm SD) alındı. Çalı manın istatistiki analizi SPSS for Windows (v er 10,0) paket programı ile her grubun kendi içinde birbirleriyle kar ıla tırılmalarında Mann -Whitney U testi kullanıldı. Yapılan çalı manın, her bir grup için anlamlı olup olmadı ı Kruskal Wallis testi ile analiz edildi. statistiksel de erlendirmede $p < 0.05$ de eri anlamlı olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Biyokimyasal De erlendirme

Biyokimyasal de erlendirme sonucunda AE içerisindeki EGF düzeyinin OS içerisindeki EGF düzeyinden daha yüksek oldu u gözlendi (Tablo -2).

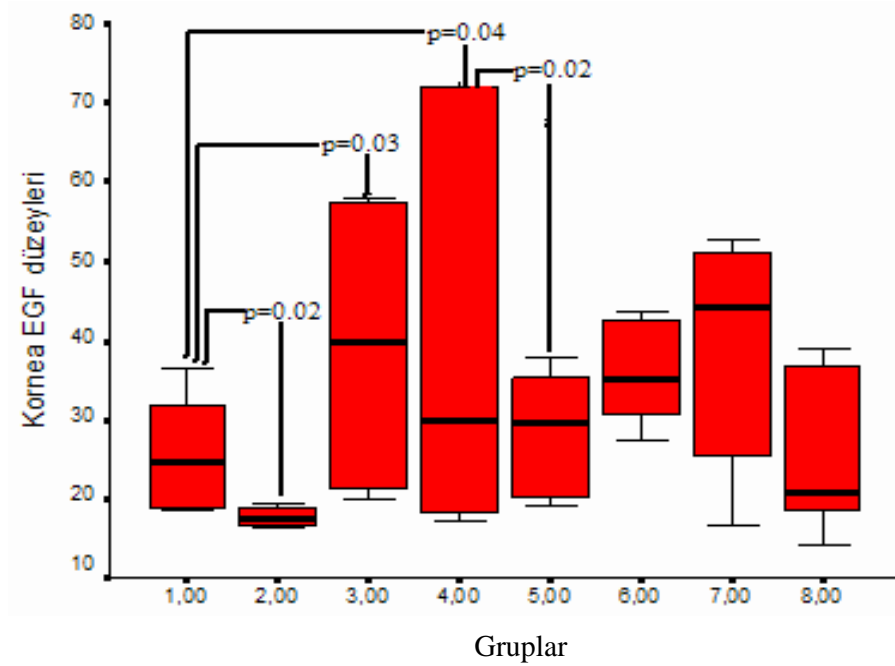
Tablo-2. Amniyon membran ekstresi ile serumdaki EGF (pg/ml) de erleri

Alınan rnek	EGF düzeyi
Ekstre	82.44
Serum	11.93

Gruplardaki kornea lizat EGF düzeyleri her grup için ayrı ayrı de erlendirilerek ortalama ve standart deviasyon (SD) de erleri tespit edildi (Tablo -3). ED’i olu turulmu gruplardaki EGF miktarları kendi aralarında kar ıla tırıldı ında EGF konsantrasyonunun en yüksek Grup 4’te, en dü k ise Grup 1’de oldu u ve birinci gruptaki bu de erin di er gruplara göre istatistiksel olarak d ük oldu u izlendi ($p<0.05$). ED olu turulan gruplardaki EGF düzeyleri aynı tedavi uygulanan fakat ED olu turulmayan gruplardaki EGF düzeyleri ile kar ıla tırıldı ında sadece Grup 4’ teki düzeyin Grup 8’deki düzeye göre anlamlı olarak yüksek oldu u gözlendi ($p<0.05$) (ekil-6). ED’i olu turulması ve AMT gibi oküler yüzeyde cerrahiye ba lı hasar olu turulan gruplardaki EGF düzeylerinin, herhangi bir cerrahi i lem uygulanmamı sa lam oküler yzeyeye sahip olan gruplardaki EGF düzeylerine göre anlamlı olarak fazla oldu u tespit edildi.

Tablo-3. Gruplardaki kornea lizat EGF düzeylerinin (pg/ml) ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

Gruplar	n	Minimum	Maksimum	Ortalama \pm SD
Grup 1	6	18.56	36.48	17.69 \pm 7.6
Grup 2	6	16.50	19.19	25.84 \pm 1.1
Grup 3	6	20.00	58.00	39.47 \pm 17.7
Grup 4	6	17.20	75.19	40.38 \pm 26.3
Grup 5	6	18.95	37.92	28.50 \pm 7.7
Grup 6	6	27.29	43.70	35.72 \pm 6.4
Grup 7	6	16.72	52.63	39.09 \pm 14.9
Grup 8	6	14.25	38.96	24.94 \pm 10.2



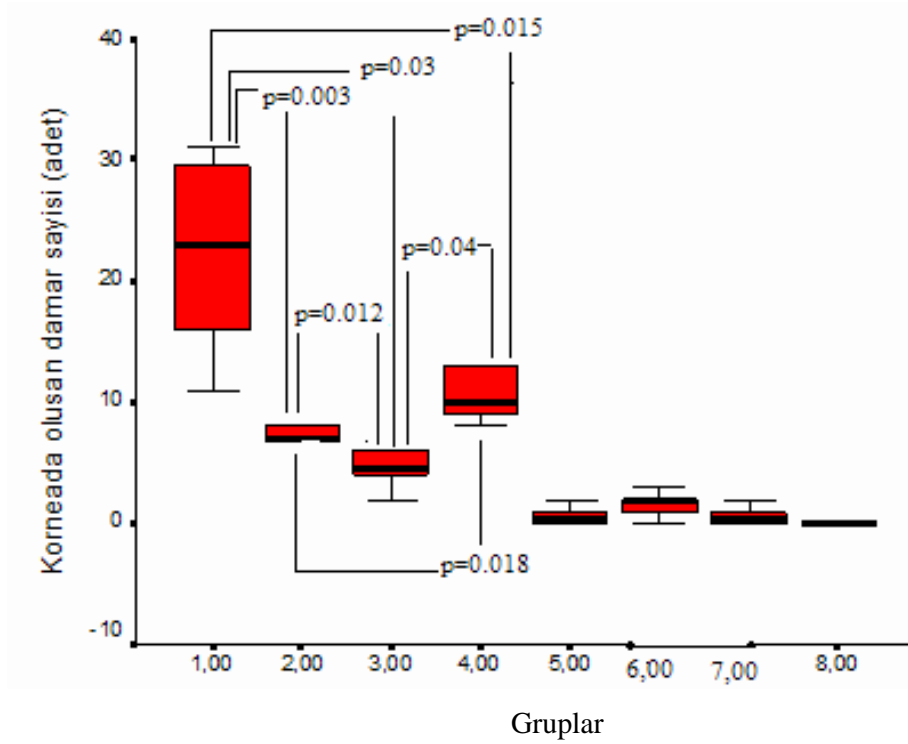
ekil-6. Gruplardaki EGF miktarlarının karşılaştırılması

5.2. Histopatolojik De erlendirme:

H-E boyamada korneada olu an neovaskularizasyon lar sayılarak ortalama ve SD de erleri tespit edildi (Tablo-4). ED olu turulduktan sonra tedavi verilen gruplardaki (Grup 1,2,3,4) ortalama damar sayıları, ED olu turulmadan tedavi verilen gruplardaki (Grup 5,6,7,8) damar sayılarına göre anlamlı yüksek oldu u ($p<0.05$) bulunmu tur, buda bize olu turdu umuz alkali yanık in korneada yeni damar olu umuna neden oldu unu göstermektedir. ED olu turulan gruplar içinde Grup 1'deki damar sayısının anlamlı olarak en yüksek, Grup 3'teki ise anlamlı olarak en dü ük oldu u izlenmektedir (ekil 7,8). Grup 4'teki ortalama damar sayısı Grup 2'deki damar sayısına göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$) (ekil-9). Bu sonuçlar bize alkali yanık sonrası olu an korneal damarlanmayı önlemede, AMT'nin çalı mamızda uyguladı ımız di er tedavi yöntemlerine göre daha etkili oldu unu göstermektedir.

Tablo-4. Neovaskularizasyon skor ortalaması, standart sapma, minimum ve maksimum de erleri

Gruplar	n	Minimum	Maksimum	Ortalama \pm SD
Grup 1	6	12.0	31.00	24.16 \pm 7.3
Grup 2	6	5.00	10.00	7.33 \pm 1.6
Grup 3	6	2.00	6.00	4.50 \pm 1.5
Grup 4	6	8.00	13.00	10.50 \pm 2.0
Grup 5	6	0.0	2.00	0.66 \pm 0.8
Grup 6	6	0.0	3.00	1.66 \pm 1.0
Grup 7	6	0.0	2.00	0.66 \pm 0.8
Grup 8	6	0.0	1.00	0.16 \pm 0.4

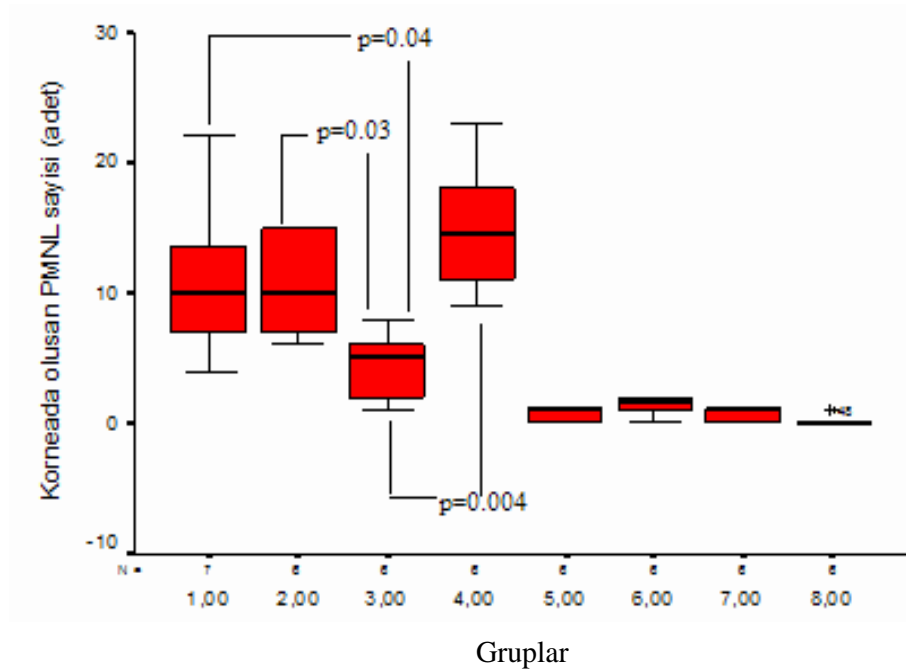


ekil-9. Neovaskülarizasyon sayıları (adet) ve gruplar arası karşılaştırılması

H-E boyamada korneada oluşan PMNL sayılarının ortalaması ve SD değerleri tespit edildi (Tablo-5). ED olmuş olan grupların hepsindeki (Grup 1,2,3,4) PMNL sayısının, ED olmuş olan gruplardaki (Grup 5,6,7,8) PMNL sayısına göre anlamlı yüksek olduğunu ($p < 0.05$) bulunmuştur. Bu da bize alkali yanık olmuş olan gruplarda belirgin bir enflamasyona neden olduğunu göstermektedir. ED olmuş olan grup içerisinde PMNL yoğunluğunun en fazla Grup 4'te en düşük ise Grup 3'te olduğunu izlendi (ekil 8,10). İlk dört grup içerisinde Grup 3'teki PMNL sayısı diğerlerine göre anlamlı olarak düşük izlenirken, Grup 1, 2 ve 4 birbirleriyle karşılaştırıldıklarında PMNL sayısı açısından aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.005$) (ekil-11). Bu sonuçlar bize alkali yanık sonrası oluşan enflamasyonu baskılamada, AMT'nin çalışmamızda uyguladığımız diğer tedavi yöntemlerine göre daha etkili olduğunu göstermektedir.

Tablo-5. PMNL skor ortalaması, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri

Gruplar	n	Minimum	Maksimum	Ortalama \pm SD
Grup 1	6	5.00	22.00	12.16 \pm 5.7
Grup 2	6	4.00	15.00	9.50 \pm 4.6
Grup 3	6	1.00	8.00	4.50 \pm 2.5
Grup 4	6	9.00	23.00	15.00 \pm 5.2
Grup 5	6	0.0	1.00	0.66 \pm 0.5
Grup 6	6	0.0	2.00	1.33 \pm 0.8
Grup 7	6	0.0	1.00	0.66 \pm 0.5
Grup 8	6	0.0	1.00	0.16 \pm 0.4

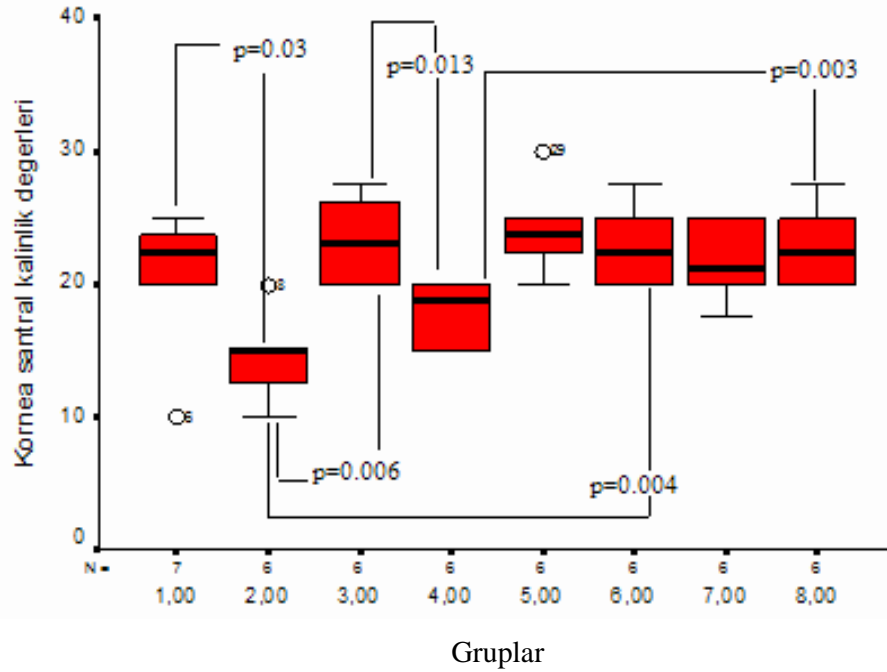


ekil-11. PMNL sayıları (adet) ve gruplar arası karşılaştırılması

H-E boyamada santral korneal epitelyal kalınlık (μm) ölçülerek ortalama ve SD de erleri tespit edildi (Tablo-6). ED olu turulan gruplar içerisinde, Grup 3 dı indaki di er gruplarda ED olu turulmayan gruplara göre kornea kalınlı nın daha dü ük oldu u gözlemlendi. ED olu turulduktan sonra tedavi verilen grupların (Grup 1,2,3,4) santral korneal epitel kalınlıkları kendi aralarında kar ıla tırıldı nda en yüksek ortalama de erin Grup 3'te, en dü ük de erin ise Grup 2'de oldu u gözlemlendi ($p<0.05$) (ekil-12). Grup 3'teki korneal kalınlı nın Grup 1'e göre, Grup 1'deki korneal kalınlı nın ise Grup 4'e göre yüksek oldu u fakat bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadı ı tespit edildi ($p=0.07$). ED olu turulmadan tedavi edilen son dört grup arasında ortalama kornea kalınlı ı açısından anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Verilen tedavilerin aynı olması baz alınarak ED olu turulan ilk dört grupla, olu turulmayan son dört gruptaki kornea kalınlık de erleri kar ıla tırıldı nda Grup 1,2 ve 4'te Grup 5, 6 ve 8'e göre ortalama kornea kalınlı nın dü ük oldu u izlenirken bu fark Grup 2-6 ve Grup 4-8 arasında anlamlı olarak bulundu ($p<0.05$) (ekil-13). Sonuç olarak alkali yanık olu turulan gruplarda, defekt olu turulması sonrası santal epitel kalınlı nın üçüncü grup dı nda defekt olu turulmamı gruplara göre daha ince oldu u bulunmu tur. Buda bize incelen kornea kalınlı nda artı a neden olan tedavi seçeneklerinden AMT uygulanmasının di er tedavi yöntemlerine göre daha etkili oldu unu göstermektedir.

Tablo-6. Santral korneal epitelyal kalınlık de erleri, standart sapma, minimum ve maksimum de erler

Gruplar	n	Minimum	Maksimum	Ortalama \pm SD
Grup 1	6	10.00	25.00	20.41 \pm 5.5
Grup 2	6	10.00	20.00	14.58 \pm 3.3
Grup 3	6	20.00	27.00	23.31 \pm 3.1
Grup 4	6	15.00	20.00	17.91 \pm 2.4
Grup 5	6	20.00	30.00	24.16 \pm 3.4
Grup 6	6	20.00	27.50	22.91 \pm 2.9
Grup 7	6	17.50	25.00	21.66 \pm 3.0
Grup 8	6	20.00	27.50	22.91 \pm 3.3

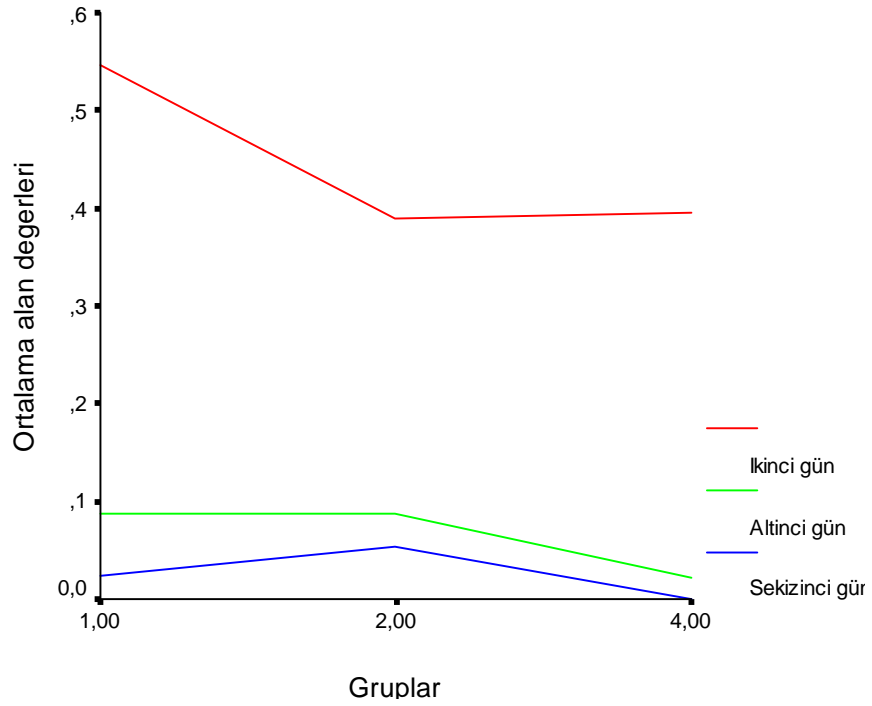


ekil 13. Santral korneal epitel kalınlıkları ve gruplar arası karılaştırılması

Grup 1, 2 ve 4'te defekt alanları 2,6 ve 8. günler ölçülerek ortalama ve SD değerleri tespit edildi (Tablo-7). Bu gruplarda tedavi ile 8. gündeki ortalama alan değerlerinin 2. gündeki değerlere göre düşük olduğu ve hepsinde reepitelizasyon olduğu izlendi. Grup 1'de sadece 8. gündeki ortalama alan değerleri, 2. gündeki değerlere göre anlamlı olarak daha küçük olduğu izlendi. Grup 2'de reepitelizasyon hızı açısından günler arasında anlamlı fark bulunmazken Grup 4'te ise reepitelizasyonun günler arasında anlamlı olarak hızlı olduğu ve sekizinci günde ED'nin tamamen kapandığı izlendi. 8. gün ölçülen değerler karşılaştırıldığında Grup 3'teki defekt çapının Grup 2 ve Grup 1'e göre anlamlı olarak daha büyük olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$) (ekil-14). Grup 2 ve Grup 1 arasında farklı günlerde ölçülen ortalama defekt alanları karşılaştırıldığında iyileme hızları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Bu sonuçlar bize herhangi bir tedavi uygulanmamış dördüncü grupta defektteki iyilemenin, tedavi uygulanmış gruplara göre daha hızlı olduğunu ve tedavi uygulanan gruplar içerisinde ise epitelizasyonun tekrar sağlanmasında AMT'nin çalışmamızda uyguladığımız diğer tedavi yöntemlerine göre daha etkisiz olduğunu göstermektedir.

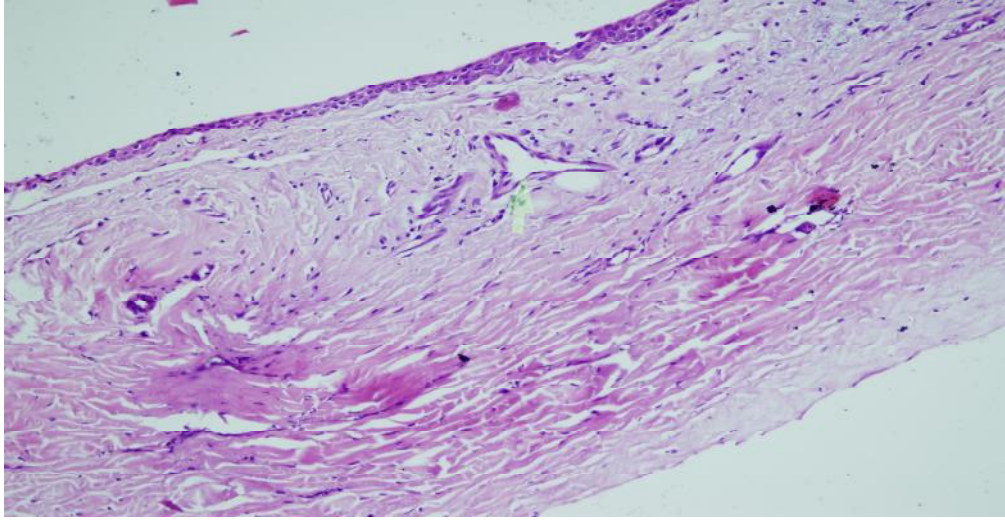
Tablo-7. Gruplarda epitelyal defekt ortalama alan de erlerinin 2, 6 ve 8. günlerdeki de erleri

Gruplar	2. gün ortalama alan \pm SD	6 .gün ortalama alan \pm SD	8. gün ortalama alan \pm SD
1	0.54 \pm 0,2	0.08 \pm 0,0	0.02 \pm 0,0
2	0.39 \pm 0.1	0.08 \pm 0.0	0.05 \pm 0.0
3	-	-	0.12 \pm 0.0
4	0.39 \pm 0.2	0.02 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

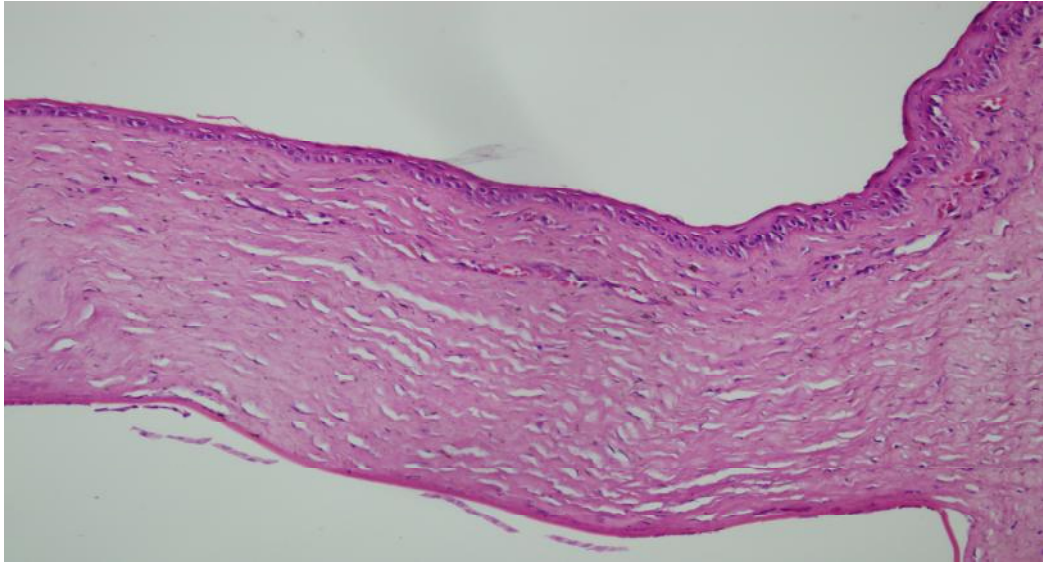


ekil 14. İkinci, altı ve sekizinci günlerde Grup 1, 2 ve 4'teki ortalama alan de erleri (mm²)

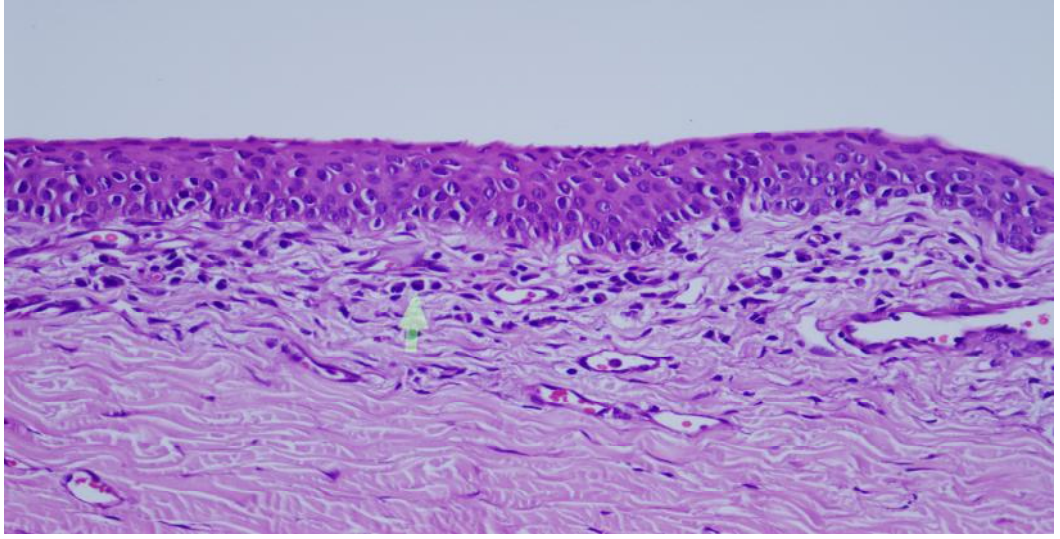
Çalışmamızda kullanılan medikal tedaviler ile uygulanan cerrahi i lemlere ba lı olarak hiçbir grupta deney süresince herhangi bir topikal veya sistemik yan etki olu mamı tır.



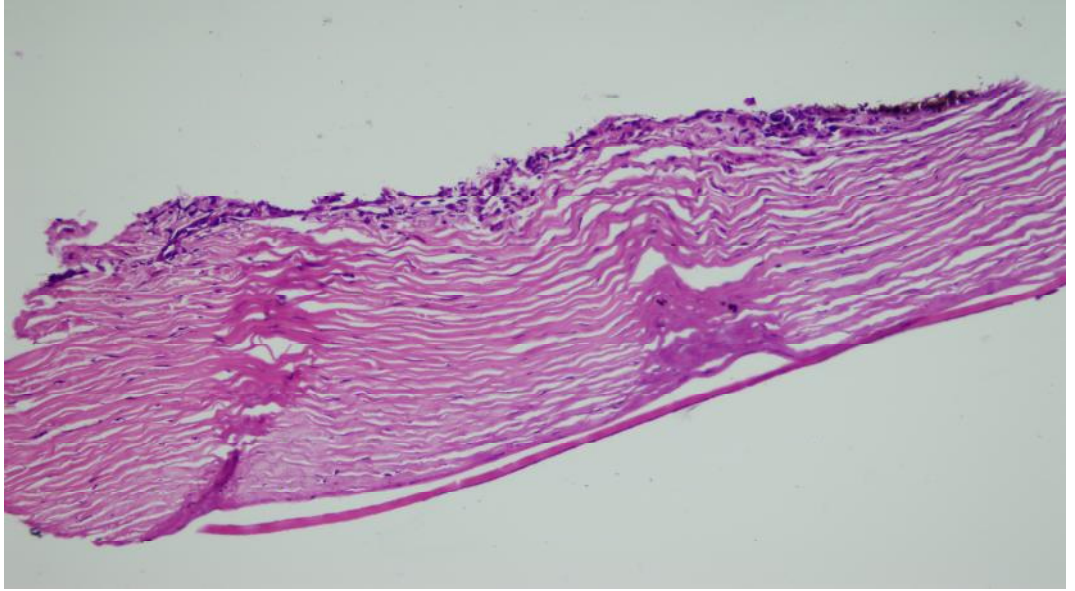
ekil-7. Birinci gruba ait korneada, çok sayıda olu an damarlanma (kalın ok) görülmektedir (HEX200).



ekil-8. Üçüncü gruba ait korneada az sayıda olu an damarlanma ve P MNL infiltrasyonu görülmektedir (HEX200).



ekil-10. Dördüncü gruba ait korneada yoğun PMNL infiltrasyonu (kalın ok) (HEX400).



ekil-12. İkinci gruptaki santral kornea görüntüsü. Epitelin tam olarak rejenerasyon olmadığı ve ince olduğu görülmektedir (HEX200).

6. TARTI MA

Kornea yalnız güçlü bir mekanik bariyer olmakla kalmaz aynı zamanda optik bir sistem olan gözün en önemli refraktif kısmını oluşturur. Kornea bu özelliğini epitelin düzenli dizilimine, düzgün gözyaşı tabakasına, içinden geçen ışınların da ılsmasına izin vermeyen stroma yapısına ve stromanın bu özelliğini korumasında en büyük yardımcı olan endotel hücrelerine borçludur. Korneanın transparan ve avasküler formunu ve bariyer etkisini sürdürebilmesi için hücre çoğalması, farklılaşma, motilite ve apoptozis arasında bir denge olmalıdır. Bu koruyucu fonksiyon komşu epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantı noktalarının yüksek direnci ile olur (130). Sıkı bağlantıların bütünlüğü epitelyal bariyer fonksiyonu ve kornea effaflılığı için gereklidir (131). Kornea epitel kök hücreleri kornea ve konjonktiva birleşim yeri olan limbusda yer alır (132). Limbal kök hücre harabiyeti meydana geldiğinde rekürren veya kalıcı epitel defekti olur (60). Limbal kök hücre eksikliği ile korneaya olan konjonktival epitelyal hücre invazyonu, yüzeysel yeniden damarlanma, korneal bazal membran harabiyeti ve kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu olur. Limbal kök hücre harabiyeti 2 kategoride değerlendirilebilir. Birinci kategorideki durumlar limbal kök hücrelerinin tamamen kaybı ile karakterizedir. Bunlar; kimyasal ve termal yaralanmalar, Steven-Johnson sendromu, limbal bölgeye uygulanan çok sayıda cerrahi müdahale veya kriyoterapi, kontak lens kullanımı ve iddetli mikrobik infeksiyonlar nedeni ile meydana gelen kök hücre kayıplarıdır. MMP' lar ile epitel ve nötrofillerden salgılanan proteazlarla perforasyona kadar gidebilen defektler gözlenir. Bu kategorideki hasta grubunun kornea yüzeyinin tekrar kazanılması için limbal otograft veya allograft uygulanması gerekir. İkinci kategoride ise direkt olarak kök hücre harabiyeti yoktur ancak kök hücrelerini destekleyen stroma harabiyeti vardır. Bu grupta yer alan hastalıklar; aniridi, multiplendokrin bozukluk, limbitis, periferal ülseratif ve inflamatuvar keratit, nörotropik ve iskemik keratit, pterijyum ve psödoterijyumdur. Limbal kök hücre harabiyeti ile seyreden korneal hastalıklar birçok klinik problemlere neden olur. Hastalar çok iddetli fotofobiden şikayetçidirler ve görmeleri azalmıştır.

Alkali yanıklar ile olan yaralanmalara günlük yaşamda sık rastlanılmaktadır ve yaralanmadan yaklaşık 30 dakika sonra sahaya göç eden nötrofillerin ağırlıklı olarak salgıladıkları birtakım enzim ve kemotaktik maddeler olu-
caak hasardan sorumludur.

Alkali yanık sonrası konjonktivada skarlaşma ve sembleferon oluşumu engellenmelidir.

Alkali yanık tedavisinde ilk yapılması gereken oküler yüzeyin bol su ile yıkanması ile partiküllerin mekanik olarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Daha sonra uygulanması gereken tedavi yaklaşık 2-3 haftalık süre içinde ortaya çıkabilecek komplikasyonları önlemeye yöneliktir. Bu klasik tedaviler şöyle sıralanabilir.

1. Epitelyal düzelmeyi sağlamak

- a. Suni göz yaşı
- b. Kontak lensler

2. Ülser oluşumunu minimize etmek için keratosit kollajen üretimini desteklemek

- a. Kollajenaz inhibitörleri
- b. Vitamin C ve sitrat

3. Enflamasyonun kontrolü

- a. Topikal steroidler
- b. Progestasyonel steroidler
- c. Non steroid antiinflamatuvar ilaçlar

Korneal alkali yanık tedavisinde kullanılan birçok tedavi modalitesi, farklı oranlarda GF konsantrasyonları içermekte olduğundan dolayı her birinin içerdiği EGF konsantrasyonunda farklıdır. Alkali yanıklardan sonra iyileşme fazlarında GF'lerin rolü büyüktür. GF'ler birçok hücre tarafından sentezlenen hücre çoğalması, göçü ve sağ kalımını aktive ve inhibe edebilen çözünebilen yapıda peptidlerdir (133). Etkilerini, otokrin, jukstakrin ve büyük çoğunlukla parakrin mekanizmalarla gösterirler (134). Aköz hümeördeki mevcut birtakım GF'lerde ön kamara ve korneanın hemoastazını sağlar (135). GF'ler spesifik reseptörlerine bağlandıktan sonra reseptör dimerize olur ve tirozin rezidüleri otofosforile olur. Fosforilize tirozin rezidüleri sitoplazmik sinyal proteinleri için hedef bölgedir. Fosfolipaz C, fosfotidilinositol 3-kinaz (PI 3-kinaz), GTP-az'ı içeren sinyal proteinleri hedef hücrelere çoğalma ve diferansiyasyon için bilgi aktarır (136). Epitelyal iyileşme esnasında yaralanma bölgesinde bariyer fonksiyonun düzenlenmesi hasardan saatler sonra salgılanan GF'ler tarafından sağlanır. Yaralanmadan dakikalar sonra, interlökin 1 (IL-1) ve TNF- α gibi sitokinlerin hasarlı epitelden sekresyonuna ilk cevap olarak stromal hücre apoptozu gerçekleşir. IL-1 yara iyileşmesinde anahtar rol oynayarak

epitel ve stromadan GF artımı salınımını tetikler (137). Yaralanmadan 7 gün sonra kadar keratositlerden KGF ve HGF salınımı devam eder. Epitel bazal membranından aynı zamanda PDGF salınımı fibroblastlarda kemotaksis etkisi yapar ve KGF ve HGF salınımını upregüle eder (138) (Tablo-8).

Tablo-8 Epitelyal hasar sonrası olu an iyile me kaskadı

1. Epitelyal hasar
2. Sitokin salınımı (IL-1, PDGF)
3. Keratosit apoptozisi ve nekrozu
4. Lakrimal bez/ büyüme faktör cevabı, erken epitelyal iyile me
5. Keratosit ço alması ve göçü
6. Miyofibroblast/ keratosit sitokin üretimi
(HGF, KGF, TGF-)
7. Miyofibroblast ekstraselüler matriks üretimi
8. Enflamatuvar hücre infiltrasyonu, monositlerin fibroblastlara dönü ümü
9. Stromal remodeling (Kollojenaz, metalloproteinaz)
10. Epitelyal yüzey kapanması, hiperplazi
11. Miyofibroblast apoptozisi ve nekrozu
12. Enflamatuvar hücre apoptozisi ve nekrozu
13. Keratositlerin normal durumuna dönmesi

EGF' nin reseptörüne olan afinitesi, reseptörün lokalizasyonuna göre de i mektedir. Yüksek-dü ük afiniteli reseptörler özellikle limbal bölge korneal epitel hücrelerinde ve endotel hücrelerinde bulunurken , (139) dü ük afiniteli reseptörler stromal keratositlerde mevcuttur. Antikor kullanılarak yapılan çalı malarda epitelyal hücreler ve epitelin yüzeyel tabakalarında terminal farklı ma olu tukça, EGFR seviyesinin azaldı ı bulunmu tur. Rat korneasında EGFR' nin limbal kök hücrelerinde yo un olarak bulundu u ve kök hücrelerin terminal diferansiyasyonu ile EGFR miktarının azaldı ı görülmü tür. EGFR intakt limbal epitelin bazal tabakasında ve membranöz lokalizasyondadır. EGFR ile yapılmı çalı malarda EGFR' nin migrasyon fazında aktive oldu u, yaralanmadan 1 saat sonra

EGFR' nin membranöz lokalizasyonunu kaybetti i ve internalize olarak hasarlı epitel hücrelerinin tüm katlarında lokalize oldu u izlenmi tir. EGFR kök hücrelerde yo un lokalizasyonu ile bu hücrelerin ço alması ve göç a amasında aktif rol oynar (140) ve yaralanmadan saatler sonra bile yüksek yo unlukta bulunur (141). Sa lam kornea epitelinde çok dü ük miktarlarda fosforilize EGFR düzeyleri bulunur. Bir çalı mada korneal epitel defekti olu turulduktan 30 dk sonra EGFR düzeylerinin defekt olu turulmamı gruba göre 4 kat daha fazla oldu u ve ekzojen EGF ilavesi yapılanlarda bu oranın 10 kat fazla oldu u izlenmi tir . Bu da EGFR' nin endojen GF' lerle aktive edildi ini ve yaralanmadan 30 dk - 2 saat sonraki zamanda fosforilize EGFR nin pik yaptı ı gösterilmi tir. Çalı malarda EGF mRNA'nın tüm korneal tabakalarında bulundu u (139), lakrimal bezden 0.7-9.7 ng/ ml fizyolojik dozda sentezlenen EGF konsantrasyonunun korneal epitel yaplanması için gerekli oldu u bulunmu tur (116). EGF yaralanma bölgesinde bazal ve suprabazal hücrelerin yüzeyinde iken, yara kenarının uza nda bazal hücrelere ba lanmaktadır. Gözya mın bir komponenti olan EGF, korneal epitel ve endotel hücrelerinde ço almaya neden olur (142). Bir çalı mada 4 aylık tav an kornea epitel, keratosit ve endotel hücrelerinde invitro olarak EGF nin ço altıcı etkisine bakıldı . Epitel hücrelerinde bu etkinin 3. günde 1 ng/mililitre dozda % 199, 4. günde 10 ng/ml dozda % 211 oranında ve endotel hücrelerinde ise 4. günde % 193 oldu u bulunmu tur (53). Bir çalı mada hasarlı korneaya topikal EGF uygulanmasından 5 dk sonra EGF' nin membranöz lokalizasyonda oldu u, 15. dakika da ise reseptörler ile agrege olduktan sonra, 30. dk içinde internalize oldu u gözlenmi . Ba ka bir çalı mada tav anlarda 7.5 mm çapında anterior keratektomi uygulanmasından önce ile uygulandıktan hemen sonra mikropipet ile alınan gözya larında EL SA yöntemi ile EGF konsantrasyonları ölçülmü . Bazal EGF konsantrasyonu 600 pg/ml olarak ölçülürken, i lemeden hemen sonra ölçülen EGF konsantrasyonunun 1600 pg/ml oldu u tespit edilmi (129). Tav anlarda 9 mm çapında ED olu turulan bir çalı mada h-EGF'nin 1-100 mg/l arasında de i en dozları ile SF damlatılan gruplardaki reepitelizasyon düzeyleri kar ıla tırıldı . Tedaviden 9 gün sonra EGF ile tedavi edilen gözlerde ki defekte tam kat iyile me olurken kontrol grubunda ise defekte düzelme izlenmemi . 10 mg/ saat konsantrasyonlarda uygulanan h-EGF defekt iyile mesinde optimal doz iken, 100 mg/ saatte konsantrasyonlarda uygulanan dozun ise etkisiz oldu u tespit edilmi (143).

Çalı malarda EGF ile tedavi edilmi k orneal yaralanmalarda, EGF dozu ile PI 3-kinaz aktivitesinin korele oldu u görülmü tür (144). EGF ile PI 3-kinaz aktivitesi arasındaki korelasyonu tespit etmek amacıyla yapılmı bir çalı mada tav anların her iki gözünde alkali yanık olu turularak, bir göz 2 µg EGF ile tedavi edilirken tedavi verilmeyen di er göz kontrol grubu olarak alınmı . Kontrol grubu olan kornealardaki epitel defektin % 75' inin 48. saatte, tamamının ise 72. saatte kapandı ı izlenmi ken, EGF ile tedavi edilen gözlerde defektin tamamı nın 48. saatte kapanmı oldu u izlenmi . Kontrol gözlerde ise minimal bir PI 3-kinaz aktivitesi oldu u gözlenirken tedavi grubunda PI 3-kinaz aktivitesin 12. saatte de arttı ı, 36. saatte pik yaptı ı ve 48. saatte de erlerinde azalma oldu u izlenmi . Kontrol grubundaki minimal PI 3-kinaz aktivitesinin ise korneal yaralanma sonrası lakrimal bez kaynaklı endojen EGF etkisi ile oldu u ve fazla oranda PI 3-kinaz aktivitesini stimüle etmek için ekzojen EGF' ye ihtiyaç oldu u speküle edilmi tir (145). Yapılmı bir çalı mada EGF' nin kültüre korneal epitel hücrelerindeki mitojenik etkisinin epitelyal hücrelere Ca⁺² giri ini artırarak sa ladı ı ve EGF' nin 5 ng/ml konsantrasyondaki dozunun maksimum giri sa ladı ı tespit edilmi ken (146) bir ba ka çalı mada in vivo olarak 10 ve 20 µg/ml⁻¹ konsantrasyonlardaki EGF' nin kor neal yaralanmalarda iyile me oranını artırdı ı izlenmi tir (46).

50 mikrometre derinlikte, 3 mm geni likte excimer lazer uygulanmı rat korneaları ile yapılmı bir çalı mada bazal EGF miktarının 62 copies/ hücre, lazerden 1,5 gün sonra 79 copies/ hücre, 21. günde 73 copies/ hücre oldu u, i lemden ancak 3 ay sonra bazal EGF düzeylerine ula ıldı ı tespit edilmi tir. EGFR düzeylerinde ise bazal EGFR miktarının 9 copies/ hücre, 7. günde 571 copies/ hücre, 21. günde 20 copies/ hücre oldu u, 3. ayda ise bazal EGFR' nin 6 katı kadar oldu u ve EGFR' nin bazal, suprabazal seviyelerde yo unla mı oldu u gözlenmi . Bu çalı mada EGFR' ye ba lanan EGF düzeyleri ölçülmü oldu undan EGFR düzeylerindeki artı a paralel olarak ölçülen EGF düzeyleride artmı oldu u ve ligand -reseptör düzeyi arasında bir korelasyon oldu u sonucuna varılmı (147).

Bir çalı mada; pterijyum cerrahisinden sonra AMT uygulanan 36 hastanın 40 gözü iki gruba ayrılarak bir gruba topikal olarak m -EGF, di er gruba ise topikal BSS uygulanarak kornea ve konjonktivadaki epitelin iyile me hızları kar ıla tırılmı . m -EGF ile tedavi edilen grupta kornea ve konjonktivadaki epitel iyile me hızlarının

kontrol grubuna göre anlamlı daha hızlı oldu u tespit edilmi . Çalı ma sonucu m - EGF' nin oküler yüzey epitelinde iyile meyi artırıcı etkisi oldu u yorumuna varılmı tır (148).

Çalı mamızda, AE, EGF konsantrasyonu (82,44 pg/ml) serum EGF konsantrasyonundan (11,93 pg/ml) daha yüksek olarak bulunmu tur. Farklı çalı malarda AM ve OS içerisindeki EGF miktarları da farklı bul unmu tur. Bir çalı mada AM' de epiteli soyulmadan ve soyulduktan sonra içerisindeki GF miktarı EL SA yöntemi ile ölçülmü . Her 2 grupta da yüksek oranda EGF, KGF, HGF, FGF içerdi i fakat bu oranın epitel soyulmamı grupta soyulmu gruba göre istatistiksel olarak daha yüksek oldu u dolayısıyla GF' lerin kayna mın AM epitel hücreleri oldu u tespit edilmi tir (149).

Çe itli çalı malarda hazırlanan serum konsantrasyonları farklıdır ve içerisindeki EGF miktarı da buna ba lı olarak de i mektedir. Poon kloromfenikol ile kombine edilmi % 50 oranında (121), Tsubota ve ark ise % 20'lik OS'yi tedavide kullanmı lardır. Bu çalı mada, Sjögren's sendromuna ikincil kuru gözü olan hastalarda OS' nin etkinli i ara tırmak üzere tüm hastalarda 4 haftalık tedavi sonrası break up time zamanı, Schirmer testi ve impresyon sitoloji de er leri incelenmi ve tüm de erlerde bazal de erlere göre iyile me oldu u tespit edilmi . Bu çalı mada aynı zamanda 1 ay boyunca derin dondurucuda -20 C° de ve buzdolabında + 4 C° de muhafaza edilen OS içerisindeki EGF, vitamin A, and TGF- β de erleri tedaviden önce ve 1 ay sonra ölçülmü . Esansiyel olan bu maddelerin 1 aylık saklama ko ullarında bile konsantrasyonlarının de i medi i ve stabil kaldı ı tespit edilmi . EGF konsantrasyonu bu çalı mada 0.51 ng/ml olarak bulunmu tur (115).

Farklı dozlardaki EGF konsantrasyonlarının epitelizan etkilerinin farklı oldu u ve her zaman korneal epitel defektinin, EGF ve reseptör düzeylerinde belirgin artı a neden olmadı nı gösteren çalı malar da bulunmaktadır. Bir çalı mada excimer laser uygulanması sonrası tav an kornealarında EGFR mRNA düzeylerinin ilk hafta yükselmeye ba layarak, 3 ay sonuna kadar yüksek kalmaya devam etti i fakat EGF mRNA düzeylerinde deney süresince yeterince yükselme olmadı ı izlenmi tir (141). Fare kornealarına mekanik olarak epitelial debridman uygulanmasından sonra EGF ve EGFR düzeylerinin insitu hibridizasyon yöntemi ile ölçülerek sa lam kornea düzeyleri ile kar ıla tırıldı ı bir çalı mada EGF mRNA düzeylerinde yaralanmadan

30 dakika sonra ba layan ve 48.saate kadar süren bir artı oldu u fakat bu de erlerin sa lam kornea EGF mRNA düzeylerinden anlamlı olarak yüksek olmadı ı bulunmu tur. Yaralanmadan 7 gün sonra ise EGF mRNA düzeylerinin bazal de erlere indi i tespit edilmi . Benzer ek ilde EGFR mRNA düzeylerinde de yaralanmadan 4 saat sonra ba layan ve ED kapanana kadar olan bir artı oldu u fakat bu de erlerin sa lam kornea EGFR de erlerine göre anlamlı olarak yüksek olmadı ı bulunmu tur. EGF ve EGFR' nin ED sonrası epitelizan etkileri nden daha ziyade sa lam korneada sa kalım sa layan fonksiyonlarının daha önemli oldu u üzerinde durulmu tur (150).

EGF etkisinin dozdan ba ımsız oldu unu ve yüksek doz uygulamaların reseptör down-regulasyon mekanizmasıyla terapötik etkiyi ortadan kaldırdı ını dolayısıyla reseptörleri uyaracak olan optimal dozdan a mamak gerekti ini savunan çalı malar da bulunmaktadır. Bununla ilgili yapılmı bir çalı mada yüksek doz EGF ile stromal keratositlerde timidin uptake 'inin azaldı ı, yara kenarında fibroblast sayısının dü tü ü, dü ük ve yüksek doz EGF ile normalde iyile en yarada erken dönemde varolan ancak sonradan kaybolan fibrinin direnç gösterdi i görülmü tür (151). n vitro yapılmı bir çalı mada 0.1 ng ml^{-1} üzerindeki EGF dozlarının korneal epitel hücrelerde ço almayı artırdı ı (152), ba ka bir çalı mada ise 10 ng ml^{-1} konsantrasyonu a an dozların hücre ço alması ve sayısını azalttı ı gösterilmi tir (53). Bir çalı mada tav an korneasında alkali yanık olu turulması sonrası h-EGF' nin $10 -500 \text{ µg/ml}$ dozlarının günde 4 kez uygulanması ile yara iyile mesinde kontrol grubuna göre % 45 oranında artı oldu u gözlenmi . Aynı çalı mada 500 mikrogram/ml üzeri ve 10 mikrogram/ml altındaki EGF dozlarının ise bu modelde etkili olmadı ı dolayısıyla h-EGF' nin optimal dozunun mevcut hastalıkla beraber de i ebilece i yorumu yapılmı (45).

EGF tedavisinde inflamasyon, neovaskülarizasyon, epitelial kist, limbusu a an epitel ve endotel proliferasyonu gibi potansiyel problemler olabilece i ve bu problemlerinin üstesinden steroidlerle gelinebilece i bildirilmektedir. ED uygulanmı at kornealarına topikal olarak uygulanmı farklı dozlardaki EGF' nin defekt iyile tirici etkisini ara tırmak için yapılmı bir çalı mada bir grup 5 µg/ml EGF ile di er grup ise 50 µg/ml EGF ile ve kontrol grubu ise PBS ile tedavi edilmi . Tüm gruplardaki defektte hasardan 5-7 gün sonra iyile me oldu u gözlenirken, reepitelizasyon hızında gruplar arasında anlamlı fark olmadı ı izlenmi . Fakat 50

$\mu\text{g/ml}$ EGF ile tedavi edilen grupta ki kornea vaskülarizasyon, enflamasyon ve skarlarla ma miktarı di er gruplardan anlamlı olarak fazla bulunmu ve yüksek doz EGF' nin enflamatuvar bir cevap olu turarak korneal damarlanma ve skar olu umunu tetikledi i sonucuna varılmı (153).

Çalı mamızda herhangi bir i lem uygulanmaya n 8. gruptaki EGF düzeyleri bazal de erler olarak kabul edildi inde, ED olu turulan fakat tedavi verilmeyen 4. gruptaki EGF düzeylerinin bazal düzeylere göre anlamlı olarak yüksek oldu u bulundu, bunun EGFR düzeylerinin cerrahi travma ile upregüle olması s onucu reseptöre ba lanmı EGF düzeylerine ba lı oldu u dü ünüldü. ED olu turulmadan AMT uygulanan gruptaki EGF düzeylerinin de bazal de erlere göre anlamlı olarak yüksek oldu u bulundu, bu durum cerrahi travma ile artmı EGFR sonucu reseptöre ba lı olan yüksek EGF düzeylerine ba landı.

Defekt olu turulmadan topikal tedavi verilmi gruplardaki (Grup 5 -6) EGF de erlerinin bazal de erlere göre anlamlı olarak yüksek olmadı ı gözlemlendi.

Defekt olu turulmu gruplardaki EGF düzeyleri kendi aralarında kar ıla tırıldı nda AE grubundaki kornea EGF düzeylerinin en dü ük oldu u izlenmi tir. Bu grupta cerrahi stimülasyon ile göz ya ndan kaynaklanan ve korneada üretilen EGF'ye ilaveten, ekstre içerisinde yüksek oranda bulunan EGF'nin de ekzojen ilavesi EGFR' de degradasyona (154) ve down regülasyona (51) yol açarak reseptöre ba lı olarak ölçülen total EGF düzeylerinin dü ük olarak ölçülmesine neden olmu tur.

Yapılan birçok çalı mada kimyasal ve termal yanıklar, pterjiyum, farklı sebeblere ba lı olu an kalıcı kornea ü lserleri, semptomatik büllöz keratopati, tümör, skar veya yapı ıklıkların çıkarılması, oküler sikatrisyel pemfigoid, Steven -Johnson sendromu ve limbal kök hücre harabiyetine neden olan di er durumlarda AMT' nin faydalı oldu u görülmü tür (68). AMT' nin tek ba ına kısmi LKHK ile bereber olan alkali yanıklarda yeterli bir tedavi yöntemi olmakta ve akut dönemde enflamasyon ve ilerleyici doku erimesini azaltıcı etkisinin yanı sıra epitelizasyonu da kolayla tırmaktadır (155). Tseng, AMT uyguladı ı LKHK olan 15 hastanın 17 gözünde, 15-30 günde epitelizasyonun tamamlandı nı görmü tür. Çalı malarda akut enflamasyon esnasında yapılan AMT sonuçlarının daha iyi oldu u ve skatrisyel zemini olan konjonktiva hastalıklarında yapılan AMT prognozunun, sa lıklı konjonktiva üzerine uygulananlara göre daha kötü oldu u gösterilmi tir (95). Anderson ve arkadaş ları, parsiyel LKHK olan 17 göze AMT uyguladı ve ortalama

olarak 22.8 günde epitelizasyonun sa landı nı, 14 gözde % 92.9 oranında görme düzeyinde artı oldu unu ve olgulardan % 86'sında a rı ve fotofobi ikayetlerinin azaldı nı tespit etmi ler ve AMT' nin etkili bir tedavi yöntemi oldu u ve parsiyel kök hücre yetersizli inde limbal oto veya allogreftlere alternatif bir tedavi olabilece i sonucuna varmı lardır (156). Koizumi ve arkada ları, tav anlarda yaptıkları bir çalı mada bir gözde lamellar keratektomi ile oküler yüzey hasarı olu turmu lar. Di er göz limbusundan aldıkları kök hücreleri invitro olarak aselüler AM üzerinde ço altarak hasarlı bölgeye transplante etmi ler ve cerrahiden 5 gün sonra epitelizasyonun sa landı nı tespit etmi lerdir (157). Çe itli oküler hastalıklarda AMT etkinli ini ara tırmak için yapılmı bir çalı mada 1998 - 2000 yılları arasında 16 PED, 11 büllöz keratopati, toplam 27 göze AMT uygulanmı . PED olan grupta % 75 oranında ortalama 23,1 günde epitelizasyon olu urken bu oranın, büllöz keratopatili grupta % 72 oranında ortalama 19.6 gün oldu u tespit edilmi ve AMT' nin oküler yüzey hastalıkların tedavisinde ba arılı bir prosedür olabilece i söylenmi tir (158). Bir çalı mada, Steven-Johnson sendromu, yanık, herpetik keratit, büllöz keratopati, PED, dellen, bant keratopati gibi oküler yüzey hastalıkları olan 78 hastanın 84 gözüne AMT uygulanmı ve % 83.3 hastada enflamasyonun azaldı ı, epitelyal iyile me ile irritasyonda azalma oldu u gözlenmi tir (159). Bir ba ka çalı mada ciddi kornea ve sklera ülserasyonlu 11 gözde çok katlı AMT uygulanmı ülser bo lu u AM stroması ile doldurulduktan sonra, çevresi deepitelize edilerek üzeri tekrar AM ile örtülmü , 8 gözde 16.5 günde epitelizasyon sa lanırken, 3 gözde PED devam etmi tir. 42 haftalık takipte ise tekrar ED olu mamı tır (105). Akut alkali yanıklarda AMT' nin etkinli ini ara tırmak için yapılmı bir çalı mada grade 2-4 arası oküler yanık olan 44 göz çalı maya dahil edilmi ve AMT ve medikal tedavi verilen grup ile sadece medikal tedavi verilen kontrol grup kar ıla tırılmı , 2 grup arasındaki oküler subjektif rahatlama, korneal epitelyal defektteki iyile me, görme keskinli i, korneal vaskülarizasyon ve g özya ı fonksiyon testleri arasındaki farklar de erlendirilmi . Sadece orta iddetteki yanıklar için AMT uygulanan grupta; oküler semptomlarda rahatlama ve epitelyal iyile me hızında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artı tespit edilirken bu artı idde tli yanık olan hastalarda izlenmemi tir (160). Yapılmı bir çalı mada önceden konvansiyonel tedaviye cevap vermeme 13 kimyasal yanık olan göze AMT uygulanmı , 8 gözde epitel üste 5 gözde ise stroma üste gelecek ekilde örtülmü , hepsinde 2-5 hafta içerisinde epitelizasyonda artı oldu u ve 6 gözde GK' de 6

sıradan fazla artı oldu u tespit edilmi tir (155). Davise göre Vit C, sistemik sitrat ve topikal steroid tedavisine rağmen bazı Grade 2 alkali yanıklarda PED ve opasite olu maktaki ve bunlarda sembleferon olu masını engellemekte AMT ba arılı bir yöntem olmaktadır (161). Pires ve arkadaşları, glokom nedeniyle 5 -FU kullanılmasına ba lı parsiyal limbal kök hücre yetersizli i olan gözlere AMT uygulamaları. 15 aylık takipleri sonucunda yeterli görme artı ı elde ederek, korneal yüzeyin düzgün ve avasküler kaldı ını rapor etmişlerdir (162).

invitro olarak AM epitel hücrelerinin birtakım immünoregülatuar ve büyüme faktörleri sentezledi i gösterilmiştir. Üretilen bu faktörler stromada birikerek oküler yüzey rekonstrüksiyonu için antiinflamatuvar ve immünsüpresif etki gösterirken, HLA ekspresyon etmezler, bu nedenle kornea transplant için uygun hale gelir. Tedaviye dirençli PED olan hastalarda AM epitel hücrelerin etkisini ara tırmak için yapılmış bir çalışmada tıyıcı bir kollajen parça üzerindeki amniyon epitel hücreleri hastalara transplante edilmiş ve tüm hastalarda PED' de 7 -12 hafta içerisinde düzelme olmuş. Çalışmada donmuş AM' de sentezlenmeyen GF' lerin invitro olarak amniyon epiteli tarafından sentezlendi i ve bunların korneal patolojilerde faydalı oldu u bulunmuştur (163).

Oküler yüzey hastalıklarının tedavisinde AMT etkili bir yöntem olsa da i lemin invaziv olması ve bir süre sonra korneadan dekole olarak ayrılabilmesi i lemin dezavantajlarıdır. Çalışmamızın bir amacı da; AMT' nin tedavi edici etkisi de iştirilmeden, AMT ile ortaya çıkan bu dezavantajları azaltmak için bu güne dek doku transplantasyonu olarak kullanılan AM' nin ekstre olarak kullanılabilirliğini ara tırmaya çalışmaktır, eğer bu kullanımın AMT kadar etkili oldu u saptanırsa hastaları cerrahi müdahaleye gerek kalmadan poliklinik artlarında tedavi etmenin mümkün olabileceğini düşündük. AE' nin topikal olarak uygulanmasının bir diğeri avantajının da uygulama dozu bize ba lı oldu u için damlatılma sıklığında yapılan de işiklikler ile tedavi edici konsantrasyonlara daha kolay ula ılabileceğini ve bu sayede AE' ye ba lı olu ması muhtemel a ırı duyarlılık ve infeksiyöz hastalıkların geçiğini azaltmak için laboratuvar artlarında üretim i le toplumun büyük bir kısmını etkileyen korneal ülser, PED ve kuru göz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini düşündük.

Alkali yanıklarda topikal damla formunda AE' nin etkisini ara tırmak için yapılmış bir çalışmada, 16 tav an korneaları, 1N NaOH emdirilmiş yuvarlak ka ıtların 30 sn bekletilmesi neticesi alkali yanık olu turularak 4 gruba ayrılmış .

Birinci grup AE, 2.grup Healon(R), 3. grup metil selüloz ile tedavi edilen ve ve 4. grup ise tedavi verilmeyen kontrol grubu olarak belirlenmi . Her bir tedavi, gruplara 1 hafta uygulanarak gruplar arası ED ve opasite de erleri kar ıla tırılmı . AE ile tedavi edilen gruptaki kornealarda epitelyal iyile menin daha hızlı ve opasiteninde daha az oldu u böylece AE'nin yara iyile tirici etkisinin yüksek oldu u ve alkali yanık tedavisinde kullanılabilece i ekinde yorum yapılmı tır (164).

PED, SLKK ve kuru göz gibi, oküler yüzey hastalıkların tedavisinde kullanılan bir di er seçenek ise OS tedavisidir. erisinde EGF, TGF, HGF, fibronektin ve Vit A ile epitelizasyonda etkin rol oynar. OS erisindeki IgG, lizozim ve kompleman gibi ajanlardan dolayı bakteriyostatik etkisi bulunmakta ve kontaminasyon izlenmemektedir. Bu özelli i prezervan eklenmesini gereksiz kıldı ndan dolayı prezervan maddelere ba lı olu an bir takım yan etkilerin gözlenmemesi OS' nin bir avantajıdır.

Tedaviye dirençli rekürren kornea erozyonu bulunan hastalarda OS' nin etkinli ini ara tırmak için yapılmı bir çalı mada 11 hasta OS tedavi ile 3 ay takip edilmi . Çalı ma sonunda tedaviden ö nce ortalama aylık 2.2 olan rekürrensini, tedaviden sonra ortalama aylık 0.028' e dü tü ü ve tedavi boyunca hastalarda herhangi bir lokal veya sistemik yan etki gözlenmedi i gösterilmi tir (112).

Kuru göz ve PED hastalarında OS ve metilselüloz tedavilerinin etkilerini ara tırmak için yapılmı ba ka bir çalı mada hasta kornealarında, tedavi boyunca Schirmer testi, rose bengal ve floresein boya tutulumu takip edilmi . Aynı zamanda in vitro kornea epitel hücreleri üzerinde OS ve metilselülozun toksik etkileri de erlendirilmi . OS tedavi grubunda metil selüloz ile tedavi edilmi gruba göre tüm parametreler açısından üstün oldu u ve invitro çalı mada OS' nin metilselüloza göre daha az toksik oldu u bu nedenle, oküler yüzey bozukluklarında OS nin etkili ve güvenilir bir tedavi seçene i oldu u ö ne sürülmü tür (121).

Tsubota 16 PED' i olan hastanın OS ile tedavisi ile % 62'sinde ortalama 28 günde ba arı sa lamı (126). Poon ve ark ise 48 günlük tedaviye ra men düzelmeyen PED olan hastalarda OS tedavisi ile % 60'ında 29 günde ba arı elde etmi tir (121). PPV yapılan hastalara operasyon esnasında 8 mm çapında epitel abrazyon uygulanan bir çalı mada postoperatif dönemde hastalar iki gruba ayrılarak bir gruba OS tedavisi, di er gruba ise topikal hyaluronik asit tedavisi uygulanarak defektin

kapanma süreleri takip edilmi . Ortalama epitelizasyon zamanının OS grubunda 4.3 gün, hyaluronik asit uygulanan grupta ise 7.1 gün oldu u ve bu farkın anlamlı oldu u bulunmu tur (165).

OS tedavisi nörotrofik keratit tedavisinde içerisinde barındırdı ı NGF, IGF-1 ve nörotrofin sayesinde etkilidir. Klasik tedaviye cevap vermeyen nörotrofik keratopati tedavisinde OS tedavisinin etkisini göstermek için yapılmı bir çalı mada 11 hastanın 14 gözüne günde 5-10 kez % 20' lik OS damlatılarak sonuç lar de erlendirilmi ve tedavi ile korneal patolojilerde damarlanma olu madan 6 -32 gün içerisinde iyile me oldu u ve tüm hastalarda korneal sensitivitede artı oldu u tespit edilmi . Eksik olan nörotrofik faktörlerin OS tedavisi ile yerine konularak etki e tti i yorumu yapılmı tır (110).

PED tedavisinde saat ba ı damlatılan topikal OS' nin etkinli ini ve güvenilirli ini belirlemek üzere yapılmı bir çalı mada standart tedaviye cevap vermeyen PED olan 67 hastanın 70 gözü çalı maya dahil edilmi . Çalı mada defektin iyile me süresi ile rekürrens takip edilmi . % 81 hastada epitel defektinde ortalama 4-45 günlük tedavi sonrası tamamen kapanma oldu u ve % 84 hastada herhangi bir rekürrens olmadı ı gözlenerek rekürren epitelyal defekti olan hastalarda OS tedavisinin etkili ve pratik bir tedavi seçene i olabilece i belirtilmi tir (166). Önceki tedavilere cevapsız 5 PED olan hastanın hidrojel kontak lens takıldıktan sonra topikal OS ile tedavi edildi i ba ka bir çalı mada ise ortalama 14.2 ± 8.9 günde PED' lerde düzelme oldu u tespit edilmi tir (167) .

Çalı mamızda herhangi bir tedavi uygulanmayan dördüncü gruptaki epitelizasyonun, di er gruplara göre daha iyi olması beklemedi imiz bir sonuçtu. Topikal olarak uygulanan tedavilerin aslında heterolog bir uygulama olması nedeniyle içerdikleri protein yapısındaki bazı maddelerin epitelde antijen etkisi göstererek epitelin yürümesini engelleyerek epitelizasyonda gecikmeye yol açmı olabilece i kanaatindeyiz. Bir çalı mada rat korneasında deneysel olarak reaksiyon olu turmak amacıyla heterolog serum ba arılı bir ekilde kullanılmı ve bu etkinin serum içerisinde bulunan yabancı antijenler vasıtasıyla olu tu u belirtilmi tir (168). Çalı mamızda tedavide kullandı mız serum insan kanından hazırlanarak tav an korneasına uygulanmı ve aslında heterolog bir uygulama yapılmı tır. Bir çalı mada kuru göz hastalarında OS ve umbilikal kord serumunun (heterolog) etkileri

kar ıla tırılmı . Epitelyal defekt çapı ve yo unlu u gi bi keratoepitelyopatik skorlar üzerinde OS tedavisinin, heterolog serum tedavisinden daha etkili oldu u gösterilmi tir (169). Aynı mekanizma ile tav an gözüne uygulanan heterolog insan AM ve ekstresinin içerdi i yabancı proteinler alerjen gibi davranarak epitelizeasyonu tedavi verilmeyen gruba göre geciktirmi olabilir. Bir çalı mada excimer laser ablasyon uygulanmı tav an korneaları iki gruba ayrılarak bir gruba intrauterin aspirasyon yöntemi ile elde edile n ve içerik olarak AE' ye benzeyen insan amniyon sıvısı di er gruba ise topikal BSS tedavisi uygulanarak iki grup arasında epitelizeasyon ve korneal haze olu umları kar ıla tırılmı tır. Epitelizeasyon açısından 2 grup arasında fark bulunamazken, amniyon sıvısı ile tedavi edilen gruptaki korneal haze' in anlamlı olarak daha az olu tu u gözlenmi tir (170).

Alkali yaralanmalarda artmı proteinaz ve asit glukosidazlar ülseratif olaylardan sorumludur. Bu enzimler PMNL' ler ile hasarlı epitelyal ve stromal keratositler tarafından salgılanır (171). PMNL infiltrasyonu ile sonuçlanan proteinaz salınımı stromal destrüksiyona katkıda bulunur. Asetilsistein, asetilendiamintetraasetikasit (EDTA), sentetik metalloproteinaz inhibitör (SIMP) gibi ajanlar alkali yanık sonrası korneal ülserasyon ve perforasyonu engellemek için kullanılır. Yapılmı bir çalı mada alkali yanık olu turulmu ve olu turulmamı tav an kornealarında limbal bölge lökosit sayısı kar ıla tırılmı . Hasara u ramamı korneal limbusta bulunan lökosit sayısının (<5/1 alan), hasara u ramı limbal korneadaki lökosit sayısından (15-25/alan) daha az oldu u bulunmu tur. Yaralanma bölgesinde ortalama lökosit sayısı 35 (15-25/alan) olarak tespit edilirken yaralanmadan 35 saat sonra limbustan yaralanma bölgesine yo un lökosit (PMNL ve makrofaj) göçü oldu u gözlenmi tir. mmünofloresans teknikler ile yara yüzeyindeki lökositlerin kayna mın konjonktival damarlar ve lakrimal bez oldu u tespit edilmi tir. Aynı çalı mada fusodin kullanılarak lökosit blokajı yapılan gruptaki epitelyal iyile menin lökosit blokajı yapılmamı gruba göre daha hızlı ve olu an epitelin daha ince oldu u ve lökositlerin epitel ço alması üzerinde rolü bulunabilece i yorumuna varılmı tır (172).

AMT' nin alkali yanıklarda olan teropatik etkilerinden bir tanesi de AM' nin korneal proteinazlar üzerindeki inhibitör etkisidir. AM' de çe itli proteinaz inhibitörleri bulunur. Bunlar; 1- antitripsin, 2 -makroglobulin, inter - tripsin

inhibitör, 2-plazmin inhibitör, 2- antikimotripsindir. Alkali yanıklardan sonra enflamasyon 2 dalga ekinde ortaya çıkar, bunlardan birisi ilk 24 saat içinde di eri ise 7. günde ortaya çıkan lökosit infiltrasyonu sonucu olu ur ve ilk dalganın olu ması ikinci dalganın olu umunu tetiklemektedir. Bu nedenle alkali yanıklardan sonra AMT uygulanma zamanı da ba arılı bir sonuç için önemlidir. Çalı malarda ilk 5 gün içerisinde uygulanan AMT’de daha iyi sonuçlar elde edildi i gösterilmi tir (173).

PMNL aktivitesi üzerinde AM etkisini de erlendirmek için invitro olarak yapılmı bir çalı mada kültüre edilmi taze AM’ nin, donmu AM’ den daha fazla olmak üzere PMNL hücrelerini apoptozise u rattı ı tespit edilmi tir. Bunun nedeni olarak PMNL apoptozisine neden olan faktörlerin taze AM’ de daha yüksek oranda bulunmasından kaynaklandı ı vurgulanmı tir (174). Çalı malarda AM içerisindeki EGF, TGF- , KGF, HGF, bFGF ve IL-10 gibi faktörlerin PMNL apoptozisini hızlandırdı ı speküle edilmi tir (89). Park’ ın yaptı ı bir çalı mada PRK yapılan tav anlarda travmatize bölgenin patolojik incelenmesinde AMT uygulanan örneklerde, AMT uygulanmayan kontrol grubuna göre PMNL hücrelerde belirgin azalma oldu u tespit edilmi tir. AM’ nin, gözya ından olan PMNL göçünü ve yaralanma çevresinde olan PMNL infiltrasyonunu engelleyerek ilk enflamatuvar hasarı önledi i tespit edilmi tir. Aynı zamanda AMT uygulanan gözlerde ED’ deki iyilemenin kontrol grubundaki gözlere göre daha hızlı oldu u, bununda PMNL blokajı neticesinde oldu u yorumuna varılmı . Alkali yanıktan 3 hafta sonra sadece kontrol grubunda ortaya çıkan ikinci bir epitelyal defekt olu tu u bununda fibroblastların kollajenaz üretmesine ba lı oldu u ve ED ile ‘PM NL infiltrasyonunun latent fibroblastları aktive etmesi buna neden olarak gösterilmi tir. AMT grubunda 3. haftada rekürrens gözlenmemesi AMT’ nin ED ve PMNL infiltrasyonunun inhibe etmesine ba lamı tir. Sonuç olarak çalı mada akut alkali korneal yaralanma lardan sonra AMT’ nin PMNL inhibisyonu ile kornea yara iyile mesi hızlandırdı ı tespit edilmi tir (175).

Literatürde OS ve AE’ nin entienflamatuvar etkileri ile ilgili de yapılmı çalı malar bulunmaktadır. Tav an kornealarına LASIK uygulanması sonrası olu an epitel defektlerinin tedavisinde OS’ nin antienflamatuvar etkisini ara tırmak için 7 mm çapında epitel defekti olu turulan bir çalı mada, tav anların bir gözü OS ile di er gözü ise suni gözya ı ile tedavi edilerek 1 hafta sonra örnekler histopatolojik doku takibine alınmı . OS ile tedavi edilen kornealarda suni gözya ı ile tedavi edilen gruba göre, minimal hücre infiltrasyonu oldu u tespit edilmi bunun ise keratosit

apoptozisi ve enflamatuvar hücrelerin göçünde azalma sonucu olan sitokin salınımında azalma neticesinde olabileceğini speküle etmişlerdir (176). *in vitro* olarak UVB ile aktive edilmiş keratositler üzerinde AE'nin antienflamatuvar etkinliğini tespit etmek için yapılmış bir çalışmada bir grup AE ile tedavi edilirken tedavi edilmeyen bir başka grup ise kontrol grubu olarak belirlenerek her 2 grupta enflamasyonun indirek bir göstergesi olan nitrik oksit sentaz (NOS) düzeyleri incelenmiştir. Çalışma sonunda tedavi edilen gruptaki NOS düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir (177).

Çalışmamızda gruplardaki ortalama PMNL düzeyleri incelendiğinde PMNL sayısının en az dolayısıyla enflamasyonun en fazla baskılandığı grubun AMT uygulanan grup olduğu gözlemlendi. AE ve serum tedavi gruplarındaki enflamasyonun herhangi bir tedavi uygulanmayan dördüncü gruptaki enflamasyondan anlamlı olarak düşük olmadığı dolayısıyla bu 2 gruptaki tedavilerin literatür bilgilerinden farklı olarak antienflamatuvar etkilerinin düşük olduğu izlenmiştir ve bu sonuç ise her iki tedavinin heterolog olarak kullanılmasına bakanmıştır. Heterolog olarak uygulanan bu 3 tedavi arasındaki enflamasyonu en fazla baskılayan AMT grubunda, yavaş salımlı proteinaz inhibitörlerinin etkisi ile enflamasyonun sürekli ve uzun dönemde kontrolünün yanı sıra EGF'nin de yavaş salınımı neticesi korneayı enflamasyon yapıcı dozlardan koruması bu sonucun ortaya çıkmasına neden olmuş olabiliriz kanaatindeyiz.

Çalışmalarında termal yanıkların OS ile tedavisinde başarı olunduğu görülmektedir. OS bu hastalardaki ilerlemiş kök hücre kaybını yerine koyamamaktadır. Bunlarda subepitelyal defekt kenarında oluşan fibrozis ile beraber stromal enflamasyon epitelyal iyileşmeyi engellemektedir (178). Aynı zamanda yüksek dozdaki EGF'nin enflamasyonu artırması nedeniyle, yoğun enflamasyon ile giden alkali yanık tedavisinde AE ve OS'nin dikkatlice kullanılması, mümkünse tedavide antienflamatuvar etkinliği daha fazla olan AMT'nin tercih edilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Normal korneada vaskülarizasyon olmaması, korneanın antianjiyogenik faktörler üretmesine bakanmıştır (179). Özellikle limbal epitel hücrelerinin antianjiyogenik olduğu düşünülmektedir (180). Yoğun enflamasyonla seyreden yanıklarda, akut fazda kornea vaskülarizasyonu bakanmaktadır. Bu hastalıklardaki vaskülarizasyon sürecinde PMNL, monosit ve makrofaj hücreleri tarafından ortama salınan sitokinler ve çeşitli büyüme faktörleri rol oynamaktadırlar. Enflamasyon

VEGF' in salınımındaki en önemli faktörlerdendir ve kornea neovaskülarizasyon geli meden önce, kornea stromasında lökosit infiltrasyonu oldu u bildirilmi tir (181). Lokal olarak doku tarafından üretilen VEGF' in son yapılan çalı malarda lökositler tarafında da salgılanabildi i rapor edilmi tir. Enflamasyonla doku hasarı sonucu olu an fosfolipitlerden siklooksijenaz yolu ile PG'ler olu ur. Bunlardan PGE₁ olan prostasiklin, vaskülarizasyonunda önemli bir faktördür. Kornea tarafından üretilen ve salınan IL-8'in de vaskülarizasyonda rolü oldu u dü ünülmektedir. Limbusta olu an küçük damarlar kornea santraline do ru ilerleyerek bi rle me e ilimindedirler. Korneal vaskülarizasyonun derecesi, inflamatuvar olayların iddeti ve süresi ile yakından ilgilidir (182).

Çalı mamızda PMNL yo unlu unun en fazla olarak izlendi i Grup 1 ve 4' te, vaskülarizasyonun da en fazla oldu u gözlendi ve v askülarizasyonun enflamasyonun indirekt etkisi neticesi olu mu olabilece i dü ünüldü.

Literatür bilgilerine göre topikal EGF ile tedavi edilen kornea yaralanmalarından sonra kornea epitel kalınlı m, epitelyal ve subepitelyal iyilemenin etkisiyle paralel olarak yüksek oldu u yönündedir. Bununla ilgili yapılmı bir çalı mada deneysel alkali yanık olu turulmu tav an kornealarında uzun süre salınımı sa lamak için 50 µ/ml konsantrasyonda EGF içeren Carbocol jel ve EGF içermeyen jel tedavisi olarak iki grup o lu turularak kornealar histolojik olarak incelenmi . Tedavi grubunda iyilemenin daha erken ve kornea epitelinin daha kalın oldu u tespit edilmi tir (183). EGFR' nin korneal epitelyal yara iyilemesindeki rolünü incelemek için yapılmı bir çalı mada ratlar da 6 mm boyutlarında kornea alkali yanık olu turularak 40, 80 mg dozlarda EGFR tirozin kinaz inhibitör (ZD1839) tedavi grubu, ilaç verilmeyen kontrol grupları ile kar ıla tırılmı ve epitel yara iyilemesinin EGFR inhibitörü kullanılan gruplarda doza ba ı mlı olarak gecikti i gözlenmi tir. Yaralanmadan 24 saat sonra tedavi grubu ile kontrol grubu arasında limbal kornea epitelyal hücre sayısı açısından anlamlı fark oldu u gözlenmi tir. Yine tedavi grubunda yaralanmadan 48 saat sonra ölçülen epitel kalınlık k ontrol grubuna göre belirgin olarak ince ölçülmü tür (139).

Çalı malarda epitel hasar sonrası tedavide uygulanan AE, OS ve AMT' nin kornea epitel kalınlı ı üzerine olan etkileri ile ilgili çe itli çalı malar bulunmaktadır. Korneal hasar sonrası kalınlık ölçümleri, hasarın iddetine ve biçimine göre de i mekle beraber enflamasyon kontrolünün indirekt bir göstergesidir.

Bununla ilgili yapılmı bir çalı mada deneysel olarak tav anlarda alkali yanık olu turulması sonrası bir grup AE ile di er bir grup ise metil selüloz ile tedavi edilerek iki grup arasındaki korneal epitel kalınlık de erleri kar ıla tırılmı . AE ile tedavi edilen gruptaki santral korneal epitelyal kalınlı ın di er gruba göre daha ince oldu u tespit edilmi tir (164).

Tav an kornealarında LASIK sonrası olu an epitel defektlerin tedavisinde OS' nin etkinli ini ara tırmak için yapılmı bir çalı mada, tav anlarda 7 mm çapında defekt olu turulduktan sonra bir göz OS ile di er göz ise suni göz ya ı ile tedavi edilmi ve gruplar arası korneal epitelyal kalınlık de erleri histopatolojik olarak de erlendirilmi . OS ile tedavi edilen kornealardaki epitelin suni göz ya ı ile tedavi edilen gruba göre daha kalın oldu u izlenmi tir (176).

Bir çalı mada PRK uygulanan tav anlarda AMT uygulandıktan 1 hafta sonra yapılan patolojik incelemede kontrol grubuna göre santral korneal epitelyal kalınlı ın anlamlı olarak fazla oldu u fakat 4. hafta sonunda kontrol grubu ile aynı düzeylere indi i tespit edilmi tir. Erken dönem olan kalınlık artı nın AMT' nin yara bölgesinden olan evoporasyonu inhibe etmesine 4. haftada ise yara iyile mesindeki artı ve endotelial hücre fonksiyonununda düzelme sonucu kornea kalınlı ın normal seviyelere indi i sonucuna varılmı tir (175).

Tav anlarda santral 6mm boyutlarında alkali yanık olu t urarak yapılmı bir çalı mada AMT uygulanan ve herhangi bir tedavi verilmeyen kornealar arasındaki ED, korneal epitelyal kalınlık, opasite ve yara bölgesindeki PMNL infiltrasyonu kar ıla tırılmı . AMT grubunda kontrol grubuna göre epitelyal iyile menin dah a hızlı, epitelin daha kalın ve PMNL infiltrasyonunun daha az oldu u tespit edilmi tir (184).

Çalı mamızda ilk dört grup içerisinde PMNL yo unlu unun en az oldu u ve korneal epitelyal kalınlı ın en fazla olarak ölçüldü ü grup AMT ile tedavi edilen gruptur. Enflamasyonun en fazla baskılandı ı bu grupta beraberinde kollajenzların da baskılanması epitelyal ve stromal erimeyi azaltıcı etki yaratacaktır. Çalı mamız sonunda AM' nin enflamasyonu, evoporasyonu ve korneanın oksijenasyonunu azaltıcı etkilerinin yanı sıra yava ve optimal dozda EGF salınımı için ideal bir ortam olması sonucu korneal epitelyal kalınlı ı artırdı ı kanaatindeyiz (175).

Sonuç olarak biz bu çalı ma ile deneysel alkali yanık modelinde AMT, serum ve AE tedavilerinin korneal enflamasyon, neovaskülarizasyon, korneal kalınlık ve reepitelizasyon üzerine olan etkilerini kar ıla tırdık. Enflamasyon ile

neovaskularizasyonu baskılamada ve kornea kalınlık artı ında AMT'nun di er tedavi yöntemlerine göre daha etkili oldu unu fakat her 3 tedavinin tav a n gözüne heterolog bir uygulama olmasından kaynaklanan antijenik yapıları nedeniyle, epitelizasyonun en hızlı olarak herhangi bir tedavi uygulanmayan grupta oldu u izlendi. Bu nedenle prognozu kötü olan alkali yanık gibi yo un enflamasyon ile giden hastalı kların tedavisinde AMT seçilirse enflamasyon ve korneal neovaskularizasyon kontrolünün daha ba arılı olaca ı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Donzis PB, Insler MS, Gordon RA. Corneal curvatures in premature infants. *A J Ophthalmol* 1988;103:785-801.
2. Dua HS, Gomes JAP, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *British Ophthalmol* 1994;78:401-408.
3. Gipson IK, Yankaukas M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Rinehart W. Characteristics of a glycoprotein in the ocular surface glycocalyx. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:218-227.
4. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell E. *Histology of the human eye*. WB Saunders 1971;55:11.
5. Robert L. Legeasis JM. Robert AM. Corneal collagens. *Pathol Biol* 2001;49:353-363
6. Fini EM. Keratocyte and fibroblast phenotypes in reparing cornea. *Progress in Retinal and eye Research* 1999;18:529-551.
7. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edlerhauser HF, Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985;4:671-677
8. Newell FW. Anatomy of the cornea. *Ophthalmology , Principles and Concepts* 1992; 13:8-13.
9. Sevel D, Isaacs R. A re-evaluation of corneal development. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1998;86:178-207
10. rkeç MK. Gözya ı tabakasının yapısı, biyokimyası, immünolojisi ve kontakt lensler. *Oftalmoloji* 1994;1:18-20.
11. Efron N, Carney LG Oxygen levels beneath the closed eyelid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:93-100.
12. Bazan HE, King WD, Rossowska M. Metabolism of phosphoinositides and inositol polyphosphates in rabbit corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1985;4:793-801
13. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endotehelium. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:69-94.
14. Ahmadi AJ, Jakobiec FA. Corneal wound healing, cytokines and extracellular matrix proteins. *International Ophthalmology Clinics* 2002;42:13-22.

15. Kaufman HE, Barron AB, McDonald MB, Waltman SR. Corneal trauma. *The Cornea* 1991;22:599-642.
16. Fujikawa LS, Foster S, Gipson IK, Colvin RB; Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds, immunofluorescence and ultrastructural studies. *J Cell Biol* 1984;98:128-138.
17. Dua HS, Forrester JV. Clinical patterns of corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1987;104:481-489.
18. Dua HS, Forrester JV. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1990;110:646-656.
19. Chan KY, Jones RR, Bark DH, Swift J, Parkerjr JA, Haschke RH. Release of neuronotrophic factor from rabbit corneal epithelium during wound healing and nerve regeneration. *Exp Eye Res* 1987;45:633-646.
20. 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.
21. Matsuda M. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:443 -449.
22. Philipp W, Göttinger W. Leukocyte adhesion molecules in diseased corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2449 -2459.
23. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: A review. *Pharmacol Ther* 1994;63:265-280.
24. Gallar J, Pozo MA, Rebollo I, Belmonte C. Effects of capsaicin on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1968-1974.
25. Petroustos G, Guimaraes R, Giraud J, Poliques Y. Antibiotics and corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1775 -1778.
26. Stern GA, Schemmer GB, Farber RD, Gorovoy MS. Effect of topical antibiotic solutions on corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol* 1983;101:644-647
27. Singh G. Corticosteroids in corneal endothelial healing. *Exp Eye Res* 1985;41:487-495.
28. Puelhorn G, Sosath G, Thiel HJ. The effect of 5-iodo-2'deoxyuridine (IDU) and dexamethasone on corneal wound healing in the rabbit. *Acta Ophthalmologica* 1978;56:40-52.

29. Petroustos G, Guimaraes R, Giraud JP, Poliquen Y. Corticosteroids and corneal epithelial wound healing. *British J Ophthalmol* 1982;66:705-708.
30. Woost PG, Brightwell J, Eiferman RA, Schultz GS. Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. *Exp Eye Res* 1985; 40:47-60.
31. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose, Miller D, Kublin C, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983;101:640-643.
32. Peyman GA, Sanders DR, Goldberg MF. Wound healing. Principles and practice of ophthalmology 1980;.381-386.
33. Aquavell JV, del Carro M, Musco PS, Ueda S, de Paolis M. The effect of a collagen bandage lens on corneal wound healing. A preliminary report. *Ophthalmic Surg* 1987; 8:570-573.
34. Nishida T, Nakagawa S, Nishibayashi C, Tanaka H, Manabe R. Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits in vivo. *Arch Ophthalmol* 1984;102:455-456.
35. Watanabe K, Frangieh G, Reddy CV, Kenyon KR. Effect of fibronectin on corneal epithelial wound healing in the vitamin A -deficient rat. *Invest.Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2159-2162.
36. Soong HK, Hassan T, Varani J, Huang SCM, Brennan M. Fibronectin does not enhance EGF-mediated acceleration of corneal epithelial wound closure. *Arch Ophthalmol* 1989;107:1052-1054.
37. Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol* 1983;97:1653-1657.
38. Frangieh G, Hayashi K, Teekhasaene C, Wolf G, Colvin RB, Gibson HK, Kenyon KR. Fibronectin and corneal epithelial wound healing in the vitamin - A deficient rat. *Arch Ophthalmol* 1989;107:567-571.
39. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Differential modes of action of fibronectin and EGF on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol* 1990;145: 549-554.
40. Nishida T, Nakamura M, Mishima M, Otori T, Hikida M. Interleukin-6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Arch. Ophthalmol* 1992;110:1292-1294.

41. Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH. Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol* 1983;95:353-358.
42. Schultz G, Khaw PT, Oxford K, Macauley S, van Setten G, Chegini N. Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 1994;8:184-187.
43. Cohen S. The Epidermal Growth Factor (EGF). *Cancer* 1983; 51:1787-1791.
44. Byyny R, Cohen, S. Radioimmunoassay of Epidermal Growth Factor. *Endo* 1972; 90: 1261-1266.
45. Brazzell RK, Stern ME, Aquavella JV, Beuerman RW, Baird L. Human recombinant EGF in experimental corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:336-340.
46. 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.
47. Erba D. Epidermal Growth Factor. *Gazi. Üniv. Tıp Fak. Der.* 1990; 1:30-34.
48. Tripathi RC, Raja SC, Tripathi BJ. Prospects for EGF in the management of corneal disorders. *Survey Ophthalmol* 1990;34:457-462.
49. Singh G, Foster CS. EGF in alkali burned corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* 1987;103:802-807.
50. Neufeld AH, Jumblatt MM, Matkin ED, Raymond GM. Maintenance of corneal endothelial cell shape by prostaglandin E2: Effects of EGF and Indomethacine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1437-1442.
51. Mathers WD, Sherman M, Fryczkowski A, Jester JV. Dose-dependent effects of EGF on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:2403-2406.
52. Wilson SE, Schultz GS, Chegini D, Weng J, He Yu-G. EGF, TGF alpha, TGF beta, Acidic FGF, Basic FGF and IL-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 1994;59:63-72.
53. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of cornea. *Prog Retina Eye Res* 2000;19:113-129.
54. Rich LF, Hatfield JM, Lourselle I, Shellans S, Haraguchi KH. Stimulation of corneal endothelial wound healing in cats by MGF. *Research* 1990;509-516.

55. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retina Eye Res* 1999;18:293-309.
56. Happenreijns VPT, Peis E, Vrensen FJM, T reffers WF. Effect of platelet derived GF on endothelial wound healing of human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:150-161.
57. Arffa RC. Grayson's diseases of the cornea. 4.ed. Mosby, St. Louis, 1997; 690-707.
58. Burns FR, Gray RD, Paterson CA. Inhibition of alkali -induced corneal ulceration and perforation by thiol peptide. *Invest Opth an d Vis Scien* 1990; 31:107-114.
59. Christmas R. Management of chemical burns of the canine cornea. *Can Vet J* 1991; 32: 608-612.
60. Micheal DW. Chemical injuries of the eye: Current consepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology* 1997; 41: 275-307.
61. Srinicasan BD, Kulkarni PS. The role of arachidonic acid metabolites in the mediation of the polymorphonuclear leukocyte response following corneal injury. *Assoc Res Vis Ophthalmol* 1980;19:1087-1091.
62. Pfister RR, Nicolaro ML, Paterson CA. Sodium citrate reduces the inc idence of corneal ulceration and perforations in extreme alkali burned eyes: acetylcystein and ascorbate have no favorable effect. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:486-490.
63. Carrel A. Growth-promoting function of leukocytes. *J Exp Med* 1922;36:385-389.
64. Strissel KJ, Rinehart WB, Fina ME. A corneal epitjelial inhibitor stromal cell collagenase synthesis identified as TGF beta 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:151-162;1995.
65. Osberr L. Leukocyte adhesion to the endothelium in inflammation. *Cell* 1990;62:3-6.
66. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997;41:275–313.
67. Pollard SM, Aye NN, Simmonds EM. Scanning electron microscopic appearance of normal human amnion and umbilical cord at term. *Br J Ob stet Gynaecol* 1976;83:470-477.

68. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998;82:235-240.
69. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:748-752
70. Pollard SM, Aye NN, Simmonds EM. Scanning electron microscopic appearance of normal human amnion and umbilical cord at term. *Br J Obstet Gynaecol* 1976;83:470-477
71. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at The Johns Hopkins Med J 1910;15:307.
72. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:844-845.
73. Dhall K. Amnion graft for treatment of congenital absence of the vagina. *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91:279-282
74. Gharib M, Ure BM, Klose M. Use of amniotic grafts in the repair of gastroschisis. *Pediatr Surg Int* 1996;11:96-99.
75. Trelford-Sauder M, Dawe EJ, Trelford JD. Use of amniotic membrane for control of intraabdominal adhesions. *J Med* 1978; 9:273-284.
76. Zohar Y, Talmi YP, Finkelstein Y, Shvili Y, Sadov R, Laurian N. Use of human amniotic membrane in otolaryngologic practice. *Laryngoscope* 1987; 97: 978-980.
77. Denig R. Early surgical treatment of burns of the conjunctiva. *Am J Ophthalmol* 1920;3:256-8.
78. Brown AL. Lime burns of the eye: use of rabbit peritoneum to prevent severe delayed effects. *Arch Ophthalmol* 1941;26:754-69.
79. Sorbsy A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree). *Br J Ophthalmol* 1946;30:337-45.
80. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997; 41:275-313.
81. Sato H, Shimazaki J, Shimazaki N, et al: Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:428.

82. Terranova VP, Lyall RM: Hemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin: a mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 1986;57:311-7.
83. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, Dowling je: Adhesion of regenerating corneal epithelium: the role of basement membrane. *Am J Ophthalmology* 1968;65:339-48.
84. Lee SH, Tseng SCG: Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-12.
85. Juan Murube, MD, Hugh Taylor, MD, Kazuo Tsubota, md: Am niotic membrane transplantation: A major contribution to ocular surface disease. *Highlights of Ophthalmology* 2000;28:3-12.
86. Boudreau N, Simpson CJ, Werb Z, Bissel MJ: Suplestion of ice and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891-3.
87. Tseng SCG, Li D-Q, Ma X. Down-regulation of TGF- β 1, β - 2, β - 3, and TGG- β receptor II expression in human corneal fibroblasts by amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39: 428.
88. Kim JS, Park SW, Kim jh, et al. Temporary amniotic membrane graft promotes healing and inhibits protease activity in corneal wound induced by alkali burn in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:s90.
89. Hao Y, Ma DHK, Hwang DG, et al. dentification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19:348-52.
90. Solomon A, Rosenblatt M. and Monroy D. et al. Suppression of Interleukin 1 alpha and Interleukin 1 beta in the human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 444-449.
91. Adinofli M, Akle CA, McColl I, et al. Expression of HLA antigens, β 2-microglobulin and enzymes by human amniotic membrane. *Nature* 1982;295:325-327.
92. Talmi YP, Sigler L, Inge E. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991;12:285 -288.
93. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee S-H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997;124:765 -774.

94. Gris O, Wolley-Dod C, Güell JL, Tressera F, Lerma E, Corcostegui B, et al. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology* 2002;109:508-12.
95. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, et al: Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116:431-41.
96. Kim J.C. and Tseng S.C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14: 473-484.
97. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, et al. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997;104:974-985.
98. Hong JW, Kang SM, Kim HJ, et al. The effect of phototherapeutic keratectomy (PTK)-amniotic membrane transplantation (AMT) on myopic regression with corneal opacity after PRK in high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:S354.
99. Choi YS, Kim JS, Wee WR, Lee JH. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 1998;17: 389-395.
100. Kim JC, Tseng SCG. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 1995; 9: 32-46.
101. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P, Puangsricharern V, Maskin SL, Kim JC, Tan DTH. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999;117: 1291-97.
102. Budenz DL, Barton K, Tseng SCG. Repair of leaking glaucoma filtering blebs using preserved human amniotic membrane graft. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:S941.
103. Budenz DL, Barton K, Tseng SCG: Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmic Surg Lasers* 2000;130:580-8.

104. Fujishima H, Shimazaki J, Shinozaki N, et al: Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrolable glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998;29:428-31.
105. Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K: Multilayer amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmology* 2000;131:324-31.
106. Tseng SCG, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997;124:825-35.
107. Allen S, John T, John AG, Lai CI, Carey RB. Comparison of *Staphylococcus epidermidis* adherence to human amniotic membrane versus human, rabbit, and cat conjunctivae. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:356.
108. Khokhar S, Sharma N, Kumar H, Soni A. Infection after use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 2001;20:7734.
109. Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 2001; 20: 807-810.
110. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, Tsubota K. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004; 111: 1115-1120
111. Kruse FE, Tseng SC. Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2976-2989.
112. Del Castillo JM, de la Casa JM, Sardina RC, Fernandez RM, Feijoo JG, Gomez AC, et al. Treatment of recurrent corneal erosions using autologous serum. *Cornea* 2002; 21: 781-783
113. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens- Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996; 122: 38-52.
114. Gupta A, Monroy D, Ji Z, Yoshino K, Huang A, Pflugfelder SC. Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. *Curr Eye Res* 1996; 15: 605-614.

115. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 390-395.
116. 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.
117. Shimazaki J, et al. Albumin as a tear supplement in the treatment of severe dry eye. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 1279-1283.
118. Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R. Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol* 1983; 101:1046-1048.
119. Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ. Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol* 1996; 169: 159-166.
120. Noble BA, Loh RS, MacLennan S, Pesudovs K, Reynolds A, Bridges LR, et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 647-652.
121. Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 1188-1197.
122. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 1467-1474.
123. McDonnell PJ, Schanzlin DJ, Rao NA. Immunoglobulin deposition in the cornea after application of autologous serum. *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 1423-1425.
124. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243: 706-714.
125. Shao C, Sima J, Zhang S, Jin J, Reinach P, Wang Z. Suppression of Corneal Neovascularization by PEDF Release from Human Amniotic Membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1758-1762.
126. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, et al. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999;106:1984-9.

127. Li Y, Feng G, Yi Y, Lin J. The experimental investigation of epithelial healing in rabbit central corneal alkali wounds *Yan Ke Xue Bao* 1999;15:74-7.
128. Robin J, Regis-Pacheco L, Kash R, S chanzlin J. The histopathology of corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1985;103:284 -287.
129. Sheardown H, Cheng YL. Tear EGF concentration following corneal epithelial wound creation. *J Ocul Pharmacol Ther* 1996;12:239-43.
130. Klyce S. Electrical profiles in the corneal epithelium. *J Physiol* 1972; 226:407–429.
131. Klyce SD. Enhancing fluid secretion by the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16:968–973.
132. Liesegang TJ. Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *CLAO J* 2002; 28:12 27
133. S.M Jones, A. Kazlauskas. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* 2000;19:5558–67
134. Lauffenburger J, J Linderman. *Receptors: Models for Binding, Trafficking and Signaling*. Oxford University Press, New York 1993:56-57
135. Welge-Lü en, C.A. May, A.S. Neubauer and S. Priglinger, Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis, *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:94–99.
136. Pawson T, Gish GD. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 1992;71:359-362.
137. S.E. Wilson, R.R. Mohan, R.R. Mohan, R. Ambrosio, J.W. Hong and J.S. Lee, The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells, *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 625–637
138. D Li, S.C.G. Tseng. 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
139. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis. *Exp Eye Res* 2001; 72:511-7
140. Savage, C. R. Jr and Cohen, S. Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 1973; 15: 361-366.

141. I. Ratkay, B. Hopp, Z. Bor, L. Dux, D. L. Becker T. Krenacs. Regeneration of Rabbit Cornea Following Excimer Laser Photorefractive Keratectomy: a Study on Gap Junctions, Epithelial Junctions and Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Correlation with Cell Proliferation. *Exp Eye Res* 2001; 73: 291-302.
142. Gospodarowics D, Mescher A.L, Birdwell, C.R. Stimulation of corneal endothelial cell proliferation in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res* 1977; 25:75–89.
143. Leibowitz S, Morello Jr, Stern M, Kupferman A. Effect of topically administered epidermal growth factor on corneal wound strength . *Archives Ophthalmology* 1990;108:5.
144. Zhang Y, Akhtar RA. Epidermal growth factor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase during wound closure in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1139–1146.
145. Yi Zhang, Gregory I, Liou, Adrash K et al. Expression of Phosphatidylinositol 3-Kinase during EGF-Stimulated Wound Repair in Rabbit Corneal Epithelium *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:12.
146. Yang H, Sun X, Wang Z, Ning G, Zhang F, Kong J, Lu L, Reinach PS. GF stimulates growth by enhancing capacitative calcium entry in corneal epithelial cells. *J Membr Biol* 2003;194:47-58.
147. Sonal T, Liu R et al. Immunohistochemical localization of EGF, TGF- α , TGF- β and their receptors in rat corneas during healing of excimer laser ablation. *Current Eye Research* 2006;31:709-719.
148. Li Z, Lin YS, Guo H, Li DM, Du YM, Zhang HY. Effect of recombinant epidermal growth factor on ocular surface re-epithelization following amniotic membrane transplantation in patients with pterygium excision. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002 ;22:437-8.
149. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research* 2000; 20:173–177.
150. 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 ;68:377-97.

151. Mathers WD, Sherman M, Fryczkowski A, Jester JV. Dose-dependent effects of EGF on corneal wound healing. *Invest OphthalmolVis Sci* 1989;30:2403-2406.
152. M Hongo, M. Itoi, N Yamaguchi. Distribution of epidermal growth factor (EGF) receptors in rabbit corneal epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the changes induced by transforming growth factor - 1, *Exp. Eye Res* 1992;54:9-16.
153. Burling K, Segulin MA, Marsh P et al. Effect of topical administration of epidermal growth factor on healing epithelial defects in horses. *Am J Vet Res* 2000; 61:1150-5
154. Korc M, Finman JE. Attenuated processing of epidermal growth factor in the face of marked degradation of transforming growth factor -alpha. *J Biol Chem* 1989; 5:14990-99.
155. Meller D, Pires RTF, Mack RJS, et al. Amniotic membrane transplantation of acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000;107: 980-990.
156. Anderson DF, Ellies P, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2001;85:567-75.
157. Koizumi N, Inatomi T, et al: Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19:65-71.
158. Petriæ I. et al. Amniotic membrane transplantation *Acta Clin Croat* 2002;41:23.
159. Prabhasawat P, Kosrirukvongs P, Booranapong W, Vajaradul Y. Application of Preserved Human Amniotic Membrane for Corneal Surface Reconstruction. *Cell and Tissue Banking* 2000;1:213-222.
160. Tamhane A, Vajpayee R, Biswas N, Pandey R, Sharma N, Titiyal J, et al. Evaluation of Amniotic Membrane Transplantation as an Adjunct to Medical Therapy as Compared with Medical Therapy Alone in Acute Ocular Burns. *Ophthalmology* 2005 ;112:1963-9.
161. Davis AR, Ali QH, Aclimandos WA, Hunter PA. Topical steroid use in the treatment of ocular alkali burns. *Br J Ophthalmol* 1997;81:732 -4.

162. Pires RTF, Chokshi A, Tseng SCG: Amniotic membrane transplantation or conjunctival limbal autograft for limbal stem cell deficiency induced by 5 - fluorouracil in glaucoma surgeries. *Cornea* 2000;19:284 -7.
163. Parmar DN, Alizadeh H, Awwad ST, Li H, Neelam S, et al Ocular surface restoration using non-surgical transplantation of tissue-cultured human amniotic epithelial cells. *Am J Ophthalmol* 2006 ;141:299-307.
164. Ha SW, Kim JS, Cheong TB, Kim JC. Therapeutic Effect of Amniotic Membrane Extract on Keratitis Following Corneal Alkali Burn. *J Korean Ophthalmol Soc* 2001 ;42:1555-1561.
165. Schulze SD, Sekundo W, Kroll P. Autologous serum for the treatment of corneal epithelial abrasions in diabetic patients undergoing vitrectomy. *Am J Ophthalmol* 2006 ;142:207-11.
166. Ferreira de Souza R, Kruse FE, Seitz B. Autologous serum for otherwise therapy resistant corneal epithelial defects - Prospective report on the first 70 eyes. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2001;218:720-6.
167. Schrader S, Wedel T, Moll R, Geerling G. Combination of serum eye drops with hydrogel bandage contact lenses in the treatment of persistent epithelial defects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006 ;244:1345-9.
168. Verhagen C, Den Heijer R, Broersma L, Breebaart AC, Kijlstra A. Analysis of corneal inflammation following the injection of heterologous serum into the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991 ;32:3238-44.
169. Yoon KC, Heo H, Im SK, You IC, Kim YH, Park YG. Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 2007;144:86-92.
170. Kim JC, Chung TB, Chung BS, Lee HY, Tseng SC. A Study on the Possibility of Reducing Corneal Haze with Topical Application of Human Amniotic Fluid in the Wounds Induced by Excimer Laser Keratectomy in Rabbits. *Korean Ophthalmol Soc* 1995; 36:578-588.
171. McCulley. *Chemical agents in the cornea.* Little, Brown and Company: Boston, Toronto 1994; 617-33.
172. Gan I, Fagerholm P, Kim HJ. Effect of Leukocytes on Corneal Cellular Proliferation and Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 ;40:575-81.

173. Prabhasawat P, Tesavibul N, Prakairungthong N, Booranapong W. Efficacy of amniotic membrane patching for acute chemical and thermal ocular burns. *J Med Assoc Thai* 2007 ;90:319-26.
174. Zhou S, Chen J, Feng J. The effects of amniotic membrane on polymorphonuclear cells. *Chin Med J (Engl)*. 2003;116:788-90.
175. Park WC, Tseng SCG. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2906-14.
176. Esquenazi S, He J, Bazan HE, Bazan NG. Use of autologous serum in corneal epithelial defects post-lamellar surgery. *Cornea* 2005;24:992-7.
177. Chang, D S. Seo, S J. Hong, C K The effect of amniotic membrane extract on the expression of iNOS mRNA and generation of NO in HaCaT cell by ultraviolet B irradiation *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine* 2002;18:280-286.
178. Hossein M, Ghassemifar V. Treatment of Persistent Corneal Epithelial Defect with Autologous Serum. *Asian J Ophthalmol* 2006; 8:236-241.
179. M Grazyna, Y Kaminsska. Spontaneous corneal neovascularization in nude mice, local imbalance between angiogenic and anti-angiogenic factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:222-230.
180. Huang AJW, Thio IM, Hernandez E. Modulation of corneal vascularization by conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:822-810.
181. Edelman J, Castro 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.
182. Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447.
183. Sheardown H, Clark H, Wedge C, Apel R, Rootman D, Cheng YL. A semi-solid drug delivery system for epidermal growth factor in corneal epithelial wound healing. *Curr Eye Res* 1997;16:183-90.
184. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000;70:329-37.

8. ÖZGEÇM

20.04.1979' da Elazı 'da do dum. İlk, orta e itimimi Karadeniz Ere li'de, lise e itimimi Elazı 'da tamamladım. 2002'de Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Aynı yıl TUS sınavında Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nı kazanarak ara tırma görevlisi olarak çalı maya başladım. u an halen ara tırma görevlisi olarak bu görevime devam etmekteyim.